

巩卓彦,黄帅阳,陈芳,等. 参枝苓口服液对 *App/Ps1* 双转基因小鼠早期海马突触和髓鞘改变的影响[J].中国实验动物学报, 2019,27(5):592-597.

Gong ZY,Huang SY,Chen F, et al. Effect of Shenzhiling oral liquid on early hippocampal synapses and myelin sheath in *App/Ps1* transgenic mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin,2019,27(5):592-597.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.05.007

参枝苓口服液对 *App/Ps1* 双转基因小鼠早期 海马突触和髓鞘改变的影响

巩卓彦[#],黄帅阳[#],陈芳[#],盛宁,冯慧利,董云芳,任映,杨金铎,王蓬文^{*}

(北京中医药大学东直门医院中医内科学教育部和北京市重点实验室,北京 100700)

【摘要】 目的 通过观察3月龄 *App/Ps1* 双转基因小鼠早期海马CA1区髓鞘和突触超微结构以及髓鞘特殊

染色变化,判断参枝苓口服液对AD小鼠早期神经保护作用。方法 由 *PrP-hAppk595N/M596L* 单转基因痴呆模型小鼠及 *PrP-hPs1dE9* 单转基因痴呆症模型小鼠杂交培育形成的 *App/Ps1* 双转基因小鼠模型是研究阿尔茨海默病的常用疾病模型。将3月龄 *App/Ps1* 双转基因小鼠随机分成模型组、多奈哌齐组[0.92 mg/(kg·d)],参枝苓高剂量组[50 g/(kg·d)],参枝苓中剂量组[25 g/(kg·d)],参枝苓低剂量组[12.5 g/(kg·d)],每组9只;另将9只同月龄同背景C57BL/6J小鼠为对照组。连续灌胃3个月,实验结束后取小鼠海马CA1区组织进行电镜切片并观察此区域髓鞘以及突触相关的超微结构,运用神经髓鞘固蓝染色法对髓鞘进行染色分析。结果 电镜下观察显示,模型组与对照组相比,小鼠海马CA1区突触数量减少($P<0.01$),神经元结构出现退行性改变,少突胶质细胞形态学呈凋亡前状态以及髓鞘板层结构出现显著崩解;与模型组相比,各药物干预组小鼠海马CA1区突触数量增多($P<0.01$),神经元和少突胶质细胞形态结构较完整、染色质均匀,髓鞘板层结构明显好转。特殊染色法显示模型组较于对照组髓鞘纤维明显减少、染色变浅,各干预组髓鞘纤维分布均呈不同程度增加且染色加深。结论 参枝苓口服液可能通过增加 *App/Ps1* 双转基因小鼠海马CA1区突触数量以及改善髓鞘、少突胶质细胞和神经元相关结构形态来发挥AD早期神经保护作用。

【关键词】 阿尔茨海默病;参枝苓;突触;髓鞘;少突胶质细胞;超微结构;小鼠

【中图分类号】Q95-33 【文献标识码】A 【文章编号】1005-4847(2019)05-0592-06

Effect of Shenzhiling oral liquid on early hippocampal synapses and myelin sheath alterations in *App/Ps1* transgenic mice

GONG Zhuoyan[#], HUANG Shuaiyang[#], CHEN Fang[#], SHENG Ning, FENG Huili, DONG Yunfang, REN Ying,
YANG Jinduo, WANG Pengwen^{*}

(Key Laboratory of Chinese Internal Medicine of Ministry of Education and Beijing City,
Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China)
Corresponding author: WANG Pengwen. E-mail: pw_wang@163.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上资助项目(81573927);北京市教育委员会科学研究与研究生培养共建项目(2016)。
Funded by the National Natural Science Foundation of China(81573927), and the Scientific Research and Graduation Training Project of Beijing Municipal Commission of Education(2016)。

[作者简介] 巩卓彦(1994—)女,硕士研究生,研究方向:神经变性病的中医药防治。Email: gongzhuoyan629@163.com
黄帅阳(1993—)女,硕士研究生,研究方向:神经变性病的中医药防治。Email: 1138507954@qq.com
陈芳(1981—)女,博士研究生,研究方向:神经变性病的中医药防治。Email: fangxueer1027@126.com
[#]共同第一作者

[通信作者] 王蓬文(1963—),女,博士,教授,研究方向:神经变性病的中医药防治。Email: pw_wang@163.com

[Abstract] Objective To observe the early neuroprotective effect of shenzhiling oral liquid on AD mice, and to observe the effect of shenzhiling oral liquid on the ultrastructure of myelin sheath and synapse in CA1 area of hippocampus and the changes of special staining of myelin sheath. **Methods** The *App/Ps1* transgenic mouse model is formed by *PrP-hAppk595N/M596L* single transgenic dementia model mice and *PrP-hPs1dE9* single transgenic dementia model mice, which is a common disease model to study Alzheimer's disease. The 3-month-old *App/Ps1* double-transgenic mice were randomly divided into the following groups ($n = 9$ per group): model group, donepezil group [$0.92 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$], shenzhiling high-dose group [$50 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$], shenzhiling medium-dose group [$25 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$], and shenzhiling low-dose group [$12.5 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$]. C57BL/6J mice of the same age and background were used as the control group. After 3 months of continuous intragastric administration, the hippocampal CA1 tissue of mice was obtained for electron microscopic analysis, and the ultrastructural changes of myelin sheath and synapses in this area were observed. The myelin sheath was stained and analyzed by luxol fast blue staining of nerve myelins. **Results** The number of synapses in the hippocampal CA1 area was decreased in the model group compared with controls ($P < 0.01$); the structure of neurons showed degenerative changes, the morphology of oligodendrocytes showed pre-apoptotic state, and the structure of myelin sheath layer collapsed. The number of synapses in the hippocampal CA1 area of mice in each drug intervention group was increased compared with the model group ($P < 0.01$); the morphological structure of neurons and oligodendrocytes was relatively complete, the morphological structure of neurons and oligodendrocytes was intact, the chromatin was uniform, and the myelin lamellar structure was improved. Luxol fast blue staining revealed that myelin fibers in the model group were significantly decreased and the staining was lighter than that in the control group. The myelin fibers in the intervention groups were increased and staining was deepened to different degrees. **Conclusions** Shenzhiling oral liquid may play an early neuroprotective role in Alzheimer's disease by increasing the number of synapses in the hippocampal CA1 area of *App/Ps1* transgenic mice and improving the structure and morphology of myelin sheath, oligodendrocytes and neurons.

[Keywords] Alzheimer's disease; Shenzhiling oral liquid; synapses; myelin sheath; oligodendroglia cell; ultrastructure; mice

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

目前的研究广泛认为阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种皮质疾病,但 AD 发病中白质的超微结构改变如髓鞘和少突胶质细胞破坏会加速认知障碍^[1]。AD 患者体内磁共振成像研究证实了 AD 中白质受累的假设,发现了白质微观结构的改变。AD 患者尸检发现白质总蛋白、髓鞘碱性蛋白、髓鞘蛋白脂蛋白、环核苷酸磷酸水解酶和胆固醇显著降低,这表明髓鞘的丢失。髓鞘完整性受损也会导致神经回路和认知功能的损害,髓鞘障碍引起的突触功能破坏,会进一步影响神经元回路,导致 AD 临床症状的出现^[2]。电子显微镜在澄清髓鞘精细结构方面发挥了重要作用^[3]。 β -淀粉样蛋白 (Amyloid-beta, $A\beta$) 的聚集不仅会损伤改变髓鞘的完整性,也会影响成熟少突胶质细胞的组织结构^[4]。因此,观察髓鞘和少突胶质细胞的病理结构在 AD 中的变化具有重要意义。

参枝苓口服液作为我国第一个获批用于轻、中度 AD 的中药复方,在改善 AD 早期症状发挥着重要作用^[5]。研究证明,参枝苓口服液可以通过增强

扣带回后部和大脑特定区域之间的互通性进而提高大脑功能,还能够通过改善 AD 模型小鼠细胞内 $A\beta$ 的沉积和细胞外 tau 蛋白的高度磷酸化,从而提高其认知功能^[6]。本研究通过观察 AD 动物模型 *App/Ps1* 双转基因小鼠海马 CA1 区髓鞘和突触超微结构和突触数量变化,探讨参枝苓口服液对 AD 模型小鼠早期神经保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物

3 月龄 SPF 级雄性 *App/Ps1* 小鼠 45 只,以及同背景同月龄雄性 C57BL/6J 小鼠 9 只,体重在 $(20 \pm 2) \text{ g}$,购自北京华阜康生物科技有限公司【SCXK (京)2014-0004】,由北京中医药大学东直门医院屏障环境动物室【SYXK (京)2015-0001】进行饲养,实验过程中动物单笼饲养、自由饮水和摄食。本实验获得北京中医药大学东直门医院实验动物伦理委员会批准 (伦理号:15-26)。

1.1.2 试剂及仪器

盐酸多奈哌齐由卫材(中国)药业有限公司提供(批号 140635);参枝苓口服液(由人参、远志、茯苓和石菖蒲共同组成)来自山东沃华药业(国药准字 Z20120010);神经髓鞘固蓝染色法(luxol fast blue)髓鞘染色液试剂盒(货号 G3240)由北京索莱宝科技有限公司提供;2.5%戊二醛溶液购自北京军区陆军总医院八一脑科医院电镜室;氯化钠、多聚甲醛、水合氯醛、二甲苯、无水乙醇(将 100%乙醇和双蒸水配制成 95%乙醇、80%乙醇和 70%乙醇)来自北京化学试剂公司;JEM-2100F 型透射电镜来自日本电子公司。

1.2 方法

1.2.1 分组与给药

将 45 只 3 月龄 *App/PS1* 双转基因小鼠随机等分成 5 组:模型组、多奈哌齐组 0.92 mg/(kg·d)、参枝苓高剂量组 50 g/(kg·d)、参枝苓中剂量组 25 g/(kg·d)和参枝苓低剂量组 12.5 g/(kg·d),药物均溶于蒸馏水中进行灌胃。9 只同窝同月龄 C57BL/6J 雄性小鼠为对照组。适应性喂养 3 d。给予模型组和对照组等体积的蒸馏水进行灌胃。连续 3 个月,1 次/日。

1.2.2 小鼠脑组织取材

实验灌胃结束后,将小鼠麻醉后固定于实验台,用手术剪充分暴露心脏和肝,灌注针插入心脏顶端并固定,同时从右心耳剪开一小口并注射 0.9%氯化钠溶液至肝变白,继续推注 4%多聚甲醛固定液以充分灌注直至小鼠全身僵硬停止。固定后随即断头剪开颅骨,暴露脑组织,置于冰上快速取出海马 CA1 区,储存于盛有 2.5%戊二醛溶液的 EP 管内,4℃静置 2 h 充分固定后用 PBS 缓冲液冲洗 3 次。

1.2.3 透射电镜观察

对海马组织进行常规制备超薄切片,采用透射电镜在 1500 倍的视野下随机取 5 个视野计算突触数量并比较其平均值,在 2000 倍的视野下观察每组小鼠海马 CA1 区神经元和少突胶质细胞的超微结构,在 4000 倍数的视野下观察每组小鼠海马 CA1 区髓鞘的超微结构,分析其形态学变化。

1.2.4 Luxol fast blue 髓鞘染色(伊红法)

将用 4%多聚甲醛固定后的脑组织进行冠状面

组海马组织进行连续冠状切片,片厚 4 μm,然后对切片进行 luxol fast blue 髓鞘染色(伊红法)。

在 60℃恒温烤箱中对制好的石蜡切片进行烤片,1 h 后立即放入二甲苯 I 中脱蜡 20 min,再依次放入二甲苯 II 中 20 min、100%乙醇 3 min、95%乙醇 3 min、80%乙醇 5 min、70%乙醇 5 min,最后在双蒸水中冲洗。将清洗好的切片放入 95%乙醇蘸洗,随后将切片置于 luxol fast blue 髓鞘染色剂中,室温过夜后于第 2 天取出切片依次用 95%乙醇、双蒸水冲洗残余染色液。将切片依次用 luxol 分化液分色 15 s、70%乙醇分色 30 s,用光学显微镜下观察灰白质直至清晰,放置于双蒸水中。用伊红染液将分化好的切片复染 2 min,随后放入蒸馏水中进行冲洗,用光学显微镜观察。观察结束后依次用无水乙醇 5 min、95%乙醇 5 min 脱水,先后放入二甲苯 I 和二甲苯 II 中分别透明 20 min、中性树胶封片。晾干后用光学显微镜观察脑髓鞘的分布形态。

1.3 统计学分析

数据分析借助 SPSS 20.0 软件,用($\bar{x} \pm s$)表示结果,若其呈正态分布且方差齐则用单因素方差分析,采用 LSD 检验进行组间比较。 $P < 0.05$, $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

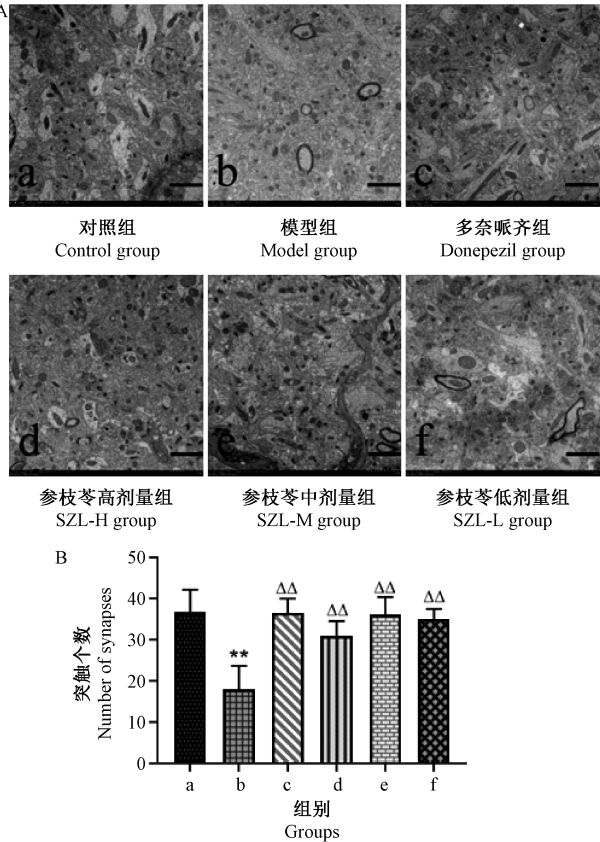
2 结果

2.1 透射电镜观察小鼠海马 CA1 区突触数量的变化

电镜×1.5 k 倍视野下观察神经毡中的突触数目,计算随机选择的 5 个神经毡视野中的突触数量并比较其平均值。与对照组相比,模型组小鼠海马 CA1 区突触数目显著减少($P < 0.01$);各给药组突触数目均多于模型组($P < 0.01$)。(图 1)。

2.2 透射电镜观察 *App/PS1* 小鼠海马 CA1 区髓鞘等相关超微结构的形态学变化

电镜×4.0 k 倍数下显示对照组髓鞘结构较为完整(图 2a),模型组髓鞘结构发生显著破坏(图 2b);与模型组相比,各药物组髓鞘结构均有不同程度改善(图 2c-f)。电镜×2.0 k 倍数下观察对照组少突胶质细胞结构基本完整、核膜较连续、核染色质分布较均匀(图 3a);模型组的少突胶质细胞内核染色质固缩,呈凋亡前状态,(图 3b);与模型组相比,各给药组的少突胶质细胞结构明显好转,核染色质分布均匀(图 3c-f)。电镜×1.5 k 倍数下



注:A. 神经毡(标尺=2.0 μm);B. 突触数量。

图 1 各组小鼠海马组织种的突触结构

Note. A. Nerve felts (Bar=2.0 μm). B. Number of synapses.

Figure 1 Ultrastructural images of synapses in the mouse hippocampus

显示对照组神经元结构完整,染色质均匀分布,核形态正常,胞质结构正常(图 4a);模型组神经元呈凋亡早期改变,核染色质固缩,胞质内可见解聚的多聚核糖体,线粒体肿胀,部分线粒体出现嵴断裂现象,整个细胞发生退行性改变(图 4b);与模型组比较,多奈哌齐组神经元结构基本正常,参枝苓各剂量组神经元结构均有改善,形态完整,核染色质分布较均匀,多聚核糖体和线粒体较丰富(图 4c-f)。

2.3 Luxol fast blue 髓鞘染色(伊红法)观察小鼠海马髓鞘变化

髓鞘经 luxol fast blue 特殊染色后,白质纤维呈深蓝色,对照组髓鞘出现密集分布的深蓝色白质纤维(图 5a,图 6a);模型组白质纤维明显减少且染色变淡,显示髓鞘减少(图 5b,图 6b);较模型组,多奈哌齐组和参枝苓各剂量组小鼠脑内髓鞘白质纤维分布显著增加且染色变深(图 5c-f,图 6c-f)。

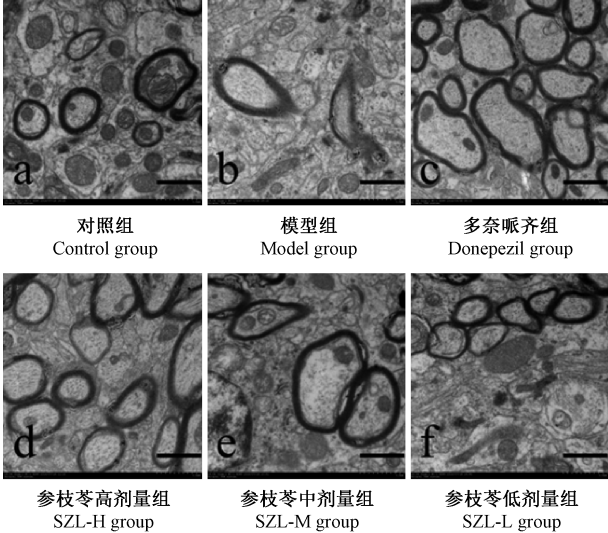


图 2 各组小鼠髓鞘超微结构(标尺=1.0 μm)

Figure 2 Ultrastructure of myelin sheath in each group (Bar=1.0 μm)

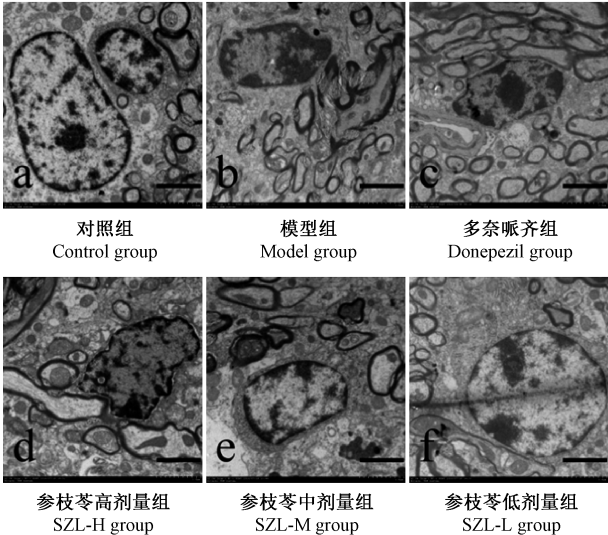


图 3 各组小鼠少突胶质细胞超微结构(标尺=2.0 μm)

Figure 3 Ultrastructure of oligodendrocytes in the mouse hippocampus CA1 area of each group (Bar=2.0 μm)

3 讨论

研究发现先于轴突异常发生的髓鞘损伤与 AD 紧密相关。髓鞘破坏是指轴突周围髓鞘的损伤和丢失,并早于老年斑沉积和神经纤维缠结发生^[7]。早在 1964 年就有研究人员利用电子显微镜首次发现在 AD 患者白质中存在广泛的脱髓鞘病变,发现髓鞘板层之间有空间较大且充满致密的颗粒状碎片和空泡^[8],而目前的研究针对 AD 具体髓鞘变化知之甚少。研究显示,少突胶质细胞在 AD 进展期

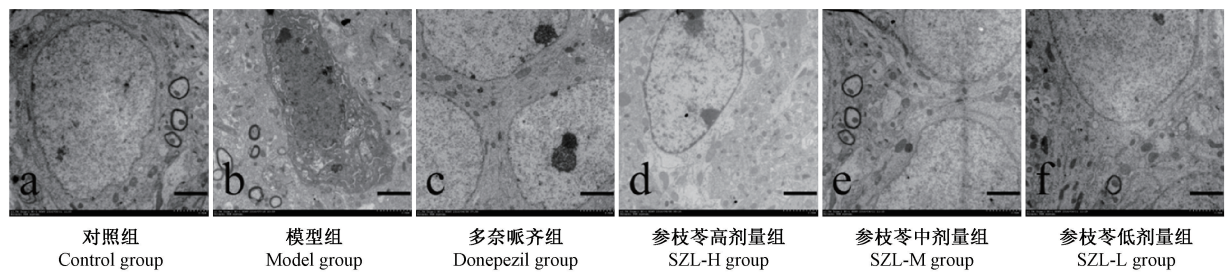


图 4 各组小鼠神经元超微结构(标尺=2.0 μm)

Figure 4 Ultrastructure of neurons in the mouse hippocampus CA1 area of each group (Bar=2.0 μm)

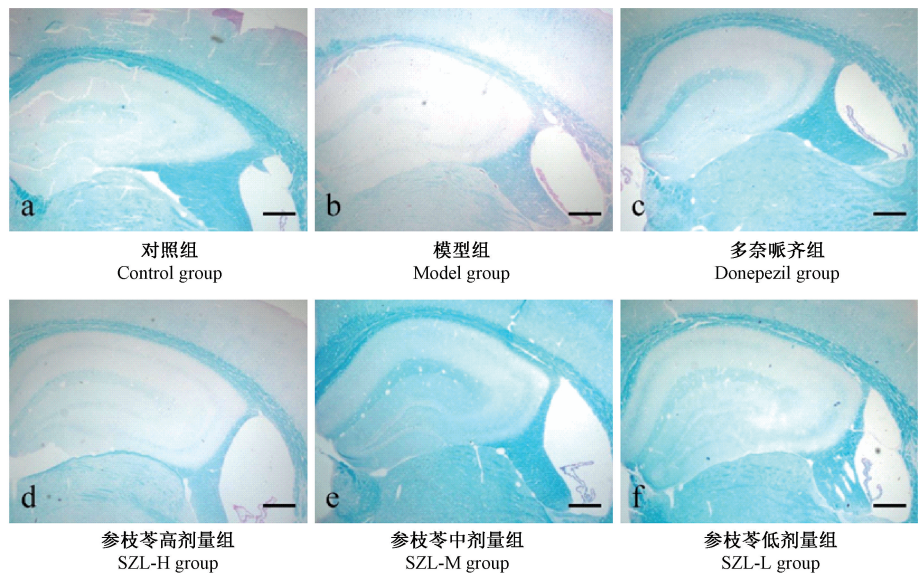


图 5 各组小鼠 Luxol fast blue 髓鞘染色(标尺=500 μm)

Figure 5 Changes of myelin sheath in the mouse brain tissues of each group (Luxol fast blue staining. Bar=500 μm)

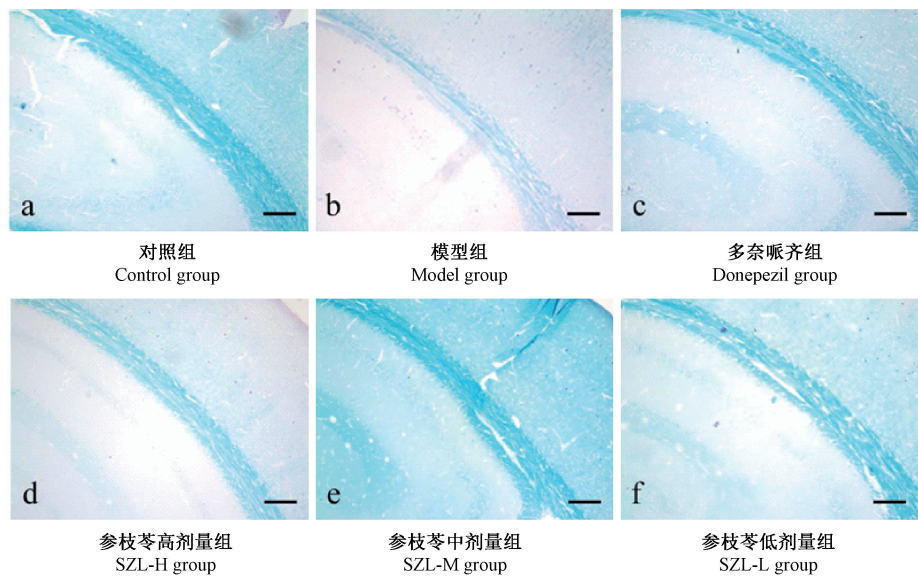


图 6 各组小鼠 Luxol fast blue 髓鞘染色 (Bar=200 μm)

Figure 6 Changes of myelin sheath in the mouse brain tissues of each group (Luxol fast blue staining. Bar=200 μm)

间表现出特定的形态学变化,通过原位缺口末端标记的方法发现 A β 通常会导致少突胶质细胞破裂和细胞体收缩^[9]。各种观察结果表明,髓鞘和少突胶质细胞受损可能会加速认知障碍。但目前针对 AD 病理变化中髓鞘及少突胶质细胞超微结构变化鲜有报道。突触功能异常也会引发各种神经系统疾病^[10],突触丢失和神经元破坏也是造成 AD 早期记忆损伤的重要原因^[11]。课题组前期对 *App/Ps1* 小鼠突触的超微结构进行了研究,发现参枝苓口服液能改善突触结构^[12],可能会进一步改变突触可塑性,从而增强其早期空间记忆能力和记忆保持能力^[13]。

目前尚无有效方法能够治愈 AD,西药针对 AD 的某一环节有阻断作用,中医药由于其整体观和辨证论治的特点及优势越来越受到研究者的青睐。参枝苓口服液以开心散为基础进行遣药组方,从心论治。方中党参补气安神,桂枝温经振阳,茯苓益气凝神,远志、石菖蒲、龙骨和牡蛎能够通窍安神,炙甘草和干姜健脾和中。针对 AD 本虚标实的病机本质,一则补益心气、振奋心阳,二则行气化痰开窍^[14]。

本实验利用透射电镜研究参枝苓口服液对 *App/Ps1* 小鼠海马 CA1 区髓鞘、少突胶质细胞、突触和神经元超微结构的影响。结果显示,模型组 *App/Ps1* 小鼠海马 CA1 区髓鞘板层结构发生显著损坏、少突胶质细胞呈凋亡前状态、突触数目减少、神经元出现退行性改变;Luxol fast blue 染色显示髓鞘纤维明显减少,染色变浅。与模型组相比,参枝苓各剂量组 *App/Ps1* 小鼠海马 CA1 区髓鞘板层结构均明显好转、少突胶质细胞结构有所改善且染色分布均匀,突触数目增多,神经元结构呈现不同程度的改善;Luxol fast blue 染色显示髓鞘纤维分布显著增加且染色加深。以上结果都表明,参枝苓口服液可能是通过改善小鼠海马 CA1 区髓鞘、少突胶质细胞和神经元的形态学变化,以及增加突触数目从而影响突触功能来发挥早期 AD 患者的神经保护作用。

参 考 文 献(References)

- [1] Dean DC, Hurley SA, Kecsckemeti SR, et al. Association of amyloid pathology with myelin alteration in preclinical Alzheimer disease [J]. JAMA Neurol, 2017, 74(1): 41-49.
- [2] Overk CR, Masliah E. Pathogenesis of synaptic degeneration in Alzheimer's disease and Lewy body disease [J]. Biochem Pharmacol, 2014, 88(4): 508-516.
- [3] Cai Z, Xiao M. Oligodendrocytes and Alzheimer's disease [J]. Int J Neurosci, 2015, 126(2): 97-104.
- [4] McKenzie AT, Moyon S, Wang M, et al. Multiscale network modeling of oligodendrocytes reveals molecular components of myelin dysregulation in Alzheimer's disease [J]. Mol Neurodegener, 2017, 12(1): 82.
- [5] Pan W, Wang Q, Kwak S, et al. Shen-Zhi-Ling oral liquid improves behavioral and psychological symptoms of dementia in Alzheimer's disease [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2014, 18(5): 1-6.
- [6] Xing S, Shen D, Chen C, et al. Effect of the herbal formulation Shen-Zhi-Ling on an *App/Ps1* mouse model of Alzheimer's disease by modulating the biliverdin reductase/heme oxygenase 1 system [J]. Exp Ther Med, 2017, 14(3): 1961-1966.
- [7] Carriel V, Campos A, Alaminos M, et al. Staining methods for normal and regenerative myelin in the nervous system [J]. Methods Mol Biol, 2017, 1560: 207-218.
- [8] Terry RD, Gonatas NK, Weiss M. Ultrastructural studies in Alzheimer's presenile dementia [J]. Am J Pathol, 1964, 44(2): 269-297.
- [9] Nasrabady SE, Rizvi B, Goldman JE, et al. White matter changes in Alzheimer's disease: a focus on myelin and oligodendrocytes [J]. Acta Neuropathol Commun, 2018, 6(1): 22.
- [10] Fu AK, Ip NY. Regulation of postsynaptic signaling in structural synaptic plasticity [J]. Curr Opin Neurobiol, 2017, 45(8): 148-155.
- [11] Ossenkoppele R, Pijnenburg YA, Perry DC, et al. The behavioural/dysexecutive variant of Alzheimer's disease: clinical, neuroimaging and pathological features [J]. Brain, 2015, 138(Pt 9): 2732-2749.
- [12] 吴艺琼, 陈芳, 王蓬文, 等. 参枝苓口服液对 *Appsw/PsldE9* 小鼠学习记忆和突触超微结构的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2018, 41(10): 821-827.
- Wu YQ, Chen F, Wang PW, et al. Effects of shenzhiling oral solution on learning and memory and synaptic ultrastructure in *Appsw/PsldE9* mice [J]. J Beijing Univ Trad Chin Med, 2018, 41(10): 821-827.
- [13] 董云芳, 冯慧利, 陈芳, 等. 金思维对东莨菪碱致记忆障碍小鼠胆碱能系统的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(01): 107-113.
- Dong YF, Feng HL, Chen F, et al. Effect of herbal formula GAPT on cholinergic system in mice with scopolamine-induced memory impairment [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2018, 26(1): 107-113.
- [14] 陈久林, 孙申维, 郁志华, 等. 参枝苓口服液治疗轻度认知功能损害的临床疗效观察 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2017, 15(3): 365-368.
- Chen JL, Sun SW, Yu ZH, et al. Clinical observation on Shenzhiling oral liquid in the treatment of mild cognitive impairment [J]. J Cardiovasc Cerebrovasc Dis, 2017, 15(3): 365-368.