

# “脑还丹”对老龄去势大鼠海马 CA3 区及皮质神经元超微结构的影响

程志安<sup>1</sup>, 李庆明<sup>1</sup>, 李红毅<sup>2</sup>, 雷妮妮<sup>2</sup>, 吴玲霓<sup>2</sup>  
(1. 中山医科大学孙逸仙纪念医院, 广州 510120;  
2. 广州中医药大学附二院和电镜室, 广州 510507)

**摘要:** 目的: 采用透射电镜技术观察“脑还丹”对老龄去势大鼠海马 CA3 区及皮质神经元超微结构变化的影响。方法: 雌性 SD 大鼠卵巢切除后 7d 开始给药, 180 天处死, 常规灌注、固定、取材、切片、染色, 观察神经原和突触结构变化。结果: 模型组神经原内线粒体等细胞器出现明显的变性、坏死, 突触变性并间隙模糊不清, 脂褐素堆积; 雌激素组和“脑还丹”组未出现上述改变或改变明显减轻。

**关键词:** 神经原退行性变; 超微结构; 脑还丹

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2002)02-0031-03

## Effects of NaoHuanDan on Ultrastructure of Hippocampal CA3 and Brain Cortical Neurons in the Ovariectomized Rat

CHENG Zhi-an<sup>1</sup>, LI Qing-ming<sup>1</sup>, LI Hong-yi<sup>1</sup>, LEI Wei-wei<sup>2</sup>, WU Ling-ni<sup>2</sup>

(1. Memorial Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China;

2. Guangzhou University of Tradition Chinese Medicine, Guangzhou 510407, China)

**Abstract:** Our research objectivis to study the effect of NaoHuanDan on the ultrastructure of the hippocampal CA3 and brain cortical neurons in the ovariectomized rat by means of transmission electron microscopy. Forty female Sprague-Dawley rats were randomly divided into four groups: Control group, conjugated estrogen group, and NaoHuanDan groups, and experimental drugs or placebo were orally administrated per day for 6 months from day 7 of having been ovariectomized. The ultrastructure of hippocampal CA3 and brain cortical neurons' changes were observed under transmission electron microscope after routine perfusion, fixation, drawing materials, slicing up and staining. Results showed that there were obvious degeneration and necrosis in the mitochondrias and other organelles in the control group, accumulation of lipofucin in the cytoplasm. And degeneration of synapses and blurred of the synapse connection, but all these symptoms were significantly reduced after having been treated with conjugated estrogen and NaoHuanDan.

**Key words:** NaoHuanDan; Neuron retrograde affection; Ultrastructure

在临床工作的基础上,近年来我们开展了脑还丹防治脑老化的实验研究。根据肾虚是衰老主要原因的中医理论基础和“脑还丹”的立方精神<sup>[1]</sup>,我们选用了卵巢结扎<sup>[2]</sup>肾虚模型。用透射电镜技术结合图象分析对去势老龄大鼠海马 CA3 区 and 大脑皮质神经原及突触进行了定性研究,并在此基础上对“脑还丹”和雌激素抗衰老的作用进行了对比观察。拟从海马回和皮质神经原及突触超微结构变化观察肾虚

(雌激素缺乏)对脑老化的形态学影响。

### 1 材料

**1.1 实验用药** “脑还丹”由骨碎补 15g, 熟地 25g, 云苓 20g, 菖蒲 10g, 远志 8g 等药组成(原料购自广州市中药材公司),由孙逸仙纪念医院中药制剂室制剂。文火水煎 2h, 重复三次,将三次所得药液混合后浓缩至浓度为 10g/ml。

倍美力(共轭雌激素)由惠氏-立达(Wyeth-Led-erle)中国有限公司(苏州)提供,批号 9981395。戊巴比妥钠(上海行知化工厂,批号 921019);

**1.2 实验动物** 12 月龄 SD 大鼠,重 250~300g,由

收稿日期: 2001-08-07

基金项目: 广东省科委、中医药管理局科研基金资助课题 No: (99557)

中山医科大学动物实验中心提供。合格证号: 2000年粤检证字 00A005。

**1.3 实验仪器** JEM-1200EX型透射电镜, Olympus 立体显微解剖显微镜。

## 2 方法

**大鼠肾虚模型的建立** 十二月龄雌性 SD 大鼠, 重 250~300g。0.86% 的戊巴比妥钠按体重 43mg/kg 腹腔注射麻醉后, 按文献方法<sup>[2]</sup>, 在无菌条件下, 由背侧入路, 摘除双侧卵巢。术后第 1 2d 腹腔注射青霉素常规抗感染治疗。术后第二周开始喂药, 180d 处死大鼠。

**实验动物分组** 造模前称重, 并随机将实验大鼠分为模型对照组、雌激素(倍美力)组、“脑还丹”1、2组, 共 4 组, 每组 10 只大鼠。

**灌胃剂量** 造模后第 2 周开始喂药。“脑还丹”二个实验组分别按体重 10g 生药/kg, 40g 生药/kg 灌胃, 每日一次; 模型对照组每日灌生理盐水 2mL 一次; 雌激素组按体重 0.125mg/kg 灌胃, 每日一次。连续给药 6 个月。实验期间大鼠均自由摄食和饮水。

**电镜标本的制备** 大鼠脑经常规灌注、固定、取材后, 在 Olympus 立体解剖显微镜下参照大鼠脑图谱切取海马 CA3 区和皮质组织, 经双重固定后, 常规脱水, Epon812 包埋, LKP 超薄切片, 醛酸油、柠檬酸铅双重染色, JEM-1200EX 型透射电镜观察并拍片。

## 3 结果

**3.1 神经元的改变** 镜下可见雌激素组皮质及海马区胞核(N)表面光滑, 双层核膜清晰可辨。核内染色质以常染色质为主, 胞质内有中等量的线粒体(Mi)、多组高尔基器(Go)、众多的游离核糖体(FR)与为数不多的粗面内质网(RER)。海马区和皮质区的神经元超微结构形态相近似。模型组胞核(N)表面欠规则, 染色质有轻度凝聚变化, 部分核膜模糊不清, 且此病变以海马区明显, 胞质内的线粒体(Mi)较雌激素组明显减少。线粒体肿胀、脊减少、断裂或萎缩呈中空状。游离核糖体(FR)减少, 胞质中形成空的小区域。此外, 尚可见高尔基复合体核粗面内质网轻度扩张。脑还丹 1 组游离核糖体较模型对照组多, 胞质内无空泡区域。线粒体、高尔基器、粗面内质网核和模型组相近似。神经元形态在海马区与雌激素组相似, 在皮质区却和模型组相近似。脑还丹 2 组神经元形态及超微结构和雌激素组相近似。

**3.2 脂褐素(Lic)的变化** 雌激素组海马区和皮质

区镜下偶见脂褐素存在于细胞质中, 量较少。模型组皮质及海马区脂褐素较雌激素组显著增多。脑还丹治疗 1 2 组皮质及海马区脂褐素量和雌激素组接近。

**3.3 突触的变化** 突触由突触前部分、突触间隙及突触后部分三者组成。镜下可见雌激素组皮质区突触较海马区突触数量稍多, 突触前部分内有大量的突触小泡(SV), 大小基本一致, 突触前膜(↑)与后膜之间(⇑)的突触间隙清晰。模型组皮质及海马区突触数量较雌激素组明显减少, 突触间隙模糊不清, 突触连接短少或呈间断病变, 突触小泡减少且大小不均。这些变化海马区较皮质区明显。脑还丹 1 2 组突触超微结构和雌激素组相近似, 但脑还丹 1 组突触量稍少于雌激素组, 脑还丹 2 组突触量则和雌激素组相近。

## 4 讨论

中医理论认为“主骨, 生髓, 脑为髓之海”, 这是“脑还丹”立方的理论基础。“脑还丹”由骨碎补、熟地等组成, 具有补肾填精, 活血通络, 平衡阴阳, 调和气血的功效。

海马 CA3 区是学习记忆的关键部位, 并对衰老较为易感<sup>[3]</sup>。大脑皮质是高级神经活动的物质基础, 是机体全部功能的最高调节器官。Woolley CS 等研究报道成年大鼠卵巢切除术后, 大脑海马 CA-1 区部分会退化, CA-1 区树突棘和轴突棘的密度降低。雌激素替代治疗能恢复神经原的结构和突触的密度<sup>[4,5]</sup>。本研究结果表明, 模型组大鼠神经元表面欠规则, 染色质有轻度凝聚变化, 部分核膜模糊不清, 且此病变以海马区明显, 胞质内的线粒体较雌激素组明显减少; 线粒体肿胀、脊减少、断裂或萎缩呈中空状; 游离核糖体减少, 胞质中形成空的小区域, 高尔基复合体核粗面内质网轻度扩张; 脂褐素较雌激素组显著增多, 皮质及海马区突触数量较雌激素组也明显减少, 突触间隙模糊不清, 突触连接短少或呈间断病变, 突触小泡减少且大小不均, 且这些改变和文献报道基本吻合<sup>[4,5]</sup>, 雌激素组未见这些退行性改变。“脑还丹”低剂量组较雌激素组改变稍明显, 但较模型组程度又较轻; 高剂量组则和雌激素组无明显差异, 说明“脑还丹”和雌激素一样能防治神经元退行性改变, 促进神经原结构和突触密度的恢复。

研究表明老龄细胞内线粒体数量减少同时容量增大形成巨大线粒体, 内质网结构紊乱表面密度降低, 溶酶体体积增大并脂褐素堆积<sup>[6]</sup>。随着年龄的

增加,出现海马内脂褐素堆积<sup>[7]</sup>。尽管文献报道脂褐素的来源不一,但大量脂褐素在细胞内堆积,必将导致神经原的功能紊乱。有人认为衰老时线粒体大量变性坏死乃至细胞衰老死亡的分子基础是损伤的线粒体缺乏修复能力<sup>[8]</sup>。突触连接间断、突触间隙不清、突触小泡变性等改变反映了神经原本身和突触后神经原出现异常改变,这些改变均将成为神经原实现其功能的障碍,并可能导致记忆功能的紊乱<sup>[8]</sup>。实验结果表明,脑还丹能防治这些改变的出现。

从同期的研究结果来看<sup>[9]</sup>,“脑还丹”的作用机制可从以下三个方面来阐明:1. 提高血清中 IGF- I 的浓度,调节大脑皮质和海马中的 IGF- I 的表达,保护神经原;2. 调节雌激素的分泌,防止神经原退行性变;3. 有效改善血脂水平,改善大脑血流量,防止动脉硬化。

参考文献:

[1] 李庆明,谭朝晖,程志安.“脑还丹”防治老年痴呆的经验. 中医杂志 1999, 40(增刊): 89.  
[2] 苗明三. 实验动物和动物实验技术[M]. 北京,中国中医药出版社,1997. 242.

[3] Hyd n H, Lange PW, Mihailovi L, et al. Changes of RNA base composition in nerve cells of monkeys subjected to visual discrimination and delayed alteration performance[ J]. Brain Res 1974, 65(2): 215-30.  
[4] Woolley CS, McEwen BS. Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat[ J]. J Neurosci 1992, 12: 2549-54.  
[5] Woolley CS, McEwen BS. Roles of estradiol and progesterone in regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat[ J]. J Comp Neurol 1993, 336(2): 293-306.  
[6] David H. Position and problems is morphological characterizing of aged cells and organs ( author' s transl) [ J]. ZFA 1977, 32(6): 519-41.  
[7] Mani RB, Lohr JB, Jeste DV. Hippocampal pyramidal cells and aging in the human: a quantitative study of neuronal loss in sectors CA1 to CA4[ J]. Exp Neurol 1986, 94(1): 29-40.  
[8] 赖红,刘子娟,吕永利,等. 人参皂甙对老龄大鼠海马 CA3 区神经原超微结构影响的定性、定量研究[ J]. 解剖学杂志, 1997, 20(2): 123-125.  
[9] 程志安,李庆明,曾志勇,等.“脑还丹”对老龄去势大鼠血清 IGF-I 和血脂水平的影响[ J]. 中国实验方剂学杂志, 2002, 8(1): 38-40.

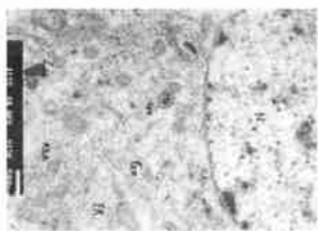


图 1 雌激素组海马 CA3 区神经原(0128, × 12K)

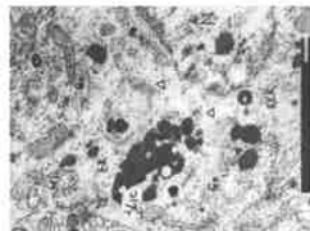


图 2 空白组海马神 CA3 区神经原(0215, × 12K)



图 3 “胶还丹”2 组海马 CA3 区神经原(0117, × 12K)

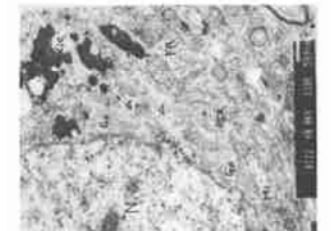


图 4 空白组皮质神经原(0122, × 10K)

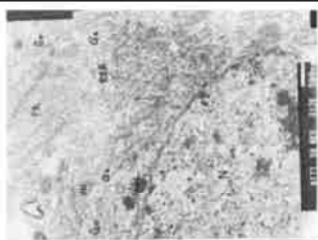


图 5 雌激素组皮质神经原(0133, × 12K)

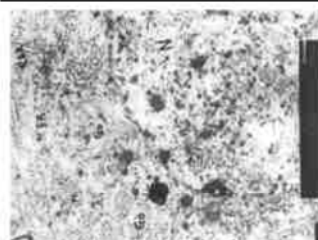


图 6 “脑还丹”2 组海皮质神经原(0139, × 12K)

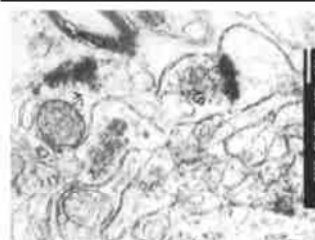


图 7 空白组海马 CA3 区突触(0223, × 40K)

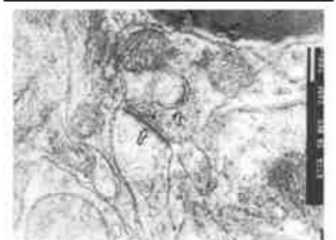


图 8 “脑还丹”2 组海马 CA3 区突触(0220, × 40K)