

· 论 著 ·

## NS398 对缺氧缺血性脑损伤新生鼠远期学习记忆能力的干预效应

温恩懿, 廖伟, 赵聪敏

(第三军医大学新桥医院儿科, 重庆 400037)

**摘要:**目的 研究新生大鼠缺氧缺血性脑损伤(HIBD)时应用选择性环氧合酶-2(COX-2)抑制剂 NS398 干预后的远期学习记忆能力干预效应。方法 于制备新生大鼠左脑的 HIBD 模型后 30min, 应用腹腔注射 NS398 20mg/kg, 同时建立未注射 HIBD 组及假手术组, 于 HIBD 后 28d, 用 Morris 水迷宫实验及穿梭箱实验测试大鼠的远期学习记忆能力。结果 28d 后 HIBD 组远期学习记忆能力显著低于假手术组; NS398 组远期学习记忆能力优于 HIBD 组。结论 应用选择性 COX-2 抑制剂 NS398 可以改善 HIBD 新生鼠的远期学习记忆能力。

**关键词:**缺氧缺血性脑损伤; 选择性 COX-2 抑制剂; 学习记忆能力; 新生鼠

**中图分类号:** R365.741

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1671-8348(2009)22-2793-02

## Long-term learning and memory capacity effects on neonatal HIBD rats after NS398 intervened

WEN En-yi, LIAO Wai, ZHAO Cong-min

(Department of Pediatrics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

**Abstract: Objective** To study long-term learning and memory capacity effects on the neonatal hypoxic-ischemic brain damage (HIBD) rats after injected selective COX-2 inhibitor NS398 intervened. **Methods** Intraperitoneal injected with NS398 after the model of HIBD Wistar rats was established, the Morris water maze test and shuttle box test in rats were used to research effects of long-term learning and memory at 28d after hypoxic-ischemic damaged. HIBD group and control group also counted at a same way. **Results** After statistical comparison, HIBD group was significantly lower than control group in long-term learning and memory ability, and NS398 group was superior to HIBD group. **Conclusion** Application of selective COX-2 inhibitor NS398 can improve long-term learning and memory ability in neonatal HIBD rats.

**Key words:** hypoxic-ischemic brain damage; selective COX-2 inhibitor; learning and memory capacity; neonatal rat

新生儿缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)是造成新生儿死亡和儿童永久性神经功能障碍的最常见原因。多项研究已提示, 于缺氧缺血(hypoxic-ischemic, HI)后环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)表达迅速增加并密切参与 HIBD 中病理损伤过程。研究者既往实验亦证明, 适时予以选择性 COX-2 抑制剂可以有效改善新生鼠 HIBD 后急性中枢神经损伤<sup>[1-3]</sup>。本实验旨在明确给予选择性 COX-2 抑制剂 NS398 干预 HIBD 新生鼠是否对其远期学习记忆能力存在改善作用, 以研究非甾体抗炎药物(nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)对新生鼠 HIBD 的临床应用可能。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物与分组** 选择 7 日龄(P7)健康 Wistar 大鼠, 由第三军医大学实验动物中心提供, 体质量 12~15g, 共 36 只。随机分组为 HIBD 组、NS398 干预组、假手术组, 每组 12 只, 用于 HI 后 7d 时进行检测。

## 1.2 模型建立

**1.2.1 HIBD 模型** 参照 Rice 等<sup>[4]</sup>法制作。

**1.2.2 NS398 处置** NS398 干预组于缺氧后 30min 予 20mg/kg 剂量腹腔注射 NS398。HIBD 组于缺氧后同样条件下腹腔注射等量生理盐水。

**1.2.3 假手术组** 仅予以分离左侧颈总动脉, 不予以结扎后缝合皮肤, 不予以缺氧处置, 术后 30min 腹腔注射等量生理盐水。

**1.3 HI 后远期学习记忆能力检测** 在鼠龄 1 个月(28d)时进行测试。

**1.3.1 学习和空间学习记忆能力测试(水迷宫试验)** 各组随机各选 6 只, 用 Morris 水迷宫测试学习记忆功能。定位航行

实验: 训练前 24h 将大鼠放入水迷宫中自由游泳 3min, 以熟悉迷宫环境。实验历时 4d, 每天在固定时间分上午、下午两个时间段, 每个时间段训练 4 次。分别从池壁 4 个象限的中点将大鼠头朝池壁放入水池, 记录大鼠从入水至爬上平台的时间, 即隐匿平台逃避潜伏期(escape latency, EL), 至 60s 找不到平台, 即将引其上平台, EL 记为 60s, 让大鼠在平台上休息 15s。取实验第 4 天 EL, 计算各组均数。隐匿平台逃避潜伏期反映动物获得经验的能力, 即学习能力。空间探索实验: 第 5 天进行空间探索实验, 撤除平台, 将大鼠随机从某一象限池壁中点头朝池壁放入水中, 记录 2min 穿越平台的次数。空间探索实验反映动物保持经验的能力, 即记忆能力。

**1.3.2 穿梭箱实验** 各组随机各选 6 只, 用大鼠穿梭程序自动控制仪进行。记录动物受电击次数(stimulate counts, SC)及受电击时间(stimulate time, ST)。实验时将大鼠放入箱内适应 10s 后, 持续出现蜂鸣音 5s, 蜂鸣强度为 20dB。蜂鸣音停后马上给予 10s 电刺激(电流强度 1.5~2mA), 间隔 5s 后再次出现蜂鸣, 受到电击的大鼠即逃至箱对侧以逃避电击, 如此迫使大鼠来回穿梭。当蜂鸣音出现时大鼠立即跳至对侧安全区以回避电击即认为出现了主动回避反应。每天进行 20 个循环, 连续 7d, 以最后 3d SC、ST 结果为实验结果。

**1.4 统计学方法** 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 运用统计软件 SPSS11.0 进行方差齐性检验, 并通过 SNK 分析方法进行组间分析比较。

## 2 结果

**2.1 学习和空间学习记忆能力测试对比** 1 月龄后, 经 Morris 水迷宫测试发现: 随游泳次数增多各组大鼠 EL 时间均有不同程度缩短; HIBD 组 EL 较正常对照组明显延长 ( $P <$

0.001), NS398 干预组 EL 值较 HIBD 组缩短 ( $P < 0.05$ ), 较假手术组仍有延长 ( $P < 0.05$ )。在空间探索实验中, 假手术组大鼠运动轨迹主要集中在原平台位置, 而 HIBD 组则多沿池壁游泳, 撤去平台后 120s 内, HIBD 组跨越平台次数明显低于假手术组 ( $P < 0.001$ ); NS398 干预组优于 HIBD 组结果 ( $P < 0.05$ ), 但与假手术组仍存在差异 ( $P < 0.05$ ), 见表 1。

表 1 Morris 水迷宫实验结果

组别	隐匿平台逃避潜伏期(s)	空间探索(次)
假手术组	26.76±5.32	4.87±1.94
HIBD 组	38.79±7.65 <sup>▲</sup>	2.21±1.37 <sup>▲</sup>
NS398 干预组	33.12±4.29*	3.37±1.41 <sup>▲</sup>

▲: 与假手术组对比,  $P < 0.001$ ; \*: 与假手术组, HIBD 组对比,  $P < 0.05$ 。

**2.2 穿梭箱实验对比** 1 月龄后, 经穿梭箱实验中测试发现: HIBD 组大鼠 SC、ST 数值均较假手术组显著增加 ( $P < 0.01$ ); NS398 干预组较 HIBD 组大鼠 SC、ST 数值显著缩短 ( $P < 0.05$ ), 但与假手术组仍存在差异 ( $P < 0.05$ ), 见表 2。

表 2 穿梭箱实验结果

组别	电击次数(次)	电击时间(s)
假手术组	10.27±3.18	71.36±30.29
HIBD 组	17.32±2.87 <sup>▲</sup>	97.68±44.24 <sup>▲</sup>
NS398 干预组	14.54±3.51*	79.37±52.01*

▲: 与假手术组对比,  $P < 0.01$ ; \*: 与假手术组、HIBD 组对比,  $P < 0.05$ 。

### 3 讨 论

目前已经证明在脑缺氧缺血损伤中存在许多重要的细胞及分子方面的损伤因素, 如兴奋性氨基酸的兴奋毒性及自由基的毒性作用、NO 以及氧自由基等<sup>[5]</sup>。目前许多研究均揭示 COX-2 与这些因素密切相关。但 COX-2 是否为脑缺氧缺血损伤中的一个重要的中间环节或分支因素仍需进一步研究。因此, 开展 COX-2 及其选择性抑制剂应用的研究, 可以为临床新生儿 HIBD 提供新的治疗途径。

目前研究揭示机体内的环氧合酶(cyclooxygenase COX) 有 2 种同工酶(COX-1、COX-2), 其中 COX-1 为结构酶, 位于内质网, 通过促进前列腺素的生物合成而发挥体内环境平衡作用(保护胃黏膜、调节肾血流动力、刺激血小板凝集等); COX-2 为诱导酶, 存在于白细胞和核膜, 在炎症和疼痛时合成前列腺素, 由 COX-2 产生的前列腺素可优先进入核内, 而对胃黏膜几乎无作用。这种细胞内位置差异和不同的调节特征, 决定了 2 种 COX 的不同功能<sup>[6]</sup>。非甾体类抗炎药(nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) 是一类具有解热、镇痛、抗炎作用而非类固醇结构的药物, 根据酶学、生物化学和药理学的 3 项指标, 目前 NSAIDs 可分成 4 类: 即 COX-1 特异性抑制剂、COX 非特异性抑制剂、COX-2 倾向性抑制剂和 COX-2 特异性抑制剂。目前 COX-2 特异性抑制剂已不断应用于临床。

NSAIDs 对 COX 抑制作用的强度可通过 IC<sub>50</sub>COX-2/IC<sub>50</sub>COX-1 的比值来反映, 凡比值越小则提示药物对 COX-2 存在高度选择性。本实验中, 通过应用选择性 COX-2 抑制剂 NS398(IC<sub>50</sub> 为 0.02~0.038, COX-2 非特异性抑制剂如吲哚美辛 IC<sub>50</sub> 为 5.2~60<sup>[7]</sup>) 于新生鼠 HIBD 模型, 结合实验者既

往实验结果, 发现 NS398 不仅可以有效降低 HIBD 后 COX-2 表达, 并可减轻缺氧缺血对发育中大鼠脑组织的急性病理损伤程度, 而且还可以有效改善 HIBD 后大鼠远期学习记忆能力, 从而综合证明了在 HIBD 中通过腹腔注射选择性 COX-2 抑制剂对发育中脑组织缺氧缺血损伤存在明确治疗效应, 为临床中选择性地采用 NSAIDs 治疗新生儿 HIBD 提供了实验室依据, 并最终有望可以用于临床治疗 HIBD。

虽然选择性 COX-2 抑制剂多年来已用于多种成人疾病的临床治疗, 但选择性 COX-2 抑制剂对于儿童尤其对新生儿缺氧缺血性脑病的治疗作用还需要对药物安全性进行更多的评估: (1) 已有研究提示 COX-2 参与了胚胎器官的生长发育, 但是否参与出生后的器官与组织的正常生长发育目前缺乏研究资料; (2) 现有的选择性 COX-2 抑制剂药物用于成人疾病的治疗仍然存在较严重的不良反应, 已发现选择性 COX-2 抑制剂罗非昔布(Rofecoxib, Vioxx, 万络) 血管内血栓形成事件发生率为泰普生的 3 倍, 服用高剂量罗非昔布的患者, 其患冠心病的危险是非服药组的 1.7 倍<sup>[8]</sup>, 因此, 罗非昔布已停止临床使用。另外如环氧合酶与脂氧合酶(COX-2/5-LOT) 双重抑制剂替尼达普(Tenidap) 也因其肝毒性而停止使用。对于处于生长期的儿童, 选择性 COX-2 抑制剂 NS398 临床应用的安全性还需要进一步评估和更深入的研究。

### 参考文献:

- [1] 温恩懿, 赵聪敏. 选择性 COX-2 抑制剂 NS398 干预后对 HIBD 新生大鼠海马 CA1 区存活锥体细胞计数的变化[J]. 中国医药指南, 2008, 12(6): 19.
- [2] 温恩懿, 赵聪敏, 王丽雁, 等. 新生大鼠脑缺氧缺血损伤时的 COX-2 表达变化[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(21): 1947.
- [3] 温恩懿, 赵聪敏, 张雨平, 等. 选择性 COX-2 抑制剂 NS398 干预对 HIBD 新生鼠脑细胞凋亡的影响[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(17): 1901.
- [4] Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic ischemic brain damage in the rat[J]. Ann Neurol, 1981, 9: 131.
- [5] Johnston M, Michael V, Trescher B, et al. Neurobiology of hypoxic-ischemic injury in the developing brain[J]. Pediatr Res, 2001, 49(6): 735.
- [6] Ermert L, Dierkes C, Erment M. Immunohistochemical expression of cyclooxygenase isoenzymes and downstream enzymes in human lung tumors[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(5): 1604.
- [7] Hamasaki Y, Kitzler J, Hardman R, et al. Phorbol ester and epidermal growth factor enhance the expression of two inducible prostaglandin H synthase genes in rat tracheal epithelial cells[J]. Arch Biochem Biophys, 1993, 304(1): 226.
- [8] Bombardier C, Laine L, Reicin A, et al. Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis[J]. N Engl J Med, 2000, 343: 1520.