灵芝三萜类化合物对 AD 大鼠海马神经元凋亡的影响*

张 玥，罗 俊**，黄能慧，张小毅
（贵州医科大学 药理学教研室，贵州 贵阳 550004）

［摘 要］**目的：**研究灵芝三萜类化合物（GLT）对阿尔茨海默病（AD）模型大鼠脑细胞凋亡的影响。**方法：**将自然衰老模型大鼠 60 只随机均分为 GLT 低、中、高剂量组，模型组，溶媒对照组（食用油）及阳性对照组（健脑胶囊），5 月龄大鼠 10 只为正常对照组；连续灌胃给予相应药物 60 d，取各组大鼠海马组织 HE 染色观察神经元变化，TUNEL 法检测各组大鼠海马神经细胞凋亡。**结果：**与正常对照组比较，模型动物脑海马神经细胞损伤明显，细胞排列极度紊乱，大小形态不规则，数量明显减少，海马凋亡阳性细胞数显著增多，差异具有统计学意义（$P < 0.05$），神经细胞核内有大量深染棕黄色颗粒状；给予 GLT 后，神经细胞损伤减轻，GLT 高剂量组无明显神经细胞坏死特征；与模型组比较，GLT 中、高剂量组大鼠海马凋亡阳性细胞数减少（$P < 0.05$），神经细胞核浅染棕黄色颗粒。**结论：**GLT 可减少 AD 大鼠海马神经元凋亡，这可能是防治 AD 的机制之一。

［关键词］海马；阿尔茨海默病；衰老；细胞凋亡；灵芝三萜类化合物
［中图分类号］R285.5；R749.6 ［文献标识码］A ［文章编号］1000-2707（2016）05-0532-03
DOI：10.19367/j.cnki.1000-2707.2016.05.009

Effects of Ganoderma Lucidum Triterpenoids on Apoptosis of Brain Tissue of Alzheimer Disease Model Rat

ZHANG Yue, LUO Jun, HUANG Nenghui, ZHANG Xiaoyi
(*Department of Pharmachology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China*)

［**Abstract**］**Objective**: To investigate the protective effects and mechanism of Ganoderma lucidum Triterpenoids (GLT) in Alzheimer Disease model rats. **Methods**: 60 natural aging rats were randomly divided into 6 groups, GLT low dose group, GLT middle dose group, GLT high dose group, model group, solvent group (edible oil) and positive group (JNJN). 10 rats of 5 months of age were used as control group. Then the intragastric administration was used. After being treated with GLT for 60 days, brain tissues were stained with Hematoxylin-eosin to observed, and the numbers of apoptotic neuron in hippocampus were tested by TUNEL. **Results**: Neurons were damaged in the brain, cell display were extremely messed with irregular size and shapes and the number of cells decreased in model rats. Hippocampus apoptotic positive cells increased significantly, large amount of dark brown particles were found in neuro cell nucleus; GLT high dose group showed no significant neuro cell apoptosis features; comparing with model group, middle and high dose group showed decreased hippocampus apoptotic positive cells ($P < 0.05$), light brown particles were found in neuro cell nucleus. **Conclusion**: GLT can decrease necrosis of neuron and inhibit apoptosis, it maybe the mechanisms of protecting AD model animals.

［**Key words**］hippocampus; Alzheimer disease; natural aging; apoptosis; *Ganoderma lucidum* Triterpenoids

阿尔茨海默病（alzheimer disease, AD）是一种老年人神经系统退行性疾病，起病潜隐，临床主要表现为严重的认知和记忆功能减退，并伴有进行性的记忆、智能、言语、视空间技能障碍及人格改变

*［基金项目］教育部科学技术研究重点项目（V200801）；贵州省科技攻关项目（黔科合 2004NGY031）；贵州省优秀科技教育人才省长专项资金（2005293）
**通信作者 E-mail：luojun@ gmc.edu.cn
网络出版时间：2016－05－13 网络出版地址：http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20160513.2141.052.html

等[1]。AD 的病因和发病机制不明确,临床多采用细胞代谢激活剂等药物改善脑细胞功能,无特异性治疗药物及方法。本课题组前期研究表明灵芝主要有效成分—灵芝三萜类化合物(*Ganoderma lucidum* triterpenoids,GLT)能提高 AD 自然衰老模型大鼠的学习记忆能力,其机制可能是通过改善 AD 大鼠脑内能量代谢,提高总抗氧化能力,降低乙酰胆碱酯酶活力,升高乙酰胆碱转移酶活力等起效,本文观察 GLT 对 AD 模型大鼠脑细胞凋亡的影响。

1　材料与方法

1.1　材料

GLT(中科院地化所提取),健脑胶囊(JNJN,青岛国风药业公司),TUNEL 法细胞凋亡检测试剂盒(武汉 BOSTER 公司)及 BIOMIAS-99 图像分析系统(四川大学图像图形研究所)。SD 大鼠由贵州医科大学实验动物中心提供。

1.2　方法

1.2.1　AD 大鼠筛选　取 24 月龄 SD 大鼠 100 只和 5 月龄大鼠 10 只进行 Morris 水迷宫实验,以 5 月龄大鼠的逃避潜伏期均数加 2 倍标准差为判别 AD 的标准,24 月龄大鼠大于该值的为 AD 大鼠[2]。

1.2.2　分组　筛选出的 60 只 AD 大鼠随机分为模型组(NS 10 mL/kg)、GLT 低剂量组(0.25 g/kg)、GLT 中剂量组(0.5 g/kg)、GLT 高剂量组(1.0 g/kg)、溶媒对照组(食用油 10 mL/kg)及阳性对照组(健脑胶囊 0.38 g/kg),每组 10 只,雌雄各半;以 5 月龄大鼠为正常对照组(NS 10 mL/kg)。每日 1 次灌胃给药,连续 60 d。

1.3　观察指标

给药结束后,各组大鼠迅速于冰台上 0℃下断头取出大脑,取视交叉后 5 mm 厚的冠状位脑片(包含海马),石蜡包埋,连续冠状切片,每例标本切片分别作 HE 染色观察海马细胞;TUNEL 法(按试剂盒操作)检测海马神经凋亡细胞并计数:每张切片(每例动物标本)随机选取 5 个 400 倍视野,以 5 个视野阳性细胞数的平均值作为一例标本的阳性表达细胞数。

1.4　统计学方法

所有实验数据采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析进行统计学处理,两两比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　大鼠海马组织病理学

图 1 显示,正常对照组大鼠海马神经细胞排列整齐,形态规则,胞体为类圆形;细胞结构完整,胞膜、胞核轮廓清晰;神经细胞无明显肿胀及坏死。模型组及溶媒对照组大鼠海马神经细胞排列极度紊乱,大小形态不规则,神经细胞数量明显减少,细胞肿胀,结构轮廓模糊,有明显神经细胞空泡样变性改变(细胞浆染色变浅,其内有大小不等圆形或类圆形空泡,有明显的神经细胞坏死表现);核结构模糊、向一侧固缩、碎裂或溶解消失。GLT 低、中剂量组及阳性药对照组大鼠海马神经细胞排列轻度紊乱;GLT 高剂量组神经细胞大小形态规则,细胞数量较多,细胞结构完整,胞膜、胞核轮廓清晰,细胞体积稍增大、无明显肿胀,少量神经细胞空泡变性,无明显神经细胞坏死特征。

2.2　大鼠海马神经细胞凋亡

显微镜下可见细胞核呈棕黄色颗粒状改变(凋亡小体)的为凋亡阳性细胞(箭头所示)。与正常对照组比较,模型组大鼠海马凋亡阳性细胞数显著增高,差异有统计学意义($P < 0.01$),神经细胞核内有大量深染棕黄色颗粒状;与模型组相比,GLT 中、高剂量组及阳性对照组海马凋亡阳性细胞数降低,神经细胞核浅染棕黄色颗粒(图 2、表 1)。

表 1　各组大鼠海马神经细胞凋亡情况($\bar{x} \pm s$)

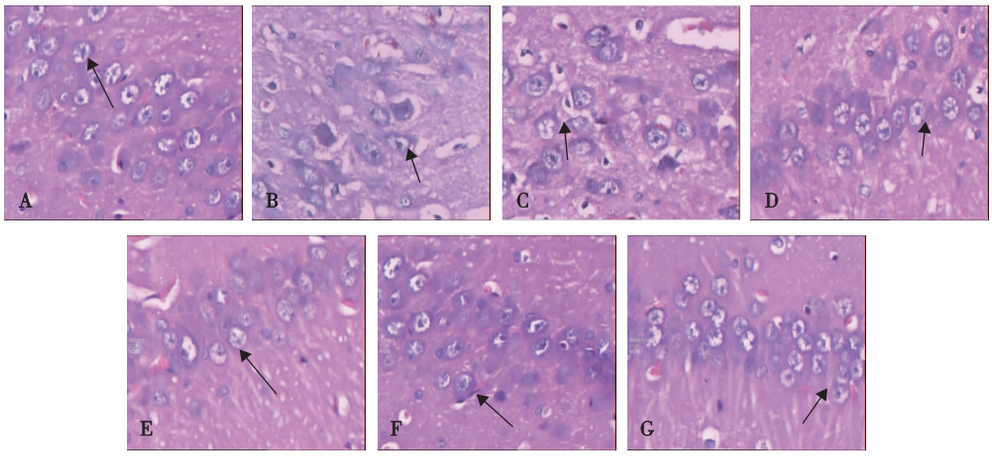
Tab. 1　Apoptosis of the hippocampus cells of aging rats

组别	n	凋亡阳性细胞数
正常对照组	10	0.50 ± 0.17
模型组	10	44.60 ± 4.45(1)
溶媒对照组	10	38.40 ± 2.55(1)
GLT 低剂量组	10	31.20 ± 2.10(2)
GLT 中剂量组	10	20.40 ± 1.58(2)
GLT 高剂量组	10	10.70 ± 1.95(2)
阳性对照组	10	20.40 ± 1.58(2)

(1) 与正常对照组比较,$P < 0.01$;(2) 与模型组比较,$P < 0.05$

3　讨论

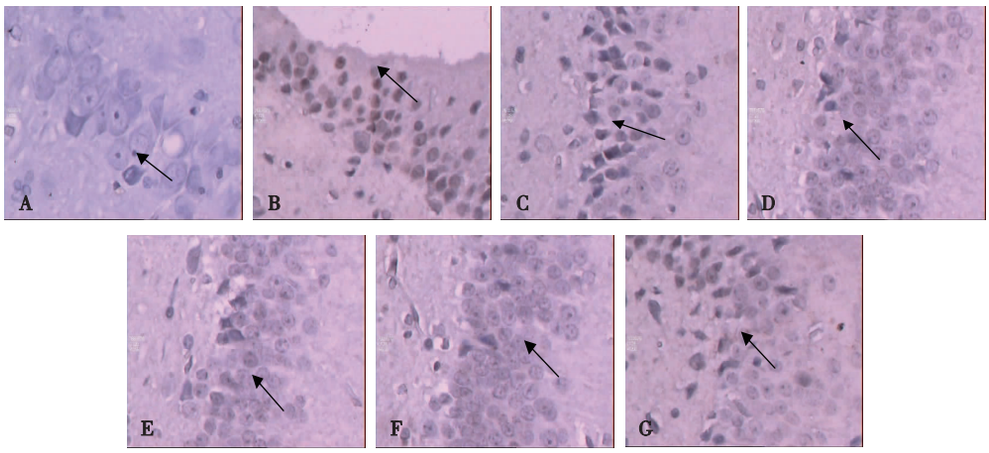
有关 AD 的发病机制研究很多,研究已证实基因突变、脑内胆碱能传递功能紊乱、自由基损伤、Aβ 沉积、神经元凋亡等因素可能在AD的发病中



注:A 为正常对照组,B 为模型组,C 为溶媒对照组,D、E 及 F 为 GLT 低、中及高剂量组,G 为阳性对照组

图 1　各组大鼠海马神经细胞(HE, ×400)

Fig. 1　The pathology examination of hippocampus in rats



注:A 为正常对照组,B 为模型组,C 为溶媒对照组,D、E 及 F 为 GLT 低、中及高剂量组,G 为阳性对照组

图 2　各组大鼠海马细胞凋亡情况 (TUNEL, ×400)

Fig. 2　Apoptosis of the hippocampus cells of aging rats

起关键性作用。习惯所称灵芝属中赤芝的子实体部分。灵芝具有广泛的药理活性,主要有效成分之一是 GLT[3-5]。本文旨在观察 GLT 对 AD 大鼠组织细胞凋亡的影响,从而研究该药对 AD 有无防治功能,并探讨其可能的作用机制。建立理想的模型是研究的重要环节,本研究采用自然衰老认知障碍模型,更符合衰老因素在 AD 发病过程中的重要作用[6]。AD 的病理学改变有老年斑(senile plaque, SP)、神经元纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFT)、大量神经元丢失及颗粒空泡变性等。在某些神经变性疾病中,一个明显的病理特征是神经元的缺失,其中细胞凋亡起了主要作用,特别是在 AD 中[7]。本研究结果表明:自然衰老模型大鼠形态学方面,脑组织切片 HE 染色可见神经细胞肿胀、坏死,胞浆空泡样变性等改变;在神经生化学方面,神经细胞凋亡数增多。以上结果表明,本实验建立的 AD 模型组织病理学以及神经生化学变化方面模拟出与 AD 相似的特征。自然衰老模型大鼠用 GLT 灌胃 2 个月后,脑神经元坏死减少,细胞凋亡数减少,表明 GLT 能够保护 AD 自然衰老模型大鼠脑组织,减轻大脑神经损伤。

细胞凋亡是 AD 重要的神经病理学特性。大量的研究表明,在 AD 发病过程中,细胞凋亡起主导作用,AD 患者脑内细胞丢失的机制可能与细胞凋亡有关[8]。传统上用显微镜来观察细胞的死亡,其特征为核染色质的浓缩和碎片的形成,但这种现象出现晚且时间短暂。凋亡的特征是内源性核酸内切酶被激活,细胞自身的染色质或 DNA 被切割,出现单链或双链缺口,并产生与 DNA 断点数

(下转第 550 页)

ROC 曲线面积(AUC)分别为 0.819、0.794,证明血清 IL-6、TNF-α 水平对首发抑郁症有一定诊断价值。但是,因本研究采用特异性和灵敏度相对较局限的 ELISA 法,结果影响因素相对流式细胞技术和化学发光法等较多,结果尚需进一步研究证实。此外,还需进一步研究对照组的 HAMD 各因子、细胞因子以及甲状腺功能之间的相关性来补充证明各细胞因子在抑郁症首次发作中的作用。

4 参考文献

[1] Mariana P, Simone A. The importance of cytokines and autoantibodies in depression [J]. Autoimmun Rev, 2015 (1):30 - 35.

[2] Kim YK, Na KS, Shin KH, et al. Cytokine imbalance in the pathophysiology of major depressive disorder[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2007(5):1044 - 1053.

[3] 沈渔邨. 精神病学[M]. 5 版. 北京:人民卫生出版社, 2012:553.

[4] Rudolfa S, Greggersena W, Kahl KG, et al. Elevated IL-6 levels in patients with atypical depression but not in patients with typical depression[J], Psychiatry Res, 2014 (1):34 - 38.

[5] Papanicolaou DA, Wilder RL, Manolagas SC, et al. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease [J]. Ann Intern Med, 1998 (2):127 - 137.

[6] 赵娜,刘薇,刘洋,等. 首发抑郁症患者血清 IL-18 水平的研究[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2010(2):192 - 194,197.

[7] Rajeev K, Jonathan C. Depression: an inflammatory illness[J]. JNNP, 2012(5):495 - 502.

[8] Himmerich H, Fulda S, Linseisen J, et al. Depression, comorbidities and the TNF-alpha system[J]. Eur Psychiatry, 2008(6):423 - 429.

[9] Black PH. Immune system-central nervous system interactions: effect and immunomodulatory consequences of immune system mediators on the brain[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1994(1):7 - 12.

[10] Berthold-Losleben M, Himmerich H. The TNF-alpha System: Functional Aspects in Depression, Narcolepsy and Psychopharmacology [J]. Curr Neuropharmacol, 2008 (3):193 - 202.

[11] Zhu CB, Blakely RD, Hewlett WA, et al. The Proinflammatory Cytokines Interleukin-1beta and Tumor Necrosis Factor-Alpha Activate Serotonin Transporters [J]. Neuropsychopharmacology, 2006(10):2121 - 2131.

[12] Stolakis, Vasileios. The regulatory role of neurotensin on the hypothalamic-anterior pituitary axons: Emphasis on the control of thyroid-related functions [J]. Neuropeptides, 2010(1):1 - 7.

[13] 贾福军,张海燕,郭新胜, 等. 抑郁症患者的甲状腺功能和细胞因子的研究[J]. 上海精神医学杂志, 2004 (5):277 - 279.

(2016-02-20 收稿,2016-05-08 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 刘 华

(上接第 534 页)

目相同的 3' - OH 末端,通过 TUNEL 法可以检测凋亡细胞。本实验中,AD 模型动物组脑组织 HE 染色显示神经元变性、坏死及丢失较正常对照组显著增多,予 GLT 治疗后,GLT 治疗组动物脑组织神经元变性、坏死及丢失明显减少,与模型组有显著性差异;与正常对照组相比,模型组动物脑组织 TUNEL 阳性凋亡细胞数显著增加,GLT 治疗后,TUNEL 阳性凋亡细胞数较模型组明显减少;提示 GLT 能减少 AD 神经元细胞损伤、坏死、丢失,抑制细胞凋亡。

本研究结果表明 GLT 对 AD 有防治作用,其可能的作用机制与减少脑神经元坏死、抑制细胞凋亡有关。

4 参考文献

[1] 吴文宝,孔庆宏,阚祥绪,等. 凋亡通路及 caspases 在阿尔茨海默病中作为治疗靶点的研究[J]. 中国药理学通报, 2015(11):1496 - 1501.

[2] 盛树力. 老年性痴呆:从分子生物学到临床诊治[M]. 北京:科学技术文献出版社, 1998:351 - 352.

[3] 陈慧,杨海龙,刘高强. 灵芝三萜的生物合成和发酵调控[J]. 菌物学报, 2015(1): 1 - 9.

[4] 林志彬. 中西医结合研究诠释灵芝的扶正固本功效[J]. 福建中医药大学学报, 2010 (6):1 - 6.

[5] 李钦艳,陈逸湘,钟莹莹. 灵芝主要活性成分及其功能的研究进展(综述)[J]. 食药用菌, 2015(2):86 - 91.

[6] 赵保胜,徐暾海. 老年性痴呆疾病模型的建立[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011(6):274.

[7] 李建,王芳,周军,等. 丹参酮 IIA 对 AD 大鼠脑组织 p53,pp53 表达及细胞凋亡的影响[J]. 中南大学学报:医学版, 2015(11):1210 - 1216.

[8] 侯雪芹,张磊,林雅萍,等. 4 种阿尔茨海默病动物模型行为学改变及凋亡机制的比较[J]. 中国老年学杂志, 2015(12):3185 - 3187.

(2016-01-12 收稿,2016-04-28 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 赵 毅