

黄精多糖对 APP 转基因小鼠海马 CA1 区突触结构的影响

成威¹, 田伟², 李友元^{3*}, 邓洪波³, 张萍³

(1. 湘潭市中心医院, 湖南 湘潭 411100; 2. 河南许昌市人民医院, 河南 许昌 461000;
3. 中南大学湘雅二医院老年病科, 长沙 410011)

[摘要] 目的: 探讨黄精多糖 (polygona-polysaccharose, PP) 对 APP 转基因小鼠海马 CA1 区突触结构的影响及其可能机制。方法: 26 只 APP 转基因小鼠, 随机分为空白对照组 ($n=8$)、低剂量黄精多糖治疗组 ($n=9$) 和高剂量黄精多糖治疗组 ($n=9$)。采用不同浓度黄精多糖溶液对治疗组 APP 转基因小鼠连续 ig 45 d 后, 取海马 CA1 区组织在透射电镜下观察, 对其突触的数量、面积、变性程度及其含有突触小泡数量进行体视学分析。结果: 黄精多糖治疗组突触数量增多 ($P<0.01$); 突触截面积减小且变性程度减轻 ($P<0.01$); 突触中突触小泡数量增多 ($P<0.01$); 改善程度具有一定量效关系。结论: 黄精多糖能保护 APP 转基因小鼠海马 CA1 区突触结构。

[关键词] 黄精; 多糖类; 小鼠; 转基因; 突触; 海马; 体视学

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)10-0165-03

Effects of Polygona-polysaccharose upon Synapse Structure in Hippocampus s CA1 Region of APP Transgenic Mice

CHENG Wei¹, TIAN Wei², LI You-yuan^{3*}, DENG Hong-bo³, ZHANG Ping³

(1. Xiangtan Central Hospital, Xiangtan 411100, China; 2. First People's Hospital of Xuchang, Xuchang 461000, China; 3. Xiangya Second Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of polygona-polysaccharose (PP) upon the synapse structure in hippocampus s region of APP transgenic mice and the related mechanism. **Method:** Different concentrations of PP solution were Ig given to APP transgenic mice daily for 45 consecutive days, then tissues of hippocampus s CA1 region were observed through transmission electron microscope (TEM), and stereology was adopted to analyze the quantity, sectional area and degeneration of its synapse and the alteration of the quantity of the synapse vesicles involved. **Result:** The PP treated groups exhibited an obvious increase in synapse quantity ($P<0.01$), a decrease in synapse sectional area and degeneration degree, and an increase in synapse vesicles quantity, and the improvement of its synapse had dose-effect relation to some extent. **Conclusion:** PP is beneficial for the improvement of the synapse structure in hippocampus s CA1 region of APP transgenic mice.

[Key words] polygonatum; polysaccharides; mice, transgenic; synapse; hippocampus; stereology

阿尔茨海默病(AD) 又称老年痴呆, 临床上主要表现为记忆力和认知功能的损害, 神经元及突触的

丢失和变性是主要病理改变之一。海马是学习记忆的重要脑区, 突触是神经元之间连接以及信息传递的结构基础, 突触的可塑性变化与学习记忆行为密切相关。AD 患者海马 CA1 区神经元丢失尤其明显并伴有突触变性、突触及突触递质数量减少。有研究证实, 黄精口服液可通过改变海马突触的可塑性而改善血管性痴呆小鼠学习记忆力^[1]。本研究着重探讨黄精多糖对 APP 转基因小鼠海马突触结构的

[收稿日期] 20100116(008)

[第一作者] 成威, 硕士, 医师, 主要从事老年医学-抗衰老与内分泌方向研究, Tel: 15173238351, E-mail: powerchengwei@163.com

[通讯作者] * 李友元, Tel: 13907316386, E-mail: lyy6386@163.com

保护作用,为开发新的治疗 AD 药物提供理论基础。

1 材料

1.1 动物 26 只 12 月龄 APP 转基因小鼠由中国医学科学院实验动物中心提供,雌鼠 16 只,雄鼠 10 只,体重(28.6 ±4.4) g。

1.2 主要药品 黄精多糖冻干粉(pp,湖南省中医药研究院提供 批号 061209,每克相当于生药 30.3 g 纯度 97.0%,得率 3.3%)

1.3 主要设备 日立(HITACHI)H-7500 透射电子显微镜(日本日立公司),图像分析处理系统(德国 Soft Imaging System GmbH)

2 方法

2.1 动物的分组及干预 26 只 APP 转基因小鼠随机分为 3 组,空白对照组(BG)8 只、pp 低剂量组(LDG)9 只 1 pp 高剂量组(HDG)9 只。每日清晨分别 ig 1 mL 无菌注射用水、4% 黄精多糖溶液(取黄精多糖冻干粉 4 g 加入无菌注射用水 100 mL,剂量为 1 g·kg⁻¹·d⁻¹)、16% 黄精多糖溶液(剂量为 4 g·kg⁻¹·d⁻¹) ig,每日 1 次,连续 45 d。

2.2 电镜标本的取材及制作 每组随机选取 3 只 APP 转基因小鼠,4% 多聚甲醛快速灌注后,按照海马分区图谱,每只快速取左侧海马 CA1 区(1 ×2 ×2) mm³ 组织块 3 块,常规电镜包埋及铀铅双染色等,每个标本制成切片厚度为 60 nm 的铜网 2 张。

2.3 电镜标本的拍照及体视学方法 采用日立 H-7500 透射电子显微镜,在 40 000 倍数下,选择神经毡部位,双盲情况下每组随机拍照 40 张。在每组 40 张相片中,随机选择结构完整的突触 120 个,按 Gundersen 法则^[2]计数每张相片中 Gray1 型突触^[3]的数目;采用德国 Soft Imaging System GmbH 图像分析软件测量 Gray1 型突触截面积及周长,采用魔棒自动测量突触小泡的总面积。按以下体视学方法计算突触的面数密度(Numerical density on area, N_a)、截面积(profile area, A)、比表面(specific surface,)以及突触中突触小泡的体密度(volume density, V_v)。体视学方法^[4]为: $\bar{V}_v = 4 / \pi \times B_x / A_x$; $N_a = N_x / A_r$; $V_v = A_x / A_r$ (B_x 为粒子周长; A_x 为粒子截面积; π 取 3.14; A_r 为参照系截面积, N_x 为参照系中颗粒截面数目)

2.4 统计学方法 使用 SPSS13.0 软件进行数据处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用 LSD- t 检验,多组间均数比较用 SNK- q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 突触的面数密度 N_a 表示在参照系单位面积内突触截面的数目,反映相同面积内突触数量的多少。每组 40 张相片,设定 100 μm^2 为参照系截面积。如表 1 所示:LDG, HDG 两组突触 N_a 均较 BG 多,且 HDG 增多更明显,各组之间差异有统计学意义($P < 0.01$)。结果提示:黄精多糖可增加 APP 转基因小鼠海马 CA1 区突触数量,并且 HDG 更显著。

表 1 黄精多糖对 APP 转基因小鼠海马 CA1 区突触 N_a 的影响
($n = 40$, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	N_a (个/100 μm^2)
空白对照	-	21.86 ±5.09
黄精多糖	1	44.38 ±11.30 ²⁾
	4	51.59 ±13.71 ^{2,3)}

注:与空白对照组相比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与黄精多糖低剂量组相比³⁾ $P < 0.01$ (下同)

3.2 突触的截面积和比表面 用来描述突触肿胀、扩张或固缩等形态变化,组织水肿变性时 A 增大,减少。如表 2 所示: BG 中突触的 A 最大,与 LDG 及 HDG 比较有统计学意义($P < 0.01$),LDG 及 HDG 突触的 A 比较尚不认为有统计学意义。 BG 中突触 A 最小,与 LDG 及 HDG 比较有统计学意义,LDG 及 HDG 突触 A 比较尚不认为有统计学意义。结果提示:黄精多糖可减轻突触水肿变性程度。

表 2 海马 CA1 区突触 A 及 定量分析($n = 120$, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	$A / \mu\text{m}^2$	
空白对照	-	0.44 ±0.15	0.0078 ±0.0030
黄精多糖	1	0.31 ±0.09 ²⁾	0.0087 ±0.0025 ¹⁾
	4	0.31 ±0.09 ²⁾	0.0083 ±0.0025 ¹⁾

3.3 突触小泡的体密度 V_v 表示突触小泡体积与所处突触体积之比,反映突触中突触小泡含量的多少。如表 3 所示黄精多糖 2 个剂量组中突触小泡 V_v 大于空白对照组,且 HDG 组更显著,各组间 V_v 比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。结果提示:黄精多糖可增加突触中突触小泡的含量,HDG 更显著。

表 3 海马 CA1 区突触小泡 V_v 参数定量分析($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	V_v
空白对照	-	0.19 ±0.10
黄精多糖	1	0.24 ±0.09 ²⁾
	4	0.28 ±0.12 ^{2,3)}

3.4 黄精多糖对 APP 转基因小鼠海马 CA1 区类触结构的影响 海马 CA1 区透射电子显微镜下突触结构见图 1。

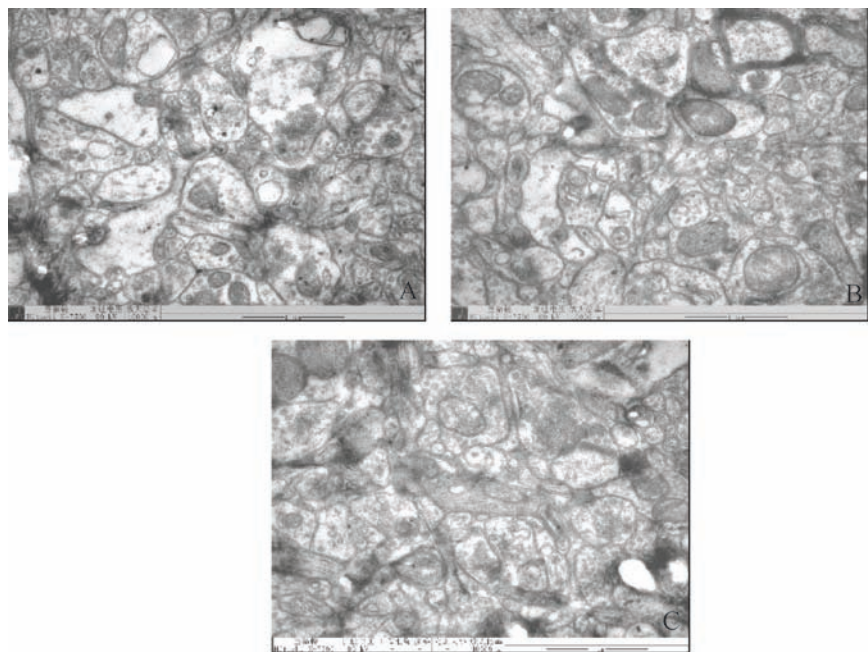


图 1 海马 CA1 区电镜下类触结构 (×40 000)

A. 空白对照组, 突触数量较多、结构相对清晰、水肿程度较轻、截面大小适中, 突触小泡的数量较多, 分布较均匀; B. 黄精多糖 $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组, 突触数量少、结构欠清、截面积增大、可见水肿变性, 突触小泡数量较少甚至消失, 部分突触小泡异常团聚; C. 黄精多糖 $4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组, 突触数量多、形态完整、结构清楚、水肿程度轻、截面大小适中, 突触内可见大量分布较均匀、结构清晰、圆形清亮的突触小泡。

4 讨论

突触是神经元之间及神经元与效应器之间相互接触并实现信息传递和功能联系的部位, 改善海马突触可塑性可以增强学习记忆能力。黄精多糖具有延缓衰老、抗炎、抗自由基损伤、调节免疫^[5]等作用。已有研究表明: 黄精能重塑血管性痴呆小鼠海马突触的结构与功能, 增强记忆力^[11]。

本研究结果提示: 黄精多糖治疗组 APP 转基因小鼠海马 CA1 区 Gray1 型突触的截面积减小、比表面增大, 说明突触结构水肿变性程度减轻, 提示黄精多糖可以通过减轻突触结构的水肿变性程度、改善突触结构重塑性来保护突触结构功能; 黄精多糖治疗组 APP 转基因小鼠海马 CA1 区 Gray1 型突触数量及突触中突触小泡的含量显著增加, 说明黄精多糖能减少 APP 转基因小鼠海马 CA1 区 Gray1 型突触及突触小泡的丢失, 增加突触及神经递质的数量, 促进 APP 转基因小鼠突触中神经递质的产生和储备, 使突触处于更活化状态, 从而增强 APP 转基因小鼠的神经元之间或神经元与效应器细胞之间以突触小泡为神经递质的信息传递和功能联系, 使突触能更好地发挥信息传递功能; 黄精多糖增加突触及突触小泡数量、重塑突触结构的作用具有一定的量效关系。

黄精多糖对突触保护作用的可能机制有: 改善轴突漏功能: 有研究提示轴突漏(axonal leakage)可能

在 AD 的发病机制和认知的改变上起到关键性的作用^[6], 轴突漏使轴突中神经递质等多种成分从轴突漏出, 使远端轴突、突触营养不良和末梢神经递质减少。本研究发现黄精多糖能减轻水肿变性, 增加突触及其含突触小泡数量, 故认为黄精多糖有改善轴突漏功能。减轻氧化损伤和炎症: 氧化损伤和炎症反应被认为是导致 AD 的重要因素^[7]。黄精多糖中有较高含量的硒, 而硒有抗氧化、清除自由基等作用。研究发现黄精多糖能降低氧自由基水平、减轻炎症反应^[8-9]。本研究发现黄精多糖能减轻突触水肿变性, 故认为黄精多糖可能有减少氧自由基的产生及减轻中枢神经系统的炎症反应和氧化损伤的作用。

综上所述, 黄精多糖对 APP 转基因小鼠海马 CA1 区突触结构有保护作用, 且具有一定的量效关系。其机制可能与黄精多糖减少氧化损伤及炎症反应, 防治轴突漏等作用有关。

[参考文献]

- [1] 赵小贞, 王玮, 康仲涵. 黄精口服液对血管性痴呆大鼠学习记忆与海马突触可塑性的影响[J]. 神经解剖学杂志, 2005, 21(2): 147.
- [2] Gundersen HJG. Notes on estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect [J]. Microsc, 1977, 111(2): 219.
- [3] He Y S, Yao Z B, Ga Y M, et al. NGF promotes collateral sprouting of cholinergic fibers in the septohippocampal cholinergic system of aged rats fimbria transaction [J]. Neurosci lett, 1991, 129(): 189.
- [4] 郑富盛, 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: 21, 39, 86.
- [5] 王和生, 林亚平, 齐敏友, 等. 黄精首乌有效部分均匀设计组合对高脂血症大鼠抗脂质过氧化的影响[J]. 中华中医药杂志, 2005, 20(8): 502.
- [6] Xiao Aiwu, Dai Jiapi. Axonal Leakage is a Key Neuropathological Change in Alzheimer's Disease [J]. Acta Med Univ Sci Technol Huazhong, 2006, 35(2): 277.
- [7] Akiyama H, Barger S, Barnum S, et al. Inflammation and Alzheimer's disease [J]. Neurobiol Aging, 2000, 21(3): 383.
- [8] 张萍, 刘丹, 李友元. 黄精多糖对动脉粥样硬化家兔血清 IL-6 及 CRP 的影响 [J]. 医学临床研究, 2006, 23(7): 1100.
- [9] 李微, 彭锐, 唐理斌, 滇黄精对大鼠脑缺血再灌注损伤神经元的作用 [J]. 大理学院学报, 2006, 5(10): 19.

[责任编辑 聂淑琴]