

# 清脑通络方对老年性阿尔茨海默病大鼠海马突触结构的重建作用

程骁<sup>1,2</sup>, 邓敏贞<sup>1,2</sup>, 侯紫君<sup>3</sup>, 华荣<sup>1,2</sup>, 孙景波<sup>1,2</sup>

1. 广东省中医院脑病中心, 广东 广州 510120

2. 广东省中医药科学院, 广东 广州 510006

3. 河南南阳理工学院, 河南 南阳 473004

**[摘要]** 目的: 观察清脑通络方对老年性阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 模型大鼠海马突触结构的影响。方法: 将大鼠随机分为青年组、老年组、模型组、石杉碱甲组、清脑通络方组。除青年组和老年组外, 其他各组大鼠注射 D-半乳糖和鹅膏蕈氨酸到基底前脑进行造模。造模成功后, 清脑通络方组大鼠灌胃清脑通络方 6 g/(kg·d), 石杉碱甲组大鼠灌胃石杉碱甲 0.3 mg/(kg·d), 青年组、老年组、模型组大鼠以等体积生理盐水灌胃, 连续 4 周。电镜观察大鼠海马 CA1 区和 CA3 区分子层突触特征, 用体视学方法分析海马 CA1 区和 CA3 区突触数密度 (Nv)、突触连接带面密度 (Sv) 和突触连接带平均面积 (S)。结果: 老年组大鼠 CA1 区和 CA3 区突触数密度、突触面密度与青年组比较无明显变化。与老年组比较, 模型组大鼠 CA1 区和 CA3 区突触数密度、突触面密度显著降低 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 清脑通络方组大鼠在 CA1 区和 CA3 区的突触数密度、突触面密度显著增加 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 石杉碱甲组大鼠在 CA1 区和 CA3 区的突触数密度增加, 在 CA3 区突触面密度增加 ( $P < 0.01$ )。与石杉碱甲组比较, 清脑通络方组大鼠在 CA1 区的突触面密度增加 ( $P < 0.01$ )。结论: 清脑通络方对老年性 AD 大鼠海马突触密度有显著的改善作用。

**[关键词]** 阿尔茨海默病; 清脑通络方; 海马突触; 动物实验; 大鼠

**[中图分类号]** R277.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2018) 07-0026-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2018.07.008

## Reconstruction of Qingnao Tongluo Prescription on Synaptic Structure in Hippocampus of Rats with Senile Alzheimer's Disease

CHENG Xiao, DENG Minzhen, HOU Zijun, HUA Rong, SUN Jingbo

**Abstract:** **Objective:** To observe the effect of Qingnao Tongluo prescription on synaptic structure in hippocampus of model rats with senile Alzheimer's disease (AD). **Methods:** Divided rats randomly into the young group, the aged group, the model group, the huperzine A group and the Qingnao Tongluo prescription group. In addition to the young group and the aged group, the rats of other groups were established into models by injection of d-galactose and ibotenic acid into basal forebrain. After the success of model establishment, the Qingnao Tongluo prescription group was given 6 g/(kg·d) of Qingnao Tongluo prescription by gavage; the huperzine A group was given 0.3 g/(kg·d) of huperzine A, and the young group, the aged group and the model group were given the same volume of saline by gavage for four weeks continuously. Observed synaptic characteristics in area of CA1 and CA3 in the hippocampus of rats by electron microscope, and analyzed the synaptic numerical density (Nv), surface density (Sv) and average size of synaptic conjunction in area of CA1 and CA3 in the hippocampus by stereological method. **Results:** No obvious change was found in the synaptic numerical density and surface density in area of CA1 and CA3 in the hippocampus of rats between the aged group and the young group. Compared with those in the aged group, the synaptic numerical density and surface density in area of CA1 and CA3 of rats in the model group were significantly decreased ( $P < 0.01$ ). Compared with those in the model group, the synaptic numerical density and surface density in area of CA1 and CA3 of rats in the Qingnao Tongluo prescription group significantly increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); the synaptic numerical density in CA1 and CA3 and the synaptic surface density in CA3 area of rats in the huperzine A group were increased ( $P < 0.01$ ). Compared with that in the huperzine A group, the synaptic surface density in CA1 area of

**[收稿日期]** 2017-12-07

**[基金项目]** 广东省科技计划项目 (2014A020221032); 国家自然科学基金面上项目 (81774042)

**[作者简介]** 程骁 (1983-), 女, 副研究员, 研究方向: 中医脑病基础与临床研究。

**[通信作者]** 孙景波, E-mail: gdszyysjb@163.com。

rats in the Qingnao Tongluo prescription group was increased ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Qingnao Tongluo prescription has obvious improvement for synaptic density in hippocampus of rats with senile AD.

**Keywords:** Alzheimer's disease; Qingnao Tongluo prescription; Hippocampal synaptic; Animal experiment; Rats

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD), 又称老年性痴呆, 是一种发生于中老年的原发性脑退行性疾病, 其患病率随着社会的老龄化而增加, 已成为严重的社会问题。虽然 AD 的病理机制至今仍不清楚, 但基底前脑胆碱能神经元丢失、海马区突触大量丧失是 AD 的主要病理改变<sup>[1]</sup>。海马是脑处理学习记忆功能的重要结构, 这一功能与海马突触可塑性关系密切。成熟的神经系统虽然不再产生新的神经元, 并且神经元胞体一直保持相对稳定的状态, 但神经元却具有产生新的突起和形成新的突触连接的能力, 同时神经元的突起包括轴突末梢、树突及树突侧棘等一直处于可修饰状态, 这种能力是神经环路可塑性的基础<sup>[2]</sup>。清脑通络方对 AD 模型大鼠的学习记忆行为有明显的改善作用<sup>[3]</sup>, 为了观察该方的作用机理, 本实验探讨该方对 AD 模型大鼠海马突触结构的影响。

## 1 材料与方

**1.1 动物与分组** 健康雄性 Wistar 大鼠, 3 月龄 15 只, 体质量 200~250 g, 为青年组。20 月龄 60 只, 体质量 450~550 g, 随机抽取 15 只用作老年组, 其余 45 只大鼠为造模组。所有大鼠均由广州中医药大学实验动物中心提供, 合格证编号为 26-2005A001, 实验在广东省中医药科学院动物实验中心 SPF 级动物实验室进行, 使用许可证号: SYXK(粤)2013-0094。

**1.2 仪器和试剂** D-半乳糖(上海试剂二厂); 鹅膏蕈氨酸(美国 Sigma 公司); 动物脑立体定位仪(美国 Stoling 公司); 清脑通络方(决明子、丹参、山楂、赤芍、川芎、水蛭等用水提醇工艺制成 2 g/mL 药液, 4℃保存); 石杉碱甲(临用前配制成 6 mg/100 mL 液体)。

**1.3 模型制备与干预** 动物适应性喂养 2 周, 造模组 45 只大鼠腹腔注射 0.96% D-半乳糖(生理盐水配制), 5 mL/(kg·d), 连续 6 周。青年组和老年组大鼠腹腔注射生理盐水, 5 mL/(kg·d), 连续 6 周。从第 7 周开始, 造模组大鼠双侧基底前脑注射鹅膏蕈氨酸, 以 3% 戊巴比妥钠 35 mg/kg 的剂量腹腔注射麻醉大鼠, 将大鼠固定于脑立体定位仪上, 纵向切开头皮, 暴露颅骨, 参照 Paxinos 和 Watson 大鼠脑立体定位图谱(Academic Press, 1982)<sup>[4]</sup>, 梅纳特基底核(Meynert 基底核)坐标为 AP-0.8 mm, Lat 2.6 mm, DV-8.2 mm(前囟后 0.8 mm, 中线旁开 2.6 mm, 颅骨下 8.2 mm), 每侧缓慢注射鹅膏蕈氨酸 1 μL(生理盐水配制, 浓度 5 μg/μL), 注射时间每侧 10 min, 留针 10 min。青年组和老年组在相同脑区注射等体积的生理盐水。2 周后, 将造模组存活的大鼠随机分为模型组、清脑通络方组和石杉碱甲组, 每组 10 只。清脑通络方组以清脑通络方灌胃, 5 mL/(kg·d), 相当于生药量 6 g/(kg·d); 石杉碱甲组以石杉碱甲灌胃, 5 mL/(kg·d), 相当于生药量 0.3 mg/(kg·d); 模型组、青

年组和老年组以等体积的生理盐水灌胃, 连续 4 周。

**1.4 标本制备与观察** 取每组大鼠各 3 只, 以含 0.2% 戊二醛、4% 多聚甲醛的磷酸缓冲液经心灌注固定, 取脑, 置同样固定液后固定 4 h。各标本均取海马 CA1 区和 CA3 区同一部位组织, 组织块大小约 1 mm<sup>3</sup>, 每一部位取组织块 4~6 个。用 0.01 mol/L PBS 洗组织块 3 次, 每次 15 min, 1% 锇酸固定 1 h 后(4℃), 再用 0.01 mol/L PBS 洗 3 次, 每次 15 min。梯度酒精脱水, 用 50%, 70% 酒精各 5 min, 80%, 90%, 95%, 99% 酒精各 10 min, 再用 100% 酒精脱水 2 次, 每次 10 min, 用丙酮脱水 2 次, 每次 10 min。用丙酮:包埋剂 = 1:1, 渗透 1 h; 丙酮:包埋剂 = 1:3, 渗透 2 h, 纯包埋剂共渗透 3 h。将渗透后的组织块放在盛有苯二甲酸二丙烯酸酯包埋剂(包埋剂配方: 苯二甲酸二丙烯酸酯 10 mL、邻苯二甲酸二丁酯 2 mL、过氧化苯甲酰 0.4~0.6 g)的胶囊内, 置 60℃ 烤箱, 聚合 48 h。超薄切片: 片厚 600A, 230 目铜网捞片, 醋酸铀和枸橼酸铅双染。

电镜观察与拍照: 每只大鼠每一部位观察 3 个铜网, 每张铜网由左上角至右下角斜线上移动, 随机拍摄照片 5 张, 共 15 张。突触放大倍数 2 万倍, 拍照, 最终放大倍数 4 万倍。

**1.5 突触形态参数的定量分析** 用体视学方法分析海马 CA1 区和 CA3 区突触数密度(Nv)、突触连接带面密度(Sv)和突触连接带平均面积(S)。在透明胶片上绘制 2 mm × 2 mm 的标准测试网格, 将该测试网格覆盖于电镜照片上, 按 Freddari<sup>[5]</sup>方格点计数法逐一测量每张照片中的突触数量和突触连接带与测试线的交点数, 用下列公式计算突触的数密度、面密度和平均面积。

$$Nv = \frac{Na}{(L/K0) + T} \text{ (个/}\mu\text{m}^3\text{)}$$

Na 是每个平方微米的突触总数, L 是突触连接带的平均长度(μm), 可由公式  $L = La/Na$ ;  $La = (\pi/2) \times (Ni/LT)$  计算得到, T 为超薄切片的厚度(600A), LT 为测试线总长度, Ni 为突触连接带与测试线的交叉点数,  $K0 = 1 + 3T/2L$  为校正系数, 校正因子 Holmes' 效应引起的对突触连接带长度的过高估计。  $Sv = 2Ni/LTK0(\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3)$ , 突触连接带的平均面积  $S = Sv/Nv$ 。

**1.6 统计学方法** 采用 SPSS13.0 统计软件进行数据处理, 计量资料以  $(\bar{x} \pm s)$  表示, 组间差异采用单因素方差分析。

## 2 结果

**2.1 各组大鼠海马区突触特征** 见图 1。电镜下可见老年组和青年组大鼠海马区神经毡膜性结构, 神经元的树突可见到各种断面, 断面较平滑、完整。模型组大鼠海马区神经毡膜性结构皱缩, 神经元的树突可见断面较少, 突触附近空泡化较多。

清脑通络方组和石杉碱甲组神经毡膜性结构皱缩缓解,神经元的树突可见断面增多,突触附近空泡化减弱,突触前、突触后神经细胞膜增厚,有些突触后膜增厚更明显,突触前后膜之间

有明显的突触间隙,在突触前终末(presynaptic terminal)内可见大量突触小泡和线粒体。

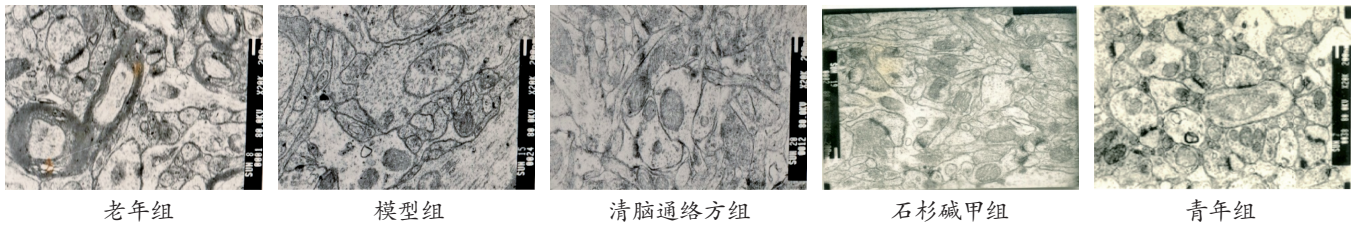


图1 各组大鼠海马区突触特征 (×40 000)

2.2 各组大鼠海马 CA1 区和 CA3 区突触数密度 (N<sub>v</sub>) 结果比较 见表 1。老年组大鼠 CA1 区和 CA3 区突触数密度与青年组比较无明显变化。与老年组比较,模型组大鼠 CA1 区和 CA3 区突触数密度显著降低(P<0.01)。与模型组比较,清脑通络方组和石杉碱甲组大鼠在 CA1 区和 CA3 区的突触数密度显著增加(P<0.05, P<0.01)。

表 1 各组大鼠海马 CA1 区和 CA3 区突触数密度 (N<sub>v</sub>)

结果比较( $\bar{x} \pm s$ )		个/ $\mu\text{m}^3$	
组别	n	CA1	CA3
青年组	15	2.743 6 ± 0.489 1	2.712 5 ± 0.512 1
老年组	15	2.708 2 ± 0.567 5	2.677 9 ± 0.436 2
模型组	10	2.091 7 ± 0.456 9 <sup>①</sup>	2.181 3 ± 0.443 2 <sup>①</sup>
清脑通络方组	10	2.447 7 ± 0.416 8 <sup>③</sup>	2.476 3 ± 0.449 3 <sup>③</sup>
石杉碱甲组	10	2.254 1 ± 0.427 8 <sup>②</sup>	2.345 7 ± 0.429 6 <sup>②</sup>

与老年组比较, ①P<0.01; 与模型组比较, ②P<0.05, ③P<0.01

2.3 各组大鼠海马 CA1 区和 CA3 区突触面密度 (S<sub>v</sub>) 结果比较 见表 2。老年组大鼠 CA1 区和 CA3 区突触面密度与青年组比较无明显变化。与老年组比较,模型组大鼠 CA1 区和 CA3 区突触面密度显著降低(P<0.01)。与模型组比较,清脑通络方组大鼠在 CA1 区和 CA3 区的突触面密度增加(P<0.01),石杉碱甲组大鼠在 CA3 区突触面密度增加(P<0.01)。与石杉碱甲组比较,清脑通络方组大鼠在 CA1 区的突触面密度增加(P<0.01)。

2.4 各组大鼠海马 CA1 区和 CA3 区突触平均面积 (S) 比较 见表 3。各组大鼠 CA1 区和 CA3 区的突触平均面积均无显著差异(P>0.05)。

### 3 讨论

AD 主要由肾精亏虚,脑髓失充,痰瘀互阻,导致脑髓枯萎所致,治疗应化痰祛瘀开窍,补肾填髓<sup>⑥</sup>。课题组成员在长期临床实践中总结出老年性痴呆存在颅脑水瘀这一病理机制,瘀血与水湿痰浊互阻于脑内为其主要病机,在临床中使用清脑通络方治疗具有颅脑水瘀病理机制的疑难脑病,该方以通窍、

表 2 各组大鼠海马 CA1 区和 CA3 区突触面密度 (S<sub>v</sub>)

结果比较( $\bar{x} \pm s$ )		$\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$	
组别	n	CA1	CA3
青年组	15	0.355 3 ± 0.056 4	0.347 2 ± 0.056 6
老年组	15	0.347 7 ± 0.053 8	0.339 2 ± 0.057 9
模型组	10	0.270 2 ± 0.059 0 <sup>①</sup>	0.265 2 ± 0.048 9 <sup>①</sup>
清脑通络方组	10	0.330 6 ± 0.054 0 <sup>②③</sup>	0.312 8 ± 0.051 9 <sup>②</sup>
石杉碱甲组	10	0.294 5 ± 0.065 7	0.301 3 ± 0.060 9 <sup>②</sup>

与老年组比较, ①P<0.01; 与模型组比较, ②P<0.01; 与石杉碱甲组比较, ③P<0.05

表 3 各组大鼠海马 CA1 区和 CA3 区突触平均

面积(S)比较( $\bar{x} \pm s$ )		$\mu\text{m}^2$	
组别	n	CA1	CA3
青年组	15	0.130 2 ± 0.011 4	0.129 9 ± 0.017 1
老年组	15	0.130 3 ± 0.013 7	0.127 5 ± 0.015 1
模型组	10	0.130 9 ± 0.021 0	0.123 5 ± 0.018 0
清脑通络方组	10	0.136 4 ± 0.017 6	0.127 8 ± 0.019 8
石杉碱甲组	10	0.131 5 ± 0.020 6	0.129 0 ± 0.014 0

化痰、利水为主,由决明子、丹参、山楂、赤芍、川芎、水蛭等药物组成,在临床上有较好的效果<sup>⑦</sup>。实验研究亦表明,该方对 AD 模型大鼠学习记忆功能有较好的改善作用<sup>⑧</sup>。

AD 患者海马区突触大量丢失,造成学习记忆功能障碍。海马突触长时程增强(LTP)被认为是突触传递可塑性的证据,并成为研究学习记忆过程的突触模式。大量研究报告对突触多种结构参数进行定量测定,探讨突触传递效能变化与形态结构的相关性,发现了某些传递效能与形态结构的相应改变。学习记忆障碍与脑内神经信息传递的关键结构——突触的可塑性变化有关,如衰老时发生脑内突触密度减低、突触平均面积代偿性增大及 LTP 减弱<sup>⑨</sup>等突触可塑性变化。研究显示,补肾益气及活血化瘀方药对老年性 AD 大鼠海马区神经突触数密度、面密度及突触平均面积的减少均有改善作用<sup>⑩</sup>。

结果表明,老年组大鼠 CA1 区和 CA3 区突触形态与青年组比较无明显变化,突触数密度、突触面密度及突触平均面积

与青年组比较均无明显改变,说明单纯生理性衰老对突触没有明显影响。而模型组大鼠 CA1 区和 CA3 区突触数密度、突触面密度较青年组和老年组显著下降,说明基底前脑胆碱能神经元损害对海马突触产生了显著影响,造模成功。清脑通络方组大鼠突触数密度和突触面密度无论在 CA1 区或 CA3 区均明显高于模型组,说明清脑通络方可减少大鼠海马 CA1 区和 CA3 区突触的损伤。石杉碱甲组大鼠在 CA1 区和 CA3 区的突触数密度增加,CA3 区突触面密度增加,说明石杉碱甲可减少大鼠海马 CA3 区突触的损伤。清脑通络方组与石杉碱甲组比较,在 CA1 区,清脑通络方组突触面密度明显高于石杉碱甲组,在 CA3 区两者未显示出明显差异,说明清脑通络方对模型大鼠海马 CA1 区和 CA3 区突触损害有显著的保护作用,其保护范围比石杉碱甲广,保护作用跟石杉碱甲相近。此外,清脑通络方组突触面密度在 CA1 区已经恢复到老年组水平,在 CA3 区还未恢复到老年组水平;其突触数密度较模型组有明显增高,但仍未恢复到老年组水平,这说明清脑通络方的主要保护作用是增加海马 CA1 区突触面密度。

综上所述,清脑通络方对老年性 AD 大鼠海马突触有显著的改善作用,主要体现于减缓模型大鼠海马 CA1 区和 CA3 区突触损害和增加海马 CA1 区突触面密度这两个方面。

#### [参考文献]

- [1] 李常琼. 早期 APP/PS1 转基因 AD 模型小鼠海马胆碱能神经元改变的体视学研究[D]. 重庆:重庆医科大学,2017.
- [2] 张雪玲,王黎明,陈念东,等. miR-132 调控神经环路-突触可塑性及改善卒中后痴呆的机制研究[J]. 中风与神经疾病杂志,2017,34(12):1080-1083.
- [3] 孙景波,华荣,何莉娜. 清脑通络方对老年痴呆模型大鼠学习记忆功能的改善作用[J]. 陕西中医,2009,30(8):1095-1097.
- [4] 饶燕,高洁,赖世隆,等. D-半乳糖合并 Meynert 基底核损毁对海马长时程增强和突触形态的影响[J]. 中国应用生理学杂志,2002,18(1):18-22.
- [5] Bertoni-Freddari C, Fattoretti P, Casoli T, et al. Morphological plasticity of synaptic mitochondria during aging [J]. Brain Res, 1993, 628(1-2): 193-200.
- [6] 邓家刚,郝二伟,范丽丽,等. 中医药对老年性痴呆认识和防治的研究进展[J]. 辽宁中医杂志,2007,34(11):1659-1661.
- [7] 符文彬,孙景波. 张学文教授从肝论治脑病经验介绍[J]. 新中医,2004,36(5):14-15.
- [8] Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, et al. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus[J]. Science, 2006, 313(5790): 1093-1097.
- [9] 赵小贞,王玮,康仲涵,等. 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):147-153.

(责任编辑:冯天保,郑锋玲)