

海参磷脂对阿尔兹海默病模型大鼠认知功能的影响

王颖, 李忠辉

内蒙古包钢医院老年病科, 内蒙古 包头 014000

摘要: **目的** 研究海参磷脂对阿尔兹海默病模型大鼠去甲肾上腺素(NE)、多巴胺(DA)、乙酰胆碱转移酶(ChAT)水平和认知功能的影响。**方法** 选择 SD 健康大鼠 30 只,将 30 只大鼠随机分为空白组、模型组和海参磷脂组三组,每组 10 只,对模型组和海参磷脂组大鼠进行阿尔兹海默病模型建立,空白组不做处理。给予海参磷脂组大鼠注射海参磷脂治疗,对模型组和空白组大鼠注射等体积生理盐水。2 周后观察三组大鼠状况,比较三组大鼠认知功能,HE 染色后观察其病理组织学特征,采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测 NE、DA 和 ChAT 水平。**结果** 模型组和海参磷脂组大鼠的逃避潜伏期明显长于空白组(P 均 < 0.05),但海参磷脂组大鼠较模型组明显缩短(P 均 < 0.05);模型组和海参磷脂组大鼠的穿越平台次数明显少于空白组(P 均 < 0.05),且海参磷脂组较模型组明显增多($P < 0.05$);海参磷脂组大鼠平衡木评分和 Longa 评分在 5、10、14 d 时的评分均显著低于模型组大鼠(P 均 < 0.05);空白组 HE 染色镜下可见神经元的排列较为整齐和紧密,细胞核也清晰可见,模型组的神经元排列相对混乱且有部分呈现细胞核凋亡和固缩,海参磷脂组相较于模型组神经元排列较为整齐,神经元凋亡和细胞核固缩的状态也明显好于模型组;模型组和海参磷脂组 NE、DA、ChAT 水平明显低于空白组(P 均 < 0.05),但海参磷脂组较模型组明显升高(P 均 < 0.05)。**结论** 海参磷脂能够改善阿尔兹海默病大鼠的认知功能和海马组织的神经元排列及细胞凋亡程度,提高 NE、DA、ChAT 的水平。

关键词: 海参磷脂; 阿尔兹海默病; 大鼠; 认知功能; 去甲肾上腺素; 多巴胺; 乙酰胆碱转移酶

中图分类号: R-33 R 749.1⁺6 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2019)07-0915-04

Effects of sea cucumber phospholipids on cognitive function in Alzheimer's disease model rats

WANG Ying, LI Zhong-hui

Geriatrics Department, Baogang Hospital, Baotou, Inner-Mongolia 014000, China

Corresponding author: LI Zhong-hui, E-mail: obisn88@163.com

Abstract: Objective To study the effects of sea cucumber phospholipid on the levels of norepinephrine (NE), dopamine (DA), acetylcholine transferase (ChAT) and on the cognitive function in Alzheimer's disease model rats. **Methods** Thirty healthy SD rats were randomly divided into three groups: blank group, model group and sea cucumber phospholipid group ($n = 10$, each). The models of Alzheimer's disease were established in model group and sea cucumber phospholipid group, and no processing was performed in blank group. The sea cucumber phospholipid injection was given in sea cucumber phospholipid group, and normal saline of equal volume was injected in model group and blank group. Two weeks later, the cognitive function was compared among three groups. The histopathological characteristics were observed after HE staining. The levels of NE, DA and ChAT were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The escape latency in model group and sea cucumber phospholipid group increased significantly compared with blank group (all $P < 0.05$), and was significantly shorter in sea cucumber phospholipid group than that in model group (all $P < 0.05$); the number of platform-crossing significantly decreased in model group and sea cucumber phospholipid group compared with blank group (all $P < 0.05$), and was significantly lower in model group than that in sea cucumber phospholipid group ($P < 0.05$). The balance beam score and Longa score in sea cucumber phospholipid group were significantly lower than those in model group at 5-, 10-, and 14-day (all $P < 0.05$). HE staining showed that in blank group, neurons arranged in orderly and tightly compact, and the nucleus were clearly visible; in model group, neurons were relatively chaotic, and some of them showed apoptosis and pyknosis of nucleus; in sea cucumber phospholipid group, the neurons arranged more orderly with improved state of neuron apoptosis and nuclear pyknosis compared with model group. The levels of NE, DA and ChAT in

model group and sea cucumber phospholipid group were significantly lower than those in blank group (all $P < 0.05$), and were statistically higher in sea cucumber phospholipid group than those in model group (all $P < 0.05$). **Conclusion** Sea cucumber phospholipids can improve the cognitive function of Alzheimer's disease rats, the arrangement of neurons in the hippocampus and the degree of cell apoptosis and increase the levels of NE, DA and ChAT.

Key words: Sea cucumber phospholipid; Alzheimer's disease; Rat; Cognitive function; Norepinephrine; Dopamine; Acetylcholine transferase

阿尔兹海默病, 又被称为老年痴呆, 是一种病因尚不明确的中枢神经退行性疾病, 主要临床表现是以记忆力逐渐减退、失语、失认、失用认知功能障碍和人格和行为改变为特征^[1-2]。随着当今社会老龄化步伐的加快, 与学习记忆能力急剧下降一致的老龄化患者日益增多, 与老年痴呆相关的研究也越来越多, 但是经过众多学者们对阿尔兹海默病的研究, 目前尚未发现对老年痴呆更为有效的治疗方法^[3-4]。因此, 深入探讨阿尔兹海默病的发病机制并且寻求适当有效的治疗方法依然是目前医学界关注的问题。本文通过建立阿尔兹海默病大鼠模型, 并对其采用海参磷脂注射治疗, 旨在探讨海参磷脂对阿尔兹海默病大鼠认知功能和对去甲肾上腺素(NE)、多巴胺(DA)和乙酰胆碱转移酶(ChAT)水平的影响。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选择 SD 健康大鼠 30 只, 由广西医科大学实验动物中心提供。其中雌性大鼠 18 只, 雄性大鼠 12 只, 年龄 6~10(8.2±0.4) 周龄, 体重 220~240 g, 饲养温度为 22~25℃, 室内湿度 35%~40%, 饲养室定时进行紫外线照射消毒。统一喂给标准饲料, 允许它们自由活动, 饲养时间为 1 周。本研究所做实验均获得我院伦理委员会批准。

1.2 主要药品及试剂来源 海参磷脂提取物(购自 Hyclone 公司); D-半乳糖、东莨菪碱(购自 Gibco 公司); 小鼠抗大鼠 NE 抗体(购自 Invitrogen 公司); 鼠抗人 DA、ChAT 抗体(购自 Sigma 公司); ELISA 试剂盒及配套试剂(购自上海国药集团); HE 染色剂、PBS 缓冲液(购自武汉博士德生物)。

1.3 方法

1.3.1 建模及分组处理 将 30 只大鼠随机分为空白组、模型组和海参磷脂组三组, 各 10 只。对模型组和海参磷脂组大鼠每天颈背部皮下注射 1% D-半乳糖 5 ml/kg, 连续注射 3 周, 使大鼠转变为亚急性衰老状态, 同时从第 4 周开始时转变为腹腔注射 2 ml/kg 东莨菪碱, 持续注射 2 周, 使大鼠转变为老年痴呆状态, 模型建造完毕。空白组大鼠造模期间不做任何处理。建模完成后每天对海参磷脂组大鼠注射海参

脂 1 次, 1 ml/kg, 连续注射 2 周, 同时每天对模型组和空白组大鼠注射等体积的生理盐水, 连续注射 2 周。

1.3.2 学习记忆能力测试 在建模用药干预后 1、5、10、14 d 时使用 Morris 水迷宫对三组大鼠学习记忆能力进行测试。建造直径 1.25 m、高 0.5 m 的圆形水池, 水深为 0.3 m, 水温保持在(26.5±0.8)℃。在池壁上设置四个不同的标志点, 在水池中央设置一直径 9 cm, 高 28 cm 的深色平台, 平台顶部位于水面下 1.5 cm 处。训练测试期间水迷宫外参照物不变。以四个标志点作为入水点, 将大鼠放入池中, 记录所有大鼠游至平台所用时长, 若 2 min 内未找到平台, 将其引至平台, 潜伏期记为 120 s。所有大鼠上台后均停留 30 s, 随后将其从不同的标志点放入水中再次检测。第 14 天撤去水中平台, 将大鼠从池壁放入水中, 记录 1 min 内大鼠穿越原平台位置次数。

1.3.3 平衡木评分法和 Longa 评分统计 在干预结束后采用平衡木评分法和 Longa 评分对三组大鼠的行为学进行评价。平衡木评分法: 能跳上平衡木, 在上面行走不会跌倒记 0 分; 在上面行走且跌倒的几率 <50% 记为 1 分; ≥50% 记为 2 分; 能爬上平衡木, 患肢后侧不能向前移动记为 3 分; 能坐在平衡木上, 但不能行走记 4 分; 将大鼠放在平衡木上会掉下来记 5 分。Longa 五级评分法: 无体征记 0 分; 不能将前肢完全伸直记 1 分; 一侧肢体瘫痪, 有追尾现象记 2 分; 不能站立或者打滚记 3 分; 无自发性活动, 并且有意识障碍记 4 分。

1.3.4 HE 染色处理 在注射干预 14 d 后, 将大鼠断头处死, 于冰冻手术台上取脑, 取出一侧海马组织, 对三组大鼠切片样本进行染色处理, 使用二甲苯进行常规脱蜡处理 2 次, 每次 5 min, 然后在梯度酒精下水化处理 3 min, 自来水冲洗 1 次; 使用苏木素染色 5 min, 自来水冲洗 1 次; 使用 1% 盐酸酒精分化处理 30 s, 在 0.2% 氨水中返蓝处理 2 min, 自来水冲洗 1 次; 在 0.5% 伊红染色 10 min, 自来水冲洗 1 次; 使用乙醇梯度进行脱水处理, 最后用中性树胶进行封片, 使用光学显微镜进行图像分析。

1.3.5 酶联免疫吸附法(ELISA)检测 NE、DA、ChAT

水平 将取出的另一侧海马组织放置于生理盐水中清洗,除去血迹后用滤纸擦干然后进行称重,加入海马组织 9 倍体积的生理盐水,然后将待测的标本和酶标物严格按照 ELISA 试剂盒说明书操作步骤与固相载体产生反应作用,将固相载体反应的复合物经过洗涤与其他物质分离,加入酶反应底物,经过酶的催化作用形成有色物质,根据颜色的深浅进行定性或定量分析 NE、DA、ChAT 的水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 20.5 软件进行统计处理。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 描述,采用方差分析及两两比较的 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 认知功能评价 (1)空间学习记忆能力对比:逃避潜伏期比较,模型组和海参磷脂组大鼠明显长于空白组(P 均 < 0.05),海参磷脂组则较模型组明显

缩短(P 均 < 0.05)。穿越平台次数模型组和海参磷脂组大鼠明显少于空白组($P < 0.05$),海参磷脂组则较模型组明显增多($P < 0.05$)。见表 1。(2)平衡木评分和 Longa 评分比较:海参磷脂组大鼠平衡木评分和 Longa 评分在 5、10、14 d 时均显著低于模型组大鼠(P 均 < 0.05)。见表 2。

2.2 三组大鼠海马组织 HE 染色结果 如图 1 所示,空白组的 HE 染色后镜下可见中神经元的排列较为整齐和紧密,细胞核也清晰可见;模型组的神经元排列相对混乱且有部分呈现细胞核凋亡和固缩;海参磷脂组相较于模型组神经元排列较为整齐,神经元凋亡和细胞核固缩的状态也明显好于模型组。

2.3 三组大鼠海马组织 NE、DA、ChAT 水平比较 大鼠海马组织 NE、DA、ChAT 水平,模型组和海参磷脂组明显低于空白组,海参磷脂组高于模型组(P 均 < 0.05)。见表 3。

表 1 三组大鼠空间学习记忆能力对比 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

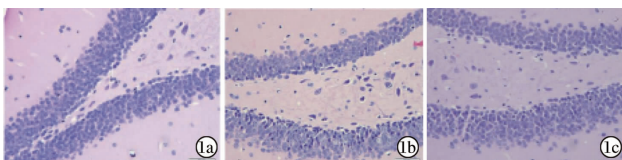
| 组别 | 逃避潜伏期(s) | | | | 穿越平台次数(次) |
|------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| | 1 d | 5 d | 10 d | 14 d | |
| 空白组 | 42.59 ± 4.13 | 36.38 ± 2.19 | 30.96 ± 2.14 | 26.42 ± 1.98 | 2.42 ± 1.85 |
| 模型组 | 63.38 ± 6.15 ^a | 50.92 ± 2.85 ^a | 42.79 ± 2.57 ^a | 35.70 ± 2.30 ^a | 0.89 ± 0.23 ^a |
| 海参磷脂组 | 54.17 ± 5.42 ^{ab} | 43.96 ± 3.12 ^{ab} | 31.44 ± 2.15 ^{ab} | 30.24 ± 1.87 ^{ab} | 1.98 ± 0.57 ^{ab} |
| <i>F</i> 值 | 39.641 | 70.04 | 85.09 | 51.36 | 4.90 |
| <i>P</i> 值 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.05 |

注:与空白组相比,^a $P < 0.05$;与模型组相比,^b $P < 0.05$ 。

表 2 三组大鼠平衡木评分和 Longa 评分比较 ($n = 10, \text{分}, \bar{x} \pm s$)

| 组别 | 平衡木评分 | | | | Longa 评分 | | | |
|------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | 1 d | 5 d | 10 d | 14 d | 1 d | 5 d | 10 d | 14 d |
| 空白组 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 |
| 模型组 | 4.21 ± 0.36 ^a | 4.19 ± 0.40 ^a | 4.28 ± 0.33 ^a | 4.20 ± 0.30 ^a | 2.68 ± 0.63 ^a | 2.72 ± 0.60 ^a | 2.71 ± 0.58 ^a | 2.80 ± 0.50 ^a |
| 海参磷脂组 | 3.94 ± 0.34 ^a | 3.02 ± 0.32 ^{ab} | 2.26 ± 0.18 ^{ab} | 1.02 ± 0.20 ^{ab} | 2.26 ± 0.55 ^a | 2.06 ± 0.48 ^{ab} | 1.63 ± 0.40 ^{ab} | 1.01 ± 0.33 ^{ab} |
| <i>F</i> 值 | 679.45 | 534.40 | 734.29 | 878.07 | 89.12 | 102.28 | 112.48 | 168.07 |
| <i>P</i> 值 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 |

注:与空白组相比,^a $P < 0.05$;与模型组相比,^b $P < 0.05$ 。



注:1a:空白组;1b:模型组;1c:海参磷脂组。

图 1 三组大鼠海马组织 HE 染色结果($\times 400$)

表 3 三组大鼠海马组织 NE、DA、ChAT 水平比较 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

| 组别 | NE($\mu\text{g/g}$) | DA($\mu\text{g/g}$) | ChAT(U/g) |
|------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 空白组 | 0.72 ± 0.12 | 0.87 ± 0.07 | 132.45 ± 15.26 |
| 模型组 | 0.31 ± 0.11 ^a | 0.44 ± 0.08 ^a | 86.35 ± 5.79 ^a |
| 海参磷脂组 | 0.45 ± 0.02 ^{ab} | 0.62 ± 0.06 ^{ab} | 90.52 ± 5.25 ^{ab} |
| <i>F</i> 值 | 48.44 | 93.89 | 66.35 |
| <i>P</i> 值 | <0.01 | <0.01 | <0.01 |

注:与空白组相比,^a $P < 0.05$;与模型组相比,^b $P < 0.05$ 。

3 讨论

阿尔兹海默病是一种以老年人群为主,临床表现为认知功能障碍、记忆力减退和人格行为改变并伴随有一系列精神病症状的中枢神经退行性疾病,又被称为老年性痴呆^[5-6]。随着当今社会人口老龄化的加剧,阿尔兹海默病的发病率也逐渐增长,目前为止对该病的发病机制仍不清楚^[7]。

海参磷脂是从海参中提取出来的一种磷脂类药物,含有很多重要的具有生物学活性的物质,如海参皂苷、海参脑苷脂、海参多糖等,这些生物活性物质具有抗肿瘤、降血脂、提高免疫力和延缓衰老的作用^[8-9]。大部分动植物组织中均含有磷脂成分,不同来源的磷脂可以调节脂质代谢、提高机体免疫力、增

强脑功能等作用,对阿尔兹海默病或与老化相关的认知损伤也有改善作用^[10]。其中磷脂的动物来源主要集中在蛋黄、肝脏和海洋动物中^[11]。由于海洋动物中含有较多的多不饱和脂肪酸,具有特殊的生物活性,海洋磷脂中结合丰富的多不饱和脂肪酸可以改善其氧化稳定性,具有广泛的开发潜力^[12]。海参体壁内含有丰富的磷脂,海参磷脂是以磷脂酰乙醇胺和磷脂酰胆碱为主,有研究表明,磷脂酰胆碱能够对巨噬细胞产生应激性,增加吞噬功能,提高 T 细胞的增殖效应和淋巴细胞的转换率^[13]。卵磷脂可以提高脑组织乙酰胆碱(AChE)的浓度,从而改善阿尔兹海默病大鼠的记忆能力和空间学习能力,对阿尔兹海默病也有一定的预防功效^[14]。

有研究表明,海马组织的质量减轻、神经元突触的可塑性改变以及神经元数目减少与学习和记忆功能减退有关,阿尔兹海默病的患者往往海马病变会早于大脑皮质的改变,并且伴随着病程的延长,病变有加重的趋势^[15]。本研究 HE 染色结果显示,阿尔兹海默症大鼠的海马轮廓模糊,神经元排列相对混乱且有部分呈现细胞核凋亡和固缩,注射海参磷脂的大鼠神经元排列较为整齐,神经元凋亡和细胞核固缩的状态也较好,说明海参磷脂对损伤的海马神经元细胞具有一定的保护作用,可能通过减少神经元细胞凋亡起到对阿尔兹海默病的治疗作用。

对学习和记忆功能具有重要调节作用的脑内神经递质是胆碱能神经递质和单胺类神经递质,NE 可以通过轴突调节大脑皮质的兴奋状态,投射到大脑中枢神经系统,从而对认知功能和情绪、觉醒和运动产生广泛影响^[16]。协同 NE 一起调节兴奋状态的是具有多种生物学效应的 DA,DA 可以减少氧化应激损伤,抑制脂质过氧化、改善脑部神经元、增加脑部血流供应^[17]。阿尔兹海默病的临床症状与 ACh 含量的较少程度密切相关,而 ChAT 则是 ACh 合成的关键酶,降解 ACh 的关键酶是 AChE,脑内 ACh 的含量和 AChE、ChAT 的活性密切相关,共同维持体内 ACh 含量的动态平衡^[18-19]。临床相关研究表明,胆碱能神经递质和单胺类神经递质含量的减少可以直接导致老年性痴呆的形成^[20]。

综上所述,海参磷脂对于治疗大鼠阿尔兹海默病、恢复相关指标水平具有一定作用,能够有效改善其认知功能和海马组织的神经元排列及细胞凋亡程度,期望未来可将研究向临床领域拓展。

参考文献

- [1] 吴凡,绳宇.阿尔兹海默病主观认知障碍概念及评估的研究进展[J].中国实用护理杂志,2017,33(23):1828-1831.
- [2] 李润辉.阿尔兹海默病的研究现状[J].沈阳医学院学报,2013,15(3):129-133.
- [3] 宋昕,洪羽蓉,胡秋莹.阿尔兹海默病发病原因及机制的研究进展[J].临床和实验医学杂志,2015,14(10):871-873.
- [4] 易军,张道鹏.阿尔兹海默病患者生活质量及其影响因素分析[J].中国公共卫生,2015,31(11):1481-1485.
- [5] Ossenkoppele R, Pijnenburg YA, Perry DC. The behavioural/dysexecutive variant of Alzheimer's disease: clinical, neuroimaging and pathological features[J]. Brain, 2015, 138(Pt 9):2732-2749.
- [6] Togliola P, Demuro A, Mak DD, et al. Data-driven modeling of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease [J]. Cell Calcium, 2018, 76:23-35.
- [7] 张晓燕,张璐,于莹,等.阿尔兹海默症动物模型的研究进展[J].实验动物科学,2016,33(5):68-70.
- [8] 张健,王茂剑,马晶晶,等.仿刺参生殖腺营养成分分析[J].食品科学,2013,34(14):232-236.
- [9] 付雪媛,刘丰海,张铃玉,等.海参极性脂质对东莨菪碱致痴呆小鼠学习记忆能力的保护作用[J].中国食品学报,2016,16(9):26-32.
- [10] 杨兰苹,郑立勇,饶煜,等.海参内脏的活性成分、保健功能与开发研究进展[J].食品安全质量检测学报,2018,9(10):2426-2432.
- [11] 俞乐,丛芳,王兴国,等.不同来源大豆毛油磷脂组成的核磁检测及磷脂酸含量比较[J].中国油脂,2017,42(1):130-133.
- [12] 宋玉昆,徐晟,杨洋,等.海参肠脂质的提取及组成研究[J].中国食品学报,2018,18(2):148-154.
- [13] 楼乔明,李来好,陈胜军,等.刺参体壁和内脏的脂肪酸组成分析[J].中国食品学报,2017,17(7):221-229.
- [14] 陈玉江,殷涌光,林松毅,等.蛋黄卵磷脂对小鼠神经兴奋性的影响[J].中国兽医学报,2009,29(5):665-668.
- [15] 刘加强,童卫.海马神经发生障碍与阿尔兹海默病发病机制[J].神经解剖学杂志,2014,30(2):244-248.
- [16] 黄意湘,马晓晓,郝欣蕊,等.邻苯二甲酸单乙基己基酯对神经干细胞增殖和迁移的作用[J].中国药理学与毒理学杂志,2016,30(5):545-552.
- [17] 李克建,郭娟,陈云,等.补肾解郁清心汤治疗更年期抑郁症状及对 DA、NE、5-HIAA 的影响[J].现代中西医结合杂志,2017,26(26):2864-2866,2954.
- [18] 张静,和梦珂,李昕,等.初步探究通咽喷雾剂对大鼠舌下神经损伤后 AChE 与运动终板的影响关系[J].世界中西医结合杂志,2017,12(7):933-937.
- [19] 孙莹,张迪,郑久明,等.微电泳 urocortin II 对大鼠纹状体神经元自发发放及 DA、ACH 能神经传递影响[J].中国药理学通报,2013,29(9):1325-1327.
- [20] 傅增辉,孙洪英,刘松,等.仙茅苷对老年痴呆大鼠的认知功能及海马区神经元凋亡的影响[J].医学研究生学报,2017,30(8):824-828.