

氢化可的松诱导的大鼠记忆减退与氧自由基的关系

张 艳*, 李卫平, 明 亮, 陈敏珠

(安徽医科大学药理教研室, 安徽 合肥 230032)

摘要: 目的 研究氢化可的松(HC)对大鼠学习记忆功能的影响及与氧自由基的关系。方法 迷宫法检测实验大鼠的学习记忆功能;Lowry法及硫代巴比妥酸法分别测定胞浆及线粒体的蛋白质及MDA含量;分光光度法及荧光分光光度法分别测定胞浆及线粒体的GSH及GSSG的含量;黄嘌呤氧化酶法及紫外分光光度法分别测定胞浆及线粒体的Mn-SOD及CAT的含量。结果 HC可引起老龄前期大鼠记忆障碍,同时使脑细胞浆及线粒体产生MDA及GSSG增加,GSH及GSH/GSSG比值下降以及Mn-SOD及CAT活性降低。结论 HC同步抑制老龄前期大鼠学习记忆功能是与降低机体的抗氧化能力和增加氧自由基的损伤有关。

关键词: 氢化可的松; 脑细胞; 学习记忆; 氧自由基; 超氧化物歧化酶

中图分类号: R965.2; R977.1⁺1; R749.1⁺6 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2000)06-0417-04

衰老(aging)的自由基学说认为机体老化是由于体内氧自由基(oxygen free radicals, OFR)产生过多和机体抗氧化能力下降,即二者之间的关系失衡引起。而衰老主要行为改变是认知功能障碍。许多研究表明,衰老及缺血性脑损伤(cerebral ischemia)时,脑内氧自由基水平升高,抗氧化酶活力下降,神经元发生退行性变^[1,2],这可能是认知功能改变的原因之一。各种原因引起的血中糖皮质激素(glucocorticoids, GC)水平升高(即外源性及内源性的GC升高),均可导致脑对损伤的易感性增加并加速脑衰老^[3,4]。关于糖皮质激素诱导的认知障碍与自由基之间的关系报道不多。本研究用氢化可的松诱导大鼠学习记忆减退模型,并在此基础上观察自由基的变化,从而探讨学习记忆改变与自由基的关系。

材 料 与 药 品

动物 Sprague-Dawley (SD)大鼠,♀♂兼用,成年鼠10月龄,体重250~300g,老龄前期鼠20月龄,体重350~450g。由安徽医科大学实验动物中心提供(皖实动准01号)。

药品与试剂 氢化可的松(hydrocortisone, HC)

上海信谊药厂生产,批号:970818;1,1,3,3-四乙氧基丙烷(1,1,3,3-tetraethoxypropane, TEP), Fluka公司产品;还原型谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH),上海试剂三厂产品;氧化型谷胱甘肽(oxidized glutathione, GSSG),上海丽珠东风生物技术有限公司,批号:960409;5,5'-二硫代对二硝基苯甲酸(DTNB), Fluka产品;乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na₂),上海试剂一厂产品;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)测定试剂盒,南京建成生物工程研究所产品。牛血清白蛋白, Sigma公司产品。

仪器与设备 Y迷宫(Y-Maze),安徽医科大学药理教研室自制。GL20A型自动高速冷冻离心机,湖南仪器总厂离心机厂生产;721分光光度计,上海第三分析仪器厂产品;7530-G紫外分光光度计,上海雷磁仪器厂;GPS-1A超声波粉碎机,上海超声波仪器厂;内切式组织匀浆机,浙西机械厂。Hitach-650型荧光分光光度计,日本日立公司产品。

实 验 方 法

HC诱导大鼠衰老模型 取正常老龄前期(20月)大鼠20只,随机分成2组:正常同龄对照及HC模型组;另取10只10月龄大鼠作正常成年对照。给予HC 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹, sc, qd, 共21 d;对照组sc等容积溶媒,每周称体重一次。d 20与d 21用Y迷宫检测各组大鼠学习记忆功能。末次给药后禁食12 h, 24 h后处死大鼠,检测各项指标。

收稿日期: 1999-12-10

基金项目:安徽省教育委员会资助项目(97J1078)

* Tel: (0551) 2815953, (0551) 2816602-3207,

Fax: (0551) 2820418

大鼠学习记忆功能的检测 Y 迷宫为均三等分辐射式穿梭箱,底部为铜栅,通电(40 V)可电击大鼠足爪。每一个穿梭箱后顶部均有一 25 W 白炽信号灯,实验时根据动物所在位置,可改变信号方位,信号灯亮时铜栅不通电,为安全区,另两臂通电。检测时首先让动物学会辨别安全信号而主动逃避电击,学习时以 20 次中遭受电击次数(错误次数, NR)作为指标,24 h 后重复上述试验。

脑细胞胞浆与线粒体的制备^[2] 于学习记忆功能检测次日,断头处死大鼠,立即在冰浴上取出大脑皮层,分别用冰冻生理盐水制成 10% 匀浆,4℃ 离心(3 000 r·min⁻¹, 10 min),取上清液,再 4℃ 离心(11 000 r·min⁻¹, 15 min),上清液即为胞浆,沉淀为线粒体。将线粒体重悬于 2.5 mL 生理盐水中,-20℃ 贮存待测。一部分线粒体悬液经 CPS-1A 超声波粉碎机粉碎,每次 60 μA, 5 s, 间隔 10 s, 反复 4 次使线粒体微粒破碎,4℃ 离心(2 000 r·min⁻¹, 10 min),上清液供酶活力测定。另一部分线粒体悬液直接供 MDA 与蛋白质含量测定。

胞浆与线粒体 MDA 含量的测定^[5]

(1) MDA 标准曲线的制备 用双蒸馏水将 TEP 配制成 5 个不同浓度的溶液(2, 4, 6, 8, 10 nmol·mL⁻¹)。各取 1 mL,加 30% 三氯醋酸 1 mL,静置 5 min 后,加入 0.67% TBA 2 mL,于沸水浴中加热 30 min,流水冷却至室温,离心(3 000 r·min⁻¹, 10 min),取上清液,535 nm 处测吸光度(A)值。以 TEP 浓度为横坐标,A 值为纵坐标,绘制标准曲线。

(2) 胞浆与线粒体 MDA 含量的测定^[6] 分别取胞浆和线粒体悬液 1 mL,加 30% 三氯醋酸 1.0 mL,破坏线粒体并沉淀蛋白质,以后步骤同上,测吸光度值,在标准曲线上查出 MDA 浓度,结果以 nmol·mg⁻¹ 蛋白表示。

(3) 蛋白质含量测定 采用改良 Lowry 氏法。以 BSA 作为标准品,测定脑细胞胞浆与线粒体的蛋白质含量。

胞浆与线粒体中还原型谷胱甘肽(GSH)含量测定

(1) GSH 标准曲线制作 取 1 mmol·L⁻¹ GSH 标准液,配成系列浓度(20, 40, 60, 80, 100 μmol·L⁻¹)溶液,各取 0.5 mL,分别加入含 4.0 mL PBS(pH 8.0, 0.1 mol·L⁻¹)的试管中,再加入 DTNB 显色液 0.5 mL,摇匀后,5 min 内在 412 nm 处读吸光度值,以 GSH 浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制

标准曲线。

(2) 胞浆与线粒体中 GSH 含量测定 分别取线粒体裂解液上清、胞浆各 0.5 mL,加 PBS(pH 8.0, 0.1 mol·L⁻¹) 4.0 mL,再加入 DTNB 显色剂 0.5 mL,摇匀后,5 min 内在 412 nm 处测 A 值,并从标准曲线上查出 GSH 浓度,结果以 nmol·mg⁻¹ 蛋白表示。

胞浆与线粒体中氧化型谷胱甘肽(GSSG)含量测定^[7]

(1) GSSG 标准曲线制作 称取 GSSG 1 mg,溶于 10 mL 0.1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液,分别取 GSSG 溶液 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL(内含 GSSG 0, 2, 4, 6, 8, 10 μg)置试管中,分别加入 0.1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液 2.8, 2.6, 2.4, 2.2, 2.0, 1.8 mL;再加入邻苯二甲醛溶液(1 mg·mL⁻¹) 0.1 mL,室温放置 30 min,用荧光分光光度计(激发波长 350 nm,发射波长 430 nm)测定荧光强度。以 GSSG 含量为横坐标,荧光强度(F)值为纵坐标,绘制标准曲线。

(2) 胞浆与线粒体 GSSG 含量测定 取线粒体裂解液上清液与胞浆各 1.0 mL,分别加入 0.04 mol·L⁻¹ N-乙基马来酰亚胺水溶液 0.4 mL,室温放置 30 min 后,加 0.187 mol·L⁻¹ NaOH 溶液 1.5 mL,邻苯二甲醛溶液(1 mg·mL⁻¹) 0.1 mL,充分混匀,室温放置 30 min。在激发波长 350 nm,发射波长 430 nm 处测荧光强度(F)值,并从标准曲线上查出相应的 GSSG 含量,以 nmol·mg⁻¹ pr 表示。

线粒体 MnSOD 活性测定 采用黄嘌呤氧化酶法测 MnSOD 活性,按 SOD 测定试剂盒说明书进行操作。其活性单位以 NU·mg⁻¹ 蛋白表示。

线粒体及胞浆过氧化氢酶(Catalase, CAT)活性测定^[5] 取胞浆或线粒体裂解液上清液 20 μL,置比色皿底部,快速加入已预温至 25℃,A 值在 0.5~0.55 之间的底物溶液 3 mL,立即于 240 nm 处测吸光度,为 A₁ 值,1 min 时再测一次吸光度为 A₂ 值。CAT 活力 = log(A₁/A₂) × 2.303/60 × 稀释倍数 ÷ 蛋白含量,结果以 U·g⁻¹ 蛋白表示。

数据的统计分析 实验数据以均数 ± 标准差表示,组间比较采用 Student's t 检验,方差分析或非参数检验(Kruskal-Wallis 法)分析。

结 果

1 HC 对老龄前期大鼠学习记忆的影响

表 1 结果表明,老龄前期大鼠(20 月)犯错误次

数较成年(10月)大鼠多,但无显著性差异;HC可使老龄前期大鼠的错误率进一步提高,体重明显下降($P < 0.01$)。

Tab 1 Effect of hydrocortisone(HC) on learning and memory in rats

Group	Dose/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	Number of error/frequency
10 month	-	4.5 ± 1.4
20 month	-	5.6 ± 1.2
HC	10	$8.0 \pm 1.7^{**}$

$\bar{x} \pm s$, $n = 10$. HC group: 20 month rats were treated with HC qd (sc) for 21 days, $** P < 0.01$ compared with 10 and 20 month rats(untreated)

2 HC对老龄前期大鼠皮层细胞线粒体及胞浆

Tab 2 Effect of hydrocortisone(HC) on MDA,GSH,GSSG,and GSH/GSSG ratio in cytoplasm and mitochondria of rat cerebral cells

Group	Dose/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	Cytoplasm/ $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein			Mitochondria/ $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein
		MDA	GSH	GSSG	MDA
10 month	-	0.66 ± 0.16	19.18 ± 4.20	0.80 ± 0.23	0.94 ± 0.24
20 month	-	$1.01 \pm 0.21^*$	$12.92 \pm 3.55^{**}$	$1.20 \pm 0.18^{**}$	$1.56 \pm 0.21^{**}$
HC	10	$1.72 \pm 0.25^{* \# \#}$	$7.35 \pm 2.31^{* \# \#}$	$1.39 \pm 0.22^{\# \#}$	$1.90 \pm 0.19^{\# \#}$

$\bar{x} \pm s$, $n = 10$. HC group: 20 month rats were treated with HC qd (sc) for 21 days, $* P < 0.05$, $** P < 0.01$ compared with 10 month rats(untreated); $\# P < 0.05$, $\# \# P < 0.01$ compared with 20 month rats(untreated)

4 HC对老龄前期大鼠皮层细胞中抗氧化活性的影响

表3结果表明,老龄前期(20月)大鼠皮层细胞中线粒体CAT和MnSOD及皮层胞浆CAT的活性均明显低于成年(10月)大鼠;HC可使老龄前期大鼠皮层线粒体和胞浆CAT活性及皮层线粒体MnSOD活性进一步降低。

Tab 3 Effect of hydrocortisone(HC) on CAT and MnSOD in cytoplasm and mitochondria of rat cerebral cells

Group	Dose/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	Cytoplasm		Mitochondria
		CAT/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ pr	CAT/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ pr	MnSOD/ $\text{NU} \cdot \text{mg}^{-1}$ pr
10 month	-	79.1 ± 20.3	18.0 ± 4.3	9.83 ± 2.95
20 month	-	$44.6 \pm 13.1^{**}$	$11.9 \pm 2.5^{**}$	5.25 ± 1.49
HC	10	$30.9 \pm 8.3^{\#}$	$8.2 \pm 2.2^{\# \#}$	2.85 ± 1.27

$\bar{x} \pm s$, $n = 10$. HC group: 20 month rats were treated with HC qd (sc) for 21 days, $** P < 0.01$ compared with 10 month rats (untreated); $\# P < 0.05$, $\# \# P < 0.01$ compared with 20 month rats(untreated). pr:protein

MDA含量的影响

老龄前期(20月)大鼠脑皮层细胞中线粒体与胞浆MDA含量均明显高于成年(10月)大鼠;HC可使老龄前期大鼠皮层细胞线粒体与胞浆中MDA含量进一步升高(表2)。

3 HC对老龄前期大鼠皮层细胞GSH,GSSG和GSH/GSSG比值的影响

与成年(10月)大鼠相比,老前期(20月)大鼠脑皮层细胞胞浆中GSH含量明显降低,GSSG含量显著升高,GSH/GSSG比值明显降低;HC(10 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \times 21$ d, sc)可进一步促使老龄前期大鼠皮层细胞中GSH含量减少,GSSG含量增加及GSH/GSSG比值的降低(表2)。

讨 论

在机体衰老过程中,下丘脑-垂体-肾上腺轴(hypothalamo-pituitary-adrenal axis, HPAA)被激活,且该轴的激活程度与老年性痴呆的发病率及记忆缺损程度密切相关。体外实验发现,糖皮质激素可促进氧化应激诱导的海马神经元的死亡^[8]。本研究结果表明,与10月龄大鼠比较,20月龄大鼠脑线粒体与胞浆中氧化产物(MDA,GSSG)含量增高,抗氧化活性(GSH,GSH/GSSG,MnSOD与CAT)降低,而记忆功能的减退不明显,提示老龄前期大鼠体内自由基产生增多和抗氧化酶活力降低,但这些改变还不足以影响学习记忆。HC使老龄前期大鼠上述指标变化更加显著,且引起明显的学习记忆障碍,提示HC可促进脑皮层细胞自由基的产生,而自由基损伤不是HC诱导学习记忆障碍的唯一途径。这与文献报道^[8,9]的GC可促进大脑产生氧自由基而降低其抗氧化能力一致。另外,GC介导的神经5-脂酶通路上调可能也会促使脑对退化的易感性增加^[10]。但也有报道氢化可的松或其它糖皮质激素

素可抑制单核细胞氧自由基的产生^[11],这可能与其发挥作用的部位和环境有关。

参考文献:

- [1] Selkoe DJ. The molecular pathology of Alzheimer's disease[J]. *Neuron*, 1991, **4**: 487.
- [2] Seck LJT, Olsson T. Glucocorticoid hypersecretion and the age-impaired hippocampus: cause or effect? [J] *J Endocrinol*, 1995, **145**: 201.
- [3] Swaab DF, Raadsheer FC, Endert E, et al. Increased cortisol levels in aging and Alzheimer's disease in post mortem cerebrospinal fluid[J]. *J Neurochem*, 1994, **6**: 681.
- [4] Meaney MJ, O'Donnell D, Rowe W, et al. Individual differences in hypothalamic-pituitary-adrenal activity in later life and hippocampal aging[J]. *Exp Gerontol*, 1995, **30**: 229.
- [5] Nohi H. Involvement of free radicals in aging: a consequence or cause of senescence[J]. *Br Med Bull*, 1993, **49**: 653.
- [6] Luine V, Bowling DB. Spatial memory deficit in aged rats: contributions of monoaminergic systems[J]. *Brain Res*, 1990, **537**: 271.
- [7] 袁晓玫, 王海燕. 老年鼠肾线粒体的老化及其药物防护[J]. *中华老年医学杂志*, 1994, **13**: 168.
- [8] Christian B, Frank L. Glucocorticoids enhance oxidative stress-induced cell death in hippocampal neurons *in vitro* [J]. *Endocrinology*, 1997, **138**: 101.
- [9] McIntosh LT, Hong KE, Sapolsky RM. High glucocorticoids levels decrease some antioxidant enzyme activities in adult rat brain[J]. *Soc Neurosci Abstr*, 1995, **21**: 2129.
- [10] Uz T, Dwivedi Y, Savani PD, et al. Glucocorticoids stimulate inflammatory 5-lipoxygenase gene expression and protein translocation in the brain[J]. *J Neurochem*, 1999, **73**: 693.
- [11] Dandona P, Thusu K, Hafeez R, et al. Effect of hydrocortisone on oxygen free radical generation by mononuclear cells[J]. *Metabolism*, 1998, **47**: 788.

HYDROCORTISONE INDUCED DECREASE OF LEARNING AND MEMORY FUNCTIONS IN RATS AND ITS RELATED TO OXYGEN FREE RADICAL

ZHANG Yan, LI Wei-Ping, MING Liang, CHEN Min-Zhu

(Department of Pharmacology, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

ABSTRACT: **AIM** To study the effects of hydrocortisone (HC) on the learning and memory function and its mechanism related to the oxygen free radical in presenium rats. **METHODS** The learning and memory function was determined by Y-Maze; The contents of protein and MDA in cytoplasm and mitochondria were assayed by methods of Lowry and TBA respectively; The contents of GSH, GSSG, Mn-SOD and CAT in cytoplasm and mitochondria were assayed by spectroscopy, fluorescence spectroscopy, XO and UV spectroscopy respectively. **RESULTS** The learning and memory function in presenium rats treated with HC (10 mg·kg⁻¹·d⁻¹ × 21 d, sc) decreased significantly, accompanied with increased levels of MDA and GSSG, and lowered levels of GSH, SOD and CAT. **CONCLUSION** HC can induce the change of learning and memory via production of oxygen free radical.

KEY WORDS: hydrocortisone; cerebral cells; learning and memory; oxygen free radical; superoxide dismutase