

七宝美髯丹对老龄鼠神经元超微结构和突触界面结构影响的研究

瞿延晖¹, 文昌湖¹, 张六通², 梅家俊², 徐锡萍³, 文乐兮¹, 谭功恩¹

(1 湖南中医学院, 长沙 410007; 2 湖北中医学院, 武汉 430061; 3 中南大学湘雅医学院, 长沙 410007)

摘要: 探讨七宝美髯丹对老龄鼠前额皮质、海马 CA₁ 区神经元超微结构和突触界面结构参数的影响, 与老年组比较, 七宝美髯丹组神经元脂褐素含量减少, 细胞膜及线粒体结构清晰。老年对照组粗面内质网脱颗粒, 胞浆聚集, 脂褐素电子密度增大, 核糖体与粗面内质网减少, 神经元与线粒体平均密度降低, 线粒体平均体积明显增加且肿胀, 而且空泡化。海马 CA₁ 区突触后膜致密物质(PSD), 活性区长度与突触界面曲率显著增大, 突触间隙宽度显著变窄。

关键词: 七宝美髯丹; 衰老; 前额皮质; 超微结构; 突触

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2002)04-0024-04

Experimental Study of Qibaomeirandan on Ultrastructure and Synapse Interface Configuration of Neurons in Aged Mice

QU Yan-hui¹, WEN Chang-hu¹, ZHANG Liu-tong², MEI Jia-jun², XU Xi-ping³, WEN Le-xi¹, TAN Gong-en¹

(¹Hunan College of TCM, Changsha, 410007; ²Hubei College of TCM, Wuhan, 430061,

³Xiangjia Medical College, Changsha, 410007)

Abstract: To explore the effect of Qibaomeirandan on the ultrastructure changes of prefrontal cortex and Synapse interface Configuration in hippocampus CA₁ area in aged mice, we used electron microscopy observing structural changes in hippocampus CA₁ area. The content of lipofuscin in the neurons region of the experiment group was reduced as compared with that of the aged group. The structure, such as membrane, ridges, of the mitochondrion was clearly seen in hippocampus neuron in Qibaomeirandan group. The average density of neurons in the forehead cortex and CA₁ hippocampus area showed shrinkage with the aging. So were the number of ribosomes and rough endoplasmic reticulum. The mitochondrion average volume showed some increase with aging. Postsynaptic density, active zones, curvature of synaptic interface, showed some increase and the synaptic cleft width showed some decrease with aging.

Key words: Qibaomeirandan; Senescence; Prefrontal cortex; ultrastructure; Synapse

七宝美髯丹为传统抗老延年名方。原方为明·李明珍《本草纲目》引自明·万密斋《积善堂方》。功用为：“补肾元，乌须发，延年益寿。治血气不足，羸岫周痹，肾虚无子，消渴，淋漓，遗精，崩带”等。本研究为该方对老年大鼠前额皮质、老年小鼠海马 CA₁ 区神经元超微形态和突触界面结构的影响，探索其对老年神经形态学的作用。

1 材料与方方法

1.1 大鼠前额皮质神经元超微结构实验 动物: Wistar 雄性大白鼠, 18 月龄(设为老龄)和 4 月龄(设为青龄), 体重分别为 500g ± 15g、200g ± 10g, 由武汉同济医科大学动物实验中心提供。分组: 老龄大白鼠随机分为七宝美髯丹组、VE 组、空白对照组, 另设青龄空白对照组, 共 4 组, 每组均为 10 只大鼠。给药: 按大鼠与人体表面积计算等效给药, 七宝美髯丹 9.375g/kg, VE 0.037g/kg, 老、青空白组给予生理盐水。灌胃容量为 10ml/kg, 1 次/日, 连续 90d。电镜标本取材与制作: 断头处死大鼠并迅速取出大脑组织, 置冰桌上切取右侧前额皮质 1 × 1 × 2mm³, 4% 戊二醛固定, V 型超薄切片, 铅、铀染色。放大 1.7~ 2.5 万倍观察。每标本随机摄片 10 张以作图象分析。

1.2 小鼠海马 CA₁ 区神经元超微结构与突触结构参数实验 动物: 昆明雌性小鼠, 清洁级, 15 月龄(设为老龄)和 4 月龄(设为青龄), 体重分别为 36 ± 2g、20 ± 2g, 均由湖南医科大学医学实验动物研究中心提供。分组: 老龄小鼠随机分为七宝美髯丹组、抗脑衰胶囊组、尼莫通组、老龄空白对照组, 另设青龄空白对照组, 共 5 组, 每组均为 12 只小鼠。给药: 按小鼠与人体表面积计算等效给药, 七宝美髯丹 50g/kg, 抗脑衰胶囊 16.4g/kg, 尼莫通 0.82g/kg, 老、青空白组给予蒸馏水。灌胃容量为 20ml/kg, 1 次/日, 连续 90d。电镜标本制作与取材: 腹腔注射戊巴比妥钠

(45mg/1000g) 将小鼠深度麻醉, 经左心室-主动脉灌注磷酸缓冲液(PBS 0.1mol/L, pH7.4) 50ml 冲洗血管, 继之以 200ml 磷酸缓冲液与 2% 多聚甲醛和 2.5% 戊二醛的混合组织固定液灌注约 0.5h。迅速取脑, 切取整个脑组织投入 2.5% 戊二醛中固定约 0.5h。待脑组织稍硬后, 在 Olympus 立体显微解剖镜下, 取体积约 1 × 1 × 1mm 的右侧大脑海马组织。醋酸铀和硝酸铅双重染色。放大 2.0~ 2.5 万倍观察。每标本随机对神经元超微结构和突触分别摄片 10~20 张以作图象分析。

其中突触界面结构的检测方法: 以 HPIAS-1000 病理图像分析仪测量突触界面(Synapse interface) 的结构参数, 包括突触间隙(Synaptic cleft of synaptic gap) 的宽度、突触后致密物(postsynaptic density, PSD) 的厚度、活性区(Active zone) 长度与突触界面曲率(Synapse interface curvature)。并计算突触界面曲率比值(计算公式: 曲率比值 R = 弧长/弦长)^[1]。

1.3 药物 七宝美髯丹药物及其用药量比例: 何首乌: 牛膝: 补骨脂: 茯苓: 菟丝子: 当归: 枸杞 = 3: 1: 1: 1: 1: 1: 1。其中大鼠前额皮质神经元超微结构实验药材由湖北中医学院专家门诊部提供, 小鼠海马 CA₁ 区神经元实验药材由湖南省药材公司楚仁堂药号提供, 均按水提取法制备, 配成 100% 药物浓度, 4℃冰箱保存备用; 维生素 E(VE), 油剂, 由湖北中医学院附属医院药剂科提供, 加蒸馏水以超声震荡仪制为 1% 浓度混悬液; 抗脑衰胶囊, 唐山市龙山药业有限公司生产, 批号 981202; 尼莫通, 德国拜耳公司生产, 批号 483759。

1.4 仪器与试剂 HPIAS-1000 病理图像分析仪, 同济医科大学千屏影像工程公司; 日立 H-600 透射电镜; Olympus 立体显微解剖镜; LKB8800 超薄切片机; CPS-A 超声粉碎仪, 上海超声波仪器厂; TP-1000

电子天平,湘仪仪器厂;戊巴比妥钠、多聚甲醛、戊二醛、丙酮、钨酸、醋酸铀、硝酸铅均为分析纯。

1.5 统计学方法 方差分析,方差齐性检验,q检验。

2 结果

2.1 老年大鼠大脑额前叶皮质神经元超微结构

七宝美髯丹对神经元的染色质、核膜结构、粗面内质网、核糖体、脂褐素、线粒体和高尔基复合体均有明显改善作用,VE也有类似作用,但在核膜结构、线粒体、高尔基复合体等方面的改善作用明显不及七宝美髯丹(图1~4)

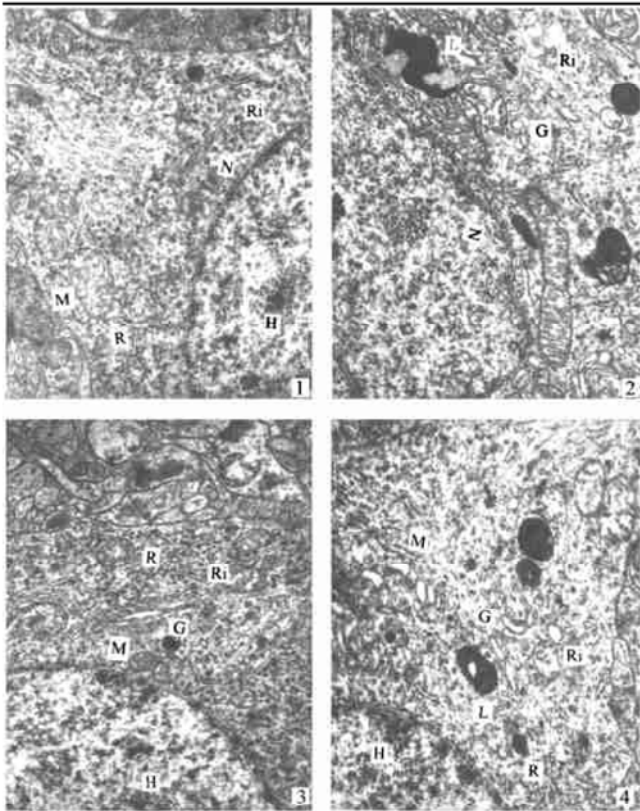


图1~图4 大鼠前额皮质神经元超微结构

图1 七宝美髯丹组:H基本正常,M、R、G结构较清楚,Ri丰富,×20000;图2 老年空白组:L、H多,核膜结构扭曲,M嵴一定程度断裂模糊,G一定程度肿胀,×1.7000;图3 青年空白组:各结构正常,×1.7000;图4 VE组:核膜结构模糊,H较多,M少且嵴断裂模糊严重,G断裂肿胀,×20000。

2.2 老年小鼠海马CA₁区神经元超微结构:七宝美髯丹对神经元细胞器超微结构的作用,与其对大鼠大脑额前叶神经元作用类似,表明本方具有较好改善衰老神经组织形态学的实验作用,结果的重复性与可靠性高。中药复方抗脑衰胶囊和尼莫通也有一定改善作用,但在核膜结构、线粒体、高尔基复合体及突触等方面的改善作用明显不及七宝美髯丹(图5~8)。

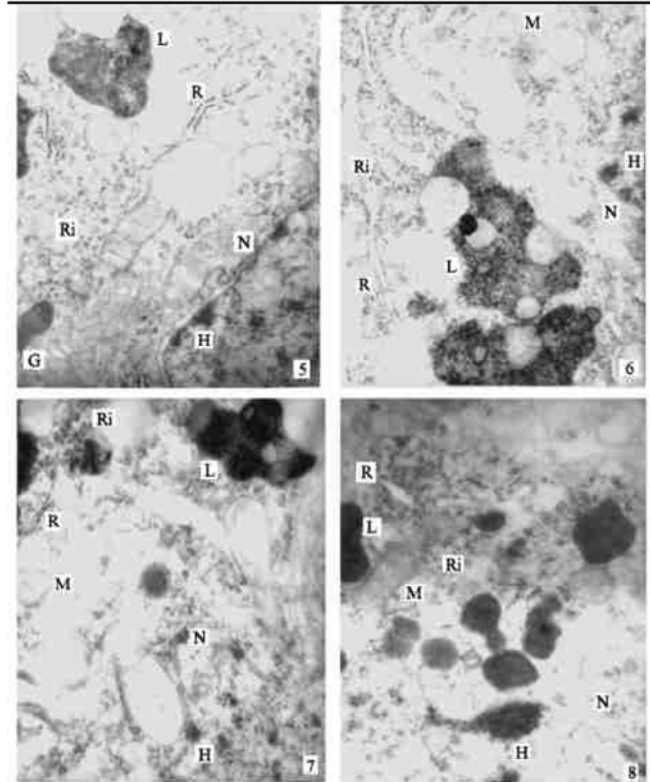


图5~图8 小鼠海马CA₁区神经元超微结构

图5 七宝美髯丹组:核膜M、R及其结构基本正常,R较丰富,有一定L,×25000;图6 抗脑衰组:L多,M、R少,G肿胀,×25000;图7 尼莫通组:核膜、G结构模糊扩张,M肿胀嵴模糊,×25000;图8 老年空白组:核膜M、G、R结构显著变形,Ri少,×25000

2.3 老年小鼠海马CA₁区突触结构参数:(见表1)

3 讨论

国内外研究发现,老年大脑神经组织具有明显组织退化及超微结构的形态改变,并是导致老年神经功能衰退与机体衰老的重要组织学基础。脑的衰老改变主要见于海马和大脑皮质,特别是海马中CA₁区是对脑老化最敏感的脑区^[2]。海马作为边缘系统的重要组成部分,是与学习、记忆等高级神经活动有关的重要核团和参与空间定位的重要中枢。前额皮质是大脑完成认知(Cognition)任务的重要脑区之一,前额皮质接受经次级感觉旁联合皮质加工过的更精确的感觉信息,并依此制定运动的步骤。在工作记忆(Working memory)、联想记忆(Associative memory)和辨认记忆(Recognition memory)中,前额皮质区尤其是工作记忆的关键脑皮质区,当前额皮质受到损害时,记忆能力中的空间短时记忆、动作顺序中的策划和实施能力都会受到损害或丧失^[3]。脑神经科学的重要研究成果之一,是证实脑内突触(Synaptic)具有结构与功能上的可塑性(plasticity),并证实其是学习记忆的重要神经生物学机制^[4]。

表 1 各组老年小鼠海马 CA₁ 区突触结构参数($\bar{x} \pm s$)

n = 20

组别	突触后致密物厚度 (nm)	突触间隙宽度 (nm)	活性区长度(nm)	突触界面曲率
空白对照组	74.85 ± 12.20	21.11 ± 1.33	301.95 ± 51.05	1.0931 ± 0.0159
七宝美髯丹组	85.15 ± 12.68*	19.97 ± 1.22**	342.85 ± 48.36**	1.1103 ± 0.0084**
抗脑衰组	76.90 ± 10.81	20.86 ± 1.35	335.35 ± 40.91*	1.0986 ± 0.0163*
尼莫通组	75.95 ± 11.61	21.07 ± 1.58	328.30 ± 51.95	1.0933 ± 0.0051

注:与空白对照组比较,* P < 0.05,** P < 0.01

本研究结果显示,在老龄大鼠前额皮质和老龄小鼠海马 CA₁ 区这二部分的神经元超微结构中,脂褐素(Lipofuscin)含量多而且电子密度高,很多研究均提示,大脑神经元随增龄的组织与功能降低,与脂褐素积累有对应平行关系^[5];线粒体(Mitochondrion)平均体积的相对增大,数量减少,嵴断裂以及形成肿胀与空泡等形态学改变,与有关研究结果类似^[6];神经元核膜(Nuclear membrane)严重内陷,扭曲变形,深浅不一,而且多数较深,神经元细胞皱缩;异染声质(Heterochromatin)相对增多且边集,一般认为此是细胞退变前兆也是神经元老化的标志之一,粗面内质网(Rough endoplasmic reticulum)和高尔基复合体(Golgi complex)均出现断裂、扩张等损伤性变化,胞质内出现空泡、脂粒以及老年组粗面内质网分布较稀疏等现象,以及粗面内质网脱颗粒;核糖体(Ribosome)具有脱颗粒及游离核糖体减少的现象,这一变化也公认是反映细胞内蛋白质合成受抑制的形态学指标之一。而七宝美髯丹对以上老年神经元超微结构异常变化均有较好改善作用,并优于对照中、西药。另外,老年海马 CA₁ 区突触的连接间断,间隙不清,后膜肿胀,突触小泡大小不等,有些则聚集成堆远离突触前膜,而七宝美髯丹组的负向弯曲(凹型突触)突触数目较正向弯曲(凸型突触)多,突触后膜致密物质显著增厚,突触间隙显著变窄。抗脑衰胶囊与尼莫通也有一定改善,但不及七宝美髯丹。

尼莫通(Nimotop,有效成分为尼莫地平),是迄今在动物实验中改善记忆作用最强的药物,并在临床对老年痴呆等多种脑功能障碍性疾病有一定疗效^[7];VE为强抗氧化剂,国内外大量研究表明其具有一定抗衰老作用;抗脑衰胶囊为中成药,主要药物为人参、制何首乌、党参、丹参、黄芪、茯神、石菖蒲、远志、枸杞子、菊花、山药等,主要功效为补气活血、强肾健脑,用于神经衰弱、记忆力减退、老年痴呆等。本实验结果也表明以上药物均有一定改善小鼠老化

海马神经元超微形态结构的作用,由于其作用机理不一,而对老化神经元细胞器的改善,尤其是尼莫通,在不少方面的作用不及七宝美髯丹。而VE主要为抗氧化剂,其通过减轻自由基损伤的组织保护作用有限,则可能是其不及七宝美髯丹作用的重要原因之一。

我们的前期研究表明,有关抗衰促智中药有较好改善老年大鼠前额皮质超微结构与记忆力的作用^[8],本实验结果进一步表明,七宝美髯丹对老化神经元超微结构和突触界面结构均有良好改善作用,并可能是该方抗衰老以及改善老年学习记忆的重要神经生物学基础,揭示该方在防治衰老和改善老年记忆力方面或有着广阔的开发应用前景。

参考文献:

[1] 罗兰,陆汉新,吴馥梅,等.突触界面结构参数的定量分析法[J].南京大学学报(自然科学版),1990,26(4):690-694.

[2] 姚志彬.海马—研究神经科学的理想模型[J].广东解剖学通报,1989,11(1):17-19.

[3] 许绍芬.神经生物学[M].上海:上海医科大学出版社.第二版.1990.370-373.

[4] Desmond NL, Levy WB. Changes in numerical density of synaptic contracts with long-ostentation in the hippocampal dentate gyros[J]. Comp Neural, 1986, 253: 466-482.

[5] 徐晓红,王良斌,杨少伟,等.小鼠学习记忆行为与脑内脂褐素含量的关系[J].中华老年医学杂志,1998,17(2):80.

[6] 张兵,张家骥.大鼠海马 CA₁ 区锥体神经元在衰老过程中的超微结构变化[J].触剖学杂志,1995,11(3):249-251.

[7] 韩太真,吴馥梅.学习与记忆的神经生物学[M].北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1998.398-399.

[8] 瞿延晖,张六通,梅家俊.益寿康对大脑神经元超微结构影响的研究[J].中国中医药科技,1996,(3):31-32.