

人参皂甙 Rb1 对血管性痴呆大鼠认知功能及突触素表达的影响*

董静尹¹ 袁张根¹ 宋水川² 张大勇¹ 王俊波¹ 李 达¹ 丁立峰¹

(1 浙江大学城市学院医学与生命科学学院, 杭州 310015; 2 解放军 117 医院, 杭州 310013)

摘要 目的:研究人参皂甙 Rb1 (GSRb1)对血管性痴呆大鼠认知功能与海马突触素表达的影响。**方法:**将 36 只大鼠随机分为对照组、模型组和治疗组。以双侧颈总动脉结扎法制作血管性痴呆大鼠模型。造模后治疗组大鼠腹腔注射 GSRb1($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)。Y 型迷宫和免疫组织化学法结合图像分析检测各组大鼠认知功能和海马突触素免疫阳性产物的平均光密度。**结果:**与对照组大鼠相比,模型组大鼠 Y 型迷宫中错误次数增加,模型组大鼠学习记忆能力减退,其海马区突触素免疫反应阳性产物平均光密度降低;与模型组相比,治疗组大鼠出错次数减少,而海马区突触素免疫阳性产物平均光密度升高。**结论:**人参皂甙 Rb1 可增加血管痴呆大鼠海马区突触素表达,显著改善其认知功能。

关键词 人参皂甙 Rb1;血管性痴呆;认知功能;海马;突触素

Effects of ginsenoside Rb1 on cognitive function and synaptophysin expression in vascular dementia rats*

Dong Jingyin¹, Yuan Zhanggen¹, Song Shuichuan², Zhang Dayong¹, Wang Junbo¹, Li Da¹, Ding Lifeng¹

(1. School of Medicine and Life Science, City College, Zhejiang University, Hangzhou 310015;

2. The 117th Hospital of PLA, Hangzhou 310013, China)

Abstract Objective: To study the effects of ginsenoside Rb1 on cognitive function and synaptophysin expression of hippocampus in vascular dementia (VD) rats. **Methods:** Total 36 rats were divided randomly into a control group, a VD model group and a treated group. The vascular dementia rats were established by permanent ligation of bilateral common carotid arteries. After operation, the rats of the treated group were treated intraperitoneally with ginsenoside Rb1 ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) for 4 weeks. Cognitive function was detected in a Y model maze, and the expression of synaptophysin (SYN) of hippocampus was detected with immunohistochemical method and image analysis. **Results:** Compared with control rats, the number of errors of VD rats in a Y model maze increased and mean optical density of SYN in hippocampus decreased significantly. Compared with the model rats, the error time of treated rats decreased, and mean optical density of SYN in the hippocampus increased significantly. **Conclusion:** The study indicates that ginsenoside Rb1 could enhance the expression of SYN in VD rats and improve cognitive function.

Key words ginsenoside Rb1; vascular dementia; cognitive function; hippocampus; synaptophysin

血管性痴呆(vascular dementia),是指由各种脑血管疾病引起的脑功能障碍,其突出表现有记忆力下降,智能减退,行为异常和人格改变等^[1],严重影响了患者的生活质量,因此改善其学习记忆能力是目前治疗血管性痴呆重要指标之一。突触素(synaptophysin, SYN)是一种位于突触前囊泡上的固有钙结合蛋白,其数量和分布可间接反映突触的数量和密度^[2]。目前,有关人参皂甙 Rb1 (ginsenoside Rb1, GSRb1)能否通过影响学习记忆脑区之一的海马内突触素的表达,达到改善血管性痴呆大鼠认知功能(学习记忆能力)的研

究报道较少。本实验拟采用颈总动脉结扎法制作血管性痴呆大鼠模型,以 GSRb1 作为干预因素,通过 Y 型迷宫和免疫组织化学结合图像分析的方法,探讨 GSRb1 对血管性痴呆大鼠学习记忆能力及海马突触素表达的影响,为临床治疗血管性痴呆,改善患者学习记忆能力的减退提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

清洁级 2~3 月龄健康雄性 SD 大鼠 36 只,体质量 180~200 g,浙江省医科院提供,许可证号:SCXK(浙)2008-0033。动物自由进食,饮水,室温保持在 23℃~25℃,自然光照。适应性饲养 1 周,观察状态良好。

1.2 仪器,药品与试剂

Y 型迷宫(江苏三兴声电公司);Nikon 50i 显微镜

* 浙江大学城市学院 2009 年教师科研基金(J09013);浙江教育厅 2009 年度科研立项项目(Y200909882)

第 1 作者 E-mail: dongjy@zucc.edu.cn

收稿日期:2010-09-10;修回日期:2010-11-12

(日本 Nikon 公司);Microm 石蜡切片机(德国美康公司);GSRb1(上海融禾医药科技发展有限公司,批号 090109);突触素抗体(Synaptophysin Ab-4)(NeoMarkers 生产);即用型 SP 试剂盒(福建迈新公司)。

1.3 实验分组

大鼠随机分为 3 组:对照组、模型组、治疗组,每组 12 只。

1.4 造模与给药

采用郑敏等的改良双侧颈总动脉结扎法^[3],建立血管性痴呆大鼠模型。大鼠术前 12 h 禁食,自由饮水。1%戊巴比妥钠腹腔麻醉(30 mg/kg)后,颈部正中左侧旁开 0.5 cm 处做手术切口,分离出该侧颈总动脉后,以手术线作双重结扎。术后每天以 80 万单位青霉素肌肉注射作预防感染。术后 3 d,于颈正中右侧旁开 0.5 cm 处切开,同前分离该侧颈总动脉并结扎。对照组大鼠除不结扎颈总动脉外,麻醉方法和手术过程均与模型组相同,术后肌肉注射青霉素 80 万 U 预防感染。

术后 24 h 腹腔注射给药,各组大鼠如下处理,(1)对照组:假手术+生理盐水(30 mg · kg⁻¹ · d⁻¹);(2)模型组:双侧颈总动脉结扎+生理盐水(30 mg · kg⁻¹ · d⁻¹);(3)治疗组:双侧颈总动脉结扎+GSRb1(30 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)。腹腔注射给药持续 4 周。

1.5 Y 型迷宫测试学习记忆能力

造模给药完成之后,参照余建等改良的评价方法对 3 组实验动物进行 Y 型电迷宫测试^[4],每天分别进行 50 次测试,第 1 天为学习阶段,检测其学习能力,第 2 天为保持阶段,检测其记忆能力,以 10 为计数单位,比较每天每个计数单位之间的错误次数。检测完成之后,采用灌注固定法取脑。取脑之前,上述各组存活大鼠分别有 10、10、12 只。

1.6 免疫组织化学方法

将大鼠以 1%戊巴比妥钠腹腔麻醉(30 mg/kg)后,打开胸腔,经左心室升主动脉 4%多聚甲醛(pH7.2)灌注取脑,取视交叉后 4 mm 处至小脑前的脑组织置于相同固定液内后固定 4~8 h,石蜡包埋制片。连续切片,隔 3 取 1,片厚 5 μm。每只大鼠海马切片分为 2 套,分别进行 H-E 染色及免疫组织化学显色方法。

应用免疫组织化学 SP 法测定血管性痴呆大鼠海马区突触素表达水平。显色步骤按照突触素测定试剂盒说明书进行。突触素抗体浓度为 1:100。阴性对照以 0.1 mol/L PBS 代替一抗进行免疫组织化学显色,余步骤相同。于光学显微镜下观察突触素免疫反应阳性产物的分布,同时应用 Nikon 显微镜 Image-Pro Plus (IPP)分析软件检测突触素免疫反应阳性产物的平均光密度。每只大鼠各取 3 张不同断面切片,并使切片在各组间保持断面一致,海马 CA1 和 CA4&DG 区随机选取 3 个视野测量突触素

阳性产物的平均光密度。所得数据计算其均值,再计算每组均值。

1.7 统计学处理

所得数据经统计学处理后,求出每组平均每张切片测试区内突触素阳性产物的平均光密度,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,运用 SPSS11.0 统计软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA)。

2 结果

2.1 Y 型迷宫测定结果

对照组,模型组和治疗组大鼠每天每个计数单位之间的错误次数差异有统计学意义(表 1)。

表 1 各组大鼠 Y 型迷宫学习记忆检测数据($\bar{x} \pm s$,/10 times)
Tab 1 Cognitive function detected in a Y model maze in different groups ($\bar{x} \pm s$,/10 times)

Group	n	Number of errors in the first day	Number of errors in the second day
Control	12	2.1±0.7	0.8±0.5
Model	10	6.3±2.1**	5.6±1.4**
Treatment	10	4.5±1.4△△	2.9±1.1△△

** P < 0.01 vs control; △△ P < 0.01 vs model

2.2 光镜下 H-E 切片观察

光镜下,对照组大鼠海马内组织结构基本正常,锥体细胞排列整齐,形态正常,细胞着色均匀,胞质呈淡红色,胞核呈蓝色并较清亮;而模型组大鼠该区域锥体细胞排列紊乱,细胞间隙增宽,神经元发生明显的变性和坏死,出现胞质红染,胞核固缩、碎裂、溶解等;治疗组神经元细胞排列稍显紊乱,可见细胞变性坏死,但数量较模型组明显减少(图 1~4)。

2.3 突触素阳性产物平均光密度

突触素免疫反应阳性产物为棕黄色点状或颗粒状沉积,主要分布于神经元周围,颗粒大小不一,这与突触前终末的大小和突触类型有关,胞质内颗粒状产物较少见,白质、血管和胶质细胞不着色。各组间海马区神经元突触素表达水平的比较显示,模型组、治疗组 and 对照组大鼠突触素阳性产物含量依次升高。模型组与对照组比较,阳性产物平均光密度明显降低(P < 0.01);治疗组与模型组比较,平均光密度增加(P < 0.05),差异均具有统计学意义(表 2)。阴性对照组为完全阴性。

表 2 各组大鼠海马脑区突触素表达阳性产物平均光密度($\bar{x} \pm s$)
Tab 2 Mean optical density of SYN in hippocampus in different groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	CA1	CA4&DG
Control	12	213.37±23.64	234.63±26.71
Model	10	169.08±15.67**	173.89±15.13**
Treatment	10	195.18±13.51△	197.23±14.12△

** P < 0.01 vs control; △ P < 0.05 vs model

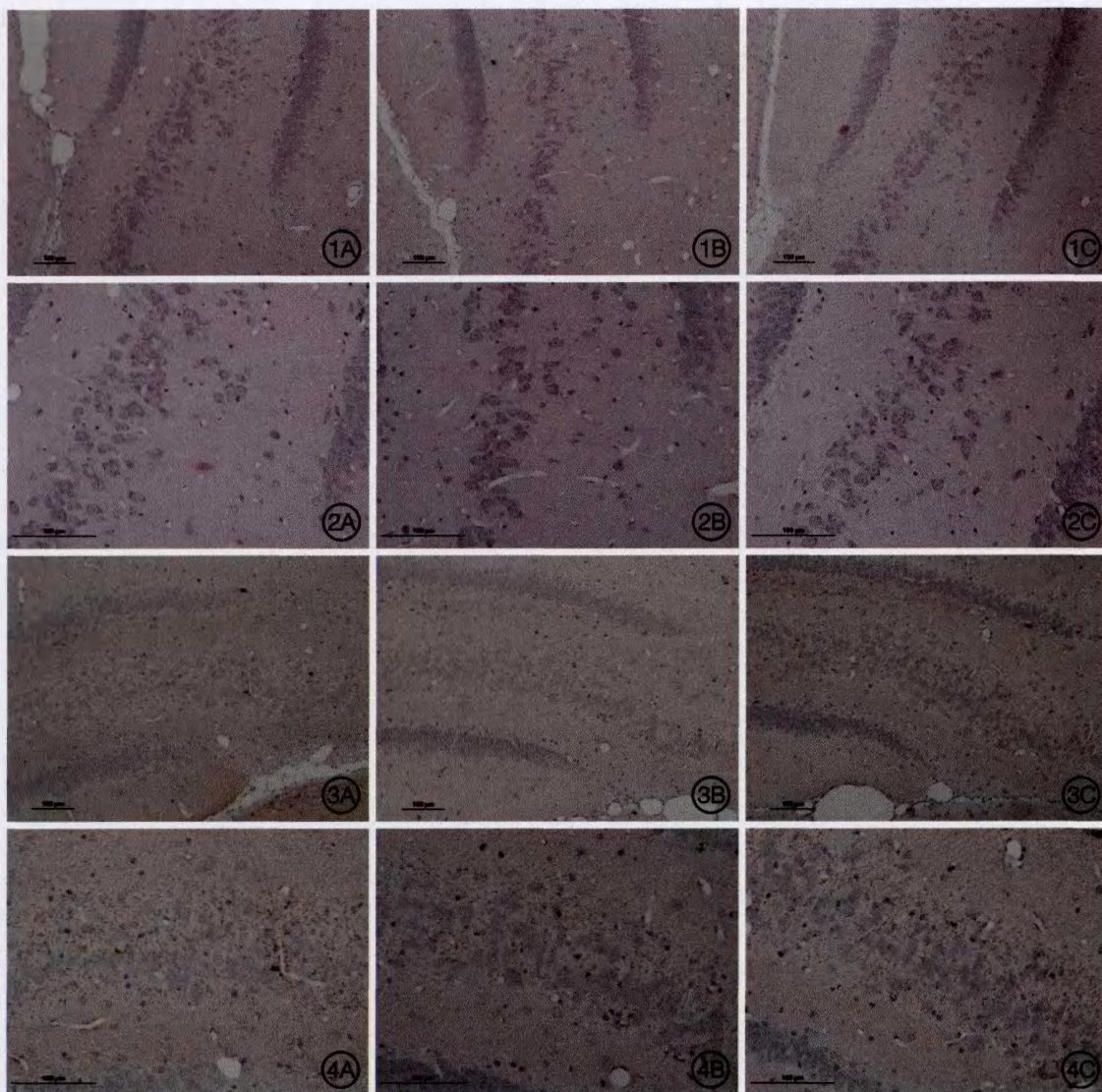


图1 大鼠CA4&DG区H-E染色,100×.
图2 大鼠CA4&DG区H-E染色,200×.
图3 大鼠CA4&DG区突触素的表达,免疫组织化学显色,100×.
图4 大鼠CA4&DG区突触素的表达,免疫组织化学显色,200×.
A:对照组;B:模型组;C:治疗组.

Fig 1 CA4&DG regions in hippocampus, H-E, 100×.
Fig 2 CA4&DG regions in hippocampus, HE, 200×.
Fig 3 Synaptophysin expression of CA4&DG regions in hippocampus, immunohistochemical staining, 100×.
Fig 4 Synaptophysin expression of CA4&DG regions in hippocampus, immunohistochemical staining, 200×.
A: Control group; B: Model group; C: treatment group.

3 讨论

血管性痴呆是一种病因不明的全身性疾病,已明确的高危因素众多,其中之一即为慢性脑缺血。本实验采用改良的双侧颈总动脉结扎术制作血管性痴呆模型,大鼠存活率较高,且更接近临床上常见的脑部慢性缺血的病理过程^[3]。

已知海马是进行信息储存的重要部位,也是研究突触可塑性,长时程增强效应(long-term potentiation, LTP)的最佳单位^[5]。突触的变化是学习与记忆形成的一个重要形态学和功能学基础,广泛分布于神经组织的突触素^[6],其表达可反映突触的发生和密度。本

研究结果显示,模型组大鼠不仅学习记忆能力明显衰退,且海马区突触素水平明显降低,提示血管性痴呆大鼠海马内突触受到严重损伤,可能是其学习记忆认知功能出现衰退的原因之一,同时佐证了突触素与认知存在明显的正相关。目前认为血管性痴呆突触素的减少可能与下列的因素有关:缺血性脑损害导致海马内各层传入纤维发生逆行性退变,由于轴突发生变性和突触后神经元的缺失使得功能性突触前成份减少;同时由于缺血导致神经元物质代谢和蛋白质合成能力下降,轴浆运输障碍,从而对损伤的突触重建产生障碍^[7]。

与模型组比较,治疗组大鼠学习记忆能力明显改

善,海马内突触素含量升高显著,显示 GSRb1 不仅能增强血管性痴呆大鼠海马内突触素的表达水平,并有改善认知的显著功效。GSRb1 是人参二醇系皂甙,研究显示 Rb1 在抗氧化,清除自由基,抑制神经毒性,促进蛋白质合成等方面均有较强活性^[8]。另外,还可通过促进乙酰胆碱释放,增加神经末梢摄取乙酰胆碱,及营养神经,促进轴突生长和神经再生的作用,发挥其促智效应^[9-10]。GSRb1 是否通过上述途径改善血管性痴呆的神经症状尚不明确,已知 LTP 的诱导与突触素的合成是偶联的,而突触素与突触可塑性密切相关^[11],推测 GSRb1 有可能通过提高海马内突触素水平,促进突触重建,诱导 LTP 形成发挥其促智效应。

综上所述,GSRb1 可改善血管性痴呆大鼠学习记忆能力,增强海马内突触素表达,进而易化与突触素相关的学习记忆环节,达到改善大鼠学习记忆的能力。作为一种促智中药,GSRb1 在智能相关脑疾病研究领域具有广阔应用前景。

参考文献

- [1] 徐姜定. 血管性认知功能障碍(痴呆)诊断与治疗进展[J]. 浙江临床医学,2008,10(9):1153-1154.
- [2] Khvotchev M V, Sudhof T C. Stimulus-dependent dynamic homo- and heteromultimerization of synaptobrevin/VAMP and synptophysin [J]. Biochemistry, 2004,43(47):15037-15043.

- [3] 郑敏,赵骥,陈红光,等. 大鼠血管性痴呆模型的改良[J]. 咸宁学院学报医学版,2008,22(4):277-278,284.
- [4] 余建,黄育文,陈忠. 经过改良的评价大鼠空间记忆能力的交替电刺激 Y 型迷宫[J]. 浙江大学学报医学版,2003,32(2):121-125,140.
- [5] Morris R G. Elements of a neurobiological theory of hippocampal function: the role of synaptic plasticity, synaptic tagging ischemas [J]. Eur J Neurosci, 2006,23(11):2829-2846.
- [6] Masliah E, Terry R. The role of synaptic proteins in the pathogenesis of disorders of the central nervous system [J]. Brain Pathol, 1993,3(1):77-85.
- [7] 金善,赵忠新,邵福源. 骨髓间充质干细胞对血管性痴呆大鼠海马 CA1 区突触素表达的影响[J]. 中国康复医学杂志,2006,21(8):683-685.
- [8] 杨吉平,赖红,吕永利. 人参皂甙 Rb1 对阿尔茨海默病样大鼠海马结构 β -分泌酶和早老素-1 表达的影响[J]. 解剖学杂志,2009,32(6):762-764.
- [9] Xue J F, Liu Z J, Hu J F, et al. Ginsenoid Rb1 promotes neurotransmitter release by modulating phosphorylation of synapsins through a cAMP-dependent protein kinase pathway [J]. Brain Res, 2006,1106(1):91-98.
- [10] 赖红,王铁民,赵海花,等. 人参皂甙对老龄大鼠海马结构胆碱能纤维的影响[J]. 解剖学杂志,2006,29(2):249-251.
- [11] Jang S, Ryu J H, Kim D H, et al. Changes of [3 H]MK-801, [3 H]muscimol and [3 H] flunitrazepam binding in rat brain by the prolonged ventricular infusion of transformed ginsenosides [J]. Neurochem Res, 2004,29(12):2257-2266.

(编辑:刘芳)

(上接英文目次二)

卵黄囊血管变得复杂,羊膜褶即将合拢。

3.2 4~14 d 的发育

随胚体的生长,胎膜(卵黄囊、羊膜、绒毛膜、尿囊)发育迅速,应重点观察胚体外形的变化和胎膜的发育状况,此时可从大头破壳进行观察,或取出胚体直接观察,孵化 4 d,羊膜包绕胚体,胚体呈弓形在羊水中浮动,尿囊及尿囊血管清晰可辨。孵化 7 d,可见浅层的尿囊血管,深层的卵黄血管,羊水宽阔,胚体位于清澈的羊水中。孵化 10 d,可见浅层鲜红的尿囊血管,深层暗红的卵黄血管,胚胎在羊水中运动,眼、喙、翅、肢的发育较完善,将其游离出来可见卵黄囊下缘,尿囊下缘,尿囊的血管还没有合拢,在下缘留有缺口,孵化 13 d,尿囊血管和卵黄囊血管发育更加完善,尿绒毛膜血管已合拢,胚体表面可见纤细的绒毛。

3.3 15~21 d 的发育

随着胚体发育逐渐完善,胎膜逐渐完成应有的作用,此时可去掉蛋壳,揭去壳膜,直接观察胚胎与胎膜的变化。孵化 15 d,可见胚胎发育较完善,但仍保留较多的卵黄。孵化 19 d,尿囊血管逐渐减少,卵黄囊逐渐变小,为出壳后的独立生活作准备。孵化 20 d,小鸡啄破胎膜,将头伸向气室,卵黄囊和卵黄即将全部收入腹内。孵化 21 d,小鸡本能地逆时针方向啄破蛋壳,挣脱脐带,顽强地破壳而出,开始新的发育过程。

4 实验效果

4.1 动态图像利于反映实验结果的真实性

破壳直接观察活体鸡胚,或者将早期鸡胚取出放在盛有任氏液的凹玻片上进行镜下活体结构的观察,未经压片、切片、固定、干燥、染色等处理过程,有效避免人为因素造成的假象,观察到的图像充

分反映实验结果的真实性,有利于学生获取真实的实验结果。

4.2 动态图像增强了实验结果的直观性

观察鸡胚的动态图像,了解鸡胚发育状况,使教科书上描写鸡胚发育的内容生动直观地展现在学生面前,让学生看到真实生活状态下鸡胚形态发生及其动态变化,有利于学生对胚胎知识的正确掌握和理解。

4.3 动态图像观察利于激发学生学习的兴趣性

在实验过程中,学生通过设计孵化和观察时间,能够牢固掌握胚胎发育过程的时序关系,可以看到生活状态下鸡胚发育过程,如:体节的发生,原条的发生与回缩,神经板、神经沟、神经褶、神经管、三脑泡、五脑泡的发生,血岛、心管、心、体循环、卵黄囊循环、尿囊循环的发生和血液流动,翅芽、肢芽的发生,卵黄囊、羊膜、尿囊的发生及演变,小鸡破壳而出等奇妙的生命现象,使学生充分感悟生命现象的奥秘,激发学生学习的兴趣,同时也为学生进行探究性学习和设计性实验奠定了基础。

4.4 动静结合有利于掌握知识的系统性

整个实验过程中在观察动态图像的同时辅以观察鸡胚切片,通过动态与静态相结合,使学生观察到鸡的囊胚、原肠胚、神经胚以及小鸡破壳而出的整个发育过程。不仅可以看到鸡胚外形和内部结构的变化,而且还可以看到胎膜与胚胎发育的密切关系,使学生容易获得鸟类胚胎发育的系统知识。

参考文献

- [1] 张红卫. 发育生物学[M]. 第2版. 北京:高等教育出版社,2006:1-3.
- [2] 吴秀山. 现代发育生物学指南[M]. 北京:化学工业出版社,2007:9-10.

(编辑:黄会龙)