

姜黄素对癫痫大鼠认知功能障碍的预防作用及其可能机制

闫志强¹ 魏 敏² 李 华¹ 修彬华¹ 杨江河¹ 田 刚¹ 邢国祥¹ 刘绍明^{1△}

(1 兰州军区乌鲁木齐总医院神经外科 新疆 乌鲁木齐 830000 中国; 2 克孜勒苏军分区卫生所 新疆 阿图什 844200)

摘要 目的:探讨姜黄素(curcumin)对癫痫大鼠认知功能障碍的预防作用及其可能机制。**方法:**将 30 只成年雄性 SD 大鼠分为正常对照组、单纯致痫组(SE 组)、姜黄素[60mg/(kg·d)]干预组(curcumin 组)。采用 Morris 水迷宫方法检测大鼠学习记忆功能变化,并检测脑片水平的长时程增强(LTP)变化,处死大鼠后取脑组织并匀浆,测超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)的水平。**结果:**(1) SE 组大鼠寻找平台的潜伏期明显长于对照组,具有统计学意义($P < 0.05$),姜黄素组寻找平台的潜伏期相对于 SE 组显著缩短($P < 0.05$)。撤离平台后,SE 组大鼠在平台所在象限的停留时间明显短于对照组($P < 0.05$),姜黄素治疗后大鼠在平台所在象限的停留时间较 SE 组显著延长($P < 0.05$)。(2) 给予 HFS 刺激后各组兴奋性突出后电位(fEPSP)斜率较前明显增加,均可持续 1h 以上,与对照组比较 SE 组 HFS 刺激后 fEPSP 斜率明显减小($P < 0.05$),姜黄素可减轻 SE 所致的 fEPSP 斜率减小($P < 0.05$)。(3) SE 组 SOD、GSH-PX、GSH 显著下降,MDA 明显增高,姜黄素可逆转上述现象,有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**姜黄素可显著减轻癫痫持续状态所致的大鼠认知功能障碍,减轻海马区的氧化应激反应从而保护海马海马是其可能机制之一。

关键词:癫痫持续状态,姜黄素,认知功能障碍

中图分类号:R742.1 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)21-4036-04

Curcumin Attenuates Status Epilepticus -Induced Cognitive Deficits and the Possible Mechanism

YAN Zhi-qiang¹, WEI Min², LI Hua¹, XIU Bin-hua¹, YANG Jiang-he¹, TIAN Gang¹, XING Guo-xiang¹, LIU Shao-ming^{1△}

(1 department of neurosurgery, Urumchi Hospital of Lanzhou Military region, Urumchi 830000, China;

2 Infirmary of Kezilesu Military Subregion in Xinjiang, Atushi 844200, China)

ABSTRACT Objective: The purpose of the study was to investigate the effect of curcumin on cognitive deficits induced by status epilepticus (SE) and the possible mechanism. **Methods:** The male SD rats were assigned to one of the following groups: (n =10 in each group): Control group, SE group and Curcumin group. Cognitive function in 3 groups was tested by the water maze task. Hippocampal LTP was measured using patch-clamp recordings in rat brain slices. Glutathione(GSH) and Maleic Dialdehyde(MDA) content in the hippocampal homogenate were measured; The activity of Superoxide Dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-PX)in the hippocampal homogenate were detected. **Results:** SE can cause severe cognitive deficits, and curcumin could attenuate SE-induced cognitive deficits. LTP inhibition in hippocampus caused by SE were markedly improved by administration of curcumin. Biochemical experiments revealed that SE can significantly increase content of MDA, decrease content of GSH and decreased the activities of SOD and GSH-PX in the hippocampal homogenate, which can be reversed by curcumin. **Conclusions:** Curcumin reveals therapeutic potential for SE-induced cognitive deficits, which is most likely related, at least in part, to its anti-oxidative stress actions in hippocampus.

Key words: Status epilepticus; Curcumin; Cognitive deficits

Chinese Library Classification(CLC): R742.1 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)21-4036-04

前言

癫痫是最常见且对患者生活质量影响较大的神经系统疾病之一,发病机制复杂,治疗手段有限,疗效难以令人满意。癫痫患者及动物可以出现记忆力下降等认知功能障碍,且发病率较高。近年来,癫痫所致的认知功能障碍越来越受到人们的重

视。姜黄素(curcumin)是从植物姜黄中提取的一种药用色素,具有抗炎、抗肿瘤、神经保护、抗凋亡等多种作用^[1-3]。近年来,姜黄素对神经系统的作用逐渐受到重视,研究发现姜黄素可减轻脑组织氧化损伤及炎症反应^[4],并可有效减轻 A β 1-40 诱导的老年痴呆大鼠认知功能障碍^[5],但姜黄素对癫痫所致的认知功能障碍是否有预防作用尚不明确。故本实验拟利用氯化锂 - 匹罗卡品癫痫持续状态模型研究姜黄素对癫痫大鼠认知功能障碍的预防作用及其可能机制。

1 材料方法

1.1 材料

Axopatch-700B 放大器 (Molecular Devices Corporation,美

作者简介:闫志强(1978-),男,硕士学位,主治医师,主要从事神经外科常见疾病的临床治疗与基础研究,联系电话:(0991)4991779。

Email: weiminyzq@sohu.com

△通讯作者 刘绍明 Email: xiubinhua@sina.com;

联系电话:(0991)4991779

(收稿日期:2011-06-05 接受日期:2011-06-30)

国), 1440A 模数数模转换器 (Molecular Devices Corporation, 美国), Master-8 脉冲发生器 (A.M.P.I, 以色列), 红外相差显微镜 (Olympus, 日本), 姜黄素 (自行提取, 液相色谱证实纯度 > 80%), 氯化锂及匹罗卡品 (购自 Sigma 公司), 超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX)、还原型谷胱甘肽 (GSH)、丙二醛 (MDA) 检测试剂盒 (购自南京建成生物工程研究所), 其余试剂为国产分析纯。

1.2 实验动物

健康雄性 SD 大鼠 (第四军医大学实验动物中心提供) 30 只, 体质量 200 ± 20 g, 随机分为健康对照组、单纯致痫组 (SE 组)、姜黄素 [60 mg/(kg·d)] 干预组 (curcumin 组), 建立致痫模型前 3 天即用姜黄素干预, 给药方式腹腔注射, 1 次/日。致痫后的第 2 天至第 7 日进行 Morris 水迷宫行为训练及测试, 第 7 天水迷宫试验结束后断头处死, 取一侧侧海马组织, -80°C 低温保存, 取另一侧海马组织, 进行电生理记录。

1.3 大鼠癫痫模型的建立

先腹腔注射氯化锂 3mmol/kg, 24 h 后腹腔注射新鲜配制的匹罗卡品 30 mg/kg^[6]。对照组同法给予等量生理盐水。大鼠在给药后 15~45 min 出现反复强直一阵挛发作, 并形成癫痫持续状态。按 Racine 癫痫发作行为学标准进行观察记录^[7]: 0 级, 无任何反应, 正常行为状态; I 级, 面部阵挛, 包括眨眼、动须、节奏性咀嚼等; II 级, I 级表现加节律性点头; III 级, II 级表现加前肢痉挛; IV 级, III 级表现加后肢站立; V 级, IV 级表现加摔倒。模型组动物发作级别均达到 IV 级以上。于癫痫持续状态后 60 min 腹腔注射地西洋 4 mg/kg 终止癫痫持续状态, 以降低死亡率。

1.4 Morris 水迷宫试验

参照文献所示方法进行^[8,9], 略有改动。致痫后的第二日上午开始行 Morris 水迷宫训练, 大鼠连续训练 5d, 每天分上、下午 2 个时段, 每个时段训练 4 次, 每次间隔为 60s。每次实验在 4 个不同象限中点将大鼠头朝池壁放入水池, 次序随机, 任其自由游泳, 直至找到平台, 允许大鼠在平台上停留 30s 以达强化记忆效果。大鼠 60s 内到达平台的时间即逃避潜伏期被记录下来, 如果大鼠在 60s 内未到达平台, 由实验者将其引导至平台并让其停留 30s, 逃避潜伏期以 60s 记录, 取每日 8 次训练平均值作为当日的逃避潜伏期。②空间探索试验: 致痫后第 7 天上午进行空间探索试验, 撤除平台, 从平台对侧象限放入大鼠, 持续 120 秒, 记录大鼠在平台所在象限的停留时间。每次实验后将大鼠用毛巾擦干放入笼中。

1.5 海马脑片制备及电生理记录

异氟烷麻醉后断头处死大鼠, 迅速取出脑组织, 置于持续通入含 95% O_2 、5% CO_2 混合气的冰浴人工脑脊液中, 配方 (mmol/L): NaCl (126), KCl (2.5), CaCl_2 (2.4), MgCl_2 (1.2), NaH_2PO_4 (1.2), NaHCO_3 (26), and glucose (11) (pH 7.35-7.45)。用震动切片机制备包含海马的厚度约为 350 μm 的脑片, 将脑片置于充氧的人工脑脊液中, 34°C 孵育 1 小时, 使脑片恢复状态。将脑片移至膜片钳记录系统浴槽, 浴槽中以 2ml/min 的速度持续灌流氧饱和的恒温 (34°C) 人工脑脊液, 维持脑片活性。将刺激电极置于 Schaffer 侧支纤维处, 记录电极置于 CA1 锥体细

胞层, 记录电极内充以 3mol/L 的 NaCl。方波测试脉冲波宽 100 μs , 频率 0.05Hz, 刺激强度为诱发 50% 最大兴奋性突出后电位 (fEPSP) 的刺激强度。基线稳定后, 先记录 30min 以上正常 fEPSP 波形, 然后给予高频强直刺激 (HFS), HFS 参数为: 波宽 100 μs 、时程 1s、频率 100Hz, 间隔 20s 后再给一次 HFS 刺激。HFS 刺激后继续用原测试脉冲刺激并记录 CA1 区 fEPSP 一小时以上。以刺激前的 fEPSP 斜率为 100%, 将刺激后的 fEPSP 斜率标准化, 结果表示为 $\pm$ SD%

1.6 脑组织匀浆的制备

将海马组织称重, 低温条件下匀浆, 在 4°C 离心机中 4000r/min 离心 10 min, 取上清液, 按照试剂盒说明书测定匀浆中 SOD、GSH-PX、GSH、MDA。

1.7 统计学处理

所得数据均用 spss 软件进行处理。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 寻找平台的潜伏期及 fEPSP 斜率组间比较采用重复测量的多因素方差分析及 Tukey-Kramer 检验, 其余数据用方差分析进行统计学分析。以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 实验结果

2.1 模型复制结果

大鼠在第二次给药后约 20-40min 出现烦躁, 洗脸样动作、节律性咀嚼, 点头运动, 随后双前肢抬起阵挛或后肢伸展, 然后出现四肢抽搐, 进一步发展到全身强直阵挛发作, 站立、摔倒反复发作, 均达到 IV 级发作, 符合癫痫持续状态。

2.2 各组大鼠寻找平台潜伏期变化

如 Fig 1 所示, SE 组大鼠寻找平台的潜伏期明显长于对照组, 具有统计学意义 ($P < 0.05$), 姜黄素组寻找平台的潜伏期时间相对于 SE 组显著降低 ($P < 0.05$)。

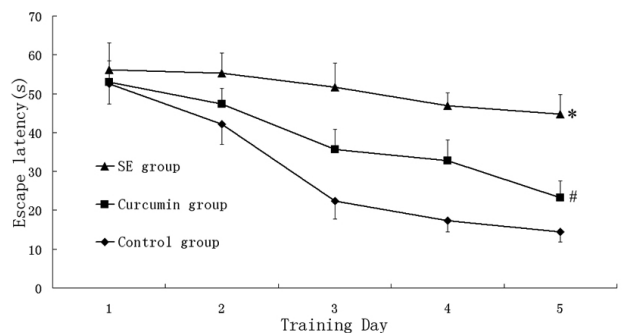


图 1 姜黄素对 SE 大鼠寻找平台潜伏期的影响

Fig. 1 Effects of Curcumin on escape latencies caused by status epilepticus

Note: * $P < 0.05$ SE group compared with control group;

$P < 0.05$ Curcumin group compared with SE group

2.3 空间探索实试验

SE 组大鼠在平台所在象限的停留时间明显短于对照组 ($P < 0.05$), 姜黄素干预组大鼠在平台所在象限的停留时间明显长于对照组 ($P < 0.05$) (Fig 2)。

2.4 姜黄素对癫痫大鼠海马 LTP 的影响

给予 HFS 刺激后各组 fEPSP 斜率较前明显增加, 均可持续 1h 以上。与对照组比较 SE 组 HFS 刺激后 fEPSP 斜率上升

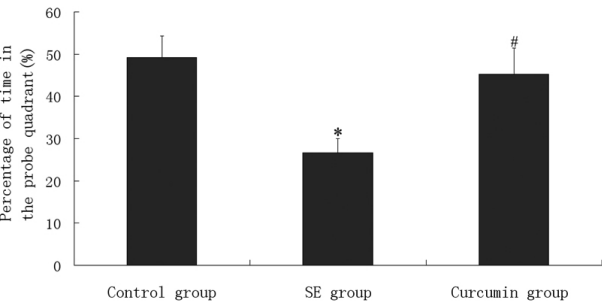


图2 姜黄素对SE大鼠寻找平台潜伏期的影响
Fig. 2 Effects of Curcumin on Percentage of time in the probe quadrant caused by status epilepticus

Note : *P<0.05 SE group compared with control group;
#P<0.05 Curcumin group compared with SE group

幅度明显降低(P<0.05),姜黄素可明显减轻SE对fEPSP斜率的影响(P<0.05)(Fig. 3)。
2.5 姜黄素对癫痫大鼠海马组织中SOD、GSH-Px、GSH、MDA的影响

由tab1可见,SE组与正常对照组相比,大鼠脑组织SOD、GSH-Px、GSH降低(P<0.05),MDA显著增高(P<0.05),姜黄素可对抗SE的作用,使上述变化减弱(P<0.05)。

3 讨论

1981年心理学家Morris首次应用水迷宫实验方法研究大

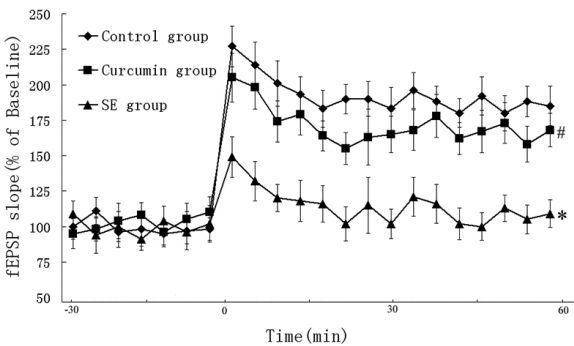


图3 姜黄素对癫痫大鼠海马LTP的影响
Fig. 3 Effects of curcumin on Hippocampal LTP inhibition induced by SE in rats

Note : *P<0.05 SE group compared with control group;
#P<0.05 Curcumin group compared with SE group

鼠学习记忆能力,此后该方法被不断完善并得到广泛认可,现已成为公认的研究学习记忆的最佳的方法之一[10-12]。本实验亦运用Morris水迷宫实验方法研究各组大鼠学习记忆能力,结果显示:癫痫持续状态可使大鼠寻找平台潜伏期延长,空间探索试验中SE大鼠在平台所在象限的停留时间较对照组显著缩短,提示学习记忆能力下降,与文献报道一致[13]。姜黄素治疗后可显著改善上述现象,从而证实了姜黄素可显著改善癫痫大鼠认知功能障碍。已明确,海马与大脑学习记忆功能密切相关,其损伤会严重影响人和动物的学习记忆功能[14-16],SE所致的认知功

表1 姜黄素对SE大鼠氧化应激的影响($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Effects of Curcumin on oxidative stress actions in hippocampus caused by status epilepticus ($\bar{x} \pm s$)

Group	SOD(μU/mg)	GSH-Px(U/mg)	GSH(nmol/mg)	MDA(nmol /mg)
Control group	87.24± 13.27	46.45± 6.78	17.26± 3.11	2.12± 0.44
SE group	39.58± 4.66*	19.37± 3.23*	8.67± 1.41*	5.02± 0.63*
Curcumin group	69.97± 6.44#	32.76± 5.45#	14.11± 2.46#	2.77± 0.31#

Note : *P<0.05 SE group compared with control group; #P<0.05 Curcumin group compared with SE group.

能障碍亦与海马区损伤有关[13],故本实验以海马为中心研究姜黄素改善SE大鼠认知功能的机制。
用HFS刺激可以在一些脑区或脑片形成长时程增强(LTP),以海马最容易引出LTP,具有时程长、特异性和可加性等特征,提示它可能是一种信息存储机制,因此海马形成的LTP已成为研究学习记忆的重要电生理指标之一[17,18]。本研究用fEPSP斜率升高作为LTP形成的指标,结果表明:SE抑制海马CA1区LTP形成,明显损害了海马细胞的突出可塑性,姜黄素干预可显著减轻SE的作用。
本实验选取GSH-Px、GSH、SOD、MDA等氧化还原相关指标探索姜黄素改善SE大鼠认知功能障碍的可能机制。SOD能催化氧自由基歧化为过氧化氢与氧气,其活力的高低反映了机体清除氧自由基的能力[19]。GSH-Px是一种过氧化物分解酶,它能使有毒的过氧化物还原成无毒的羟基化合物[20]。GSH是GSH-Px的底物,是GSH-Px完成其功能的必要条件。这两种酶及GSH的作用都是对抗氧自由基,其活性降低,可打破氧自由

基代谢的动态平衡,使氧自由基蓄积进而损伤正常组织。MDA作为脂质过氧化反应的代谢产物[21],其含量可以反应脑组织中氧自由基水平和脂质过氧化反应的强弱。本实验结果显示:SE大鼠海马组织中SOD、GSH-Px活性降低、GSH含量降低,MDA含量显著增高,姜黄素可显著对抗SE的作用。据此可得出结论:姜黄素可显著抑制海马组织的氧化应激反应,保护海马组织。
综上所述,本实验从功能水平及电生理水平证实姜黄素可改善SE大鼠认知功能障碍,其可能机制是通过减轻海马区的氧化应激反应减轻海马区的损伤,从而实现改善认知功能。为癫痫后认知功能障碍的防治提供了新思路。
参考文献(References)
[1] 郑玉强,邓立普.姜黄素药理作用研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2011,13(2):212-214
Zheng Yu-qiang, Deng Li-pu. Progression of pharmacological research on curcumin [J]. Journal of Liaoning University of TCM, 2011,13(2):

- 212-214 (In Chinese)
- [2] 冯刚,赵敬,郑维平,等. 姜黄素对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的神经保护作用[J]. 激光杂志, 2009,30(3): 77-78
Feng Gang, Zhao Jing, Zheng Wei-ping, et al. Neuroprotective effect of curcumin on focal cerebral ischemia- reperfusion in rats [J]. Laser Journal, 2009,30(3): 77-78 (In Chinese)
- [3] 黄志凌,肖波,谭利明,等. 姜黄素对癫痫持续状态致大鼠海马神经元程序化死亡的影响 [J]. 中国康复医学杂志, 2006,21(7):590-592
Huang Zhi-ling, Xiao Bo, Tan Li-ming, et al. The influence of curcumin on the programme cell death in rat hippocampus after status epilepticus [J]. China Journal of Rehabilitation Medicine, 2006, 21 (7): 590-592 (In Chinese)
- [4] Lim GP, Chu T, Yang F, et al. The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse[J]. J Neurosci, 2001,21(21):8370-8377
- [5] 尹红蕾,秦新月,王运良,等. 姜黄素对海马内注射 A β 140对大鼠认知功能障碍的影响[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2009,12(9): 6-8
Yin Hong-lei, Qin Xin-yue, Wang Yun-liang, et al. Effect of curcumin on cognitive impairment of rats after inject in hippocampus with A β 140 [J]. Chinese Journal of Practical Nervous Diseases, 2009,12 (9):6-8 (In Chinese)
- [6] Hu K,Zhang C, Long L,et al. Expression profile of microRNAs in rat hippocampus following lithium-pilocarpine-induced status epilepticus [J]. Neurosci Lett,2011, 488(3):252-257
- [7] Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical activity II : Motor seizure [J]. Electroenceph clin Neurophysiol,1972,32: 281-294
- [8] Li Ming Wang, Yi Fan Han, Xi Can Tang, et al. Huperzine A improves cognitive deficits caused by chronic cerebral hypoperfusion in rats[J]. European Journal of Pharmacology,2000; 398(1):65-72.
- [9] Zheng G,Zhang W,Zhang Y,et al. Gamma-Aminobutyric acid(A) (GABA (A)) receptor regulates ERK1/2 phosphorylation in rat hippocampus in high doses of methyl tert-butyl ether (MTBE)-induced impairment of spatial memory [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2009, 236(2): 239-245
- [10] Mulder GB, Pritchett K. The Morris water maze [J]. Contemp Top Lab Anim Sci, 2003,42(2):49-50
- [11] D'Hooge R, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory [J]. Brain Res Brain Res Rev, 2001,36(1):60-90
- [12] Brandeis R, Brandys Y, Yehuda S. The use of the Morris Water Maze in the study of memory and learning [J]. Int J Neurosci, 1989 ,48 (1-2):29-69
- [13] 李锐,杜芳,陈云春,等. 托吡酯对锂一匹罗卡品致痫幼鼠视觉空间学习记忆和海马 mGluR1 mRNA 表达的影响[J]. 卒中与神经疾病, 2003;10(6):352-355.
Li Rui, Du Fang, Chen Yunchun, et al. Altered visual-spatial memory and mGluR1mRNA expression in lithum-pilocarpine induced seizure rat treated with topiramate[J]. Stroke and Nervous Diseases, 2003, 10 (6): 352-355 (In Chinese)
- [14] 段瑞生,刘娜,王维平,等. 戊四氮诱导癫痫大鼠的认知功能测定与海马超微结构观察[J]. 江苏医药, 2009;35(3):332-334
Duan Rui-sheng, Liu Na, Wang Wei-ping, et al. Cognitive ability and ultra-microstructure in rats hippocampus after pentetrazol induced seizure[J]. Jiangsu Medical Journal, 2009, 35(3): 332-334 (In Chinese)
- [15] 叶冰,黄华品,车春晖,等. 癫痫复杂部分性发作患者认知功能与海马质子磁共振波谱改变相关性分析[J]. 中华神经医学杂志,2010,9 (2):158-161
Ye Bing, Huang Hua-pin, Che Chun-hui, et al. Correlation analysis of cognitive function and changes in proton magnetic resonance spectroscopy of the hippocampus in patients with complex partial seizures [J]. Chinese Journal of Neuromedicine, 2010,9(2):158-161 (In Chinese)
- [16] 贾丽景,王维平,刘瑞春,等.慢性癫痫大鼠认知功能及海马胞外信号调节激酶 1 / 2 的变化[J]. 中国全科医学, 2009,12(24): 2216-2219
Jia Li-ring, Wang Wei -ping, Liu Rui-chun, et al. Impaired Spatial Learning Related with Seizures and Levels of ERK1/2 in Hippocampus of Pentylene tetrazol - kindled Rats [J]. Chinese General Practice, 2009,12(24): 2216-2219 (In Chinese)
- [17] Hai J, Wan JF, Qi L, et al. Cognitive dysfunction induced by chronic cerebral hypoperfusion in a rat model associated with arteriovenous malformations [J]. Brain research,2009, 627(1):80-88
- [18] Xu B, Li XX, He GR, et al. Luteolin promotes long-term potentiation and improves cognitive functions in chronic cerebral hypoperfused rats[J]. European Journal of Pharmacology,2010, 627(1):99-105
- [19] 毛海峰,陈嘉勤,梁宋平,等. HWTX- I 对全脑缺血大鼠脑组织自由基及海马神经元损伤的保护作用研究 [J]. 北京体育大学学报, 2007,30(3): 351-353
Mao Hai-feng, Chen Jia-qin, Hang Song-ping, et al. Research on Protective Effects of HWTX- I on the Damages of Free Radical and I-lippocmpus Neurons in the Brain of Cerebral Ischemia Rats [J]. Journal of Beijing University of Physical Education, 2007,30 (3): 351-353 (In Chinese)
- [20] 卢斌,陈永,姜绪平. 消化道肿瘤患者血清中活性氧、超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶的活性测定 [J]. 中国医学创新, 2010,7 (28): 9-10
Lu Bin, Chen Yong, Jiang Xu -ping. The determination of plasma ROS, SOD and GSH - PX activity in gastrointestinal cancer patients [J]. Medical Innovation of China, 2010,7(28): 9-10 (In Chinese)
- [21] 闫志强,魏敏,李志超,等. 心房钠利尿肽对肺泡 II 型上皮细胞的保护作用[J]. 中国病理生理杂志, 2007(6):1111-1115
Yan Zhi- qiang, Wei Min, Li Zhi -chao, et al. Protective effect of atrial natriuretic peptide on alveolar type II cells [J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2007(6):1111-1115 (In Chinese)