

多烯磷脂酰胆碱对 β -淀粉样蛋白(A β 1-40)致阿尔茨海默病模型大鼠的治疗作用

张晓辉¹ 刘娟芳² 邓艳春^{2△} 刘立^{1△}

(1 第四军医大学航空航天医学院航空航天临床医学教研室 陕西 西安 710032 ;

2 第四军医大学西京医院神经内科 陕西 西安 710032)

摘要 目的 研究多烯磷脂酰胆碱(Polyene Phosphatidyl choline, PPC)对 β -淀粉样蛋白(A β 1-40)致阿尔茨海默病(Alzheimer's Disease, AD)模型大鼠的治疗作用。方法 32只SD大鼠随机分为正常组、假手术组、模型组和处理组,海马内注射淀粉样蛋白(A β 1-40),制作大鼠阿尔茨海默病模型,处理组给予多烯磷脂酰胆碱。通过 Morris 水迷宫实验检测各组大鼠认知行为学改变,海马组织学及免疫组化染色,观察多烯磷脂酰胆碱对阿尔茨海默病模型大鼠的影响,并进行统计学分析。结果 ①Morris 水迷宫实验 模型组与正常组、假手术组比较,学习和记忆潜伏期显著增加,处理组与模型组比较,学习和记忆潜伏期显著减少,组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$),提示多烯磷脂酰胆碱使 AD 模型大鼠的认知行为学功能改善。②Nissl 染色 模型组与正常对照组、假手术组组织学染色结果有显著性差异($P < 0.05$),PPC 处理组与模型组比较有显著性差异($P < 0.05$),PPC 处理组与正常组及假手术组比较也呈现出显著性差异($P < 0.05$),提示多烯磷脂酰胆碱可以减少神经元的凋亡。③ β -淀粉样蛋白免疫组化染色 模型组与正常对照组、假手术组比较, A β 沉积明显增加,PPC 处理组与模型组比较, A β 沉积范围明显缩小,PPC 处理组与正常对照组、假手术组也呈现出显著性差异。结论 多烯磷脂酰胆碱对淀粉样蛋白(A β 1-40)致阿尔茨海默病模型大鼠有治疗作用。

关键词 多烯磷脂酰胆碱 β -淀粉样蛋白 A β 1-40 阿尔茨海默病 Morris 水迷宫

中图分类号 Q95-3 R741.05 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2011)13-2438-05

Polyene Phosphatidyl Choline for Alzheimer's Disease Model Rats Induced by β -Amyloid Protein(1-40)

ZHANG Xiao-hui¹, LIU Juan-fang², DENG Yan-chun^{2△}, LIU Li^{1△}

(1 Department of Aerospace Clinical Medicine, School of Aerospace Medicine, Forth Military Medical University, 710032, Xi'an, China;

2 Department of Neurology, XiJing Hospital, Fourth Military Medical University, 710032, Xi'an, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the therapeutical effects of Polyene Phosphatidyl Choline(PPC) on β -amyloid(1-40) induced Alzheimer's Disease model Rat. **Methods:** Thirty-two Sprague-Dawley rats were divided into four groups: normal control group, sham control group, model group and PPC treatment group. β -Amyloid protein was infused into the hippocampal fissure of rats to produce Alzheimer's Disease (AD) model and the treatment group rats were given PPC. Morris water maze was detected to evaluate the cognition behavior of learning and memory. The histological and immunohistochemistry staining were used to observe the hippocampus changes caused by PPC treatment in the AD model rats. **Results:** ①Compared that in the normal control group and sham control group, learning and memory latency of the model group was prolonged significantly ($P < 0.05$); As it to PPC treatment group, compared with Model group, learning and memory latency was significantly shortened ($P < 0.05$); The differences between groups were statistically significant ($P < 0.05$). ②Nissl staining: compared the model group with the normal control group, sham control group, the results were significantly differences ($P < 0.05$); compared the PPC treatment group with the model group, the result was significantly different ($P < 0.05$); comparing the treatment group with the normal control group and the sham control group, the results also show significant difference ($P < 0.05$). ③A β immunohistochemical staining: Compared with normal control group and sham control group, the model group show obvious increasing amount of β -amyloid deposits; Compared with model group, the PPC treatment group indicate significant decreasing of the number of β -amyloid deposits. **Conclusion:** Polyene phosphatidyl Choline had therapeutical effects on Alzheimer's Disease model rats induced by β -amyloid protein (1-40).

Key words: Alzheimer's disease; Polyene phosphatidyl choline; β -amyloid; A β 1-40; Morris water maze

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3 R741.05 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)13-2438-05

作者简介 张晓辉(1983-) 男, 硕士研究生, 研究方向: 认知障碍的基础和临床研究,

电话: 13720588944, E-mail: zhxh1983@fmmu.edu.cn

△通讯作者 邓艳春, E-mail: yanchundeng@yahoo.com; 刘立, E-mail: jiliu@fmmu.edu.cn

(收稿日期 2011-03-11 接受日期 2011-04-06)

前言

随着人口的老龄化进程,阿尔茨海默病(Alzheimer's Disease, AD)成为越来越受到人类关注的健康问题。在 2001 年,世界上已经有 2400 万痴呆患者,而这个数字随诊人类对期望寿命的干预,将会以 20 年翻一番的速度继续发展,到 2040 年将达到 8100 万^[1]。AD 的发病机制复杂,目前确切机制不清。Alzheimer 病临床主要表现为:在整个病程中呈现进行性的认知功能下降伴日常生活能力缺损及进行性的行为障碍^[2]。目前临床上缺乏有效的治疗方法。多烯磷脂酰胆碱是目前临床上常用的肝病辅助治疗药物,它是在卵磷脂的甘油三酯骨架上不饱和脂肪酸键含有二十二碳六烯酸(DHA)和花生四烯酸(AA)的磷脂酰胆碱。研究表明 DHA 对于 $A\beta$ 毒性及 Tau 蛋白的磷酸化都有保护作用^[3];AA 对于衰老大鼠海马神经元的细胞膜的流动性具有保护作用^[4],且有利于增加神经突触的可塑性^[5]。因此,本实验制备了 AD 大鼠模型,应用多烯磷脂酰胆碱进行治疗,并观察多烯磷脂酰胆碱对于 AD 模型大鼠的认知行为学、形态学的影响,评价其治疗作用。为探讨多烯磷脂酰胆碱对于 AD 的治疗作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物和仪器试剂

实验使用健康清洁级雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 32 只,体重约 200-250g,由第四军医大学实验动物中心提供,饲养于(12-12)h 光暗环境,自由饮水,给予标准饮食。 β 淀粉样蛋白 $A\beta$ 1-40 由 Sigma 公司提供,焦油紫(Crystal Violet)由 Sigma 公司提供,抗 $A\beta$ 抗体由 Sigma 公司提供,DAB 试剂由 Sigma 公司提供,其他常规试剂由分析纯公司提供。微量注射器 $5\mu\text{L}$,Morris 水迷宫(第四军医大学预防医学系研制),大鼠脑立体定向仪(SN3 型,日本),倒置显微镜及图像采集系统(Nikon 公司)。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 实验分组 32 只 SD 大鼠随机等分为正常对照组、假手术组、模型组和处理组。其中后三组进行立体定向术,假手术组双侧海马灌注生理盐水各 $5\mu\text{L}$,模型组和处理组双侧海马注射 $A\beta$ (1-40) $5\mu\text{L}$ (10 μg)。

1.2.2 阿尔茨海默病大鼠模型的制备 将淀粉样蛋白 $A\beta$ 1-40 (Sigma MO, USA)溶于生理盐水,浓度为 $2\mu\text{g}/\mu\text{L}$,使用前于 37°C 恒温箱中孵育一周使 $A\beta$ 1-40 转化为聚集态^[6]。按照大鼠脑立体定向方法^[7],以 10%水合氯醛(3.5 mL/100 g)麻醉,将麻醉大鼠固定于立体定位仪上,调节固定平面使门齿比内耳连线中点低 2 mm,清洁头顶皮肤做正中竖切口,剥开皮下筋膜暴露顶骨,在两侧冠状缝后钻出小孔,取出碎骨屑,保持硬脑膜的完整。海马区定位坐标:前囟后 3.3 mm,中线外侧 2.1 mm,硬脑膜下 2.8 mm。每侧用微量注射器分别注入 $5\mu\text{L}$ (10 μg) 聚集肽的 $A\beta$ 1-40,5 min 内注完,注射后留针 5 min,以免拔针时药物溢出并使药物充分弥散。正常对照组不进行手术,假手术组手术方法相同,注射同体积的生理盐水。术后牙托粉封固颅骨孔,缝合皮肤,3 d 内每日肌注青霉素 G10 万单位抗感染。

1.2.3 术后药物干预 三日后开始给予正常对照组、假手术组、模型组灌胃给予生理盐水 0.5 mL/100 g,PPC 处理组灌胃给多

烯磷脂酰胆碱 100 mg/kg,连续给药 7 天后进行水迷宫实验,实验期间继续给药。

1.2.4 Morris 水迷宫实验 各组大鼠在模型建立后第 8 天开始进行水迷宫测试。水迷宫由圆形水桶及圆形平台构成,圆形水池直径 100 cm,高 60 cm,圆形平台直径为 9 cm,藏匿于水面下 2 cm,站台平面距水面 2 cm,水池内部不得有任何标志,向水中加入适量墨汁,使水成为不透明黑色,使大鼠不能通过视觉辨识池内有无平台。站台固定于一个象限的中间,距池壁约 15 cm,室内光线良好,实验室温度 $23\sim 25^\circ\text{C}$ 。实验环境要求相对固定的迷宫外视觉线索:进入摄像头视野的背景环境为黑色,大鼠的头部为白色。监视场内无灰度值和类似标记灰度值的参考点。水迷宫实验持续 7 天。前 6 天,在 1、2、3、4 象限四个不同的入水点,测定大鼠到达平台的时间(潜伏期),四个象限的平局值作为大鼠在该时段的成绩。第 7 天撤掉平台,测定各组大鼠在 1 min 内,在平台象限内的逗留时间、在平台区象限内的游程占总游程的百分比。

1.2.5 组织制备 连续给药并完成 Morris 水迷宫实验后,以 10%水合氯醛(3.5 mL/100 g)麻醉,经升主动脉插管,含 0.37%硫化钠的生理盐水 150 mL 冲洗后灌注 4%多聚甲醛 400 mL,取脑,后浸入 4%多聚甲醛,后固定(4~6)h。置于 30%蔗糖溶液至沉底,冰冻切片机冠状位连续切片,片厚 25 μm 。每只大鼠隔 6 张脑片取一张组成一套,每套切片约 8-10 张,共 6 套切片。切片置于 24 孔板内的冻存液(30%甘油 PBS 溶液)中, -20°C 冰箱保存备用。

1.2.6 形态学染色 ①尼氏染色:切片置于载玻片上,玻片入二甲苯 2 次各 10 分钟,无水酒精 2 分钟,95%酒精、70%酒精各 2 分钟,蒸馏水洗片刻,0.1%焦油紫染液 37°C 温箱中染色 10 分钟,蒸馏水洗,95%酒精分色,常规脱水、透明、封片。② $A\beta$ 免疫组化染色:切片入 0.01 mol/L 磷酸钾盐缓冲液(PBS pH 7.4)漂洗 30 分钟,入 80%甲醇双氧水 10 分钟,入 0.01 mol/L PBS 浸泡 30 分钟,浸入多克隆兔抗 $A\beta$ 抗体(1:1000, Sigma 公司)血清稀释液中室温孵育过夜,生物素标记二抗室温孵育 2 h,生物素-卵白素-HRP 复合物室温孵育 2 h,DAB 显色,脱水、透明、树胶封片。

1.2.7 图像分析 正常对照组及其余各组含针道及灌注区的切片中随机选 5 张进行形态学观察,图像分析系统(Image Pro Plus 6.0)计算出指定海马损伤区平均尼氏体数目。

1.3 统计学分析

Morris 水迷宫测试的结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,潜伏期统计方法采用双因素重复测量的方差分析(two-way, ANOVA),游程统计方法采用采用方差分析(one-way, ANOVA),进行各组描述性统计及组间显差异显著性分析。海马 $A\beta$ 损伤区尼氏体定量统计方法采用方差分析(one-way ANOVA)。SPSS 18.0 软件进行统计分析, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Morris 水迷宫实验

对于 Morris 水迷宫学习和记忆能力被用来评价 $A\beta$ (1-40)灌注模型大鼠的空间记忆能力。

①定位航行实验(记忆训练测试):记忆训练期第 6 天典型

的游泳路线(图 1 A(a,b,c,d)) ,以及量化的逃避潜伏期(图 1 B) ,显示出 :与正常对照组比较 ,模型组大鼠第 2 天至第 6 天到达平台的潜伏期明显延长 ($P<0.05$)。多烯磷脂酰胆碱处理组与模型组比较 ,第 2 天至第 6 天到达平台的潜伏期明显缩短 (two-way ANOVA $P<0.05$) ;与正常对照组、假手术组比较 ,潜伏期无显著性变化($P>0.05$)。与模型组比较 ,多烯磷脂酰胆碱处理组大鼠第 1 天至第 6 天到达平台的潜伏期有缩短的趋势 ,但无统计学意义。图 1 C 为水迷宫实验第 6 天各组大鼠逃避潜伏期 ,统计结果提示 PPC 处理明显缩短了由于 $A\beta$ 灌注所导致的逃避潜伏期的延长(one-way ANOVA , $P<0.05$)。与正常对照组、假手术组比较 ,PPC 处理组的逃避潜伏期无明显延长 ($P>0.05$)。

②空间探索实验 (记忆保留测试) :通过对在曾经放置平台的象限内游泳时间和游程分析来评价各组大鼠的空间探索能力。图 1 A(e,f,g,h)中数据展示了各组大鼠的游泳路线 ,提示正常对照组、假手术组和 PPC 处理组大鼠在目标象限内的游程长于 $A\beta$ 模型组。图 1 D 中的数据显示正常对照组、假手术组和 PPC 处理组大鼠在目标象限内的游泳时间和游程都明显长于 $A\beta$ 模型组(one-way ANOVA $P<0.05$)。

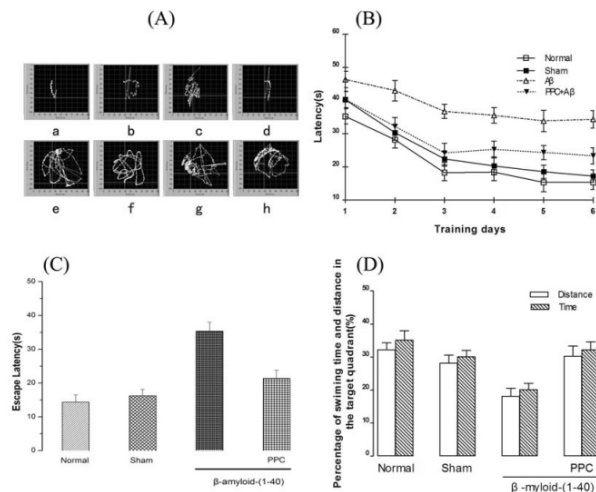


图 1 多烯磷脂酰胆碱对于 $A\beta$ 灌注 AD 模型大鼠的行为学改变的影响 :

A :典型的大鼠水迷宫游泳路线图 a b c d 为学习实验期第 6 天的游泳表现 e f g h 为第 7 天空间探索实验中的游泳路线 a 和 e :正常对照组 b 和 f :假手术组 c 和 g :模型组 d 和 h :PPC 处理组。B 大鼠从水中到平台的平均逃避潜伏期。每只大鼠每天进行两次训练 ,连续 6 天。数据用均数 $\pm$ 标准误来描述。模型组与正常对照组比较 $P<0.05$ 。PPC 处理组与模型组比较 $P<0.05$;与正常对照组及假手术组比较 , $P>0.05$ 。C :第 6 天大鼠从水中到平台的平均逃避潜伏期。数据用均数 $\pm$ 标准误来描述。PPC 处理组与模型组比较 ($P<0.05$)。与正常对照组和假手术组比较 ,PPC 处理组的逃避潜伏期无明显延长($P>0.05$, $P>0.05$)。D 空间探索实验中 ,在目标象限内游泳时间和游程。数据用均数 $\pm$ 标准误描述。模型组与正常对照组、假手术组比较 $P<0.05$; PPC 处理组与模型组比较 $P<0.05$ 。

Fig. 1 Effects of Polyene Phosphatidyl Choline on behavioral alteration in β -amyloid infusion AD model rats:

A: The typical swimming-tracking path in Morris water maze; a, b, c, and d are the performance on the sixth training day; e, f, g and h are the performance of probe trial on the seventh training day; a and e: normal

control; b and f: sham control; c and g: β -amyloid protein-(1 40) ($A\beta$) -treated model rats; d and f: rats treated with Polyene Phosphatidyl Choline (PPC). B: Mean latencies to escape from the water onto the hidden platform. Each rat was subjected to two trials per day for 6 consecutive days. Data represent Means $\pm$ S.E.M, model group vs. vehicle-treated group, $P<0.05$; PPC treatment group vs. $A\beta$ model group, $P<0.05$; PPC treatment group vs. normal control group and Sham control group, $P>0.05$ and $P>0.05$. C: Mean latencies to escape from the water onto the hidden platform in sixth training day. Data expressed as means $\pm$ S.E.M. indicated by vertical bar. PPC treatment group vs. $A\beta$ model group, $P<0.05$; PPC treatment group vs. normal control group and sham control group, $P>0.05$, $P>0.05$. D: The time spent and swum distance in the target quadrant (in which the platform had been placed during the training phase) in the probe trial (swimming 60 s without platform). Data expressed as means $\pm$ S.E.M. indicated by vertical bar. $A\beta$ model group vs. normal control group and sham control group, $P<0.05$; PPC treatment group vs. $A\beta$ model group, $P<0.05$.

2.2 尼氏(Nissl)染色形态学变化结果

各处理组 Nissl 染色情况见图 2。与正常对照组比较 ,假手术组于 $A\beta$ 灌注部位尼氏体数量有少量增加 ;与正常对照组、假手术组比较 ,模型组针道处及灌注部位均显示有明显的尼氏体数量增加 ,并有明显的神经元缺失 ,PPC 处理组与模型组比较 ,针道处及灌注部位尼氏体的数量明显减少 ,神经元缺失数量明显减少。在针道处及灌注区附近选定相同区域($0.01mm^2$) ,各组中各只大鼠图片中均选出 4 块区域计数尼氏体的数量 ,而后平均得出每只大鼠损伤区的尼氏体数量。对各组选定区域尼氏体数量进行统计分析 ,如图 3 所示 :与正常对照组、假手术组比较 ,模型组针道处及灌注部位均显示尼氏体数量明显增加 (one-way ANOVA $P<0.05$) ;与模型组比较 ,PPC 处理组针道处及灌注部位尼氏体的数量明显减少($P<0.05$) ;与正常对照组比较 ,PPC 处理组的尼氏体数量仍有显著性增加($P<0.05$)。

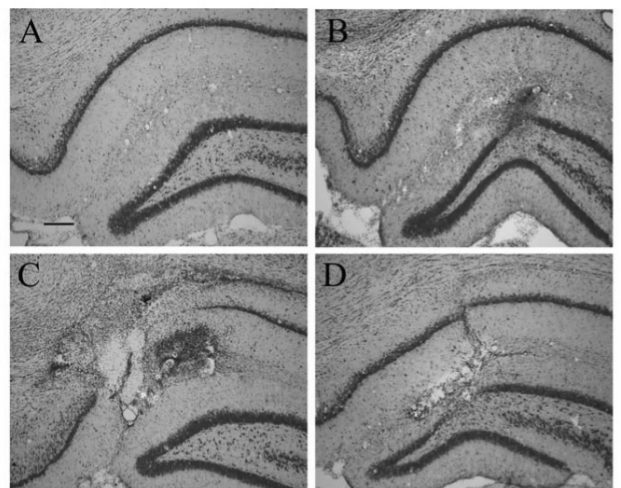


图 2 多烯磷脂酰胆碱对 $A\beta(1-40)$ 灌注 AD 模型大鼠形态学改变的影响 (尼氏染色) :

A :正常对照组 B :假手术组 C : $A\beta$ 模型组 D :PPC 处理组。CA1 海马 CA1 区。与正常对照组比较 ,假手术组于 $A\beta$ 灌注部位尼氏体数量有少量增加 ;与正常对照组、假手术组比较 ,模型组针道处及灌注部位均显示有明显的尼氏体数量增加 ,海马 CA1 区有明显的神经元坏死和缺失 ,PPC 处理组与模型组比较 ,针道处及灌注部位尼氏体的数量明显减少 ,神经元缺失数量减少。

Fig. 2 Effects of Polyene Phosphatidyl Choline on morphologic alteration in A β (1-40) infusion model rats (Nissl staining)($\times 50$)
A: normal control group; B: sham control group; C: A β model group; D: PPC treatment group. CA1: CA1 region of hippocampus. Compared with normal control group and sham control group, the A β model group show obvious increasing amount of Nissl body in target area of needle penetration and infusion; the neuronal death and loss were especially obvious in the CA1 region of hippocampus. Compared with A β model group, the PPC treatment group indicate significant decreasing of the number of Nissl body in the same area, and amount of neuronal death and loss were markedly reduced. Scale bar: 100 μ m

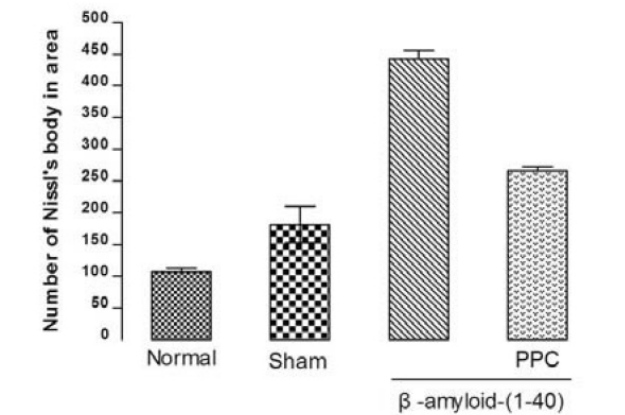


图3 多烯磷脂酰胆碱处理后 A β 损伤目标区域尼氏体定量分析：与正常对照组、假手术组比较，模型组针道处及灌注部位均显示尼氏体数量明显增加(one-way ANOVA $P<0.05$)；与模型组比较，PPC 处理组针道处及灌注部位尼氏体的数量明显减少($P<0.05$)；与正常对照组比较，PPC 处理组的尼氏体数量仍有显著性增加($P<0.05$)

Fig.3 Quantitative analysis of Nissl body in the target A β (1-40) lesion area after Polyene Phosphatidyl Choline treatment:
Compared with normal control group and sham control group, increasing amount of Nissl body in target area of needle penetration and infusion in the A β model group show significant difference(one-way ANOVA, $P<0.05$); compared with A β model group, the number of Nissl body in the same area in the PPC treatment group were remarkably decreased; compared with normal control group, the number of Nissl body also indicated significant increase.

2.3 β -淀粉样蛋白免疫组化染色结果

各处理组 A β 沉积免疫组化染色情况见图 4。假手术组与正常对照组比较，针道处两侧有少量的 A β 沉积(图 4 A、B)，模型组与正常组比较，针道处及灌注部位有明显的 A β 沉积，并有较多的神经元坏死和缺失(图 4 C)，PPC 处理组与正常对照组、假手术组比较，针道处及灌注部位有少量的 A β 沉积，并有少量的组织坏死区(图 4 D)，PPC 处理组与模型组比较，针道处及灌注部位 A β 沉积明显减少，且神经元坏死和缺失区域明显缩小。

3 讨论

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)又称老年痴呆，是一种老年期发病的神经系统退行性疾病。其主要临床表现为进行性认知功能障碍和记忆力衰退。目前认为，AD 是由遗传

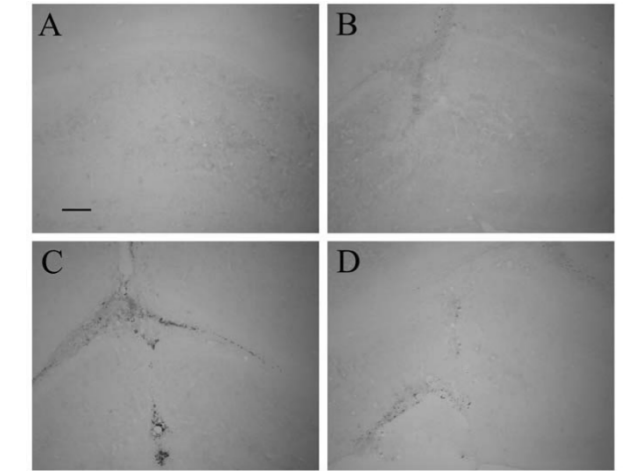


图4 多烯磷脂酰胆碱对 A β (1-40)灌注 AD 模型大鼠淀粉样蛋白沉积形态学改变的影响(抗 A β 免疫组化染色)：假手术组与正常对照组比较，针道处两侧有少量的 A β 沉积，模型组与正常对照组、假手术组比较，针道处及灌注部位有明显的 A β 沉积，并有较多的神经元坏死和缺失，PPC 处理组与正常对照组、假手术组比较，针道处及灌注部位有少量的 A β 沉积，并有少量的组织坏死区，PPC 处理组与模型组比较，针道处及灌注部位 A β 沉积明显减少，且神经元坏死和缺失区域明显减小。

Fig. 4 Effects of Polyene Phosphatidyl Choline on morphologic alteration of amyloid deposits in A β (1-40) infusion model rats (Anti-A β immunohistochemical staining)($\times 50$)
A: normal control group; B: sham control group; C: A β model group; D: PPC treatment group. Compared with normal control group and sham control group, the A β model group show obvious increasing amount of β -amyloid deposits close to the area of needle penetration and infusion; the neuronal death and loss were especially obvious in the same area. Compared with A β model group, the PPC treatment group indicate significant decreasing of the number of β -amyloid deposits in the same area, and amount of neuronal death and loss were remarkably reduced. Scale bar: 100 μ m

学因素、环境因素和代谢因素等多种因素共同作用引起的一种病理过程。基因突变、免疫病理损伤、病毒感染、神经递质和神经内分泌紊乱、代谢障碍、正常衰老等诸多因素都参与该病理过程，并相互影响和促进，形成级联反应，最终导致发病^[8]。AD 其特征性病理变化为大脑皮层萎缩，并伴有 β -淀粉样蛋白(β -amyloid, A β)沉积，神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFT)，大量记忆性神经元数目减少，以及老年斑(senile plaque, SP)的形成^[9]。目前多数学者认为 A β 在脑组织中的积聚和沉积是各种原因诱发 AD 的共同通路，也是 AD 形成和发生的关键因素，A β 诱发的神经细胞损伤是 AD 认知功能障碍的主要原因^[10]。目前用于治疗 AD 的经典药物是胆碱酯酶抑制剂盐酸多奈哌齐，但多奈哌齐有其药理作用的局限性，它仅仅是抑制神经递质乙酰胆碱的分解，根据上述 AD 的病理改变，AD 的治疗还需要营养神经减少神经细胞死亡、补充乙酰胆碱的合成原料、改善循环、抑制 β -淀粉样蛋白沉积和抑制炎症斑块的形成等多个环节的作用，才能更好的治疗该病。
多烯磷脂酰胆碱是在卵磷脂的甘油三酯骨架上不饱和脂肪酸键含有二十二碳六烯酸(DHA)和花生四烯酸(AA)的

磷脂酰胆碱。它的主要代谢产物为胆碱、磷脂、DHA 和 AA。目前的研究表明胆碱可作为 AD 脑内乙酰胆碱的合成底物^[11]；磷脂是构成生物膜的主要成分，形成脂质分子层，可调节并控制与生物膜结合的酶的活性，磷脂的过氧化可以导致 AD 动物模型出现记忆功能损伤^[12]。DHA 在体内及体外条件下对 AD 的病理改变 $A\beta$ 毒性及 Tau 蛋白的磷酸化都有保护作用^[3]；DHA 可以维持细胞膜的稳定剂修复细胞膜的功能^[13]；DHA 对于 NMDA 兴奋性对于神经细胞的毒性作用具有保护作用^[14]。AA 对于衰老大鼠海马神经元的细胞膜的流动性具有保护作用^[4]；且在老年大鼠体内有利于增加突触的可塑性^[5]。由于多烯磷脂酰胆碱还含有多不饱和脂肪酸，不饱和脂肪酸除具有上述作用外，且有利于药物通过血脑屏障，更易于被神经细胞所吸收。

通过本研究显示：①Morris 水迷宫实验中多烯磷脂酰胆碱明显改善 β -淀粉样蛋白所致阿尔茨海默病模型大鼠的学习记忆功能，其作用可能与下列机制有关：多烯磷脂酰胆碱代谢产物可补充乙酰胆碱合成底物，使脑内乙酰胆碱含量升高，脑内补充磷脂稳定细胞膜，减轻 $A\beta$ 对于神经细胞的损伤，DHA 和 AA 的神经保护作用改善脑内神经细胞的功能。从而改善大鼠的学习记忆功能。②组织学染色中多烯磷脂酰胆碱明显减少 β -淀粉样蛋白所致阿尔茨海默病模型大鼠的神经细胞缺失，并显著减少了淀粉样蛋白的沉积，其作用可能为：多烯磷脂酰胆碱代谢产物的神经保护作用，“多烯”基团可以促进脂类代谢，从而阻断 APO-E 介导的 β -淀粉样蛋白沉积^[15,16]。③ $A\beta$ 免疫组化染色显示多烯磷脂酰胆碱明显减少 β -淀粉样蛋白在注射部位的沉积，其作用机制可能为：多烯磷脂酰胆碱改善神经功能，减少损伤，促进了神经细胞对于外源性的 β -淀粉样蛋白的吞噬和代谢降解^[17]。

本实验证实了多烯磷脂酰胆碱从一定程度上减轻了 β -淀粉样蛋白灌注 AD 模型大鼠的行为学及形态学改变，给临床治疗 AD 提供了一定的参考价值。多烯磷脂酰胆碱具体是通过什么途径减轻和逆转 AD 的行为学及病理改变将会是一个很有研究意义的课题，在今后的实验中我们将会从进一步的神经行为学 β -淀粉样蛋白代谢通路、神经元丢失、神经免疫及神经发生等机制等各个方面进一步阐述，以期临床治疗 AD 提供进一步的理论和实验依据。

参考文献(References)

- [1] Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, et al. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study[J]. *Lancet*, 2005,366:2112-2117
- [2] Scarpini E, Scheltens P, Feldman H. Treatment of Alzheimer's disease: current status and new perspectives [J]. *Lancet neurology*, 2003,2: 539-547
- [3] Calon F, Cole G. Neuroprotective action of omega-3 polyunsaturated fatty acids against neurodegenerative diseases: evidence from animal

- studies [J]. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*, 2007,77:287-293
- [4] Fukaya T, Gondaira T, Kashiyae Y, Kotani S, Ishikura Y, Fujikawa S, et al. Arachidonic acid preserves hippocampal neuron membrane fluidity in senescent rats[J]. *Neurobiology of aging*, 2007,28:1179-1186
- [5] Kotani S, Nakazawa H, Tokimasa T, Akimoto K, Kawashima H, Toyoda-Ono Y, et al. Synaptic plasticity preserved with arachidonic acid diet in aged rats[J]. *Neuroscience research*, 2003,46:453-461
- [6] Giovannelli L, Casamenti F, Scali C, Bartolini L, Pepeu G. Differential effects of amyloid peptides beta-(1-40) and beta-(25-35) injections into the rat nucleus basalis[J]. *Neuroscience*, 1995,66:781-792
- [7] Paxinos G, Watson C, Pennisi M, Topple A. Bregma, lambda and the interaural midpoint in stereotaxic surgery with rats of different sex, strain and weight [J]. *Journal of neuroscience methods*, 1985,13: 139-143
- [8] Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease[J]. *The New England journal of medicine* 2010,362:329-344
- [9] Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease[J]. *Lancet*, 2006,368:387-403
- [10] Geula C, Wu CK, Saroff D, Lorenzo A, Yuan M, Yankner BA. Aging renders the brain vulnerable to amyloid beta-protein neurotoxicity[J]. *Nature medicine*, 1998,4:827-831
- [11] Gsell W, Jungkuntz G, Riederer P. Functional neurochemistry of Alzheimer's disease[J]. *Current pharmaceutical design*, 2004,10:265-293
- [12] Maki RA, Tyurin VA, Lyon RC, Hamilton RL, DeKosky ST, Kagan VE, et al. Aberrant expression of myeloperoxidase in astrocytes promotes phospholipid oxidation and memory deficits in a mouse model of Alzheimer disease [J]. *The Journal of biological chemistry*, 2009, 284:3158-3169
- [13] Horrocks LA, Faroquii AA. Docosahexaenoic acid in the diet: its importance in maintenance and restoration of neural membrane function [J]. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*, 2004,70: 361-372
- [14] Hogg E, Nyakas C, Kiliaan A, Farkas T, Penke B, Luiten PG. Neuroprotective effect of developmental docosahexaenoic acid supplement against excitotoxic brain damage in infant rats [J]. *Neuroscience*, 2003,119:999-1012
- [15] Kim J, Basak JM, Holtzman DM. The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease[J]. *Neuron*, 2009,63:287-303
- [16] Vergheze PB, Castellano JM, Holtzman DM. Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders [J]. *Lancet neurology*, 2011,10:241-252
- [17] Saido TC, Iwata N. Metabolism of amyloid beta peptide and pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. *Towards presymptomatic diagnosis, prevention and therapy*[J]. *Neuroscience research*, 2006,54:235-253