

2-(α -羟基戊基)苯甲酸盐 对痴呆大鼠大脑皮质、海马微细结构的影响

姚淦元, 罗超, 韩宁, 陈秀英, 冯娜, 贺细菊, 赵万红
湖北医药学院基础医学院, 湖北 十堰 442000

【摘要】 目的 探讨2-(α -羟基戊基)苯甲酸盐(HPB)对痴呆大鼠大脑皮质、海马微细结构的影响。方法 SD健康大鼠72只,其中60只被联合采用D-半乳糖、亚硝酸钠及三氯化铝复制为痴呆大鼠模型,并随机分为模型组、多奈哌齐组、HPB 15 mg/kg组、HPB 45 mg/kg组、HPB 135 mg/kg组,每组12只;另12只正常大鼠作为对照组。3个HPB组分别给予相应剂量的HPB灌胃给药,每天1次,连续30 d,第30天处死动物、取材。采用水迷宫测试各组大鼠的行为学,ELISA法检测脑组织sAPP α 、A β ₄₂含量,HE染色和改良Bielschowsky氨银液染色观察大鼠大脑皮质、海马微细结构的变化。结果 与对照组比较,模型组平均潜伏期(IP)、第一次穿越原平台位置的时间(FTAPT)明显延长,在原平台象限活动的时间(TAOP)明显缩短;与模型组比较,HPB 45 mg/kg组、HPB 135 mg/kg组、多奈哌齐组大鼠的IP、FTAPT缩短,TAOP延长,差异均有统计学意义($P<0.05$);与对照组比较,模型组大鼠的脑组织sAPP α 含量降低,A β ₄₂含量升高;与模型组比较,HPB 45 mg/kg组、HPB 135 mg/kg组、多奈哌齐组大鼠的脑组织sAPP α 含量升高,但A β ₄₂含量降低,差异均有统计学意义($P<0.05$);HE染色结果显示,模型组大鼠海马CA3区神经元排列不整齐、数量少,细胞小、结构模糊、核固缩;HPB 135 mg/kg组大鼠海马CA3区神经元排列较整齐、数量增多,结构较清晰;改良Bielschowsky氨银液染色结果显示,模型组皮质神经元体积小、数量少,排列分散、层次不清,皮质神经元之间、皮质与海马之间神经纤维细而稀疏;HPB 135 mg/kg组大鼠脑皮质神经元体积明显变大、数量明显增多,排列较整齐,皮质与海马之间神经纤维较多。结论 HPB对痴呆大鼠大脑皮质、海马微细结构有一定的改善作用,从而提高其空间学习记忆能力;其机制可能与HPB提高痴呆大鼠脑组织sAPP α 表达、降低A β ₄₂表达有关。

【关键词】 老年性痴呆;2-(α -羟基戊基)苯甲酸盐;大脑皮质;海马;可溶性淀粉样前体蛋白 α ; β 淀粉样蛋白42

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2019)02-142-04

Effects of 2-(α -hydroxyamyl) benzoate on fine structure of cerebral cortex and hippocampus in dementia rats.

YAO Song-yuan, LUO Chao, HAN Ning, CHEN Xiu-ying, FENG Na, HE Xi-ju, ZHAO Wan-hong. Basic Medical College, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, Hubei, CHINA

【Abstract】 Objective To investigate the effects of 2-(α -hydroxyamyl) benzoate (HPB) on the fine structure of cerebral cortex and hippocampus in dementia rats. **Methods** Seventy-two SD healthy rats were selected. Sixty of them were treated with D-galactose, sodium nitrite and aluminum trichloride to establish dementia models, which were randomly divided into model group, donepezidine group, HPB 15 mg/kg group, HPB 45 mg/kg group, and HPB 135 mg/kg group, with 12 rats in each group, and another 12 normal rats served as the control group. The rats in three HPB groups were given corresponding dose of HPB by gavage once a day for 30 days, and the animals were killed on the 30th day to collect samples. The behavior of each group was tested by water maze. The contents of sAPP α and A β ₄₂ in brain tissue were measured by ELISA method. The changes in the fine structure of cerebral cortex and hippocampus were observed by HE staining and modified Bielschowsky ammonia silver staining. **Results** Compared with the control group, the average incubation period (IP) and the time to cross the original platform position for the first time (FTAPT) in the model group were significantly prolonged, and the time to move in the original platform quadrant (TAOP) was significantly shortened. Compared with the model group, IP and FTAPT of rats in the HPB 45 mg/kg group, HPB 135 mg/kg group and donepezil group were shortened, but TAOP is extended, with statistically significant differences ($P<0.05$). Compared with the control group, the content of sAPP α in the brain tissue of the model group decreased and the content of A β ₄₂ increased. Compared with the model group, the content of sAPP α in the brain tissue of rats in the HPB 45 mg/kg group, HPB 135 mg/kg group and Donepezil group increased, but the content of A β ₄₂ decreased, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The results of HE staining showed that neurons in the CA3 area of the hippocampus of rats in the model group were not orderly arranged, the number was small, the cells were small, the structure was fuzzy, and the nuclei shrank; in the HPB 135 mg/kg group, the neurons in the hippocampal CA3 area were orderly arranged, the number of neurons increased, and the structure was clear. The results of modified Bielschowsky's ammonia silver solu-

基金项目:湖北医药学院2016年度人才启动金项目立项(编号:2016QDJZR20)

通讯作者:赵万红,E-mail:zhaowanrong0803@163.com

tion staining showed that cortical neurons in the model group were small in size, few in number, scattered in arrangement and unclear in hierarchy. Nerve fibers between cortical neurons and between cortex and hippocampus were thin and sparse. In the HPB 135 mg/kg group, the neurons in the cerebral cortex became larger and more numerous, and arranged neatly, and there were more nerve fibers between the cortex and hippocampus. **Conclusion** HPB can improve the fine structure of cerebral cortex and hippocampus of dementia rats to improve their spatial learning and memory ability, and its mechanism may be related to the increase of sAPP α expression and the decrease of A β_{42} expression in the brain tissue of dementia rats by HPB.

【Key words】 Alzheimer's disease; 2-(α -hydroxyamyl) benzoate; Cerebral cortex; Hippocampus; Soluble amyloid precursor protein α (sAPP α); β -amyloid protein 42 (A β_{42})

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)又被称为老年性痴呆,最早由德国医生 Alois Alzheimer 于 1906 年描述,是一种与年龄高度相关的、以进行性认知功能障碍为主要表现的中枢神经系统退行性疾病,其发病机制尚未完全明了,现阶段倾向于 β 淀粉样蛋白(amyloid β -protein, A β)级联假说和 tau 蛋白过度磷酸化假说。AD 主要病理改变有^[1]:①神经元外存在大量由 A β 组成的老年斑(senile plaques, SP);②神经元内神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFTs);③AD 脑皮质、海马等神经元大量丢失、突触减少,前二者为 AD 的两大特征性病变,目前无治疗 AD 的特效药物。2-(α -羟基戊基)苯甲酸盐[2-(1-hydroxypropyl)-benzoate, HPB]是我国自主合成的新型抗脑缺血化合物。笔者前期研究发现,HPB 从功能上对多种痴呆模型动物的认知缺陷有确切的改善作用,且减少 AD 脑 A β 和过度磷酸化 tau 蛋白(p-tau)的表达^[2]。然而,痴呆鼠认知功能的改善,往往有其大脑皮质、海马神经元的形态、结构及数量变化作支撑,否则这种作用是不稳定、不持久、不可重复的,更谈不上根治 AD。因此,本研究拟用 HPB 对痴呆模型大鼠给药,通过改良 Bielschowsky 银染法等观察痴呆大鼠脑皮质、海马形态结构的变化,试图探究 HPB 改善痴呆大鼠认知的结构基础及 AD 脑病理学改善、认知水平提高与细胞结构修复的相互关系。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂 MT-200 水迷宫行为学跟踪系统(成都泰盟科技有限公司);盐酸多奈哌齐片(十堰市太和医院);2-(α -羟基戊基)苯甲酸盐(中国医学科学院赠);可溶性淀粉样前体蛋白 α (sAPP α)、A β_{42} 酶联免疫(ELISA)试剂盒(美国 elabscience 公司);Bielschowsky 氨银液(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.2 实验动物 SD 健康大鼠 72 只,雄性,10 周龄,体重 300~350 g,SPF 级,由湖北医药学院实验动物中心[许可证号:SYXK(鄂)2016-0031、SCXK(鄂)2016-0008]提供。实验前将大鼠适应性喂养两周,自由饮食,每天光照 12 h,湿度 50%~60%,室温 20℃~24℃。采用行为学试验剔除逃避反应明显迟缓者。

1.3 复制大鼠 痴呆模型联合采用 D-半乳糖、亚硝酸钠及三氯化铝复制大鼠痴呆模型。将 D-半乳糖、亚硝酸钠、三氯化铝均配制成水溶液,前二者分别按 45 mg/(kg·d)、500 mg/(kg·d)颈背部皮下注射;后者按 40 mg/(kg·d)让大鼠饮用;连续 1 个月。痴呆模型判定标准:行为学测试,潜伏期>40 s,并随机抽取 10% 取脑做病理学检查,观察到海马神经元减少、神经原纤维变性或 A β 斑,则该批大鼠痴呆模型制作成功^[3-4]。

1.4 实验分组与给药 取痴呆模型鼠 60 只,随机分为模型组、多奈哌齐组、HPB 15 mg/kg 组、HPB 45 mg/kg 组、HPB 135 mg/kg 组,每组 12 只;另取健康大鼠 12 只作为对照组。对各组均灌胃给药,3 个 HPB 组给予相应剂量的 HPB;多奈哌齐组灌服多奈哌齐 3 mg/kg;模型组和对照组给予同体积生理盐水。每天 1 次,连续 30 d,第 26~30 天给药后 1 h 用水迷宫测试大鼠学习记忆能力。第 30 天处死动物、取材。

1.5 Morris 水迷宫测试 ①定位航行实验:每天 3 次,连续训练 5 d;大鼠头朝池壁,从不同象限下水,观察大鼠寻找平台的过程,记录每只大鼠找到平台并爬上去的时间,即潜伏期(incubation period, IP);若未找到平台,超过 60 s 以 60 s 计;每轮训练间隔半小时。

②空间探索实验:去除平台,观察大鼠自由探索平台的过程,时间 30 s;记录每只大鼠第 1 次穿越原平台位置的时间(first time across platform time, FTAPT)及在原平台象限活动的时间(time at the original platform, TAOP)。

1.6 灌注取脑与染色 (1)灌注取脑:①麻醉大鼠,迅速开胸,分别剪开心尖、右心耳,将灌注针经左室插入升主动脉;②用含 1%肝素的 0.9%生理盐水快速灌注,直至右心耳流出清亮液体;③更换 0.1 mol/L、4℃固定液,快速灌注 25 s 后调整速度为 20 滴/min,持续 20 min;④灌注完毕,取全脑,置 4℃冰箱后固定。(2)染色:常规做 HE 染色和改良 Bielschowsky 氨银液染色。

1.7 断头取脑与 sAPP α 、A β_{42} 检测 (1)断头取脑:①剪断大鼠头,放入冰盘,修剪周围软组织;②沿中线向前剪开头皮,向两侧分离,暴露颅骨;③在中线上剪开枕骨和顶骨至顶骨、额骨分界处,将颅骨向两

侧快速掀开;④分离脑组织与颅骨,离断与颅骨相连的脑神经、脑膜,取全脑,放入液氮保存。(2)脑组织sAPP α 、A β ₄₂检测:从液氮中取出大鼠脑,选取大脑皮质和海马组织,匀浆、离心,收集上清液;遵照sAPP α 、A β ₄₂酶联免疫试剂盒说明书要求,严格按步骤操作,于450 nm处测定吸光度(A)值,计算得出脑组织sAPP α 、A β ₄₂的含量。

1.8 统计学方法 应用SAS 9.1工具对数据进行统计分析。在WPS Office 2016表格中录入实验数据;计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用方差分析,两两比较采用 q 检验;检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HPB对各组大鼠空间学习记忆能力的影响 与对照组比较,模型组平均IP、FTAPT明显延长,TAOP明显缩短;与模型组比较,HPB 45 mg/kg组、HPB 135 mg/kg组、多奈哌齐组IP、FTAPT明显缩短,TAOP明显延长,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表1。

表1 HPB对各组大鼠学习记忆能力的影响($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	IP	FTAPT	TAOP
对照组	8.54 \pm 1.23	8.69 \pm 2.44	16.04 \pm 1.49
模型组	23.09 \pm 2.70 ^a	18.76 \pm 1.68 ^a	7.45 \pm 1.39 ^a
多奈哌齐组	18.10 \pm 4.82 ^b	14.31 \pm 4.48 ^b	9.84 \pm 2.11 ^b
HPB 15 mg/kg组	22.14 \pm 3.06	18.03 \pm 2.65	8.12 \pm 0.74
HPB 45 mg/kg组	16.80 \pm 5.97 ^b	14.41 \pm 4.74 ^b	10.65 \pm 3.29 ^b
HPB 135 mg/kg组	10.58 \pm 1.93 ^b	10.17 \pm 0.68 ^b	12.55 \pm 2.07 ^b
F值	4.723	4.357	4.047
P值	<0.05	<0.05	<0.05

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$ 。

2.2 HPB对各组大鼠脑组织sAPP α 和A β ₄₂表达的影响 与对照组比较,模型组sAPP α 含量降低,而A β ₄₂含量升高,差异均有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,HPB 45 mg/kg组、HPB 135 mg/kg组、多奈哌齐组sAPP α 含量升高,但A β ₄₂含量降低,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表2。

表2 HPB对各组大鼠脑组织sAPP α 和A β ₄₂表达的影响($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	sAPP α (ng/g)	A β ₄₂ (μ g/g)
对照组	2.612 \pm 0.18	6.950 \pm 0.637
模型组	2.296 \pm 0.14 ^a	8.204 \pm 0.758 ^a
多奈哌齐组	2.427 \pm 0.16 ^b	7.697 \pm 0.655 ^b
HPB 15 mg/kg组	2.328 \pm 0.10	8.048 \pm 0.777
HPB 45 mg/kg组	2.406 \pm 0.15 ^b	7.630 \pm 0.650 ^b
HPB 135 mg/kg组	2.581 \pm 0.13 ^b	7.147 \pm 0.737 ^b
F值	3.275	3.949
P值	<0.05	<0.05

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$ 。

2.3 HPB对各组大鼠海马神经元形态结构的影响 对照组(图1A)海马CA3区锥体神经元排列整齐、层次多,细胞大、结构清晰。模型组(图1B)海马CA3区神经元排列不整齐、数量少,细胞小、结构模糊、

核固缩。HPB 15 mg/kg组(图1D)海马CA3区神经元病理学改变与模型组基本相似,无明显改善。HPB 45 mg/kg组(图1E)、多奈哌齐组(图1C)海马CA3区神经元形态较模型组有明显改善,然而其结构仍不十分清晰。HPB 135 mg/kg组(图1F)海马CA3区神经元排列较整齐、数量增多,结构较清晰。

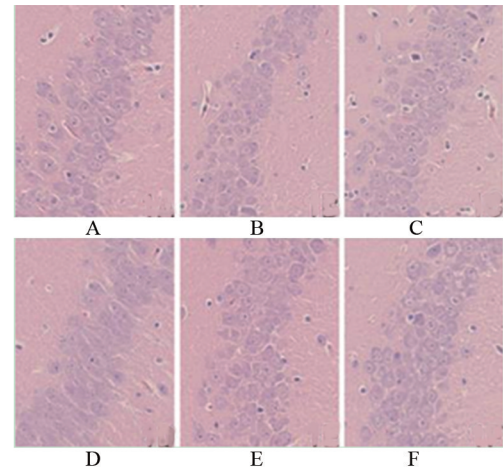


图1 各组海马组织HE染色($\times 300$)

注:A,对照组;B,模型组;C,多奈哌齐组;D,HPB 15 mg/kg组;E,HPB 45 mg/kg组;F,HPB 135 mg/kg组。

2.4 HPB对各组大鼠大脑皮质神经元和神经纤维的影响 对照组(图2A)皮质神经元体积大、数量多,排列整齐、层次清晰,皮质神经元之间、皮质与海马之间神经纤维来往密集。模型组(图2B)皮质神经元体积小、数量少,排列分散、层次不清,皮质神经元之间、皮质与海马之间神经纤维细而稀疏。HPB 15 mg/kg组(图2D)皮质神经元结构和神经纤维联系与模型组无明显不同。HPB 45 mg/kg组(图2E)、多奈哌齐组(图2C)皮质神经元体积增大、数量增多,但神经元之间神经纤维联系增加不明显。HPB 135 mg/kg组(图2F)皮质神经元体积明显变大、数量明显增多,排列较整齐,皮质与海马之间神经纤维较多。

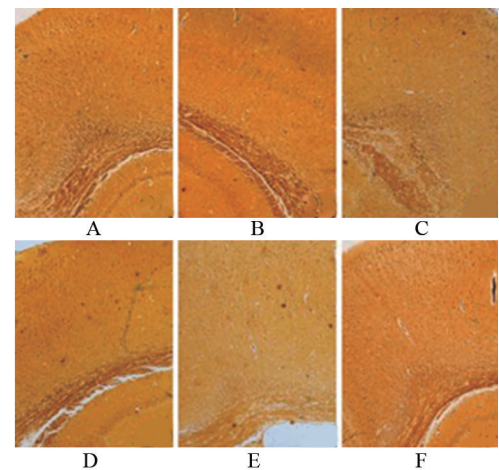


图2 各组大脑皮质改良Bielschowsky氨银液染色($\times 200$)

注:A,对照组;B,模型组;C,多奈哌齐组;D,HPB 15 mg/kg组;E,HPB 45 mg/kg组;F,HPB 135 mg/kg组。

3 讨论

我国 60 岁及以上老人已达到 2.22 亿。随着老年人口增加,AD 发病人数明显增多,严重威胁老年人的身心健康。开发防治 AD 药物已成为政府和卫生技术人员急需解决的大问题^[5]。目前防治 AD 药物的开发极其缓慢,其根本原因是还没有弄清 AD 的发病机制,因而无法复制经典的 AD 动物模型,严重制约着抗 AD 药物研究。现有的多种痴呆模型,如老化型、损伤型、脑缺血型、转基因型等均只是在一个分子通路或一个局部反映 AD 病理变化,无法表达 AD 发病过程的主要特征,不适宜开展抗 AD 的药物研究^[6-8]。本实验联合采用 D-半乳糖、亚硝酸钠及三氯化铝复制大鼠痴呆模型,能较好地模拟 AD 的发病过程、发病环境、认知变化、病理特征等,是更贴近人类 AD 发病规律的复合模型。D-半乳糖、亚硝酸钠、三氯化铝对大鼠的慢性、复合作用,通过脂质过氧化、诱发 A β 斑、神经原纤维变性等过程部分复制了 AD 的病理变化,导致大鼠脑皮质和海马神经元及其之间的突触丢失,从而产生认知功能的障碍^[3]。

本研究结果显示,模型组大鼠的空间学习和记忆缺陷;而 HPB 45 mg/kg 组、HPB 135 mg/kg 组的潜伏期、第 1 次穿越原平台的时间缩短,在原平台象限活动的时间延长,提示 HPB 具有改善痴呆大鼠学习记忆能力的作用^[9-10]。本研究结果还显示,与模型组比较,HPB 45 mg/kg 组、HPB 135 mg/kg 组 sAPP α 表达升高,而 A β_{42} 表达减少,这与 A β 级联假说相吻合。A β 级联假说是国内外学者目前广泛接受的 AD 发病机制。A β 来源于 β -淀粉样前体蛋白(APP)水解,APP 经过 3 种分泌酶($\alpha/\beta/\gamma$)和 2 条途径裂解而代谢。其中,一条是非 A β 源途径,产生可溶性 sAPP α ,对神经元具有保护作用;另一条是 A β 源途径,可产生 A β_{42} ,溶解度极低,形成纤维状物质即 SP 核心成分,可引发一系列神经毒性反应,如神经元死亡、大脑认知障碍等^[11-14]。

本研究结果进一步显示,HE 染色,HPB 135 mg/kg 组海马 CA3 区神经元数量增多、结构较清晰;改良 Bielschowsky 银液染色,皮质神经元体积变大、皮质与海马之间神经纤维较多。胡艳丽等^[1]、赵万红等^[2]研究认为,HPB 可减轻氧化损伤、保护神经元、增加痴呆大鼠皮层或海马 ChAT 活力;这与本研究结果一致。海马结构与学习记忆密切相关,海马区神经元数量增加、皮质与海马之间神经纤维联系增多,学习记忆衰

退得到遏制^[15-17]。

综上所述,HPB 可提高痴呆鼠脑组织 sAPP α 表达,同时减少 A β_{42} 表达,对抗痴呆的主要病理过程,从而改善痴呆大鼠大脑皮质、海马的微细结构,增强大脑皮质内部及皮质与海马之间的神经纤维联系,提高大鼠脑的认知功能。因此,HPB 有望被开发成新型的抗痴呆药物。

参考文献

- [1] 胡艳丽. 2-(α -羟基戊基)苯甲酸钾盐的神经保护作用及对 AD 转基因小鼠的作用[D]. 北京: 北京协和医学院, 2010.
- [2] 赵万红. 2-(α -羟基戊基)苯甲酸钾盐对痴呆动物模型的治疗作用及其机制研究[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2008.
- [3] 姚柏春, 敖云, 张戈, 等. 绞股蓝皂甙对痴呆小鼠学习记忆能力影响及机制[J]. 中国公共卫生, 2017, 33(12): 1708-1711.
- [4] 陈晨, 吴泽青, 陈秋荷, 等. 散发性阿尔茨海默病动物模型研究进展[J]. 药学研究, 2018, 37(2): 63-71, 83.
- [5] 段良霞, 景晓芬. 中国老年人口迁移特征及原因分析—基于第六次全国人口普查数据[J]. 老龄科学研究, 2018, 6(4): 31-39.
- [6] 陈智雅, 张研. 阿尔茨海默病发病机制研究概述[J]. 基础医学与临床, 2018, 38(3): 289-293.
- [7] 瞿千千, 张文霞, 卢燕婉, 等. 20 例阿尔茨海默病患者海马代谢磁共振波谱检测探讨[J]. 上海医药, 2018, 39(15): 55-56, 69.
- [8] 孔莹, 李雪岩, 包瑞, 等. 针刺百会穴对阿尔茨海默病模型大鼠海马区 A β_{42} 影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(8): 126-129.
- [9] 金昊. APP/PS1 小鼠不同时期内嗅皮质、海马体积变化特征及对学习记忆能力的影响[D]. 福州: 福建中医药大学, 2018.
- [10] 李萍萍. 2-(α -羟基戊基)苯甲酸钾盐对学习记忆的改善作用及其影响长时程增强的机制研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2011.
- [11] 赵傲楠, 李彬寅, 陈燕, 等. 阿尔茨海默病中视觉障碍与海马体积相关性研究[J]. 神经药理学报, 2018, 8(2): 56-57.
- [12] 孔海龙, 韦旭, 周倩, 等. 针药结合对阿尔茨海默病模型大鼠海马 CA1 区 ChAT、AChE 表达的影响[J]. 皖南医学院学报, 2018, 37(4): 310-313.
- [13] 田仰华, 余永强, 汪凯. 基于海马亚区的阿尔茨海默病磁共振结构和功能连接研究[J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(9): 1422-1426.
- [14] 方玲娟, 严依军. 盐酸多奈哌齐治疗阿尔茨海默病的临床疗效分析[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2018, 25(4): 271-273.
- [15] LI Q, HE S, CHEN Y, et al. Donepezil-based multi-functional cholinesterase inhibitors for treatment of Alzheimer's disease [J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2018, 158(5): 463-477.
- [16] 董阳婷. 氧化应激在 β -淀粉样蛋白及氟化物引起的实验性中枢神经损伤病理过程中的作用及其分子机制[D]. 贵阳: 贵州医科大学, 2018.
- [17] 徐菁, 陈生弟. 阿尔茨海默病中 Tau 蛋白和 A β 相互作用的研究进展[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2014, 40(4): 251-254.

(收稿日期: 2018-09-28)