

# 艾地苯醌改善血管性痴呆大鼠认知功能及其对海马区生长相关蛋白-43和突触素P38表达的影响

钱旭东<sup>a</sup>, 王东<sup>a</sup>, 徐倩倩<sup>a</sup>, 李国芸<sup>b</sup>, 王红梅<sup>a</sup>, 张晓璇<sup>a</sup>, 马征<sup>a</sup>

**摘要 目的:**探讨艾地苯醌对血管性痴呆(VD)大鼠认知功能的作用,并初步探讨其机制。**方法:**SD大鼠60只随机均分为3组:假手术组、模型组和艾地苯醌组,各20只。采用改良双血管阻断(2-VO)法建立大鼠VD模型,艾地苯醌组大鼠腹腔注射艾地苯醌,10 mg/kg,1次/d,连续给药30 d;模型组及假手术组腹腔注射等量生理盐水。采用水迷宫评价各组大鼠学习、记忆能力;免疫组化测定海马生长相关蛋白-43(GAP-43)、突触素P38表达;透射电镜观察突触超微结构的改变。**结果:**模型组逃避潜伏期长于假手术组和艾地苯醌组( $P<0.05$ ),穿越原平台次数少于假手术组和艾地苯醌组( $P<0.05$ );艾地苯醌组逃避潜伏期和穿越原平台次数与假手术组差异无统计学意义( $P>0.05$ )。模型组GAP-43和触素P38蛋白的表达水平均低于其他2组( $P<0.05$ );艾地苯醌组GAP-43和触素P38蛋白的表达水平均高于其他2组( $P<0.05$ )。电镜下可见模型组大鼠海马区突触结构受损,艾地苯醌组大鼠海马组织区突触数量丰富,结构基本完整。**结论:**艾地苯醌可改善VD大鼠的学习和记忆功能,其机制可能与增强突触相关蛋白GAP-43和突触素P38的表达有关。

**关键词** 艾地苯醌;突触再生;血管性痴呆

**中图分类号** R741;R741.02;R742 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssgncj.2019.12.004

钱旭东,王东,徐倩倩,等.艾地苯醌改善血管性痴呆大鼠认知功能及其对海马区生长相关蛋白-43和突触素P38表达的影响[J].神经损伤与功能重建,2019,14(12):611-613.

**作者单位**

承德市医学院附属医院 a.神经内科, b.呼吸内科

河北 承德 067000

**基金项目**

2018年承德市科学技术研究与发展计划项目(No.201804A080)

**收稿日期**

2019-03-10

**通讯作者**

王东

1532322795@qq.com

**Effect of Idebenone on Cognitive Function and Expression of Hippocampus GAP-43 and P38 in Vascular Dementia Rats** QIAN Xu-dong<sup>a</sup>, WANG Dong<sup>a</sup>, XU Qian-qian<sup>a</sup>, LI Guo-yun<sup>b</sup>, WANG Hong-mei<sup>a</sup>, ZHANG Xiao-xuan<sup>a</sup>, MA Zheng<sup>a</sup>. a. Department of neurology, b. Department of Respiratory Medicine, Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde 067000, China

**Abstract Objective:** To investigate the effects of idebenone on cognitive function and expression of growth associated protein-43 (GAP-43) and synaptophysin P38 in the hippocampus of vascular dementia (VD) rats. **Methods:** Sixty SD rats were randomly divided into the sham operation group, model group, and idebenone group with 20 rats in each group. The VD rat model was established by modified 2-vessel occlusion (2-VO) method. Idebenone group rats were given intraperitoneal injections of idebenone at 10 mg/kg once per day for 30 consecutive days, and model group and sham operation group rats were given equivalent doses of normal saline. The differences in learning and memory capabilities were evaluated by water maze. The expression of GAP-43 and synaptophysin P38 in the hippocampus was measured by immunohistochemistry. The ultrastructure of synapses was observed by transmission electron microscopy. **Results:** The model group showed increased escape latency and decreased platform crossings in the water maze compared to those in the sham operation and idebenone groups (both  $P<0.05$ ). The escape latency and platform crossings of the idebenone group and sham operation group showed no significant difference ( $P>0.05$ ). Compared with that of sham operation group and idebenone group rats, the GAP-43 and synaptophysin P38 expression in the hippocampus of model group rats was decreased ( $P<0.05$ ). Hippocampus expression of GAP-43 and synaptophysin P38 in idebenone group rats was increased compared to that of sham operation group and model group rats ( $P<0.05$ ). Electron microscopy showed that in model group rats, synaptic structure in the hippocampus was damaged while in idebenone group rats, synapses in the hippocampus were abundant in quantity and complete in structure. **Conclusion:** Idebenone may improve learning and memory capabilities in VD rats via mechanisms that involve up-regulating GAP-43 and synaptophysin P38 expression.

**Key words** idebenone; synaptic regeneration; vascular dementia

我国血管性痴呆(vascular dementia, VD)的发病率不断上升,痴呆患者中约1/5是VD患者<sup>[1,2]</sup>。突触是神经信息传递与处理过程的中心环节,神经突触的超微结构

与认知功能密切相关<sup>[3,4]</sup>。艾地苯醌能促进VD大鼠海马组织脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)的表达,而BDNF与其受体共同作用可促进突触再生,提高突触可塑性,改善VD大鼠痴呆状况<sup>[5-7]</sup>。为进一步明确艾地苯醌对VD大鼠海马区突触的影响,本研究从突触相关蛋白的表达和突触的超微结构的角度进行深入研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

SPF级健康SD雄性大鼠60只,体质量250~300 g,7周龄。动物使用许可证号:SCXK(冀)2008-1-003;动物合格证编号:1404010;河北医科大学实验动物中心提供。在湿度50%~70%、室温20℃~25℃中饲养,每笼5只,喂养普通颗粒型大鼠饲料。

### 1.2 方法

1.2.1 试剂与仪器 小鼠抗大鼠生长相关蛋白43(growth associated protein-43, GAP-43)、突触素P38抗体购于武汉博士德生物工程有限公司;HRP标记的二抗(山羊抗小鼠)购自Abcam公司;Western Blotting ECL化学发光检测试剂盒购自美国Bio-Rad公司;ZS-001 Morris水迷宫购自北京众实迪科技发展有限公司。

1.2.2 动物建模与分组 按照随机数字表将大鼠分为手术组40只及假手术组20只。手术组采用改良双血管阻断(2-vessels occlusion, 2-VO)法建立大鼠VD模型;大鼠采用异氟烷吸入麻醉后先分离右侧颈总动脉双重结扎。1周后以同样方法双重结扎左侧颈总动脉。假手术组大鼠只分离颈总动脉,不进行结扎。模型建立8周以后,通过Morris水迷宫测试挑选成功建模的大鼠40只。(模型组逃避潜伏期均值-对照组逃避潜伏期均值)/模型组逃避潜伏期均值 $\geq 0.2$ 为模型成功判断标准。如有大鼠死亡,补齐40只。

将40只成模大鼠随机分为艾地苯醌组和模型组,各20只。艾地苯醌组大鼠腹腔注射艾地苯醌,10 mg/kg,1次/d,连续给药30 d;模型组及假手术组腹腔注射等量生理盐水。

1.2.3 大鼠学习记忆能力检测 给药30 d后,对每组大鼠行Morris水迷宫测试。前5天定位航行测试,第6天行空间探索测试。定位航行测试:将大鼠从各象限依次放入水中,记录其在2 min内发现并爬上平台的时间,即为逃避潜伏期。4次/d,算出平均值。空间探索测试:撤除原平台,将大鼠随机选一进水点放入

水中,记录2 min内大鼠穿越原平台的次数。

1.2.4 GAP-43表达水平检测 水迷宫测试结束后,各组取10只大鼠,取脑常规制作石蜡切片,常规处理后,加入GAP-43一抗(1:500)或突触素P38一抗(1:500),4℃孵育过夜,PBS缓冲液洗涤5 min/次 $\times 3$ 次;加入HRP二抗(1:1 000),室温避光孵育40 min,PBS缓冲液洗涤5 min/次 $\times 3$ 次;DAB试剂盒显色,封片后观察。

1.2.5 突触显微结构观察 水迷宫测试结束后,各组取10只大鼠,断头处死,快速剥离脑组织,选取左边海马组织约为1 mm<sup>3</sup>,按照固定-漂洗-脱水-渗透-包埋顺序操作后,制作60~80 nm超薄切片。采用铀铅进行双染色,并经充分沥水后,透射电镜观察突触情况。

### 1.3 统计学处理

采用SPSS 19.0软件处理数据,符合正态分布以及方差齐性的计量资料以( $\bar{x}\pm s$ )表示,组间比较采用独立样本均数 $t$ 检验;计数资料以率表示,组间比较采用 $\chi^2$ 检验; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠行为学变化比较

模型组逃避潜伏期长于假手术组和艾地苯醌组( $P<0.05$ ),穿越原平台次数少于假手术组和艾地苯醌组( $P<0.05$ );艾地苯醌组逃避潜伏期和穿越原平台次数与假手术组差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见表1。

表1 3组大鼠学习记忆能力比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	只数	逃避潜伏期/秒	穿越原平台次数/次
假手术组	20	24.64 $\pm$ 11.76 <sup>①</sup>	12.65 $\pm$ 2.83 <sup>①</sup>
模型组	20	67.33 $\pm$ 21.45	6.03 $\pm$ 1.32
艾地苯醌组	20	31.78 $\pm$ 9.83 <sup>①</sup>	9.54 $\pm$ 2.76 <sup>①</sup>

注:与模型组比较,<sup>①</sup> $P<0.05$

### 2.2 3组大鼠海马突触蛋白表达水平

模型组GAP-43和触素P38蛋白的表达水平均低于其他2组( $P<0.05$ );艾地苯醌组GAP-43和触素P38蛋白的表达水平均高于其他2组( $P<0.05$ ),见表2。

表2 3组大鼠海马突触蛋白表达水平比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	只数	GAP-43	突触素P38
假手术组	20	1.33 $\pm$ 0.45 <sup>①②</sup>	0.79 $\pm$ 0.42 <sup>①②</sup>
模型组	20	0.78 $\pm$ 0.13 <sup>①</sup>	0.24 $\pm$ 0.06
艾地苯醌组	20	1.94 $\pm$ 0.76 <sup>②</sup>	1.65 $\pm$ 0.83 <sup>②</sup>

注:与艾地苯醌组比较,<sup>①</sup> $P<0.05$ ;与模型组比较,<sup>②</sup> $P<0.05$

### 2.3 各组大鼠突触超微结构的变化

电镜检测结果显示,假手术组突触结构完整,突触

间隙清晰可见,突触前后膜间吻合良好,突触后膜可见均匀增厚,突触曲面弧度规整,突触小泡丰富,有结构完整的线粒体;模型组无突触间隙,前后突触膜界限难以区分,弧度不整齐,具有较少的突触小泡,线粒体出现肿大或消失;艾地苯醌组可见清晰突触间隙、均匀增厚的突触后膜,突触结构大体完整,具有较多的突触小泡和完整、丰富的线粒体结构,见图1。

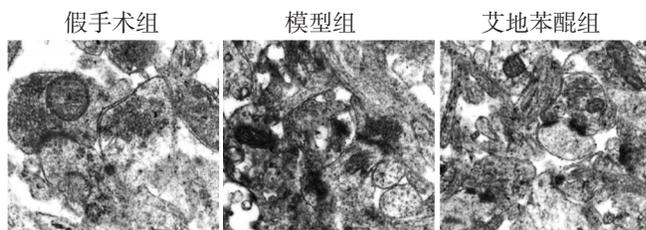


图1 各组大鼠突触超微结构观察( $\times 3000$ )

### 3 讨论

VD是常见的认知功能障碍病因之一,病变的脑血管引起全脑或局部供血、供氧不足,导致参与认知、记忆的神经组织受损可能是其发病机理之一<sup>[8]</sup>。中枢神经系统对缺血缺氧高度敏感,特别是小脑、海马、大脑皮质(第3层)等部位<sup>[9,10]</sup>。本研究采用2-VO法建立大鼠VD模型,双侧颈总动脉阻断后可导致大鼠海马慢性供血不足,神经元凋亡及突触的变性和丢失,可塑性降低,突触相关蛋白表达改变,并进一步影响突触的结构与功能<sup>[11]</sup>。突触相关蛋白可调控突触的生长、发育、成熟,并与突触可塑性密切相关,当其表达发生变化后会导致个体产生交流缺陷、认知功能受损、焦虑等神经精神症状以及社会活动缺陷等,因此突触相关蛋白的表达是突触数量及功能状态的标志<sup>[12]</sup>。

本研究发现,艾地苯醌能明显改善VD大鼠的学习记忆能力,明显促进突触相关蛋白GAP-43与突触素P38的表达。GAP-43是一种促进神经元修复与合成的轴突膜蛋白<sup>[13]</sup>,在损伤的神经元进行修复的过程中,GAP-43表达增强,合成速度加快,促进神经元轴突的延伸<sup>[14]</sup>。GAP-43还可以作为细胞内信号传导介质,增强其与G蛋白耦联的受体转运作用,在神经系统损伤之后的修复再生过程中,GAP-43扮演了重要角色<sup>[15]</sup>。突触素P38是一种钙结合糖蛋白,不仅可以促进神经元的损伤修复,还可以加快突触之间的传递速度,进一

步加快神经元的生长发育<sup>[16]</sup>。本研究发现艾地苯醌大突触素P38也明显升高,说明艾地苯醌能够保存现有突触,并促进了突触重建与再生,从而保护了缺血缺氧损伤的神经组织。

电镜观察也进一步表明大鼠经艾地苯醌治疗后具有丰富的突触囊泡,突触的尺寸变大。模型组无突触间隙,前后突触膜界限难以区分,无正常曲面,弧度不整齐,具有较少的突触小泡,线粒体出现肿大或消失,提示学习记忆能力下降与突触损害、萎缩或凋亡紧密相关。

综上所述,艾地苯醌可改善VD大鼠的学习和记忆功能,可能与增强突触相关蛋白GAP-43和突触素P38的表达有关。为得到确切结论,尚需进一步研究。

### 参考文献

- [1] 高风超. 血管性痴呆危险因素及发病机制的研究进展[J]. 医学综述, 2014, 20(10): 1068-1071.
- [2] 余波, 张晓玲, 官俏兵, 等. 血管性痴呆和阿尔茨海默病的认知功能及精神行为比较[J]. 中华全科医学, 2015, 13(12): 1204-1205.
- [3] 杨国帅, 周小艳, 周治平, 等. 亚低温对全脑缺血性癫痫大鼠认知功能和海马 synapsin I 表达及突触超微结构的影响[J]. 实用医学杂志, 2015, 31(12): 2261-2264.
- [4] 黎平, 郝学超, 律峰, 等. 抑郁大鼠电休克治疗后认知功能与突触可塑性研究[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2014, 12(12): 715-720.
- [5] 潘丽雅, 翁保慧, 邓珊. 艾地苯醌治疗非痴呆型血管认知功能障碍患者的临床观察[J]. 癫痫与神经电生理学杂志, 2016, 25(2): 227-229.
- [6] 付晓雪, 徐波, 王笑媛, 等. 艾地苯醌联合尼莫地平治疗脑梗死后血管性认知功能障碍的疗效观察[J]. 疑难病杂志, 2016, 15(1): 119-122.
- [7] 杨云生. 艾地苯醌对癫痫患者BDNF、IGF-1水平及认知功能的影响[J]. 医学综述, 2015, 19(12): 3634-3636.
- [8] 陈浪, 王学峰. 血管性痴呆病理机制研究进展[J]. 重庆医学, 2015, 26(12): 3709-3711.
- [9] 王爽, 张艳梅. 血管性痴呆危险因素及发病机制的研究进展[J]. 内蒙古医科大学学报, 2015, 22(2): 157-161.
- [10] 钟汝佳, 陶定波, 乐卫东. 血管性痴呆病因及发病机制的研究进展[J]. 转化医学杂志, 2015, 4(4): 193-198.
- [11] 刘苗苗. 生长相关蛋白和突触素对突触可塑性的影响[J]. 江西医药, 2013, 48(2): 178-182.
- [12] 任庆国, 公卫刚. 孤养对成年大鼠认知行为与不同脑区突触相关蛋白表达的影响[J]. 中华行为医学与脑科学杂志, 2016, 25(5): 877-881.
- [13] Fernandes KJ, Fan DP, Tsui BJ, et al. Influence of the axotomy to cell body distance in rat rubrospinal and spinal motoneurons: differential regulation of GAP-43, tubulins, and neurofilament-M[J]. J COMP NEUROL, 2015, 414(4): 495-510.
- [14] Donnelly CJ, Park M, Spillane M, et al. Axonally Synthesized  $\beta$ -Actin and GAP-43 Proteins Support Distinct Modes of Axonal Growth[J]. J NEUROSCI, 2013, 33(12): 3311-3322.
- [15] Dent EW, Meiri KF. Distribution of phosphorylated GAP-43 (neuromodulin) in growth cones directly reflects growth cone behavior[J]. J Neurobiol, 1998, 35(2): 287-299.
- [16] 刘苗苗. 生长相关蛋白和突触素对突触可塑性的影响[J]. 江西医药, 2013, 48(2): 178-182.

(本文编辑:唐颖馨)