

本文引用:马超,欧阳建,郑晓婷,李平,成绍武.毛冬青甲素对阿尔茨海默病模型大鼠学习记忆及海马神经元再生的影响[J].湖南中医药大学学报,2017,37(8):819-822.

毛冬青甲素对阿尔茨海默病模型大鼠学习记忆及 海马神经元再生的影响

马超¹,欧阳建¹,郑晓婷¹,李平^{1,2},成绍武^{1,2*}

(1.湖南中医药大学中西医结合学院,湖南长沙 410208;2.中西医结合防治心脑血管疾病湖南省重点实验室,湖南长沙 410208)

[摘要] **目的** 探讨毛冬青甲素对阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)模型大鼠学习记忆能力及神经元再生的影响。**方法** 选取雄性SD大鼠24只,以Aβ1-42海马注射制作AD大鼠模型,随机分为4组,分别为假手术组、模型组、毛冬青甲素组、阳性药物组(多奈哌齐)。于造模后第3天起开始干预,连续4周。干预结束后进行Morris水迷宫测试,记录各组大鼠水迷宫测试期间逃避潜伏期和空间探索实验中大鼠处于平台所在区间时间比率;用BrdU标记增殖细胞,并采用免疫组织化学法检测各组大鼠海马组织被标记的增殖细胞表达情况,甲苯胺蓝染色法观察海马组织锥体细胞Nissl体形态。**结果** Morris水迷宫实验结果表明,与模型组相比,多奈哌齐组、毛冬青甲素组均能缩短潜伏期时间和增加穿越平台次数,改善其学习记忆能力,差异均有统计学意义($P<0.05$);BrdU标记结果显示毛冬青甲素能改善海马齿状回区神经细胞再生。**结论** 毛冬青甲素能促进AD模型大鼠神经元再生,且显著改善AD大鼠空间学习记忆能力。

[关键词] 阿尔茨海默病;毛冬青甲素;学习记忆;神经元再生;Morris水迷宫实验

[中图分类号]R285.5;R741 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.08.002

Effects of Ilexonin A on Learning-Memory and Neuron Regeneration in the Hippocampal Neuron of Alzheimer's Disease Model Rats

MA Chao¹, OUYANG Jian¹, ZHENG Xiaoting¹, LI Ping^{1,2}, CHENG Shaowu^{1,2*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine; 2. Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Prevention and Treatment of Cardio Cerebral Diseases in Hunan Province, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of Ilexonin A on neurological behavior and neuron regeneration in Alzheimer's disease (AD) model rats. **Methods** The 24 male SD rats were randomly divided into sham-operation group, model group, Ilexonin A group, positive medicine group (donepezil). Aβ1-42 was injected into hippocampus CA1 region of male SD rats and to establish Alzheimer's disease-like model, then from the 3th day after modeling, the Ilexonin A or Donepezil drug gavage lasted 4 weeks. The learning and memory abilities of the rats were assessed through Morris water maze behavioral test, and neuron proliferation was tested by BrdU label. The expression of proliferative cells in hippocampus tissues was determined by immunohistochemical method. The morphology of hippocampal pyramidal neuron were observed by Nissl staining. **Results** Compared with the model group, the learning and memory of the rats in the drug treated groups significantly increased ($P<0.05$) and the levels of neuron proliferation were increased in the hippocampal dentate gyrus (DG) region of Ilexonin A treated rats. **Conclusion** The Ilexonin A treatment can promote neuron regeneration in the hippocampal DG region, and improve the learning and memory ability of the Alzheimer's disease-like model rats.

[Keywords] Alzheimer's disease; Ilexonin A; learning and memory; neuron regeneration; Morris water maze test

[收稿日期]2017-04-21

[基金项目]国家级大学生创新创业训练计划项目(201510541008)。

[作者简介]马超,男,本科在读,中西医临床医学专业。

[通讯作者]*成绍武,男,教授,硕士研究生导师,E-mail:702058195@qq.com。

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种起病隐匿的进行性发展的神经系统退行性疾病。临床上以记忆障碍、失语、失用、失认、视空间技能损害、执行功能障碍以及人格和行为改变等全面性痴呆表现为特征。现代医学对本病尚缺乏较理想的治疗方法,而中医对AD的治疗却有其独特之处。

郑关毅等^[1]研究指出毛冬青甲素可以提高神经营养因子表达和促进神经元干细胞再生。本研究以A β 海马注射制作AD大鼠模型,观察毛冬青甲素对AD大鼠行为学及海马组织神经元再生的影响。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 动物 健康SD雄性大鼠24只,体质量180~220 g。由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,许可证号:SCXK(湘)2013-0005。

1.1.2 主要试剂与仪器 毛冬青甲素购自上海榕柏生物技术有限公司;盐酸多奈哌齐片购自金日制药(中国)有限公司。甲苯胺蓝、BrdU购自北京Solarbio科技有限公司;人源性A β 1-42购自Sigma公司;兔抗BrdU多克隆抗体购自北京Bioss生物技术有限公司;山羊抗兔二抗和DAB试剂盒购自美国Vector公司。MT-200Morris水迷宫视频跟踪分析测试系统(成都泰盟软件有限公司);振动切片机(徕卡,Leica VT1000 S),脑立体定位仪(美国Stoelting公司),显微镜(蔡司,Primo Star)。

1.2 方 法

1.2.1 动物分组与AD模型制备 大鼠适应性喂养一周后随机分为4组,分别为假手术组、模型组、毛冬青甲素组、阳性药物组(多奈哌齐),每组6只。模型组、毛冬青甲素组和阳性药物组大鼠参考相关文献^[2]制作A β 海马注射大鼠模型,将SD大鼠用10%水合氯醛按4 mL/kg的剂量行腹膜麻醉后,固定于脑立体定位仪上,备皮,消毒,沿颅顶中线做1~2 cm切口,分离骨膜,找到前囟位置,参照《大鼠脑立体定位图谱》,确定前囟后3.0 mm,中线旁2.0 mm为海马CA1所在部位体表投影位置,以牙科钻钻开一骨窗,微量注射器固定于立体定位仪上,自脑表面垂直进针约2.8 mm,假手术组脑内注射等容量的生理盐水;其余各组两侧海马各缓慢均匀注入1 μ L A β 1-42(质量浓度为10 g/L),5 min注射完

毕,留针5 min,然后缓慢撤针,缝合皮肤并涂红霉素软膏,肌注青霉素,预防感染。清醒后放回笼中常规饲养。

1.2.2 干预方法 大鼠造模后,根据临床成人推荐剂量,按照体表面积法折算大鼠等效剂量,将毛冬青甲素和多奈哌齐分别溶于生理盐水,毛冬青甲素组给予1.35 mg/(kg·d)灌胃,多奈哌齐阳性药物组给予0.33 mg/(kg·d)灌胃。假手术组、模型组给予等容量生理盐水灌胃。每天2次,连续4周。

1.2.3 溴脱氧尿苷(bromodeoxyuridine, BrdU)标记 干预25 d后,各组大鼠称质量,将BrdU按照50 mg/kg的剂量,10 mg/mL浓度溶于生理盐水,腹腔注射2次/d,每次间隔2 h,其中最后一次在处死前24 h注射。

1.3 观察指标

1.3.1 Morris水迷宫测试 给药结束后进行水迷宫测试,在水池中注入清水,水面高出平台2 cm,水中加入适量二氧化钛,搅拌后使水体呈乳白色不透明状。水温控制在(21.0 \pm 1.5) $^{\circ}$ C。平台置于某一象限中,在其他3个象限中任选一入水点,大鼠面向池壁从A、B、C、D入水点放入水中,观察其在120 s内寻找到并爬上平台的时间。若120 s未找到平台,实验者将其牵引至平台上,停留10 s后放回笼中,潜伏期记为120 s,每天定时定点测试2次,连续5 d。第6天撤除平台,采用空间探索实验,记录大鼠在120 s内跨越平台所在区间的时间。重复2次,取平均值。根据实验数据对动物的游泳速度进行分析,同时通过可视站台实验检测动物的视力,将游泳能力和视力异常的动物排除。

1.3.2 大鼠海马组织被标记的增殖细胞检测 在干预后的第28天处死动物,冰台上迅速取出大脑组织,放入4%多聚甲醛固定液中固定48 h,将固定好的大脑组织用琼脂糖包埋固定,采用振动切片机制成厚度50 μ m的均匀脑片。免疫组织化学检测BrdU标记的增殖细胞:TBS清洗5 min \times 2次;在3% H₂O₂甲醇液中浸泡30 min;TBS清洗5 min \times 2次;TBS-A清洗15 min;TBS-B封闭30 min;转移至96孔板中一抗(1:100)4 $^{\circ}$ C过夜。第二天TBS-A清洗5 min \times 2次;TBS-B封闭15 min;室温孵育二抗1 h;TBS-A清洗5 min \times 2次;TBS-B封闭15 min;ABC液孵育1 h;TBS清洗5 min \times 3次,加入DAB显色,显微镜观察,显色明显时滴加TBS终止反应。

将切片梯度酒精和二甲苯脱水透明切片,中性树脂封片。每个脑组织取3张切片,于40倍物镜下随机选取海马区域5个视野,用Image Pro Plus 6.0图像处理系统进行细胞计数。

1.3.3 大鼠海马神经细胞尼氏染色 将厚度50 μm 的脑片放置于1%的甲苯胺蓝中56 $^{\circ}\text{C}$ 染色神经元Nissl体,15 s后取出放入0.5%冰醋酸中分化10 min,在100%、90%、85%、70%梯度酒精中脱水。二甲苯透明,2 min \times 2次。中性树脂封片,每个脑组织取3张切片,在40倍物镜下观察海马CA3区域大鼠海马神经元的结构变化。

1.4 统计处理

采用SPSS 17.0软件包分析,数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”表

示,多组比较采用单因素方差分析,两两比较采用SNK检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 毛冬青甲素对AD模型大鼠空间学习记忆能力的影响

通过Morris水迷宫实验检测各组大鼠空间学习记忆能力的结果显示,模型组与假手术组相比,大鼠逃避潜伏期明显延长($P<0.05$),显示造模成功;给予毛冬青甲素和阳性药物盐酸多奈哌齐后,能明显改善AD模型大鼠的学习记忆能力($P<0.05$),且两组治疗效果相当,无统计学差异($P>0.05$),见表1。

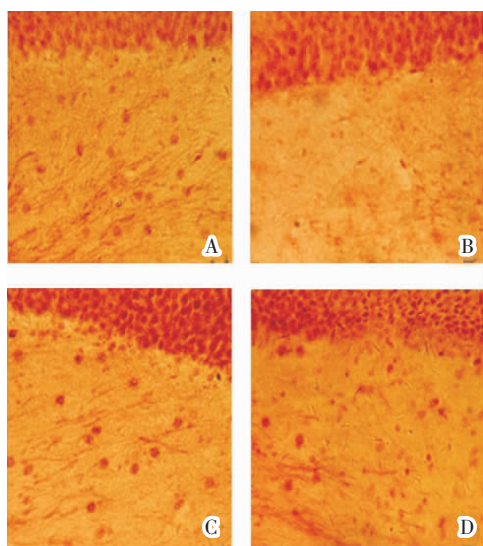
表1 毛冬青甲素对大鼠水迷宫法学习记忆能力的影响

| 组别 | 逃避潜伏期/s | | | | | 目标象限百 |
|--------|-----------------|----------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | 第1天 | 第2天 | 第3天 | 第4天 | 第5天 | 分比/% |
| 假手术组 | 94.7 \pm 8.3 | 73.1 \pm 9.6 | 54.1 \pm 4.4 | 32.7 \pm 3.4 | 23.8 \pm 2.5 | 51.1 \pm 3.4 |
| 模型组 | 93.2 \pm 7.9 | 82.3 \pm 4.5 | 77.5 \pm 2.6 [#] | 69.7 \pm 3.4 [#] | 56.4 \pm 2.9 [#] | 29.0 \pm 3.2 [#] |
| 毛冬青甲素组 | 93.8 \pm 6.6 | 72.4 \pm 3.2 | 66.1 \pm 4.5 [*] | 55.6 \pm 3.5 [*] | 44.5 \pm 8.8 [*] | 38.5 \pm 3.5 [*] |
| 阳性药物组 | 94.5 \pm 13.5 | 71.1 \pm 6.4 | 60.8 \pm 4.1 [*] | 46.3 \pm 1.8 [*] | 36.3 \pm 5.9 [*] | 42.2 \pm 1.8 [*] |

注:与假手术组比较[#] $P<0.05$;与模型组比较^{*} $P<0.05$ 。

2.2 毛冬青甲素对AD模型大鼠海马神经元再生的影响

通过BrdU标记增殖神经元结果显示,假手术组有少量BrdU标记的阳性细胞;模型组BrdU标记的阳性细胞数较少;与模型组比较,毛冬青甲素组和阳性药物组阳性细胞数显著增多,见图1。



注:A.假手术组;B.模型组;C.毛冬青甲素组;D.阳性药物组。

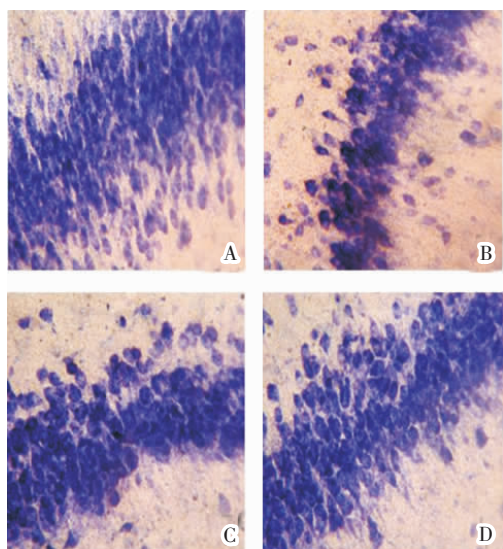
图1 各组大鼠海马组织BrdU标记增殖神经元光镜图($\times 400$)

2.3 毛冬青甲素对AD模型大鼠海马神经元结构的影响

海马CA3区神经元尼氏染色结果显示,假手术组海马CA3区组织结构正常,无病理变化,偶见神经细胞损伤和尼氏体丢失。海马锥体细胞排列整齐且紧密,胞浆染色清晰,尼氏体丰富。模型组海马CA3区出现神经细胞变性坏死。海马锥体细胞数目减少,结构模糊,胞体肿胀,排列散乱,且胞浆内大面积的尼氏体丢失,尼氏体少而小,呈散在分布。毛冬青甲素组与多奈哌齐组海马CA3区基本病变减轻,同模型组比较,锥体细胞排列较整齐,较紧密,胞浆内尼氏体较丰富,较清晰,见图2。

3 讨论

AD是一种起病隐匿的进行性神经系统退行性疾病。随着我国近年来人口老龄化越来越严峻,AD发病率显著提高,迫切需要展开进一步的发病机制和药物治疗研究。中医学对于AD早在古代便有所认识,并认为其发生机制是多脏腑共同作用,如肾精不足、髓海亏虚所致的神失所养;肝脾失调,痰浊留



注:A.假手术组;B.模型组;C.毛冬青甲素组;D.阳性药物组

图2 各组大鼠海马CA3区神经元Nissl染色图($\times 400$)

滞、蒙蔽脑窍;阳气虚损、久虚瘀滞造成的脑窍不通引起的神明失职等^[3]。毛冬青为冬青科植物毛冬青的干燥根,是我国南方常用的中药材,味微苦、甘,归肺、肝、大肠经,具有活血通脉的功效^[4]。毛冬青味甘,能补能和缓,有滋补和中的功效;其善入肝经,能疏肝解郁化痰;活血通脉,疏瘀散滞,活通脑窍,可对症治疗AD。

毛冬青甲素(Ilexonin A, IA)是从毛冬青根中提取纯化的18-去氢乌索酸经琥珀酰化所得的五环三萜类化合物。张碧琴等^[5]研究发现IA对大鼠脑缺血再灌注后Wnt信号通路调控神经再生,得出IA对大鼠脑缺血再灌注后的神经功能有明显改善作用;韩

雨等^[6]研究提示IA对大鼠脑缺血再灌注后缺血周边区Notch信号的调节作用与神经干细胞增殖和分化。本研究采用A β 1-42海马注射后,可导致认知功能障碍,如Morris水迷宫的潜伏期延长,穿越平台次数减少等表现。实验结果表明毛冬青甲素组大鼠与模型组大鼠对比,其潜伏期时间减少和穿越平台次数增加,显著改善了其学习记忆能力。本研究发现给予毛冬青甲素处理的大鼠其被标记的增殖神经元细胞数高于模型组大鼠,尼氏染色结果也进一步印证了毛冬青甲素具有促进神经元再生的功能。但毛冬青甲素是如何改善AD模型大鼠学习记忆能力和促进神经元再生的具体机制还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 郑关毅,石旺清,陈晓东,等.毛冬青甲素对大鼠脑缺血再灌注后bFGF、GAP-43的表达及神经元再生的影响[J].药理学报,2011,46(9):1065-1071.
- [2] 朱飞奇,马英,钱采韵.大鼠海马立体定向注射A β 1-40建立阿尔茨海默病动物模型[J].邵阳医学院学报,2008,27(2):106-108.
- [3] 杜骏,韩涛,汪记情,等.阿尔茨海默病发病机制及药物治疗的相关论述[J].国际老年医学杂志,2014,35(6):268-271.
- [4] 熊友香,李昶,罗宪堂.毛冬青的化学成分、药理作用研究进展[J].中药材,2002,25(5):371-374.
- [5] 张碧琴.毛冬青甲素对脑缺血后经典Wnt通路的调控作用与神经再生[D].福州:福建医科大学,2014.
- [6] 韩雨.毛冬青甲素对脑缺血后Notch通路的调控作用与神经再生[D].福州:福建医科大学,2014.

(本文编辑 杨 璞)