

褪黑素对不同年龄 SAM-P8 小鼠学习记忆相关脑区的影响

何依帆, 成绍武, 马春媚, 范文国, 何宏文*

(中山大学光华口腔医学院//广东省口腔医学重点实验室, 广东广州 510080)

摘要:【目的】研究褪黑素的短期干预对不同年龄 SAM-P8 脑内膈隔-海马胆碱能系统和海马结构退变的影响。【方法】选用 SAM-P8 鼠 36 只,分为中年低、高浓度治疗组(ME1G、ME2G),老年低、高浓度治疗组(AE1G、AE2G)及其相应的对照组 ACG、MCG,共 6 组。中年、老年治疗组分别于小鼠 4 月龄、7 月龄时每日皮下注射褪黑素(5 mg 或 10 mg/kg)30 d。对照组注射相同剂量的生理盐水,给药结束后继续饲养到 11 月龄,采用跳台试验测试其学习及记忆能力,取脑进行海马结构尼氏染色和 AchE 酶组织化学染色,基底前脑 ChAT 免疫组化染色。【结果】中年对照组和中年高浓度治疗组结果如下:跳台实验逃避潜伏期分别是(41.9 ± 8.9) s 和(28.9 ± 7.8) s;5 min 内错误次数分别是 6.1 ± 1.6 和 3.3 ± 0.9;24 h 后逃避潜伏期分别是(11.5 ± 2.1)s 和(6.4 ± 2.2)s, $P < 0.05$;海马 CA1 区锥体细胞层神经元数分别是(88.1 ± 10.6)个和(132.5 ± 17.2)个;齿状回颗粒细胞数分别是(178.7 ± 11.9)个和(220.9 ± 16.7)个;海马 CA1 区胆碱能纤维 OD 值($\times 10^3$)分别是 410 ± 34 和 471 ± 44;齿状回胆碱能纤维分别是 364 ± 34 和 416 ± 34;膈内侧核胆碱能神经元数分别是 48.4 ± 7.1 和 66.2 ± 9.7;斜角带垂直支胆碱能神经元数分别是 73.9 ± 11.1 和 93.7 ± 11.3。中年高浓度治疗组的上述指标与中年对照组比较有明显差异($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。其余治疗组的上述指标与相应对照组比较差异不明显($P > 0.05$)。【结论】MT 对 SAM-P8 小鼠治疗作用存在年龄差异,衰老前的褪黑素早期干预可明显改善 SAM-P8 小鼠的学习能力,减少海马结构神经元丢失,抑制膈-海马胆碱能系统的退变。

关键词: 阿尔茨海默病;褪黑素;快速老化小鼠;海马结构;膈-海马胆碱能系统

中图分类号: R32

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2014)06-0830-09

Effects of Melatonin on Brain Regions Associated with Learning and Memory of SAMP-8 Mouse of Different Ages

HE Yi-fan, CHENG Shao-wu, MA Chun-mei, FAN Wen-guo, HE Hong-wen

(Guanghua School of Stomatology, Sun Yat-sen University// Guangdong Provincial Key Laboratory of Stomatology, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objective】 To study the effects of melatonin in short-term treatment on the septohippocampal cholinergic system and hippocampal formation in SAMP-8 mouse of different ages. 【Methods】 36 SAM-P8 mice were randomly divided into middle-aged high or low concentration treatment group, aging high or low concentration treatment group and related control group ($n = 6$ for each group). The 4 months old SAMP8 mice (middle-aged treatment group) were injected subcutaneously with melatonin (5 mg/kg or 10 mg/kg) for 30 d. Similar treatments were performed in the 7 months old mice (aging treatment group). When the animals were complete 11 months old, a series of tests were performed. The step-down test were used to assess cognitive performance. The hippocampal formation of mice were stained by the AchE enzyme histochemistry and cresyl violet. The basal forebrain of mice were stained by the immunohistochemistry of ChAT. 【Results】 Data of related control group and middle-aged high concentration treatment group as following: The escape latency in the step-down test respectively were (41.9 ± 8.9)s and (28.9 ± 7.8)s; The numbers of error within 5 min respectively were (6.1 ± 1.6)time and (3.3 ± 0.9)time; The escape latency after 24 h respectively were (11.5 ± 2.1)s and (6.4 ± 2.2)s; The number of pyramidal neurons in the hippocampal CA1 area respectively were 88.1 ± 10.6 and 132.5 ± 17.3; The number of granule cell layer in dentate gyrus respectively were 178.7 ± 11.9 and 220.9 ± 16.7; The OD value ($\times 10^3$) for number of

收稿日期: 2014-07-25

基金项目: 国家自然科学基金(81371107, 81470760); 广东省自然科学基金(S2013010015888)

作者简介: 何依帆, 本科生; * 通信作者, 何宏文, 教授, 博士研究生导师, E-mail: hehw@mail.sysu.edu.cn

cholinergic fiber in the hippocampal CA1 area respectively were 410 ± 34 and 471 ± 44 ; The number of cholinergic fibers in dentate gyrus respectively were 364 ± 34 and 416 ± 34 ; The number of cholinergic neurons in the medial septum respectively were 48.4 ± 7.1 and 66.2 ± 9.7 ; The number of granule cell layer in vertical limb of diagonal band respectively were 73.9 ± 11.1 and 93.7 ± 11.3 . The middle-aged high concentration treatment group was significant differences compared with the control group above-mentioned data ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). Data of other treatment group was no significant differences compared with related control group ($P > 0.05$) 【Conclusion】Our results indicate that the protective effects of melatonin on neurodegeneration of SAMP8 mice are age dependent. The short term treatment of melatonin obviously improve the capability of learning, decrease neuronal loss in hippocampal formation, inhibit neurodegeneration of in the septo-hippocampal cholinergic system before SAMP-8 mice appears senescence.

Key words: Alzheimer disease; melatonin; senescence accelerated mouse; hippocampal formation; septo-hippocampal cholinergic system

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2014, 35(6): 830-838]

褪黑素(Melatonin, MT)主要是由松果体分泌的一种吲哚类激素。生理状态下 MT 的生物合成具昼夜节律性,血液中的 MT 浓度日低夜高。3~5 岁幼儿的夜间 MT 分泌量最高,青春期分泌量后开始下降,到老年期明显下降,从正常的生理角度来看,青春期以前应是内源性 MT 发挥作用的最好的时期^[1-3]。衰老的过程,伴有神经-内分泌系统的紊乱,MT 的分泌降低及节律失调,在老年性痴呆(Alzheimer disease, AD)患者中尤为明显^[1-2]。目前关于 MT 防治神经元退行性病变的研究很多,对神经元的保护机制研究主要体现在抗氧化和自由基损害作用、抗 β -淀粉样沉淀和损害、线粒体保护、促进神经发生作用、突触可塑性的调整、免疫调节等等^[1-7]。然而,与实验研究形成鲜明对比的是临床真正被认为 MT 有效的作用仅限于促进睡眠、矫正生物钟功能等,用于防治 AD 及其他神经退行性病变有明显疗效临床报道并不多。Quinn 等^[8]研究发现不同年龄段的 Tg2576 转基因 AD 模型鼠应用 MT 治疗,其疗效差异很大,在老年转基因鼠中,MT 抗 $A\beta$ 和抗氧化效果不明显。那么,是否因为大多数研究 MT 治疗 AD 的实验研究所选的实验对象常没有考虑年龄因素,有关青年 AD 模型证明有效的作用对老年 AD 患者未必有效。本课题组前期研究发现 MT 对改善不同培养时期海马神经元线粒体功能低下的作用有明显差别,培养早期的正常海马神经元效果好,衰老的海马神经元效果差^[9]。本课题组还选用快速老化鼠(senescence accelerated mouse, SAM)-P8 使用相同剂量 MT 在中年时段(4 月龄)和老年时段(7 月龄)分别治疗 4 个月,然后饲养至 11 月龄时,结果发现 4 月龄组空间学习记忆能力和淀粉样颗粒及

海马锥体细胞数等指标比对照组有明显改善,而 7 月龄组却无明显疗效,证明了年龄因素确实影响其疗效^[10]。为进一步探讨 MT 对 AD 疗效的年龄差异,实验选用 4 月龄和 7 月龄的 SAM-P8 鼠,进行 MT 短期治疗,测定 11 月龄后 SAM-P8 鼠脑内胆碱能系统和海马结构退行性变化情况,研究老年性痴呆疾病初期的褪黑素干预对其后期病程发展的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选用健康清洁级 SAM-P8 鼠,购买于北京维通利华实验动物科技有限公司,许可证编号:SCXK(京)2002-0001,体质量 20~40 g。于清洁级环境中饲养,保证通风干燥及昼夜各 12 h 的光线变换。

1.2 动物分组

SAM-P8 鼠 36 只,雌雄不限,随机分为 6 组,分别为中年对照组(MCG)、中年低浓度治疗组(ME1G)、中年高浓度治疗组(ME2G)、老年对照组(ACG)、老年低浓度治疗组(AE1G)和老年高浓度治疗组(AE2G),各 6 只。

1.3 褪黑素治疗

ME1G 和 ME2G 满 4 月龄次日,而 AE1G 和 AE2G 满 7 月龄次日,开始皮下注射 MT(PM6:00),MT 临用前用无水乙醇溶解后再加生理盐水配制,乙醇终体积分数为 0.5%,MT 质量浓度为 1mg/mL ;对照组注射相同剂量的生理盐水,乙醇终体积分数为 0.5%。治疗 30 d 后停止治疗,各组小鼠继续饲养到 11 月龄。MCG 组:选正常 4 月龄

SAM-P8 鼠,注射相同剂量的生理盐水;ME1G:选正常 4 月龄 SAM-P8 鼠,每晚 6 时腹腔注射 MT (5 mg/kg);ME2G:选正常 4 月龄 SAM-P8 鼠,每晚 6 时腹腔注射 MT (10 mg/kg);ACG 组:选正常 7 月龄 SAM-P8 鼠,注射相同剂量的生理盐水;AE1G:选正常 7 月龄 SAM-P8 鼠,每晚 6 时腹腔注射 MT (5 mg/kg);AE2G:选正常 7 月龄 SAM-P8 鼠,每晚 6 时腹腔注射 MT (10 mg/kg)。

1.4 行为学测试

各组动物满 11 月龄次日,采用小鼠跳台仪(中国医学科学院药研所 STT-2 型)测试其学习及记忆能力。跳台实验为被动回避反射方法。跳台反射箱为 60 cm × 12 cm × 18 cm 的有机玻璃箱,由不透明板隔成 5 小间,箱底为铜栅,通 36 V 电流。每小间里放置高和直径均为 4.5 cm 的橡胶圆台作为跳台,即动物回避电击的安全区。将动物放入反映箱内适应 3 min,然后立即通以 36 V 交流电,动物受到电击,其正常的反应是跳上平台以躲避伤害刺激。多数动物可能会再次或多次又跳至铜栅上,受到电击后又迅速跳回平台上。如此训练 5 min(同一实验中所有动物训练的时间相同),记录动物 5 min 内第一次跳上平台的时间即逃避潜伏期,受到电击的次数即错误次数,以逃避潜伏期和错误次数作为学习成绩。24 h 后重新测试,记录动物第一次跳上平台的时间即逃避潜伏期;第一次跳下平台的潜伏期称为跳下潜伏期,若超过 3 min,按 3 min 计;3 min 内受到电击的次数即错误次数,以 24 h 后的逃避潜伏期、跳下潜伏期及错误次数作为记忆成绩。

1.5 取材及切片

各组动物行为学测试结束后,用体积分数为 10%的水合氯醛(4 mL/kg)腹腔注射麻醉,40 g/L 多聚甲醛固定液灌注固定。迅速取脑,于嗅结节 1/2 处、灰结节 1/2 处冠状切取包括基底前脑和背侧海马部分的大脑组织,置于 40 g/L 多聚甲醛固定液后固定 4 h 后,浸泡于 200 g/L 蔗糖溶液中过夜。脑组织用冰冻切片机制冠状切片,片厚 20 μm,连续切片,隔 6 取 3,选出 3 套切片,分别进行尼氏染色、ChAT 免疫组织化学染色和 AchE 酶组织化学染色。

1.6 染色

1.6.1 尼氏染色 选用焦油紫染色法进行尼氏染色,方法如下:选用明胶玻片裱片,室温下干燥;蒸

馏水洗切片 3 次后;2.5 g/L 焦油紫 (Sigma 公司) 30 s;蒸馏水洗片;分别至体积分数 70%、80%、90%的乙醇 30 min;100%乙醇两次,30 min/次;二甲苯透明,中性树胶封片。染色切片背景为无色,尼氏体为蓝紫色。

1.6.2 ChAT 免疫组织化学染色 ChAT 免疫组化染色按 ABC 法进行,阴性对照实验为不加一抗孵育。方法如下:切片入 0.01 mol/L PBS 洗片 3 次,每次 5 min;3 g/L H₂O₂ 室温下 30 min;0.01 mol/L PBS 洗片 3 次,每次 5 min;15 g/L BSA 37 °C 下 60 min;一抗孵育用山羊抗小鼠 ChAT 多克隆抗体 (Chemicon, 1:250),37 °C 下 2 h,然后室温下过夜;0.01 mol/L PBS 洗片 3 次,每次 5 min;二抗孵育用兔抗山羊辣根过氧化物酶 (北京中杉金桥生物科技有限公司,1:1 000),37 °C 下 2 h,0.01 mol/L PBS 洗片 3 次,每次 5 min;0.5 g/L DAB+0.1 g/L H₂O₂ 室温下显色 15 min;0.01 mol/L PBS 洗片 3 次,每次 5 min;明胶玻片裱片,室温下干燥后递升乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。阴性对照实验为不加一抗孵育。

1.6.3 AChE 组织化学染色 以 Hedreen 等方法进行 AchE 纤维组织化学染色。方法如下:切片入 0.1 mol/L 醋酸缓冲液(pH 值 6.0)漂洗 2 次,每次 5 min;孵化液室温下 30 ~ 40 min;0.1 mol/L 醋酸缓冲液(pH 值 6.0)漂洗 5 次,每次 3 min;10 g/L 硫化铵漂洗 1 ~ 2 min,0.1 mol/L 硝酸钠漂洗 5 次,每次 3 min;1 g/L 硝酸银漂洗 1 min,0.1 mol/L 硝酸钠漂洗 5 次,每次 3 min;明胶玻片裱片,室温下干燥后递升乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。染色切片背景为无色,AChE 活性部位有棕黄色沉淀。阴性对照实验为孵育中不加碘化乙酰硫代胆碱。

染色前临时配制孵化液。孵化液由碘化乙酰硫代胆碱(Sigma 公司) 10 mg、储备液 I 24.5 mL 和储备液 II 0.5 mL 临时配制,其中储备液 I 由醋酸缓冲液 65 mL,柠檬酸钠·2H₂O 1 g,硫酸铜·5H₂O 75 mg,加双蒸水至 400 mL 组成。储备液 II 由铁氰化钾 165 mg,加双蒸水至 100 mL 组成。

1.7 形态计量学分析

1.7.1 海马结构神经元数量测定 每只动物选取海马结构尼氏染色切片 5 张,每张选取海马 CA1 区锥体细胞层,齿状回颗粒细胞层,40×物镜下的计数 2 个视野,计数双侧海马结构取均数。动物、

切片和视野的选择均遵从随机原则。

1.7.2 基底前脑 ChAT 阳性神经元数量测定 应用免疫组织化学方法标记出基底前脑隔内侧核 (medial septal nucleus, MS) 与斜角带垂直支 (nucleus vertical limb of the diagonal band, VDB) 的 ChAT 阳性神经元。每只动物选取基底前脑相似平面等量 5 张切片, 以前联合腹侧连线为界, 连线背侧为 MS, 腹侧为 VDB, 利用 10 × 10 方格系统分别计数各张切片 MS 和 VDB 的 ChAT 阳性神经元数量。动物、切片和视野的选择均遵从随机原则。

1.7.3 海马结构 AChE 阳性纤维测定 每只动物选取海马结构 AChE 组织化学法染色切片 5 张, 海马 CA1 区选取视野均包括辐射层及腔隙层, 齿状回选取门区分子层, 在 20 × 物镜下的视野下进行测定, 双侧海马和齿状回均被计数, 动物、切片、视野的选择均遵从随机原则。采用计算机图像辅助分析系统 (MGDS) 和 Image Pro-Plus 6.0 软件 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) 分析单位面积内 AChE 阳性纤维的灰度值计算其所占面积。

1.8 数据记录及统计学分析

所有数据以 mean ± SD 表示, 统计采用单因素和双因素方差分析 (ANOVA)。当 ANOVA 显示有明显差异, 均数间配对比较采用 post hoc Student-Newman-Keuls 方法。2 组均数间的差异使用配对 *t*-test。*P* < 0.05 被认为有统计学意义, 所有统计分析均使用 “Sigma Stat for Windows” (version 3.1, Jandel Corporation, 美国拉斯维加斯) 软件。

2 结 果

2.1 褪黑素对 SAM-P8 鼠行为学的影响

与相应对照组比较, 中年高浓度治疗组 (ME2G) 的逃避潜伏期和 5 min 内错误次数明显降低, 差异有统计学意义 (*P* < 0.01), 24 h 后逃避潜伏期明显降低, 有差异统计学意义 (*P* < 0.05), 中年低浓度治疗组 (ME1G) 的 5 min 内错误次数也有降低, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。其余各组与相应对照组比较, 逃避潜伏期、5 min 内错误次数和 24 h 后逃避潜伏期差、跳下潜伏期及 3 min 内的错误次数, 差异均无统计学意义 (*P* > 0.05; 表 1)。

2.2 MT 对 SAMP8 鼠海马结构神经元数量的影响

利用尼氏染色方法可以清晰的显示出 SAMP8 鼠的海马结构各个层次的神经元排列, 我们以海马 CA1 区锥体细胞层和齿状回颗粒细胞层的神经元作为观察指标 (图 1A)。光镜下可见 CA1 区锥体细胞层的尼氏体染色清晰, ME2G 可见 3 ~ 4 层神经元 (图 1E), 其余各对照组和治疗组 2 ~ 3 层神经元 (图 1B、C、D), 细胞呈多角形或椭圆形。ME2G 齿状回颗粒细胞层的可见 5 ~ 6 层神经元 (图 1I), 其余各对照组和治疗组仅 4 ~ 5 层神经元, 细胞呈圆形或椭圆形 ((图 1F、G、H)。

与相应对照组比较, 中年高浓度治疗组 (ME2G) 的海马 CA1 区锥体细胞层和齿状回颗粒细胞层的神经元数量明显增加, 差异有统计学意义 (*P* < 0.01), ME1G 海马 CA1 区锥体细胞层神经

表 1 褪黑素对 SAMP8 鼠跳台实验学习记忆成绩表
Table 1 Effect of melatonin on learning and memory of the SAMP8 mouse in the step-down test ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Group	CL		CMA24		
	EL/s	MEM	EL/s	LFST/s	NE3M
ACG	40.3 ± 8.2	6.5 ± 1.3	10.2 ± 2.4	62.7 ± 10.7	3.8 ± 1.2
MCG	41.9 ± 8.9	6.1 ± 1.6	11.5 ± 2.1	66.1 ± 12.2	3.9 ± 1.1
AE1G	38.4 ± 7.4	5.9 ± 1.6	9.3 ± 4.8	58.4 ± 13.1	3.3 ± 3.1
AE2G	35.3 ± 9.5	6.6 ± 2.3	8.8 ± 3.9	69.4 ± 15.2	2.8 ± 2.6
ME1G	34.5 ± 9.2	4.6 ± 1.8 ²⁾	7.3 ± 3.8	71.6 ± 20.8	2.8 ± 1.3
ME2G	28.9 ± 7.8 ¹⁾	3.3 ± 0.9 ¹⁾	6.4 ± 2.2 ²⁾	68.6 ± 18.4	3.2 ± 0.8

CL: the capability of learning; CMA24: the capability of memory after 24 h; EL: The escape latency; MEM: The numbers of error within 5 minutes; EL: The escape latency; LFST: The escape latency at the first the step-down test; NE3M: The numbers of error within 3 min. *n* = 6 for each group. The differences between the experimental groups and the related control groups were compared using paired *t*-test. 1) *P* < 0.01 vs. MCG; 2) *P* < 0.05, vs. MCG.

元数量也有增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。其余各组与相应对照组比较,CA1 区锥体细胞层和齿状回颗粒细胞层的神经元数量,差异均无统计学意义($P > 0.05$;表 2)。

2.3 MT 对 SAMP8 鼠基底前脑 ChAT 阳性神经元的影响

基底前脑的 MS 和 VDB 均可见 ChAT 阳性神经元,细胞呈深棕黄色,形态各异,主要为双极神

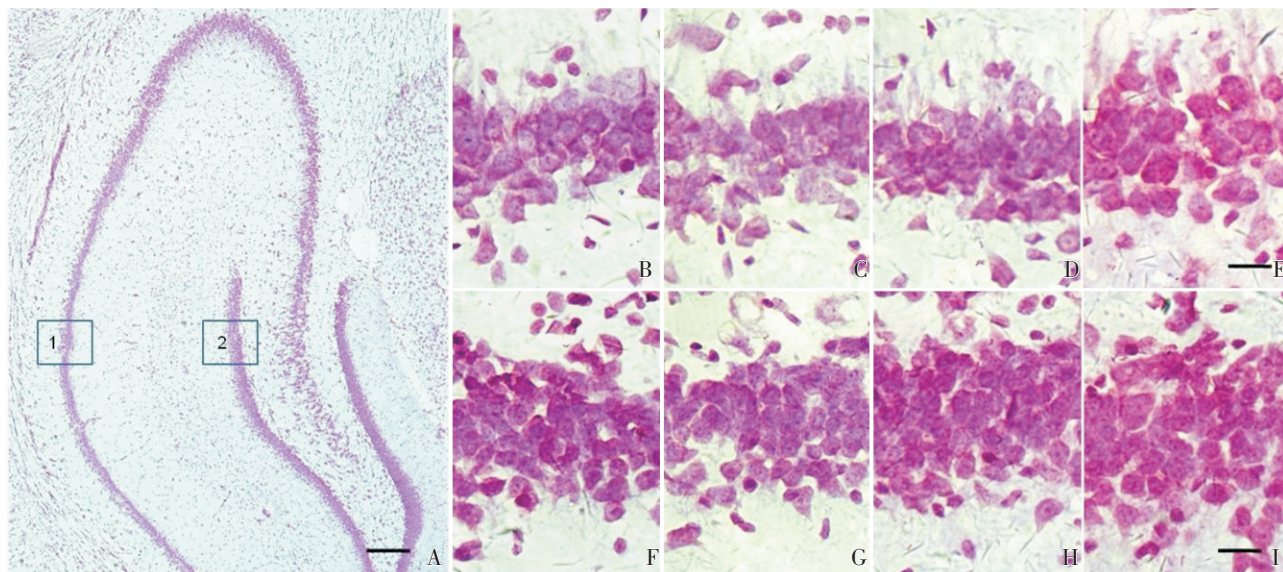


图 1 褪黑素对 SAMP8 鼠海马结构神经元的影响

Fig.1 Effect of melatonin on the neurons in the hippocampal formation in the SAMP8 mouse

A: The hippocampal formation were stained by cresyl violet; B, C, D, E: pyramidal neurons in the hippocampal CA1 area; F, G, H, I: granule cell in dentate gyrus. B, F: ACG; C, G: MCG; D, H: AE2G; I, E: ME2G. Bar = 200 mm for Fig. A or 50 mm for Fig. B-I.

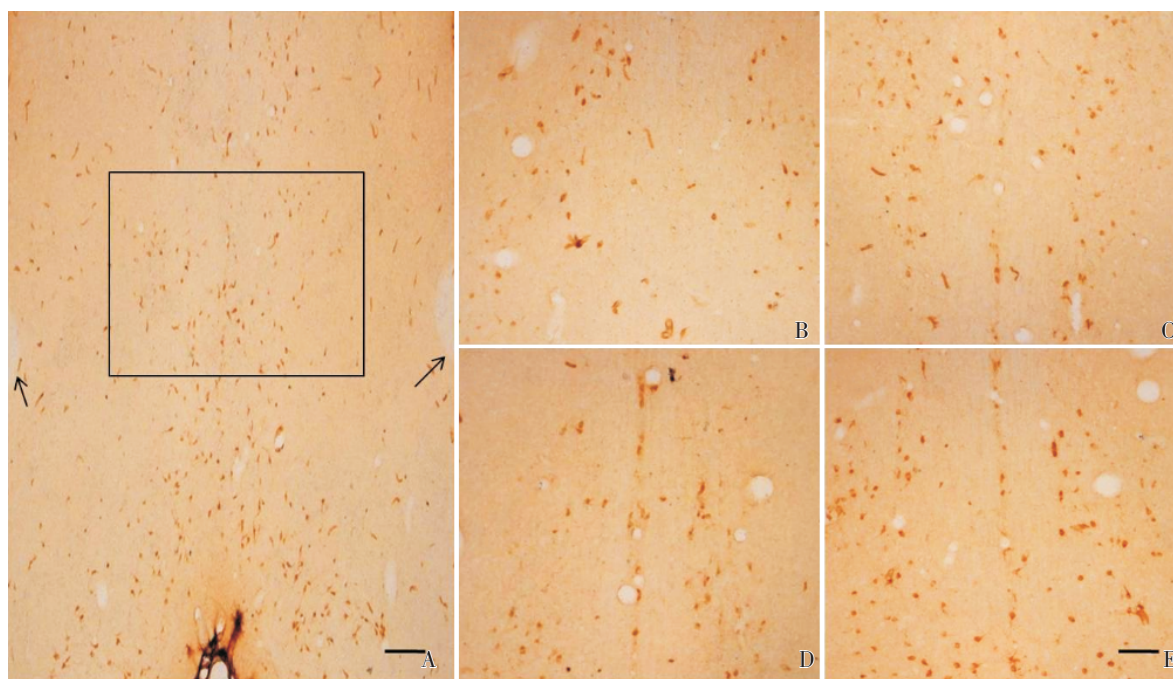


图 2 褪黑素对 SAMP8 鼠基底前脑 ChAT 阳性神经元的影响

Fig.2 Effect of melatonin on the cholinergic neurons of the basal forebrain in the SAMP8 mouse

A: cholinergic neurons in the basal forebrain; B, C, D, E: cholinergic neurons in the medial septum. B: ACG; C: AE2G; D: MCG; E: ME2G. Bar = 200 mm for Fig. A or 100 mm for Fig. B-E.

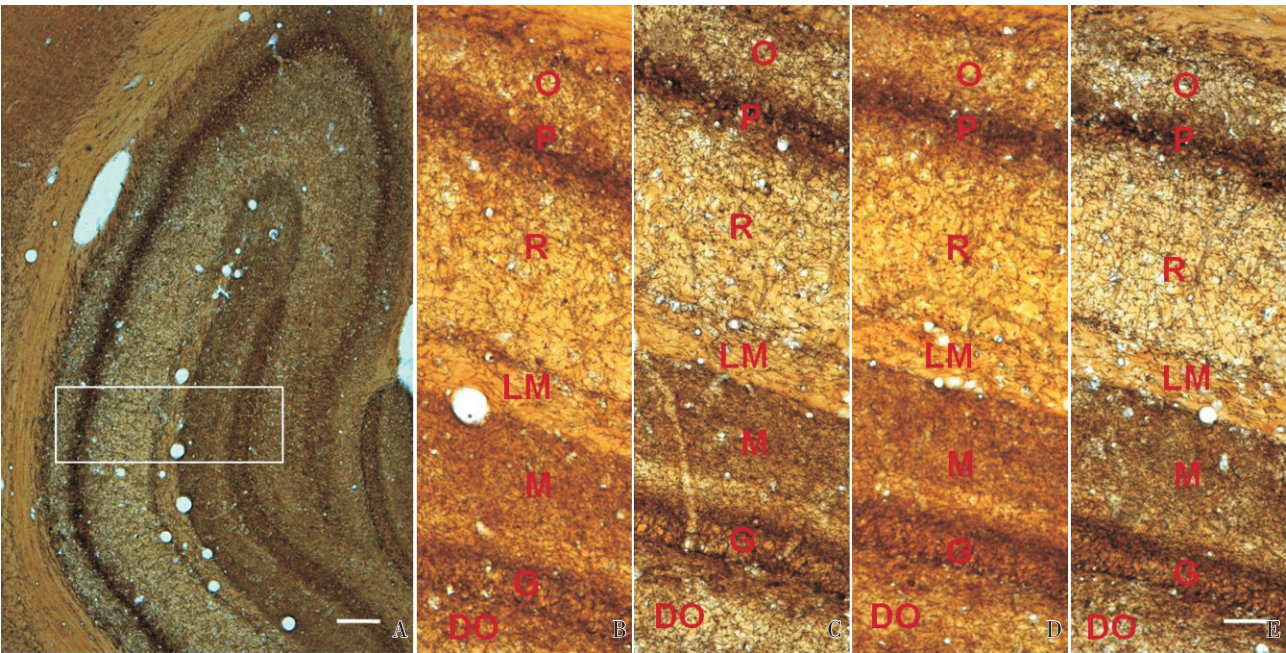


图 3 褪黑素对 SAMP8 鼠海马结构 AChE 阳性纤维的影响

Fig.3 Effect of melatonin on the acetylcholinesterase-positive fibers in the hippocampal formation in the SAMP8 mouse

A: AChE-positive fibers in the hippocampal formation; B: ACG; C: MCG; D: AE2G; E: ME2G. In the CA1 area: O, stratum oriens; P, stratum pyramidale; R, stratum radiatum; LM, stratum lacunosum-moleculare. In the dentate gyrus: M, molecular layer; G, granular layer; DO, stratum oriens. Bar 200 mm for fig.A or 100 mm for Fig.B-E.

表 2 MT 对 SAMP8 鼠海马结构神经元数量的影响

Table 2 Effect of melatonin on the number of neurons in the hippocampal formation in the SAMP8 mouse
($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Group	Hippocampal CA1	Dentate gyrus
ACG	94.55 ± 12.1	166.24 ± 13.7
MCG	88.13 ± 10.6	178.67 ± 11.9
AE1G	98.82 ± 13.7	180.33 ± 14.3
AE2G	102.46 ± 12.3	190.61 ± 15.2
ME1G	114.33 ± 16.1 ²⁾	189.34 ± 14.8
ME2G	132.52 ± 17.2 ¹⁾	220.94 ± 16.7 ¹⁾

$n = 6$ for each group. The differences between the experimental groups and the related control groups were compared using paired t -test. 1) $P < 0.01$ vs. MCG; 2) $P < 0.05$, vs. MCG.

经元和多极神经元。MS 及 VDB 的 ChAT 阳性神经元比较集中在脑组织切片中线两侧。MS 的 ChAT 阳性神经元呈倒“V”字排列(图 2B、C、D、E), VDB 的 ChAT 阳性神经元呈“人”字行排列(图 2A)。

与相应对照组比较, ME2G 的 MS 和 VDB 的 ChAT 阳性神经元数量明显增加, 差异有统计学意

表 3 MT 对 SAMP8 鼠基底前脑 ChAT 阳性神经元的影响

Table 3 Effect of melatonin on the cholinergic neurons of the basal forebrain in the SAMP8 mouse ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Group	MS	VDB
ACG	46.22 ± 8.3	70.45 ± 14.8
MCG	48.38 ± 7.1	73.88 ± 11.1
AE1G	51.66 ± 9.1	82.46 ± 11.9
AE2G	54.12 ± 8.8	88.45 ± 14.1
ME1G	58.56 ± 7.8	91.12 ± 15.7
ME2G	66.23 ± 9.7 ¹⁾	93.66 ± 11.3 ¹⁾

MS: Medial septal nucleus; VDB: Vertical limb of the diagonal band. $n = 6$ for each group. The differences between the experimental groups and the related control groups were compared using paired t -test. 1) $P < 0.01$ vs. MCG.

义($P < 0.01$)。其余各组与相应对照组比较, MS 和 VDB 的 ChAT 阳性神经元数量差异均无统计学意义($P > 0.05$; 表 3)。

3.4 MT 对 SAMP8 鼠海马结构 AChE 阳性纤维数量的影响

SAMP8 鼠的海马结构中均含有大量 AChE 阳

表 4 MT 对 SAMP8 鼠海马结构 AChE 阳性纤维的影响
Table 4 Effect of melatonin on the acetylcholinesterase-positive fibers in the hippocampal formation in the SAMP8

mouse ($\bar{x} \pm s, \times 10^3, n = 6$)		
Group	Hippocampal CA	Dentate gyrus
ACG	405 $\pm$ 37	355 $\pm$ 46
MCG	410 $\pm$ 34	364 $\pm$ 34
AE1G	426 $\pm$ 43	385 $\pm$ 29
AE2G	436 $\pm$ 61	382 $\pm$ 32
ME1G	447 $\pm$ 44	389 $\pm$ 41
ME2G	471 $\pm$ 44 ¹⁾	416 $\pm$ 34 ¹⁾

$n = 6$ for each group. The differences between the experimental groups and the related control groups were compared using paired t -test. 1) $P < 0.05$ vs. MCG

性神经纤维,其分布呈板层构筑形式。腔隙分子层纤维密度较高,依次为多形层、辐射层、锥体层(图 3B、C、D、E)。在齿状回中,分子层的纤维密度较高,(图 3B、C、D、E)。

与相应对照组比较, ME2G 的海马 CA1 区和齿状回的 AChE 阳性神经纤维数量明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$),其余各组与相应对照组比较,海马 CA1 区和齿状回的 AChE 阳性神经纤维差异无统计学意义($P > 0.05$; 表 4)。

3 讨 论

AD 患者最主要的临床表现为进行性认知障碍和记忆力减退,研究者主要是根据所要观察的指标而选择不同的 AD 模型。SAMP8 鼠是 SAMP 系的一种,平均存活期约 12.1 月,2 月龄就开始出现学习记忆能力减退,并随增龄而加重,3 月龄左右淀粉样颗粒就会在脑内出现,成熟期为 4~6 月龄,之后迅速衰老,出现一系列快速老化的特征:脑内出现淀粉样颗粒沉积、脑皮质和海马神经元减少、学习记忆能力下降,是公认的老年性痴呆模型较理想的一类^[11-12]。选择 4 月龄 SAM-P8 鼠进行研究,就是要在小鼠 4 月龄开始出现行为学及形态学病变模拟 AD 的早期,进行 MT 早期干预治疗。选择 7 月龄 SAM-P8 鼠就是要模拟 AD 患者已开始出现衰退时进行 MT 干预治疗^[8],观察老年性痴呆模型后期变化情况。研究褪黑素对 AD 病程不同发展阶段的影响。

我们前期的研究显示选用 4 月龄 SAM-P8 鼠连续 4 个月 MT 的治疗后,空间学习和记忆能力明显改善,表明褪黑素早期干预效应,但治疗跨度超过了 7 月龄的衰老早期,不能完全说明是 MT 早期的疗效^[8]。本实验 MT 的治疗时间只有 1 个月,显示成熟期(4 月龄)SAM-P8 鼠短期高浓度 MT 作用下的学习记忆能力与未治疗小鼠比较有明显改善,而衰老早期(7 月龄)SAM-P8 鼠 MT 的治疗却无明显作用。说明在小鼠出现明显中枢神经退变之前 MT 的治疗对机体学习记忆能力影响明显。但当机体已出现严重退变后,MT 的治疗对老年机体作用有限。本研究更详细行为学检查数据分析,显示 MT 治疗小鼠跳台实验中逃避潜伏期及 5 min 内错误次在成熟期进行 MT 治疗的 SAMP8 鼠均表现为明显改善,而这几个实验数据主要是反映小鼠学习能力。反映小鼠记忆能力数据的小鼠跳台实验记忆成绩只有 24 h 后逃避潜伏期出现改善,24 h 后第一次跳下跳台潜伏期和 3 min 内错误次数各组间均无明显变化。这就强烈提示 MT 早期治疗可能影响机体学习能力为主,对 AD 动物模型记忆能力改善有限。

海马结构是边缘系统重要组成部分,包括齿状回和海马,参与了情绪、学习和记忆、行为、免疫等的调节^[9-10,13-14]。一般认为海马是学习和记忆基本过程中对信息处理和加工的一个脑区,与空间学习记忆密切相关,在老年痴呆患者和 SAMP8 鼠的大脑均发现了海马神经元的丢失^[14-15]。本研究选择了海马 CA1 区和齿状回神经元作为研究指标,显示在 SAMP8 鼠成熟期进行短暂的高浓度 MT 治疗,可明显改善衰老晚期海马 CA1 区和齿状回神经元丢失,而在 SAMP8 鼠衰老早期的 MT 治疗却无明显效应。海马 CA1 区是脑内对衰老最敏感脑区。随着衰老发生,海马是首先出现形态、生理学紊乱的脑区之一^[9,13]。我们前期的研究已发现 SAMP8 鼠成熟期在低浓度 MT 治疗 4 个月后小鼠在衰老晚期海马 CA1 区神经元丢失明显改善,而本实验缩短治疗疗程后低浓度 MT 治疗效应不明显,但高浓度 MT 却有效,说明 MT 的治疗时机,用量和疗程的长短均有密切关系。本实验也表明 MT 对齿状回神经元丢失影响与海马 CA1 区的效应相似。齿状回是成年机体神经发生的重要脑区,也是与学习记忆密切相关的隔-海马胆碱能系统的重要门户。尽管本实验并不能证明 MT 影响到

机体神经发生,也不能证明通过减少齿状回神经元丢失对隔-海马胆碱能系统功能有多大的影响。至少可以认为改善了脑内神经发生条件,减缓或抑制了SAMP8鼠海马结构神经元的丢失。而海马主要与短时记忆形成有关,负责对信息处理和加工^[13-15]。结合行为学检测结果,本研究认为MT可通过减缓SAMP8鼠海马结构的退变,使机体在学习过程中对信息处理和加工能力提高,短时储存和学习能力改善。

1970年,英国学者^[16]提出AD的胆碱能学说,认为AD的脑胆碱能系统发生严重的溃变,引起老年性学习记忆减退和认知障碍,产生痴呆症状。中枢胆碱能神经系统胞体主要位于基底前脑区的内侧隔核、斜角带核等,合成大量乙酰胆碱并沿着多个通路的投射纤维输送至大脑皮质和海马^[16-17]。其中,隔-海马胆碱能投射通路是海马结构胆碱能纤维重要来源,基底前脑的隔内侧核损伤后,常可见海马AChE阳性纤维的退变^[17-18]。所以本研究选择SAMP鼠基底前脑胆碱能神经元以及海马CA1区和齿状回的AChE阳性纤维进行分析,就是要证明短期MT治疗是否可减缓SAMP8鼠隔-海马胆碱能投射通路退变,进而影响海马的结构和学习记忆功能。本研究表明成熟期(4月龄)SAM-P8鼠短期高浓度MT作用下,其基底前脑的隔内侧核和斜角带垂直支的胆碱能神经元明显增加,其海马CA1区和齿状回的胆碱能神经纤维的数量也明显改善。而对衰老早期的SAM-P8鼠上述作用却不明显。说明MT对成熟期(4月龄)SAM-P8鼠胆碱能神经系统有较大影响。本研究认为MT可能是通过减缓成熟期(4月龄)SAM-P8鼠海马结构的退变,促进齿状回神经发生,使投射到该区胆碱能纤维不会因为靶器官的退变而出现溃变,进而影响到其基底前脑胆碱能神经元^[19-20]。当然,MT对基底前脑的隔内侧核和斜角带垂直支的胆碱能神经元也可能有直接保护作用^[21]。MT改善AD的脑胆碱能系统可改善机体的学习记忆能力是一个不争的事实^[22],MT的这种减缓隔-海马胆碱能投射通路和海马结构的退变的年龄差异,将强烈提示MT临床AD治疗应尽量在AD出现明显学习记忆能力障碍时进行,即作为一个副作用轻微的MT可以进行预防性用药效果更佳。

总之,本实验研究表明:MT对减缓AD病程及中枢的影响存在年龄差异,早期的治疗可减缓

衰老晚期SAMP8鼠基底前脑胆碱能系统退变和海马锥体细胞神经元的丢失,进而影响学习记忆能力降低,主要表现在提高其学习能力低下。本项研究也可指导MT的AD临床治疗,早期、持续和高剂量效果更佳。

参考文献:

- [1] Lin L, Huang QX, Yang SS. Melatonin in Alzheimer's disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(7): 14575-14593.
- [2] Hongwen H, Weiguo D, Fang H. Anti-amyloidogenic and anti-apoptotic role of melatonin in Alzheimer disease[J]. *Curr Neuropharmacol*, 2010, 8(3): 211-217.
- [3] Weiguo D, Fang H, Hongwen H. Melatonin and mitochondria in aging[J]. *Front Biol*, 2010, 5(6): 532-539.
- [4] Polimeni G, Esposito E, Bevelacqua V, et al. Role of melatonin supplementation in neurodegenerative disorders[J]. *Front Biosci*, 2014, 19(4): 429-446.
- [5] Tapias V, Escames G, López LC, et al. Melatonin and its brain metabolite N(1)-acetyl-5-methoxykynuramine prevent mitochondrial nitric oxide synthase induction in parkinsonian mice[J]. *J Neurosci Res*, 2009, 87(13): 3002-3010.
- [6] Zhou J, Zhang S, Zhao X, et al. Melatonin impairs NADPH oxidase assembly and decreases superoxide anion production in microglia exposed to amyloid-beta1-42[J]. *J Pineal Res*, 2008, 45(2): 157-165.
- [7] Olcese JM, Cao C, Mori T, et al. Protection against cognitive deficits and markers of neurodegeneration by long-term oral administration of melatonin in a transgenic model of Alzheimer disease[J]. *J Pineal Res*, 2009, 47(1): 82-96.
- [8] Quinn J, Kulhanek D, Nowlin J, et al. Chronic melatonin therapy fails to alter amyloid burden or oxidative damage in old Tg2576 mice: implications for clinical trials[J]. *Brain Res*, 2005, 1037(1-2): 209-213.
- [9] Weiguo D, Fang H, Wenguo F, et al. Differential effects of melatonin on amyloid-beta peptide 25-35-induced mitochondrial dysfunction in hippocampal neurons at different stages of culture[J]. *J Pineal Res*, 2010, 48(2): 117-125.
- [10] Cheng S, Ma C, Qu H, et al. Differential effects of melatonin on hippocampal neurodegeneration in different aged accelerated senescence prone mouse-8[J]. *Neuro Endocrinol Lett*, 2008, 29(1): 91-99.

- [11] Masaomi M. Characteristics of age-related behavioral changes in senescence accelerated mouse SAMP8 and SAMP10[J]. *Exp Gerontol*, 1997, 32(1-2): 139-148.
- [12] Cheng XIR, Zhou WX, Zhang YX. The behavioral, pathological and therapeutic features of the senescence-accelerated mouse prone 8 strain as an Alzheimer's disease animal model[J]. *Ageing Res Rev*, 2014, 13(1): 13-37.
- [13] Gulbrandsen TL, Sparks FT, Sutherland RJ. Interfering with post-learning hippocampal activity does not affect long-term consolidation of a context fear memory outside the hippocampus[J]. *Behav Brain Res*, 2013, 240(2): 103-109.
- [14] Simic G, Kostovic I, Windblad B, et al. Volume and number of neurons of the human hippocampal formation in normal aging and Alzheimer's disease [J]. *J Comp Neurol*, 1997, 379(4): 482-494.
- [15] West MJ, Coleman PD, Flood DG, et al. Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease[J]. *Lancet*, 1994, 344(8925): 769-772.
- [16] Davis P, Maloney AJ. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease[J]. *Lancet*, 1976, 2(8000): 1403.
- [17] Spriger JE, Tayrien MW, Lay R. Regional analysis of age-related changes in the cholinergic system of the hippocampal formation and basal forebrain of the rat[J]. *Brain Res*, 1987, 407(1): 180-184.
- [18] Ransome MI, Hannan AJ. Behavioural state differentially engages septohippocampal cholinergic and GABAergic neurons in R6/1 Huntington's disease mice [J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2012, 97(2): 261-270.
- [19] Ramírez RG, Vega RNM, Oikawa SJ, et al. Melatonin synergizes with citalopram to induce antidepressant-like behavior and to promote hippocampal neurogenesis in adult mice[J]. *J Pineal Res*, 2014, 56(4): 450-461.
- [20] Liu J, Somera-Molina KC, Hudson RL, et al. Melatonin potentiates running wheel-induced neurogenesis in the dentate gyrus of adult C3H/HeN mice hippocampus [J]. *J Pineal Res*, 2013, 54(2): 222-231.
- [21] Kireev RA, Vara E, Tresguerres JA. Growth hormone and melatonin prevent age-related alteration in apoptosis processes in the dentate gyrus of male rats [J]. *Biogerontology*, 2013, 14(4): 431-442.
- [22] Corrales A, Martínez P, García S, et al. Long-term oral administration of melatonin improves spatial learning and memory and protects against cholinergic degeneration in middle-aged Ts65Dn mice, a model of Down syndrome [J]. *J Pineal Res*, 2013, 54(3): 346-358.

(编辑 刘清海)