

尼莫地平不同时间给药对血管性痴呆小鼠氧自由基代谢的影响*

张丽欣, 孙丽芳**, 刘毅, 邢利和, 张丽丽, 李娜, 石雪华

(中国人民解放军第二六一医院, 北京 100094)

[摘要] **目的:** 不同时间给予尼莫地平治疗血管性痴呆(VD)小鼠, 观察小鼠脑组织氧自由基水平的变化。**方法:** 将健康昆明小鼠随机分为假手术组、模型组、尼莫地平造模后即刻给药组、尼莫地平造模3 d后给药组, 后3组小鼠反复结扎双侧颈动脉同时加尾部放血制作VD模型, 两个尼莫地平给药组分别于造模后即刻、造模后3 d灌服尼莫地平, 模型组及假手术组均每日3次灌服注射用生理盐水, 治疗10 d后检测4组小鼠脑组织丙二醛(MDA)含量及SOD活性的变化。**结果:** 模型组小鼠脑组织中MDA含量比假手术组显著增高($P < 0.05$), 尼莫地平两个治疗组小鼠脑组织中MDA含量均明显低于模型组($P < 0.05$), 且尼莫地平造模后即刻给药组MDA含量比尼莫地平造模3 d后给药组更低($P < 0.05$); 模型组小鼠中SOD活性比假手术组显著降低; 尼莫地平两个治疗组脑组织中SOD活性较模型组显著增高, 且尼莫地平造模后即刻给药组比尼莫地平造模3 d后给药组更高($P < 0.05$)。**结论:** 尼莫地平能降低痴呆小鼠体内MDA含量, 提高SOD活性, 即刻给药组的疗效优于3 d后给药组, 所以VD一旦确诊应尽快给予尼莫地平干预, 以预防病情的进一步发展。

[关键词] 痴呆, 血管性; 尼莫地平; 氧自由基; 丙二醛; 小鼠

[中图分类号] R743.9; R749.053 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2017)03-0 -0

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.03.013

Effect of Nimodipine Treatment on Oxygen Free Radical Metabolism of Vascular Dementia Mice When Applied at Different Time Points

ZHANG Lixin, SUN Lifang, LIU Yi, XING Lihe, ZHANG Lili, LI Na, SHI Xuehua

(No. 261 Hospital, The Chinese people's Liberration Army, Beijing 100094, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the changes of oxygen free radical metabolism in brain tissue of vascular dementia mice caused by nimodipine administered at different time points. **Methods:** Forty healthy Kunming mice were randomly divided into 4 groups: sham-operation group (group S), model group (group M), and nimodipine treated groups (group N1, received nimodipine on day 0, and group N2 received nimodipine on day 3). The models of vascular dementia mice were induced by repeated ligation of bilateral common carotid arteries and tail bloodletting. The mice in groups N1 and N2 were respectively given nimodipine on 0, and 3rd days after the models were established, and mice in groups S and M were given normal saline instead. Ten days after treatment, the contents of oxygen free radical metabolism in mice brain tissue were measured. **Result:** The content of oxygen free radical malondialdehyde (MDA) was significantly higher in group M than in group S ($P < 0.05$), lower in two nimodipine treatment groups than in group M ($P < 0.05$), and significantly lower in group N1 than in group N2 ($P < 0.05$). The activity of oxygen free radical superoxide dismutase (SOD) was significantly lower in group M than in group S ($P < 0.05$), higher in two nimodipine treatment groups than

*[基金项目] 河北省中医药管理局科研计划项目(2014199)

**通信作者 E-mail: sunlifang@hebut.edu.cn

网络出版时间: 网络出版地址:

in group M ($P < 0.05$) and higher in group N1 than in group N2 ($P < 0.05$). **Conclusion:** Nimodipine can decrease the content of MDA in mice with dementia, and improve the activity of SOD, and the curative effect of the immediate treatment group was better than that of the 3-days later treatment group. Therefore, once vascular dementia is diagnosed patient should be treated immediately, so as to obtain better therapeutic effect.

[**Key words**] dementia vascular; nimodipine; oxygen free radical; malondialdehyde; mice

血管性痴呆(VD)是脑血管病后导致的智能障碍综合征,其病情常进行性加重,临床以学习记忆障碍、认知功能缺损为主要表现,随着病情的进展,患者逐渐丧失日常生活自理能力^[1]。近年来,VD的发病率呈明显上升趋势,在我国占各类老年期痴呆发病率的首位。因此,对VD的基础和临床研究具有重要意义。临床常用尼莫地平治疗脑缺血所致的VD^[2]。本研究通过不同时间给予尼莫地平,观察其治疗VD小鼠的疗效差别,为临床合理应用该药提供理论依据。

1 材料及方法

1.1 材料

实验动物:雄性健康昆明小鼠40只,均源自河北省实验动物中心培养,体质量(30 ± 2.1)g。药物及试剂:尼莫地平片(20 mg)由河北医科大学制药厂生产,总蛋白测定试剂盒由保定长城试剂有限公司提供,丙二醛(MDA)试剂盒与超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒均由南京建成生物工程研究所提供。仪器:722型光栅分光光度计(上海第三分析仪器厂)、HH-W21-600型电热恒温水箱(天津市泰斯特仪器有限公司)、MSE-25型高速冷冻离心机及TDL-5-A型离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 分组及处理方法

将健康昆明小鼠随机分为4组:假手术组、模型组、尼莫地平造模后即刻给药组、尼莫地平造模3 d后给药组。参照文献[3],后3组昆明小鼠用反复结扎双侧颈动脉同时加尾部放血的方法制作VD模型^[4]。按0.35 g/kg腹腔注射10%水合氯醛麻醉小鼠,消毒颈部,切开皮肤,暴露双侧颈总动脉,将动脉与周围组织分离,在颈总动脉下穿4号丝线,将丝线系紧,使双侧颈总动脉血流阻断20 min,同时在距离小鼠尾尖部1 cm处将尾部剪断,放血约0.3 mL(如血流不止者则热凝止血)。20 min后将颈部双侧丝线松开,使血液再灌注10 min,再次系紧丝线将双侧颈总动脉血流阻断20 min,松开丝线并抽出,观察30 min,保证小鼠正

常存活,然后缝合颈部皮肤。假手术组只按上述步骤分离出颈总动脉,穿丝线但不系紧丝线,亦不断尾放血,缝合时间与其他组相同。术后小鼠连续肌肉注射3 d青霉素(0.2万单位)。将尼莫地平用蒸馏水配置成3 g/L的混悬液,按0.5 mg/g量灌服小鼠,尼莫地平造模后即刻给药组小鼠术后苏醒即开始给药,造模3 d后给药组小鼠术后第3 d开始给药,每天1次灌服均连续治疗10 d;模型组及假手术组均每天1次灌服同等剂量的注射用生理盐水(10 mL/kg)。

1.3 行为学检测方法

采用跳台实验进行小鼠的行为学检测。跳台箱大小为12 cm × 12 cm × 7 cm,分为两间,底部有一个铜栅栏(可通电,36 V),后侧有一个橡皮垫(4 cm × 3 cm),为安全区。试验时,接通电流,记录小鼠遭到电击后跳上橡皮垫所用的时间(反应时间),以及小鼠5 min内受到电击的次数(错误次数),为学习成绩;48 h后重复,记录第1次从橡皮垫跳下的潜伏期和小鼠5 min内的错误次数,为记忆成绩。

1.4 MDA含量及SOD活性检测

各组均治疗10 d后断头处死小鼠,冰盘上快速分离出各组动物的大脑皮层,称重后加入提前预冷的生理盐水中,用电动匀浆器研磨,制成脑组织匀浆,4℃下,以3 600 r/min离心10 min,提取上清液,用双缩脲法测定蛋白含量,采用硫代巴比妥酸比色分析法测定脑组织MDA含量,黄嘌呤氧化酶法测定脑组织SOD活性。按试剂盒说明书操作。

1.5 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件进行数据分析,数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用成组设计的方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 跳台实验学习与记忆成绩

从表1和表2看,模型组VD小鼠反应时间长,潜伏期短,错误次数多,与假手术组比较差异有

统计学意义($P < 0.05$),模型组小鼠的学习记忆能力均下降($P < 0.05$),提示造模成功。

表 1 VD 小鼠跳台实验学习成绩($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The step-down test scores of vascular dementia mice

组别	n	反应时间(s)	错误次数(次)
模型组	10	52.01 ± 7.81	8.13 ± 2.01
假手术组	10	16.58 ± 3.21 ⁽¹⁾	1.49 ± 0.19 ⁽¹⁾

⁽¹⁾与模型组比较, $P < 0.05$

表 2 VD 小鼠跳台实验记忆成绩($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 The step-down test and memory performance of vascular dementia mice

组别	n	潜伏期(s)	错误次数(次)
模型组	10	73.05 ± 9.93	8.21 ± 2.18
假手术组	10	259.89 ± 34.97 ⁽¹⁾	1.39 ± 0.18 ⁽¹⁾

⁽¹⁾与模型组比较, $P < 0.05$

2.2 MDA 及 SOD 水平

模型组小鼠脑组织中 MDA 含量比假手术组显著增高,差异有统计学意义($P < 0.05$);尼莫地平两个治疗组小鼠脑组织中 MDA 含量均明显低于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$);且尼莫地平造模后即刻给药组 MDA 含量比尼莫地平造模 3 d 后给药组更低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。模型组小鼠中 SOD 活性比假手术组显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);尼莫地平两个治疗组脑组织中 SOD 活性较模型组显著增高,差异有统计学意义($P < 0.05$);且尼莫地平造模后即刻给药组比尼莫地平造模 3 d 后给药组更高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

3 讨论

研究表明,脑缺血再灌注可加重脑组织缺血性损伤,其主要机制为脑缺血再灌注可引起脑组织中产生大量自由基^[5]。自由基指含有单一电子的原子或分子,其化学性质活泼而不稳定,可以破坏多不饱和脂肪酸,导致脂质过氧化,造成膜磷脂不饱和脂肪酸损伤、膜功能障碍,甚至可以引起细胞死亡。同时,自由基损伤膜受体,影响递质的释放和再摄取过程,进而影响到脑神经元的修复。MDA 由自由基导致的脂质过氧化物分解后产生,其分子量较大,可导致 DNA 突变,使蛋白质合成功能下降^[6]。SOD 属于体内天然的抗氧化物质,能清除自由基,拮抗自由基产生的损伤^[7]。大量需氧代

谢均需要 SOD 参与,所以 SOD 能抑制脂质的过度氧化,可使氧离子与氢离子反应生成 H_2O_2 和水,故 SOD 能有效清除并阻止氧离子引发的一系列反应,使体内的自由基水平达到一种动态的平衡状态。

表 3 各组 VD 小鼠脑组织 MDA 含量和 SOD 活性($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Contents of MDA and SOD in brain tissue of vascular dementia mice of different groups

组别	n	MDA (mmol/g)	SOD (U/mg)
假手术组	10	3.19 ± 0.41 ⁽¹⁾	35.72 ± 4.19 ⁽¹⁾
模型组	10	10.58 ± 2.21	13.35 ± 2.51
尼莫地平造模 后即刻给药组	10	3.92 ± 0.56 ⁽¹⁾⁽²⁾	32.46 ± 4.53 ⁽¹⁾⁽²⁾
尼莫地平造模 3 d 后给药组	10	5.14 ± 0.78 ⁽¹⁾	29.86 ± 3.14 ⁽¹⁾

⁽¹⁾与模型组比较, $P < 0.05$;⁽²⁾尼莫地平造模 3 d 后给药组比较, $P < 0.05$

本研究结果显示,模型组小鼠脑组织中 MDA 含量比假手术组明显增高,尼莫地平两个给药组脑组织中 MDA 含量均低于模型组,模型组小鼠脑组织中 SOD 活性比假手术组降低,尼莫地平两个治疗组脑组织中 SOD 活性含量均比模型组高,说明尼莫地平能有效治疗 VD 小鼠。尼莫地平为 1,4-二氢吡啶类 L 型电压依赖性钙通道拮抗剂,是目前为止发现的选择性扩张脑血管作用最强的钙通道阻滞剂^[8]。尼莫地平对脑组织受体有高度选择性,容易透过血脑屏障,有改善脑供血和保护神经细胞的双重作用。尼莫地平可以抑制钙离子内流,消除血管痉挛,增加脑血流量,提高脑组织对缺氧的耐受力,从而保护神经元,稳定其功能^[9]。尼莫地平还可以降低红细胞脆性及血液粘稠度,高度选择性扩张脑血管,几乎不影响外周血管。尼莫地平还可以抑制过氧化,减少自由基产生从而起到保护神经元的作用。尼莫地平可降低脑缺血后脑组织中 NO 含量,从而减少其导致的神经细胞损伤,间接起到保护神经细胞的功能^[10]。研究还发现,在临床治疗中尼莫地平可明显改善痴呆患者认知能力、活动障碍及日常生活的自理能力^[11]。本实验中,尼莫地平对 VD 小鼠治疗有效,这一结论与既往研究报告一致,其中尼莫地平即刻治疗组疗效优于 3 d 后治疗组。研究发现,在脑缺血的损伤过程中,存在着缺血半暗带。研究证实,缺血半暗带从可逆性损伤向不可逆性损伤的过程是由多种病理机制介导参与的,缺血时间越长,脑细胞最终会走

向凋亡,此后任何治疗不会有效,不会改善其任何功能^[12]。大多数学者认为:脑缺血半暗带存在的时间大致为缺血后 3~6 h,所以临床常在 6 h 内溶栓治疗脑梗死;多数学者认为脑缺血半暗带在缺血后 24 h 以内仍存在,甚至时间可推后至缺血后 48 h^[13]。综上所述,因脑缺血再灌注导致的 VD,治疗上应抢在出现不可逆的损伤之前,一旦确诊,要采用尽快治疗的原则,否则治疗效果将大大降低。

4 参考文献

- [1]张立,邢艳丽,熊伟南. 血管性痴呆治疗的研究进展[J]. 医学综述,2015(8):1414-1417.
- [2]周晓秋. 尼莫地平在血管性痴呆治疗应用[J]. 中国老年保健医学,2013(6):63-64.
- [3]张艳,李倩倩,霍薇. 血管性痴呆动物模型的研究现状[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志,2015(1):67-70.
- [4]孙丽芳,张丽欣,邢利和. 补阳还五方不同时间给药对血管性痴呆小鼠行为学的影响[J]. 河北中医药学报,2016(1):5-7.
- [5]袁野,杨俊卿,周岐新. 脑缺血再灌注致小鼠神经元退

行性变进程中自由基水平和 SOD-1 表达的变化[J]. 第三军医大学学报,2011(12):1211-1215.

- [6]陈贺华,刘勇,沈晓明. 依达拉奉对急性脑梗死患者血清丙二醛和超氧化物歧化酶含量及神经功能的影响[J]. 中国现代药物应用,2014(13):159-161.
- [7]罗招凡,劳伟思,梁伟南. 血清同型半胱氨酸和 SOD 水平与急性脑梗死的相关性研究[J]. 中国卫生检验杂志,2011(10):2463-2464.
- [8]陈乾兵. 尼莫地平对脑卒中后血管性认知障碍的临床效果[J]. 吉林医学,2015(7):1359-1360.
- [9]李孟,张晓华. 尼莫地平的药理作用及临床应用[J]. 中国实用医药,2013(13):201-202.
- [10]郭付清. 超早期应用尼莫地平对脑缺血大鼠一氧化氮和自由基的影响[J]. 山东医药,2006(17):79-80.
- [11]张根平. 尼莫地平治疗血管性痴呆 92 例临床报道[J]. 中国医药指南,2015(16):112-113.
- [12]王慧霞. 脑缺血半暗带及其干预的研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘,2014(14):52-53.
- [13]汪利,李国忠. 缺血性卒中与脑侧支循环[J]. 中国医师进修杂志,2014(31):70-72.

(2017-01-12 收稿,2017-02-28 修回)

中文编辑:周 凌;英文编辑:苏晓庆