

灵芝多糖对阿尔茨海默病模型大鼠海马内突触及突触素表达的影响

袁电杰^{1*}, 张印发², 姚春香³

(1. 宝丰县食品药品监督管理局, 河南 宝丰 467400; 2. 郟县食品药品监督管理局, 河南 郟县 467400; 3. 宝丰县妇幼保健院, 河南 宝丰 467400)

[摘要] 目的: 观察灵芝多糖 (GLP) 对阿尔茨海默病 (AD) 模型大鼠海马内突触及突触素表达的影响。方法: 清洁级雄性 SD 大鼠, 双侧海马内一次性注射 β -淀粉样多肽 25~35 片段 (A₂₅₋₃₅) 制作大鼠 AD 模型; ip 不同浓度的灵芝多糖溶液进行治疗, 连续 7 d, 每天 1 次; Morris 水迷宫检测动物学习记忆能力, 采用免疫组织化学染色法、透射电镜技术结合图象分析方法比较各组大鼠海马 CA1, CA3 区突触素表达、突触的数密度和面密度变化。结果: 与模型组相比, 灵芝多糖 75, 50 mg·kg⁻¹ 能显著降低大鼠水迷宫实验的平均潜伏期, 升高跨越平台次数; 亦能显著升高大鼠海马突触素的表达 ($P < 0.01$) 及突触的数密度 (Nv) 和面密度 (Sv) (P 均 < 0.01)。结论: 灵芝多糖能显著升高老年性痴呆 (阿尔茨海默病) 大鼠海马内降低的突触素/突触, 此可能是增强大鼠学习记忆产生抗痴呆作用的机制之一。

[关键词] 阿尔茨海默病; β -淀粉样多肽; 海马; 突触素; 灵芝多糖

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)03-0151-05

Effects of *Ganoderma lucidum* Polysaccharides on Synapsis and Hippocampal Synaptophysin Expression in Alzheimer's Rats Model

YUAN Dian-jie^{1*}, ZHANG Yin-fa², YAO Chun-xiang³

(1. Baofeng Institute For Food and Drug Control, Baofeng 467400, China;

2. Jiaxian Institute for Food and Drug Control, Jiaxian 467400, China;

3. The Maternal and Child Health Hospital of Baofeng, Baofeng 467400, China)

[Abstract] **Objective:** To explore effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides (GLP) on synapsis and hippocampal synaptophysin expression in AD-rats. **Method:** AD-rats induced by A₂₅₋₃₅ were treated with different concentrations of GLP for 7 days. The Morris water maze was applied to validate the learning and memory ability in rats. The expression of synaptophysin and the alleosis of synaptic stereology were detected on tissues of CA1 and CA3 regions in hippocampus by immunohistochemistry method, transmission electron microscope (TEM) and image-analysis system. **Result:** Compared with the model group, GLP (75, 50 mg·kg⁻¹) decreased the average delitescence of rats in Morris water maze, and GLP increased the synaptophysin expression levels ($P < 0.01$) and numerica density (Nv), surface density (Sv) ($P < 0.01$, $P < 0.01$). **Conclusion:** GLP improves the learning ability in AD-rats. Reversal of synaptophysin and Nv, Sv on hippocampus could be contributed to the mechanism.

[Key words] Alzheimer disease; β -amyloid polypeptide; hippocampus; synaptophysin; *Ganoderma lucidum* polysaccharides

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD) 是一种以学习记忆能力损害为主的中枢神经系统退行性疾病,是致老年痴呆最常见的原因。有研究表明,海马突触数量和突触素(反映突触密度与分布的特异标记物)表达明显减少,是 AD 发病机制及病理改变之一^[1]。灵芝多糖(GLP)是灵芝属真菌菌丝体的次生代谢产物,近年来的研究证明,它能够通过提高海马 SOD 活性、降低丙二醛(MDA)含量及 caspase-3 的表达等提高学习记忆能力产生抗痴呆作用;那么此作用与海马内突触和突触素的表达变化有无关系呢?笔者未见文献报道。而突触数密度是一定参照空间内突触的数目,是揭示神经活动过程中神经元接点数目的直接指标;突触面密度反映一定参照空间内突触的总面积,是揭示神经活动中神经元接点面积的直接指标^[2]。且海马内突触素的变化与老年学习记忆障碍直接相关^[3]。为此,本文应用 Morris 水迷宫实验,通过观察 GLP 对 A₂₅₋₃₅ 致 AD 大鼠学习记忆能力的影响,评价 GLP 对此大鼠的治疗效果;再采用免疫组织化学染色法及透射电镜分析方法对海马内突触素的表达、突触的数密度和面密度进行分析,探讨 GLP 抗痴呆作用机制。

1 材料

1.1 动物 清洁级 SD 大鼠,雌雄各半,月龄 2 月左右,体重 150 ~180 g,郑州大学药学院提供,合格证号 SYXK-(豫)2007-0009,实验前适应性饲养 1 周。

1.2 药物与试剂 灵芝多糖(批号 20090803,98%),购自浙江方格药业有限公司,制成 15, 10, 5 g·L⁻¹ 3 种质量浓度的无菌溶液;A₂₅₋₃₅, Sigma 公司提供,制成浓度 2 g·L⁻¹ 无菌溶液,37℃ 下孵育 1 周,使其变为凝聚态。ANTI-SYNAPTOPHYSIN (MAB329 0508008535), MILLIPORE 公司;免疫组化试剂盒(编号 SA1020),武汉博士得生物工程有限公司。

1.3 仪器 Morris 水迷宫,中国医学科学院药物研究所研制;H-600 透射电子显微镜,日本日立公司;LAICA-200 图像分析仪,德国 LEICA MICROSYSTEMS LTD。

2 方法

2.1 动物分组 60 只大鼠随机分为生理盐水(NS)对照组、阿尔茨海默病组(模型组)、灵芝多糖(GLP) 75, 50, 25 mg·kg⁻¹ 高、中、低剂量治疗组共 5 组,每组 12 只。

2.2 建立 AD 模型 除 NS 对照组外,其余各组大鼠双侧海马区注射点(AP -3.5 mm, ML ±2.0 mm, DV 2.7 mm),用微量进样器注射 5 μL(10 μg) 聚集态的 A₂₅₋₃₅, 10 min 内注完。NS 对照组注射等量的生理盐水。

2.3 药物治疗 建模后 24 h, NS 对照组和模型组 ip(按 5 mL·kg⁻¹) 生理盐水;GLP 高、中、低剂量组按 75, 50, 25 mg·kg⁻¹ ip GLP 溶液;每天 1 次,连续 7 d。

2.4 Morris 水迷宫检测大鼠学习记忆能力 末次给药后 24 h, 参考马原野等的方法,应用 Morris 水迷宫测定大鼠空间学习记忆能力。定位航行实验(place-navigation): 用 60 s 内寻找到隐藏在水面下平台的时间(逃避潜伏期, escape latency) 表示,反应大鼠的学习能力;空间探索实验(spatial probe): 记录大鼠在 2 min 中内的游泳轨迹,计算其跨越平台次数,反应大鼠的空间记忆能力。每只大鼠实验 2 次。

2.5 海马突触素表达 大鼠经 Morris 水迷宫测试后,每组取 6 只用 2% 异戊巴比妥钠 ip 麻醉,开胸。以 100 mL 生理盐水经左心室灌注冲净体内血液,再用 4% 多聚甲醛 100 mL 灌注固定,开颅取脑。参照大鼠脑立体定位图谱,取含海马的脑组织,脱水、包埋,并连续冠状切片(厚 4 μm),每间隔 20 μm 取一海马组织结构完整的切片,每鼠取 6 张,按免疫组化染色试剂盒说明操作(亲和素-生物素复合物法)。实验同时设阴性对照,除磷酸缓冲液替代一抗外,其他染色步骤相同。Leica-Qwin 细胞图象分析系统观察海马突触素表达产物,相同光学条件下在每张切片的 CA1 区和 CA3 区随机各取 3 个视野拍照(×100, ×400), Image-Pro Plus 软件计算每张照片突触素表达产物的平均积分吸光度(A)。

2.6 电镜样品制备及定量分析 每组余 6 只大鼠,同 2.5 灌注固定,开颅取脑。参照脑立体定位图谱,取海马 CA1, CA3 区经戊二醛、锇酸双固定,丙酮梯度脱水,浸透、包埋、切片(厚 700 Å), 3% 柠檬酸铅 + 1% 醋酸铀双重染色后,在日立 H-600 透射电镜下观察。电脑采集图片。电脑自左上往右下顺序采集图片 12 张,放大倍数均 3 万,每组测定 72 张电镜照片。参照突触体视学铜网格法^[4-5] 计算突触数密度(numerical density, Nv, 个/μm³)、突触连接带面密度(surface density, Sv, μm²/μm³)。

电镜下突触的辨认标准: 可见突触前后膜;

突触间隙; 可见突触后致密带。

2.7 数据统计 所得数据均用 SPSS 16.0 for windows 软件统计处理, Morris 水迷宫实验结果采用单因素方差分析 (ONEWAY ANOVA)、突触素 A 值比较及突触体视学分析结果用非参数检验等。所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 Morris 水迷宫实验 由表 1 数据可见: 与 NS 对照组比较, 模型组的平均潜伏期(反映大鼠记忆能力)显著升高 ($P < 0.01$), 跨越平台次数(反映大鼠空间学习能力)显著降低 ($P < 0.01$), 而经过 GLP 高、中剂量治疗后, 上述指标发生逆转, 且与模型组比较, 有显著差异(均 $P < 0.01$); 这提示 GLP 高、中剂量能明显增强阿尔茨海默病大鼠学习记忆能力。

3.2 海马内突触素的表达 在 CA1 和 CA3 区, 镜下见生理盐水组突触素表达阳性产物颗粒粗大密集、沉积成带并呈浅褐色或棕黄色点状; 且定量结果显示, 与 NS 对照组比较, 模型组突触素的平均 A 均明显降低 ($P < 0.01$); 经 GLP 高、中剂量治疗后, 该数值显著增高 ($P < 0.01$), 接近对照组(详见表 2,

图 1)。

表 1 各组大鼠 Morris 水迷宫实验结果 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	平均潜伏期 /s	跨越平台次数 /次
NS对照	-	31.23 ±2.13	11.06 ±1.03
模型	-	45.84 ±3.12 ¹⁾	6.13 ±0.86 ¹⁾
GLP	75	32.16 ±1.96 ²⁾	10.89 ±1.01 ²⁾
	50	30.28 ±2.01 ²⁾	10.76 ±0.98 ²⁾
	25	44.13 ±2.76	6.34 ±0.86

注: 与生理盐水组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

表 2 各组大鼠 CA1 和 CA3 区突触素 A 值比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	CA1 区	CA3 区
NS对照	-	0.44 ±0.03	0.41 ±0.04
模型	-	0.24 ±0.03 ¹⁾	0.21 ±0.05 ¹⁾
GLP	75	0.43 ±0.04 ²⁾	0.40 ±0.03 ²⁾
	50	0.41 ±0.04 ²⁾	0.39 ±0.04 ²⁾
	25	0.23 ±0.03	0.20 ±0.02

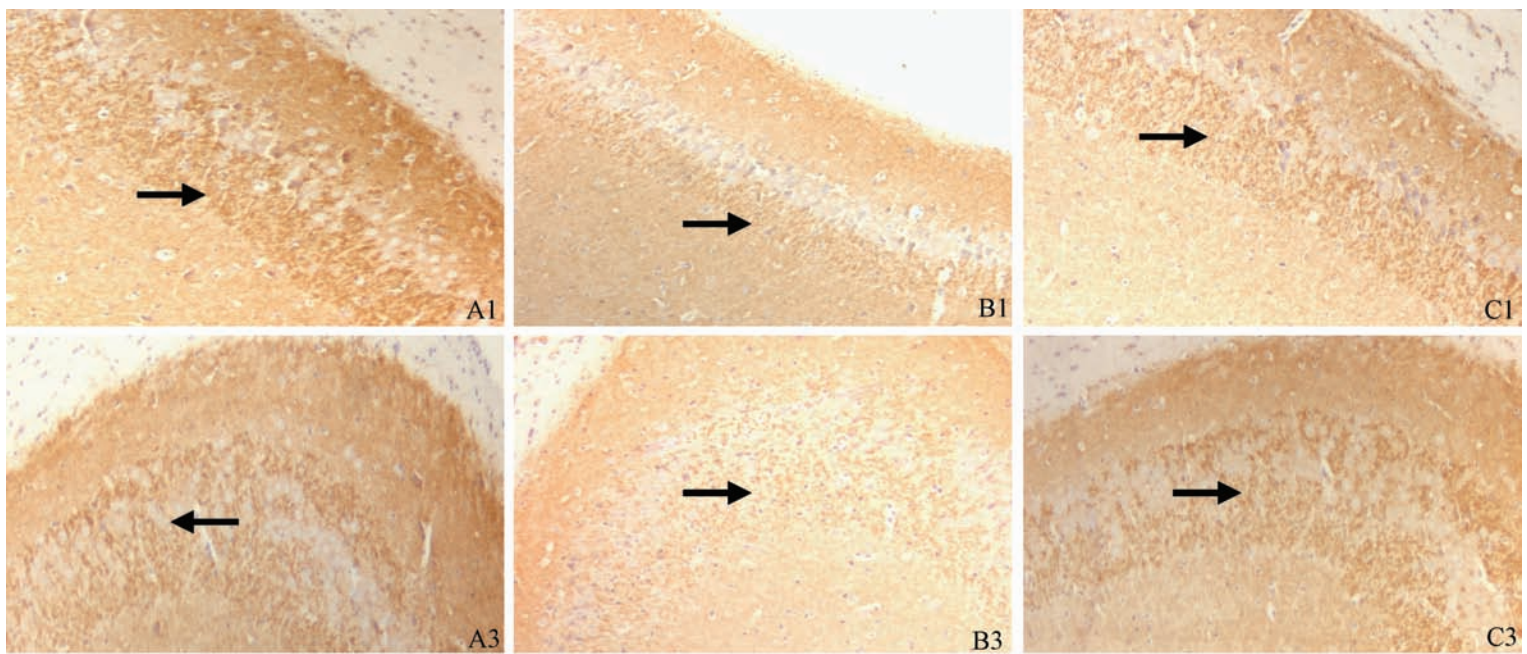


图 1 海马 CA1, CA3 区突触素表达结果(免疫组织化学染色, ×200)

“ ”指示突触素表达阳性产物; CA1: A1, B1, C1; CA3: A3, B3, C3; A1, A3: NS 对照组; B1, B3: 模型组;

C1, C3: 灵芝多糖 75 mg·kg⁻¹组

表 3 各组 CA1 和 CA3 区大鼠突触体视学分析结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	CA1		CA3	
		Nv/个/μm ³	Sv/μm ² /μm ³	Nv/个/μm ³	Sv/μm ² /μm ³
NS对照	-	1.466 ±0.366	0.105 ±0.032	1.036 ±0.269	0.056 ±0.017
模型	-	0.702 ±0.353 ¹⁾	0.066 ±0.036 ¹⁾	0.465 ±0.220 ¹⁾	0.031 ±0.014 ²⁾
GLP	75	1.456 ±0.365 ³⁾	0.104 ±0.403 ³⁾	1.042 ±0.221 ³⁾	0.052 ±0.021 ⁴⁾
	50	1.443 ±0.336 ³⁾	0.103 ±0.412 ³⁾	1.039 ±0.236 ³⁾	0.053 ±0.020 ⁴⁾
	25	0.737 ±0.278	0.069 ±0.358	0.493 ±0.213	0.032 ±0.019

注: 与生理盐水比较¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较³⁾ $P < 0.01$, ⁴⁾ $P < 0.05$ 。

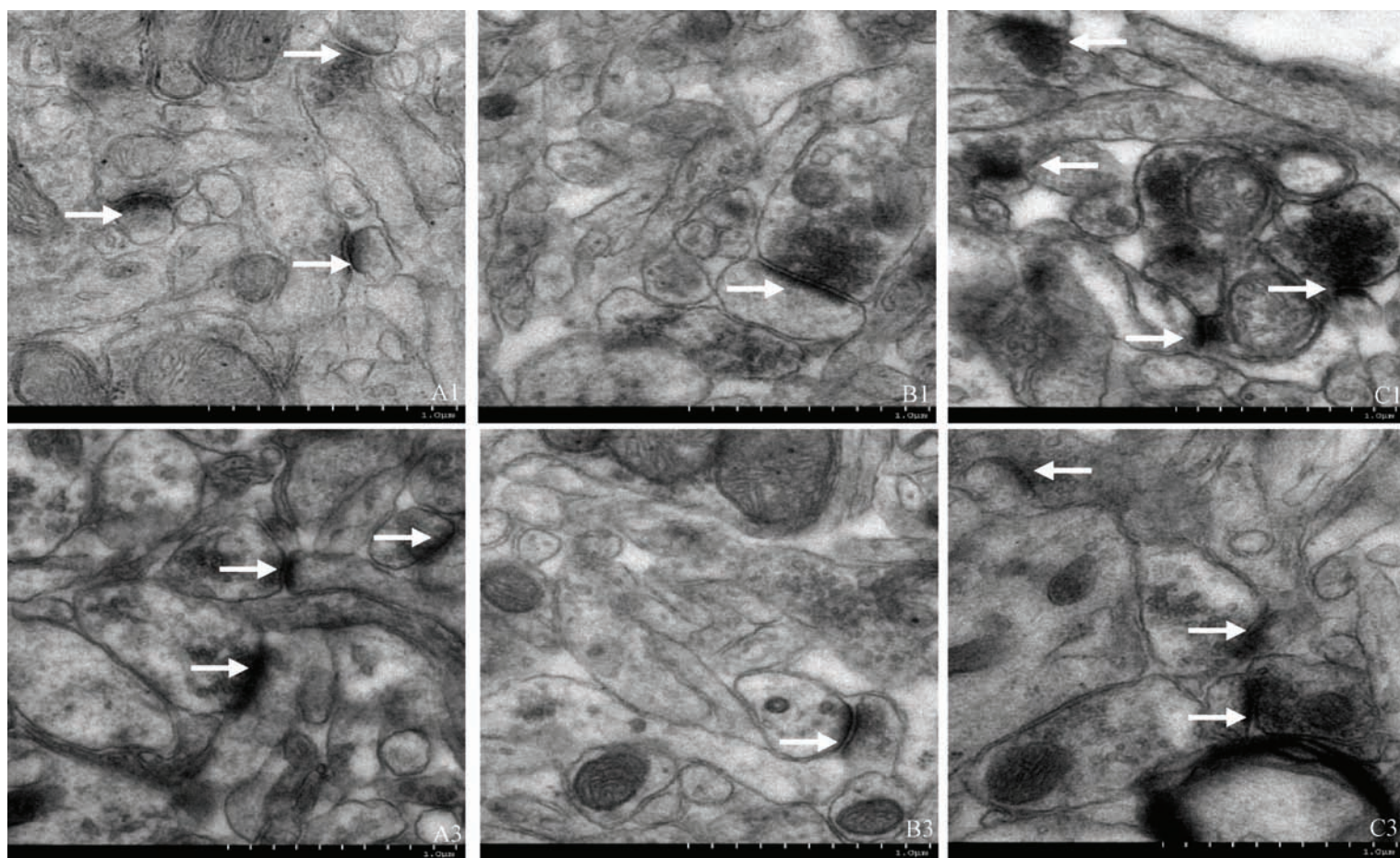


图 2 海马 CA1, CA3 区突触数目变化($\times 30\ 000$)

“ ”指示突触; CA1: A1, B1, C1; CA3: A3, B3, C3; A1, A3: NS 对照组; B1, B3: 模型组; C1, C3: 灵芝多糖 $75\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组

3.3 海马突触体视学定量分析 与 NS 对照组比较, 模型组 CA1, CA3 区突触数目明显减少, 且定量结果 N_v 和 S_v 均降低 ($P < 0.01$ 或 0.05); 经 GLP 高、中剂量治疗后, N_v , S_v 增高 ($P < 0.01$ 或 0.05), 亦接近对照组(详见表 3, 图 2)。

4 讨论

本实验选用经典的 Morris 水迷宫实验检测 A₂₅₋₃₅ 致 AD 大鼠学习记忆的能力; 结果, 模型组大鼠平均潜伏期显著升高, 而跨越平台次数减少, 通过灵芝多糖治疗后, 上述指标均逆转且接近 NS 对照组, 这提示灵芝多糖具有明显增强此大鼠学习记忆能力的作用; 这与张跃平等得出的结果一致^[6]。又通过免疫组织化学染色及透射电镜法对各组大鼠海马 CA1, CA3 区突触和突触素表达进行分析, 结果显示, 模型组大鼠突触的数密度、面密度及突触素表达产物平均 A 明显低于 NS 对照组, 说明在 A₂₅₋₃₅ 致 AD 大鼠学习记忆能力下降的同时伴有突触数量及突触素表达的降低(与姚柏春^[11]的研究发现一致), 而通过灵芝多糖治疗后, 此数值又逆转性升高; 最值得注意的是, 突触数量及突触素表达的上升与 AD 大鼠的学习记忆能力被增强是同步的, 说明二者变化的量效关系有一定的相关性。

那么, AD 大鼠突触数量及突触素表达发生了降低, 而经灵芝多糖治疗后又升高至正常水平的变化, 可能的原因是什么呢? 大量的生化, 电生理等研究

表明, 突触是学习记忆功能与脑内神经信息传递的关键结构^[7], 突触丧失是与 AD 认知功能下降关系最密切的神经生物学因素。突触素是分布在突触囊泡上的一种膜蛋白, 与突触结构和功能密切相关, 用以反映突触的分布和密度, 是突触重建和突触功能的重要标志之一; 安思训、宿宝贵等报道^[8-9] 大鼠学习记忆能力增强时其海马 CA1, CA3 区突触素表达升高、细胞轴突发生出芽等。又存在于海马内的三突触回路是与学习记忆形成密切相关的结构^[10]。故我们推测, 一定浓度的灵芝多糖能使三突触回路内嗅皮层通过穿通纤维与齿状回颗粒细胞形成的突触联系增加, 促使颗粒细胞发出苔状纤维增强 CA3 锥体细胞神经元突触前膜功能, 使突触素免疫活性增高, 进而调节神经元突起延伸、分化出轴突, 并出芽形成许多侧枝, 进而形成新的突触连接, 使突触数目、突触连接面增加及突触素表达升高; 再由 CA3 锥体细胞发出的 Schaffer 侧枝使 CA1 锥体细胞发生与 CA3 类同的变化。这与我们的实验结果——灵芝多糖能使 AD 大鼠海马 CA1, CA3 突触数量及突触素表达增加相一致。那么灵芝多糖增加大鼠海马 CA1, CA3 突触数量及突触素表达的分子机制如何呢? 又能否使齿状回等海马内其他结构发生上述改变呢? 有待进一步研究。

综上, 灵芝多糖能显著升高 AD 大鼠海马内降低的突触素/突触, 此可能是其增强大鼠学习记忆产

白芍提取物对嗅球损毁抑郁模型大鼠 行为学及下丘脑-垂体-肾上腺轴的影响

王景霞, 张建军*, 苗春平, 刘妍, 林清, 陈振振
(北京中医药大学, 北京 100029)

[摘要] 目的: 研究白芍提取物对嗅球损毁抑郁模型大鼠行为学及下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴的影响。方法: 将嗅球损毁大鼠随机分为对照组、模型组、阳性药氟西汀 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组以及白芍提取物 $70, 35, 17.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组, 采用敞箱法、跳台法观察嗅球损毁大鼠的行为变化, 同时用放免法分析白芍提取物对嗅球损毁大鼠下丘脑促肾上腺皮质激素释放素(CRH)、垂体促肾上腺皮质激素(ACTH)和血清皮质酮(CORT)含量的影响。结果: 大鼠嗅球损毁后敞箱行为出现明显变化, 水平运动和垂直运动显著增加, 白芍提取物中、高剂量组可显著降低大鼠水平运动和垂直运动的得分; 跳台试验中, 造模后大鼠训练期和测试期的错误次数显著增加, 白芍提取物中、高剂量组能显著降低嗅球损毁大鼠训练期和测试期的触电次数; 嗅球损毁大鼠下丘脑 CRH, 垂体 ACTH, 血清 CORT 含量明显增加, 白芍提取物中、高剂量组能显著降低嗅球损毁大鼠 CRH, ACTH, CORT 的含量。结论: 白芍提取物能明显改善嗅球损毁大鼠的行为活动, 并且对嗅球损毁大鼠亢进的 HPA 轴功能的调整作用是白芍提取物治疗抑郁症的机制之一。

[关键词] 白芍; 嗅球损毁; 促肾上腺皮质激素释放素; 促肾上腺皮质激素; 皮质酮

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)03-0155-04

Influences of Extract of Peony Radix Alba on Behavior and Hypothalamic-pituitary-adrenocortical Axis in Depressive Rats Model with Damaged Olfactory Bulb

[收稿日期] 20100714(003)

[第一作者] 王景霞, 医学博士, 副教授, 研究方向: 疑难疾病防治的中药用药规律, Tel: 010-64287006, E-mail: wjx117@sohu.com

[通讯作者] * 张建军, 医学博士, 副研究员, 研究方向: 疑难疾病防治的中药用药规律, Tel: 010-64286993, E-mail: zjj59@163.com

生抗痴呆作用机制之一; 本实验结果从形态学角度为灵芝多糖的临床应用提供一定的理论依据。

[参考文献]

- [1] 姚柏春, 邓兆宏, 孙天敏, 等. A₁₋₄₀ 诱导大鼠海马突触体素和突触数量的变化[J]. 中国现代医学杂志, 2007, 17(2): 153.
- [2] 刘薇. 医学体视学在小儿神经疾病研究中的应用[J]. 脑与神经疾病杂志, 2003, 11(3): 192.
- [3] 杨春. 突触素的若干研究[J]. 河南医学研究, 2004, 13(1): 85.
- [4] 王怀星, 姚志彬, 顾耀铭, 等. 老年性记忆减退大鼠内侧隔核突触结构的改变[J]. 神经解剖学杂志, 2000, 16(1): 40.
- [5] 郑富胜. 细胞形态立体计量学[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1990: 36.

- [6] 张跃平, 袁华, 黎莉, 等. 灵芝多糖对 AD 模型大鼠海马组织 Caspase-3 和 FasL 表达的影响[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2008, 17(5): 484.
 - [7] Bouren J N, Hanis K M. Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines[J]. Annu Rev Neurosci, 2008, 31: 47.
 - [8] 安思训. 大鼠学习记忆时 CA3 区突触素免疫阳性产物的变化及突触出芽表达[J]. 中国老年学杂志, 2005, 12(25): 1511.
 - [9] 宿宝贵, 潘三强, 韩辉, 等. 大鼠海马结构在空间辨别性学习记忆时突触素表达的变化[J]. 中国病理生理杂志, 2000(5): 421.
 - [10] Remondes M, Schuman E M. Molecular mechanisms contributing to long-lasting synaptic plasticity at the temporoammonic-CA1 synapse[J]. Learn Mem, 2003, 10(4): 247.
- [责任编辑 聂淑琴]