

电针促进阿尔茨海默病模型小鼠(SAMP8)海马神经元突触可塑性的神经细胞黏附机制*

卢圣锋¹ 邵欣² 唐勇¹ 尹海燕¹ 陈瑾¹ 余曙光^{1,3}

摘要 目的:研究电针对快速老化痴呆模型小鼠(SAMP8)海马神经元突触超微结构、神经细胞黏附分子(NCAM)、多聚唾液酸转移酶 ST8SiaII/IV 的影响,从神经细胞黏附角度探讨电针治疗阿尔茨海默病(AD)的可塑性作用机制。**方法:**以 SAMP8 小鼠作为 AD 动物模型,电针“百会”、“涌泉”穴,1 次/d,连续刺激 21d。以 Morris 水迷宫测试小鼠学习记忆能力的变化;电镜观察海马神经元突触界面曲率、突触后致密物(PSD)厚度和突触间隙宽度的变化;以免疫组织化学、原位杂交方法检测海马神经元 NCAM 及其 mRNA、ST8SiaII/IVmRNA 的表达。**结果:**①模针组小鼠平均逃避潜伏期较模型组小鼠短($P<0.05$);模针组小鼠在平台所在象限停留的时间($39.55\pm5.47s$)较模型组小鼠($30.27\pm6.12s$)长($P<0.05$);②模针组突触后致密物厚度($76.928\pm25.236nm$)较模型组($65.371\pm24.219nm$)增厚($P<0.05$);突触间隙宽度($25.941\pm6.217nm$)较模型组($29.161\pm7.830nm$)减小($P<0.05$);突触界面曲率(1.083 ± 0.049)较模型组(1.062 ± 0.048)变化不明显($P>0.05$);③与模型组比较,模针组小鼠 NCAM 及其 mRNA、ST8SiaII/IVmRNA 阳性表达明显增强($P<0.05$)。**结论:**①电针能有效改善 SAMP8 小鼠学习记忆能力;②电针能有效调整海马神经元突触形态,使 PSD 增厚,突触间隙宽度变窄,促进突触形态可塑性的发挥;③电针改善 SAMP8 小鼠学习记忆能力的效应可能是通过诱导 NCAM 及 ST8SiaII/IVmRNA 的合成,促进神经细胞黏附,促进神经元突触形态可塑性来实现的。

关键词 阿尔茨海默病;突触可塑性;海马神经元;神经细胞黏附;电针

中图分类号:R245 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2008)-12-1057-04

Effects of electroacupuncture on neural cell adhesion of synaptic plasticity in the hippocampus of SAMP8/
LU Shengfeng, SHAO Xin, TANG Yong, et al. //Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2008, 23(12):
1057—1060

Abstract Objective: To reveal the influences of electroacupuncture(EA) therapy on the synaptic plasticity of hippocampal neurons of senescence-accelerated mouse(SAMP8) and partly to explore the mechanism of EA on Alzheimer's disease(AD) based on neural cell adhesion. **Method:** SAMP8 was taken as animal model of AD. The treatment of acupuncturing on Baihui(Du20) and Yongquan(Kid1) with EA was applied once daily and lasted for 21d. Morris water-maze, electron-microscope and immunohistochemistry technique were used in study. **Result:** ①Comparing with control group, the average escape latency in EA group decreased obviously($P<0.05$), and the swimming time on platform quadrant in EA group($39.55\pm5.47s$) was more than that in control group($30.27\pm6.12s$), ($P<0.05$). ②Comparing with control group, structure of neural synapse in EA group was comparatively clear and complete, the thickness of post synaptic density(PSD) in EA group increased($P<0.05$), the width of synaptic cleft in EA group decreased ($P<0.05$) and the curvature of the synaptic interface in EA group had no obvious changes and just showed increasing-tendency ($P>0.05$). ③Comparing with control group, the expression of NCAM and ST8SiaII/IV of EA group increased significantly($P<0.05$). **Conclusion:** EA therapy could improve the learning and memory abilities of SAMP8 mice, influence the morphological plasticity in hippocampal synapse, strengthen the information transmission of learning and memory, and these effects maybe related with the expression of NCAM and ST8SiaII/IV enhanced.

Author's address College of Acupuncture and Tuina, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, 610075

Key words Alzheimer's disease; synaptic plasticity; hippocampal neuron; neural cell adhesion; electroacupuncture therapy

随着研究的不断深入,人们发现,神经元细胞之间的黏附现象及其作用可能是突触形态可塑性发挥的又一关键性环节。而其中神经细胞黏附分子(neural cell adhesion molecule, NCAM)在突触可塑性中的作用格外引人瞩目^[1],是突触可塑性的标志之

* 基金项目:国家自然科学基金(NO.30472235);四川省教育厅(2003C008)

1 成都中医药大学针灸推拿学院,成都,610075

2 四川省中西医结合医院针灸科

3 通讯作者

作者简介:卢圣锋,男,硕士

收稿日期:2008-06-30

一^[2]。前期研究表明,电针对老年痴呆模型鼠学习记忆的影响可能是通过其促进海马神经元突触可塑性发挥来实现的^[3],本实验拟从神经细胞黏附角度出发,观察电针对海马神经元突触超微结构、NCAM及其 mRNA、ST8SIIAII/IVmRNA 表达的影响,进一步探讨电针对海马神经元突触可塑性发挥,改善老年痴呆模型鼠学习记忆能力的部分机制。

1 材料与方法

1.1 动物与分组

快速老化小鼠(SAMP8)24只,雄性,8月龄,体重(20±2)g;抗快速老化小鼠(SAMR1)12只,雄性,8月龄,体重(20±2)g,由天津中医药大学第一附属医院老年脑病研究室动物中心提供。合格证号:W-J津实动质M准字第006号。动物在实验前适应性驯养1周,采用随机的方法,将SAMP8小鼠随机分为模型组、模型+针刺组(简称模针组),每组各12只;SAMR1小鼠12只作为空白组。

1.2 主要仪器与试剂

Morris 水迷宫(成都泰盟科技有限公司)、G6805-1型电针仪(青岛鑫升实业有限公司)、BX50光学显微镜(OLYMPUS公司)、Leica图像分析系统、NCAM一抗(Chemicon AB5032)、NCAM和ST8SIIAII/IVmRNA原位杂交试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)、日立H-600IV型透射电子显微镜(日本)、Image-Pro Plus 6.0图像分析系统(美国)。

1.3 治疗方法

模针组选取“百会”、“涌泉”(参照中国针灸学会实验针灸分会制定的《动物针灸穴位图谱》,“百会”向前斜刺3—5mm;“涌泉”直刺2—3mm双侧交替进行)。进针后,不进行手法刺激,连接G6805电针仪进行治疗,施以疏密波,频率2/100Hz,电压2—4V,强度逐渐加大到小鼠下肢轻微抖动为度,留针20min,1次/d,7d为1疗程,疗程间隔1d,共3个疗程,计21d。模型组、空白组不施针,每天以同样的方式,同样的时间和程度进行抓取、固定。

1.4 检测指标

1.4.1 学习记忆能力测试:待模针组治疗结束后,用Morris水迷宫观测各组小鼠定位航行实验中的平均逃避潜伏期和空间探索实验中在原平台象限的停留

时间评价动物学习记忆能力,连续5d。具体操作参照文献^[4]描述的方法进行。

1.4.2 突触形态可塑性检测:Morris水迷宫实验结束后1d,灌注动物迅速取海马组织,2.5%戊二醛溶液固定,切块,饿酸后固定,脱水,树脂包埋,超薄切片,醋酸双氧铀染色,透射电镜下观察。每只小鼠观察1张铜网,每张铜网由左上角至右下角斜线上下移动,随机拍摄5张照片,底片放大2万倍印相。

电镜照片图像分析与形态计量方法:采用Image-Pro Plus 6.0图像分析系统,对突触界面曲率、突触间隙宽度、突触后致密物(post synaptic density, PSD)厚度等突触界面超微结构进行测量分析。突触界面曲率的测量参照Jones等^[5]的方法,即界面曲率以突触界面弧长 a 与弦长 b 表示,界面曲率 $R=a/b$ 。PSD的测量参照Gulder方法^[6]。突触间隙宽度用多点平均法测定。

1.4.3 NCAM蛋白及mRNA、ST8SIIAII/IVmRNA表达检测:于Morris水迷宫测试结束后1d,动物麻醉、开胸、灌注后,取海马组织,固定、脱水、石蜡包埋、切片,进行免疫组化和原位杂交法检测。具体操作参照试剂盒。采用Leica图像分析系统分析染色结果。

1.5 统计学分析

数据用均数±标准差表示,运用SPSS12.0统计软件进行,定位航行实验采用重复测量数据方差分析,其余数据均采用单因素方差分析,方差不齐时用Games Howell分析。

2 结果

2.1 学习记忆能力评价

2.1.1 定位航行试验:表1显示,在5d的定位航行实验中,与模型组相比,空白组平均逃避潜伏期明显缩短($P<0.01$),模针组第1、2、3天平均逃避潜伏期缩短($P<0.05$),第4、5天呈持续缩短趋势($P<0.01$)。

2.1.2 空间探索结果:表2显示,在空间探索实验中,模型组较空白组在原平台所在象限停留的时间明显缩短($P<0.01$);模针组较模型组在原平台所在象限停留的时间延长($P<0.05$)。

2.2 海马神经元突触界面曲率、PSD、突触间隙宽度
表3显示,与空白组相比,模型组海马神经元突触界面曲率和PSD厚度明显减小、突触间隙宽度明

表1 各组小鼠平均逃避潜伏期比较

($\bar{x} \pm s, s$)

组别	鼠数	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天
空白组	12	36.47±5.47 ^②	32.77±6.52 ^②	23.38±6.93 ^②	15.25±2.69 ^②	11.48±2.61 ^②
模型组	12	68.46±2.87	61.70±2.42	63.65±3.43	63.77±3.16	64.18±3.46
模针组	12	61.25±2.76 ^①	54.72±4.60 ^①	52.98±4.12 ^①	50.53±2.21 ^②	47.45±2.72 ^②

与模型组比较:① $P<0.05$, ② $P<0.01$

显增加($P<0.01$);模针组 PSD、突触间隙宽度较模型组变窄($P<0.05$)。提示电针能使 SAMP8 小鼠海马神经元 PSD 增厚、突触间隙宽度变窄。而模针组突触界面曲率较模型组变化不明显($P>0.05$)。提示电针对 SAMP8 小鼠海马神经元突触界面曲率影响不明显。

2.3 NCAM 及其 mRNA 表达

表 4 显示,模型组 NCAM 及其 mRNA 表达明显低于空白组和模针组, $P<0.05$ 。提示:电针能提高 SAMP8 海马区 NCAM 及其 mRNA 表达水平。

2.4 ST8SIIAII/IVmRNA 表达

表 5 显示,模型组 ST8SIIAII/IVmRNA 表达明显低于空白组和模针组, $P<0.05$ 。提示:电针能提高 SAMP8 海马区 ST8SIIAII/IVmRNA 表达水平。

表 2 各组小鼠在原平台所在象限停留时间比较($\bar{x}\pm s, s$)

组别	鼠数	原平台所在象限
空白组	12	56.62±6.84 ^②
模型组	12	30.27±6.12
模针组	12	39.55±5.47 ^①

与模型组比较:① $P<0.05$,② $P<0.01$

表 3 各组小鼠海马神经元突触界面曲率、PSD、突触间隙宽度比较($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	突触界面曲率	PSD 厚度(nm)	突触间隙宽度(nm)
空白组	6	1.109±0.075 ^②	88.456±39.637 ^②	22.678±6.059 ^②
模型组	6	1.062±0.048	65.371±24.219	29.161±7.830
模针组	6	1.083±0.049	76.928±25.236 ^①	25.941±6.217 ^①

与模型组比较:① $P<0.05$;与空白组比较:② $P<0.01$

表 4 各组小鼠海马组织 NCAM 阳性表达平均光密度比较($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	NCAM 表达	NCAMmRNA 表达
空白组	6	0.235±0.006 ^①	0.468±0.015 ^①
模型组	6	0.138±0.005	0.383±0.017 ^②
模针组	6	0.231±0.007 ^①	0.528±0.016 ^{①②}

与模型组比较:① $P<0.05$;与空白组比较② $P<0.05$

表 5 各组小鼠海马组织 ST8SIIAII/IVmRNA 阳性表达平均光密度比较($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	原平台所在象限
空白组	6	0.382±0.023 ^①
模型组	6	0.302±0.017 ^②
模针组	6	0.485±0.012 ^{①②}

与模型组比较① $P<0.05$,与空白组比较② $P<0.05$

3 讨论

NCAM 是免疫球蛋白超家族中的一个单链跨膜糖蛋白,广泛分布于神经系统,主要由神经元表达,能调节神经细胞间相互作用,介导细胞的黏附和识别,参与黏附与轴突生长及延伸,并可能促进突触的形成,在正常神经元轴突的生长、神经纤维的成束、突触的塑形等过程中起重要作用^[7-8]。国外研究发现^[9],水迷宫训练 24h 后,NCAM 和 PSA-NCAM 海马区突触表达增加,提示 NCAM 作为学习调节分子

参与了海马重塑,空间记忆形成的关键过程。国内研究也显示^[10],行为训练促进大鼠空间学习记忆能力恢复的作用机制可能与海马 NCAM 的增多相关。因而,在突触可塑性中,NCAM 起了非常重要的调节作用^[1,11],参与了学习记忆过程中海马突触可塑性变化,是突触可塑性的一个标志^[12-13]。而突触界面结构参数是反映突触形态可塑性的敏感指标,与突触功能状态及神经信息传递有重要联系^[14-15]。其中,PSD 厚度、突触界面曲率和突触间隙宽度等突触界面结构指标能反映突触传递效能的变化,是学习记忆能力改变的结构基础^[16-17],且与 NCAM 之间存在密切关系。

NCAM 的唾液酸化(PSA-NCAM)由两种多聚唾液酸转移酶 ST8SIIAII 和 ST8SIIAIV 所催化,其能降低细胞的黏附性,促进轴突发生,是突触可塑性所必需的,在长时程的建立中,其能帮助神经元联系的结构重建^[7,18-19]。同时 ST8SIIAII/IV 能调节 PSA 的合成,是合成 PSA 所必需的多聚唾液酸酶,其含量的多少在一定程度上反映 PSA 含量的多少,研究显示,发育期其转录达最高水平,此时合成 PSA 量也最高,出生后,其转录急剧下降,PSA 量也显著减少,而 PSA 的转录则明显降低^[20-22]。PSA 是 NCAM 的关键调节因子,二者有协同作用,影响着在脑和神经系统的发育、生长、存活及可塑性^[23-25]。

本实验结果显示,与模型组相比,模针组平均逃避潜伏期变短和平台所在象限停留时间增长($P<0.05$);同时 NCAM 及 mRNA、ST8SIIAII/IVmRNA 在模针组的阳性信号平均光密度与模型组比较有显著差异($P<0.05$)。这提示电针治疗能显著改善和提高空间学习记忆能力,同时能提高其海马区 NCAM、ST8SIIAII/IV 表达。另外还观测到,与空白组相比,模型组突触界面曲率明显减小,PSD 厚度明显变薄,突触间隙宽度明显增大($P<0.01$),通过透射电镜对突触大体形态观察中发现,模型组 PSD 稀疏,密度低于空白组和模针组。结合其水迷宫测试结果表明,这些改变均降低了突触间信息传递的有效性,导致学习记忆信息传递效能减弱,表现为学习记忆能力明显减退。与模型组相比,模针组经治疗后,PSD 厚度增加,突触间隙宽度减小($P<0.05$),这些突触形态结构的改变意味着突触传递效能提高,神经冲动传导易于通过,学习记忆信息传递的有效性增加,使学习记忆能力得以改善。这与行为学测试结果一致。虽然模针组突触界面曲率与模型组相比,变化不明显($P>0.05$),但具有增大趋势。这可能与疗程的长短有关,也可能与电针治疗的靶向性有关,即电针治疗作

用于突触界面结构的部分参数,如 PSD 厚度和突触间隙宽度等,而对突触界面曲率等结构参数作用不明显,仅有改变趋势。

在前期的研究也显示,电针能增加老年痴呆模型鼠海马神经元的突触数密度、面密度^[3]。因此,综合前期和本次的实验结果,同时融合别人的研究^[26-27],可以推测:电针改善 AD 小鼠学习记忆能力的机制可能是通过诱导 NCAM、ST8SIAII/IV 的合成,使 PSA 合成增多,同时加强 NCAM 的 PSA 化,促进海马神经细胞黏附,促进神经元突触形态可塑性的发挥,保护突触连接结构,促进突触结构的修复与重建,使原来已破坏的神经通路通过新的突触的连接重新恢复功能,加强神经元间的连接,增强学习记忆信息的传递,最终提高 AD 小鼠学习记忆能力。对于其关系,应做进一步的研究,以期针灸促进 AD 的神经康复提供更多的实验依据。

参考文献

- [1] 邵欣,曾芳,余曙光.神经细胞黏附分子与老年性痴呆突触可塑性研究进展[J].四川生理科学杂志,2006,28(3):118—121.
- [2] Luca Bonfani. PSA-NCAM in mammalian structural plasticity and neurogenesis[J]. Neurobiology,2006,80:129—164.
- [3] 余曙光,罗松,韩婷,等.电针对老年痴呆大鼠海马神经元突触可塑性的影响研究[J].中华神经医学杂志,2006,5(4):369—371.
- [4] 褚芹,于建春,韩景献.针刺对快速老化痴呆模型小白鼠 SAMP8 认知功能的改善作用[J].中国行为医学科学,2005,14(11):964—965,994.
- [5] Jones DG,Devon RM.An ultrastructural study into the effect of pentobarbition on synaptic organization [J].Brain Res,1978,147:47—63.
- [6] Gulder FH.Increase in postsynaptic density material in optic target neuron of the rat suprachiasmatic nucleus after bilateral enucleation[J].Neurosci Lett,1980,17:27—32.
- [7] Fox GB,Kjoller C,Murphy KJ,et al. The modulations of NCAM polysialylation state that follow transient global ischemia are brief on neurons but enduring on glia [J]. J Neuropathol Exp Neurol,2001,60(2):132—140.
- [8] Philip W,Alexander D,Peter S,et al. Cell adhesion molecules in synapse formation[J]. Neuroscience,2004,24(42):9244—9249.
- [9] Venero C,Herrero AI,Touyrot K,et al. Hippocampal up-regulation of NCAM expression and polysialylation plays a key role on spatial memory[J]. Eur J Neurosci,2006,23(6):1585—1595.
- [10] 杨华,李玲,潘惠娟.行为训练对双侧海马梗死大鼠学习记忆与 NCAM 的影响[J].中华神经外科疾病研究杂志,2006,5(2):135—138.
- [11] Deanna LB,Lynn MS,Lawrence S,et al. Making memories stick:cell adhesion molecules in synaptic plasticity [J]. Trends Cell Biol,2000,10(11):473—482.
- [12] 蔡文琴,李海标主编.发育神经生物学[M].北京:科学出版社,1999.109.
- [13] Law JW,Lee AY,Sun M.Decreased anxiety,altered place learning,and increased CA1 basal excitatory synaptic transmission in mice with conditional ablation of the neural cell adhesion molecule L1 [J]. J Neurosci,2003,23(32):10419—10432.
- [14] 章子贵,陆汉新,李振武,等.小鼠记忆保持能力与海马 CA3 区突触界面结构的相关性[J].神经科学,1995,2(3):136—140.
- [15] 吴馥梅,杜红燕,章子贵.突触界面曲率及其生理意义[J].神经解剖学杂志,1994,10(1):89—92.
- [16] 赵小贞,王伟,康仲函,等.血管性痴呆大鼠海马突触结构参数的变化[J].解剖学杂志,2002,25(1):30—34.
- [17] 张艳玲,李露斯,可金星,等.血管性痴呆大鼠的记忆行为改变与突触结构参数的关系[J].第三军医大学学报,2002,24(12):1388—1390.
- [18] Maness PF, Schachner M. Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration [J].Nat Neurosci,2007,10:19—26.
- [19] Cremer H, Chazal G, Lledo PM, et al. PSA-NCAM: an important regulator of hippocampal plasticity [J].Int J Dev Neurosci, 2000, 18: 213—220.
- [20] 戴功,王丽梅,杨新颖,等.多聚唾液酸转移酶研究进展[J].中国生物工程杂志,2005,25(9):24—28.
- [21] 魏江洲,周文丽,郭婷婷,等.多聚唾液酸与多聚唾液酸转移酶[J].生命的化学,2005,25(6):473—475.
- [22] Hildebrandt H, Becker C, Murau M, et al. Heterogeneous expression of the polysialyltransferases ST8SiaII and ST8SiaIV during postnatal rat brain development[J]. J Neurochem,1998,1:2339—2348.
- [23] Imke ON, Sebastian PG, Herbert H, et al. Impact of the Polysialyltransferases ST8SiaII and ST8SiaIV on Polysialic Acid Synthesis during Postnatal Mouse Brain Development[J].J Biological chemistry,2008,283(3):1463—1471.
- [24] Sebastian PG, Rudolf G, Rita GS, et al. Enzyme-dependent variations in the polysialylation of the neural cell adhesion molecule (NCAM) in vivo[J]. J Biological Chemistry,2008, 283(1):17—28.
- [25] Herbert H, Martina M, Birgit W, et al. Dissecting polysialic acid and NCAM functions in brain development [J]. J Neurochemistry, 2007,103(Suppl.1):56—64.
- [26] Markram K, Gerardy-Schahn R, Sandi C. Selective learning and memory impairments in mice deficient for polysialylated NCAM in adulthood[J]. Neuroscience,2007,144(3):788—796.
- [27] Fabio Benfenati. Synaptic plasticity and the neurobiology of learning and memory[J]. Acta Biomed,2007,78(suppl 1):58—66.