论著

文章编号:1000-5404(2011)13-1328-05

运用新的体视学方法定量研究大鼠海马结构神经元和突触数目

师晓燕[1],赵圆宇[1],卢 伟[1],陈 林[1],张 蕾[2,3],姜 蓉[2,3],唐 勇[1] (400016 重庆,重庆医科大学:附属第一医院神经内科[1],组织学与胚胎学教研室[2],干细胞与组织工程研究室[3])

【摘要】 **目的** 建立定量研究海马结构神经元数目和突触数目的无偏体视学方法。**方法** 选择18月龄正常雌性Long-Evans大鼠5只,取一侧大脑半球进行石蜡包埋后切取14 μm厚的冠状连续切片。根据均匀系统随机抽样的原则,在包含海马结构的连续切片中均匀随机地抽取切片。将抽取的一组切片进行神经元的组织化学染色,以计数神经元的数目;将抽取的另外一组切片进行突触的免疫组织化学染色,以计数突触的数目。在体视学设备下,计数大鼠海马结构CA_1和DG的神经元数目和大鼠海马结构CA_1、CA_1放射层(CA_1sr)、齿状回内分子层(DGiml)和齿状回外分子层(DGoml)的突触数目。**结果** 得到大鼠海马结构CA_1和DG的神经元数目分别为[$(3.17\times10^5)\pm(2.23\times10^4)$]和[$(1.70\times10^6)\pm(1.87\times10^5)$]。大鼠海马结构$CA_1$、$CA_1$ CA_1sr、DGiml和DGoml的突触数目分别为[$(1.04\times10^8)\pm(5.39\times10^6)$]、[$(4.36\times10^7)\pm(3.78\times10^6)$]、[$(1.87\times10^7)\pm(1.81\times10^6)$]和[$(4.48\times10^7)\pm(7.29\times10^5)$]。**结论** 本研究建立了定量研究海马结构各区域内神经元数目和突触数目的方法,可为定量研究正常老年及各种神经系统退行性疾病状态下海马结构各区域内神经元数目、突触数目及神经元与突触数目关系的改变提供方法学依据。

【关键词】 海马结构;神经元;突触;大鼠;体视学

【中图法分类号】 R329-33;R322.81 【文献标志码】 A

Quantitative study of neurons and synapses in rat hippocampus by new stereological methods

Shi Xiaoyan[1], Zhao Yuanyu[1], Lu Wei[1], Chen Lin[1], Zhang Lei[2,3], Jiang Rong[2,3], Tang Yong[1] ([1]Department of Neurology, First Affiliated Hospital, [2]Department of Histology and Embryology, [3]Laboratory of Stem Cell and Tissue Engineering, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

【**Abstract**】 **Objective** To establish stereological methods for the quantitative studies of neurons and synapses in the hippocampus. **Methods** After five 18-month female Long-Evans rats were anesthesized, one of the two hemispheres was sampled randomly after fixation with paraformaldehyde perfusion, and then embedded in paraffin blocks. Serial coronal sections in thickness of 14 μm were cut. The sections were uniformly and randomly sampled from the consecutive sections through hippocampus according to the principles of systematic, uniform and random sampling. One series of sections were stained for Nissl substance for the quantification of neuron number, and another series of sections were stained for the quantification of synaptophysin-positive bouton number. The number of neurons in CA_1 and DG and the number of synaptophysin-positive boutons in CA_1, CA_1sr, DGiml, and DGoml were estimated with the unbiased stereological technique, the optical fractionator. **Results** The total number of the neurons in CA_1 and DG was $3.17\times10^5\pm2.23\times10^4$, and $1.70\times10^6\pm1.87\times10^5$, respectively. The total number of the synapses in CA_1, CA_1sr, DGiml, and DGoml was $1.04\times10^8\pm5.39\times10^6$, $4.36\times10^7\pm3.78\times10^6$, $1.87\times10^7\pm1.81\times10^6$, and $4.48\times10^7\pm7.29\times10^5$, respectively. **Conclusion** Our established methods can quantitatively study the neuron and synapse changes during hippocampal formation in normal aging process and in various neurodegenerative diseases.

【**Key words**】 hippocampal formation; neurons; synapses; rat; stereology

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30973155), the Foundation of Doctoral Training Program From Ministry of Education (200806310007), the Key Projects of Chongqing Medical University (XB2D200801) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2009BA5035).
Corresponding author: Tang Yong, Tel: 86-23-68485633, E-mail ytang062@yahoo.com.cn

【基金项目】 国家自然科学基金(30973155);教育部博士培养基金(200806310007);重庆医科大学重点项目(XB2D200801);重庆市自然科学基金(CSTC2009BA5035)
【通信作者】 唐 勇,电话:(023)68485633,E-mail ytang062@yahoo.com.cn

海马结构是与记忆功能相关的重要脑区,多年来一直是神经科学研究的焦点[1]。海马结构的形态和功能存在衰老相关的改变[2-3],而海马结构形态和功能的改变是导致老年空间学习能力的下降的重要原因之一[4-5]。海马结构的老年改变的研究包括海马结构内神经元数目[6-8]以及神经纤维[9-10]的变化等。目前对海马结构内突触的研究多以定性和半定量研究为主[11-12],这些方法不能精确地定量研究海马结构内神经元和突触数目的变化。本研究以新的体视学方法原理为基础,将免疫组织化学技术、组织化学技术和新的体视学方法相结合,以建立定量研究大鼠海马结构内神经元数目与突触数目的体视学方法,为定量研究正常老年及各种神经系统退行性疾病状态下海马结构内神经元数目和突触数目的改变提供方法学依据。

1 材料与方法

1.1 动物标本与切片准备

18月龄Long-Evans雌性大鼠5只(第三军医大学实验动物中心提供)。采用40 g/L水合氯醛(10 ml/kg)腹腔麻醉大鼠后,将其四肢固定于解剖盘中,在剑突下打开腹腔,穿过横膈,游离胸腔中的心脏组织。从左心室插入灌流针并固定,剪开右心耳,使用DHL-23型恒流泵从心脏灌注生理盐水80 ml以清除血液,然后用4 %的多聚甲醛(0.1 PBS,pH=7.4)经心脏灌注200 ml以固定脑组织。灌流固定完成后取出大脑,随机抽取一侧大脑半球,置于4 %多聚甲醛固定液中后固定6 h。依次进入梯度酒精脱水,置入70 %酒精1 h、置入83%酒精1 h、置入96 %酒精1 h、置入100 %酒精10 min。经过二甲苯透明后,将组织块置于石蜡中包埋2 h。将石蜡包埋的大脑半球从头侧至尾侧依次切取14 μm厚的连续冠状切片,在含有海马结构的所有连续切片中,每10张切片抽取1张,第1张在1~10的数字中随机选取,那么切片抽样分数即为1/10[13],每只动物的海马结构平均抽取了17张切片。然后,所有已抽取的切片的后一张切片也被抽取出来。这样,每只大鼠的海马结构均匀系统随机地抽取了2套连续切片。

1.2 免疫组织化学染色

将抽取的第一套石蜡切片作突触的免疫组织化学染色。置入二甲苯中脱蜡40 min,然后依次经过100%酒精、95%酒精、80%酒精、70%酒精和蒸馏水。然后将准备好的组织切片置于0.01 PBS缓冲液中浸泡3次,每次5 min。将切片浸入枸橼酸盐溶液(pH=6.0),入微波炉高温修复抗原10 min,自然冷至室温。取出切片,用0.01 PBS缓冲液冲洗。将切片浸入0.1% Triton X-100 (Sigma, USA)中1 h;置切片于0.3% H_2O_2溶液中10 min以消除内源性过氧化物酶活性。0.01 PBS (pH=7.4)洗涤;滴加正常山羊血清,37 ℃封闭1 h;滴加抗突触素的小鼠单克隆抗体(1∶600, Millipore, USA),4 ℃孵育48 h,0.01 PBS (pH=7.4)洗涤;滴加生物素标记的羊抗小鼠IgG(1∶200, ZYMED, USA),37 ℃孵育1 h,0.01 PBS (pH=7.4)洗涤。滴加辣根酶标记的链霉卵白素工作液(ZYMED, USA),37 ℃孵育1 h,0.01 PBS (pH=7.4)洗涤。最后,在室温下DAB(ZLI-9032, ZSGB;Beijing, China)显色5 min。切片依次经过梯度酒精脱水、蒸馏水、70%酒精、80%酒精、95%酒精和100%酒精,二甲苯透明20 min后,中性树脂封片。同时另取相邻切片用正常羊血清替代一抗作空白对照实验。

1.3 组织化学染色

将抽取的另外一套连续切片作尼氏染色,以定量研究神经元。配置0.01 %的甲苯胺蓝溶液,放入57 ℃烤箱中加热备用。切片浸入57 ℃的0.01 %甲苯胺蓝溶液中染色5 min;自来水终止染色;进入双蒸水洗涤3次;95 %酒精分色1 min;入无水酒精脱水5 min;二甲苯透明30 min;中性树胶封片。

1.4 体视学分析

1.4.1 体视学设备 体视学设备包括一台显微镜(Olympus),显微镜上装置有能够控制镜下的视野在X轴和Y轴精确移动的控制器、连接到电脑显示器的摄像仪、能够精确测量聚焦深度的指针测微器(Heidenhain, USA)和一个能够完成精确计数的×100物镜(N.A.1.40)。

1.4.2 画出测量区域边界,测量切片厚度 使用体视学分析系统(NewCAST, Olympus, Glostrup, Denmark)观察突触免疫组织化学染色的切片。在4倍镜下,依照大鼠解剖图谱画出所要测量的海马结构各亚区的边界。在切片上随机选取30个位置(每张切片1~3个位置)测量切片的厚度(T),即切片上表面与下表面之间的距离。当切片第一次清晰聚焦时即为切片上表面,设为0 μm,调节显微镜的焦距,当切片最后一次清晰聚焦时即为切片的下表面,此时显示的刻度即为切片的厚度。

1.4.2 设置参数 在1 000倍油镜(Olympus;数值孔径=1.40)下,画出的测量区域内,进行待测粒子数目的体视学测量。组织图像的最后显微放大倍数为2 000倍。

在尼氏染色的组织图像上叠加测试框,CA_1区的测试框面积设定为260 μm^2,每个视野测试框在x轴和y轴上移动的距离分别设定为150 μm和87 μm;DG区的测试框面积设定为133 μm^2,每个视野测试框在x轴和y轴上移动的距离分别设为160 μm和208 μm。那么CA_1区计数神经元的面积抽样分数(asf)为260/(157×87)=0.02,DG计数神经元的面积抽样分数(asf)为133/(160×208)=0.004。

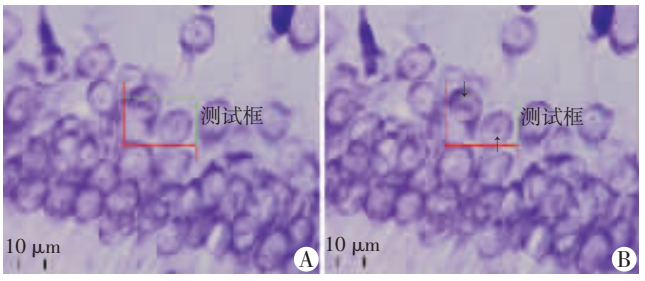
在免疫组织化学染色的组织图像上叠加测试框,CA_1、CA_1sr、DGiml和DGoml区测试框的面积均设定为12 μm^2,在CA_1区,每个视野测试框在x轴和y轴上移动的距离分别设为126 μm和189 μm;在DG,每个视野测试框在x轴和y轴上移动的距离分别设定为141 μm和106 μm。那么CA_1区计数突触的面积抽样分数(asf)为12/(126×189)=0.000 5,DG区计数突触的面积抽样分数(asf)为12/(1415×106)=0.000 8[14]。在每一个抽取的视野中,通过体视学软件系统设置扫描进入组织的高度,即光学体视框的高度(H)。因此,在Z轴方向上组织的厚度抽样分数为:hsf = H/T。

1.4.3 神经元数目的计算 根据以上的测量数据和设置参数,在每个测试框内,依照光学体视框的计数原则计数神经元的数目(图1)。无偏计数框的计数原则:当核仁第一次清晰地聚焦,且完全落在无偏计数框内或只与虚线(上线和右线)相交,而不与实线(左线及其延长线,下线,右线延长线)相交时,

就被计数。运用光学分合法，按照公式计算海马结构亚区神经元的总数目[14]：

$$N(total) = \sum Q^{-} \times 1/ssf \times 1/asf \times 1/tsf$$

$\sum Q^{-}$代表此亚区运用光学体视框最后计数的神经元总数；ssf 为切片抽样分数；asf 为此亚区神经元的面积抽样分数；tsf 为此亚区神经元的厚度抽样分数(H/T)；T 为尼氏染色切片的平均厚度(μm)；H 为光学体视框的高度(μm)。



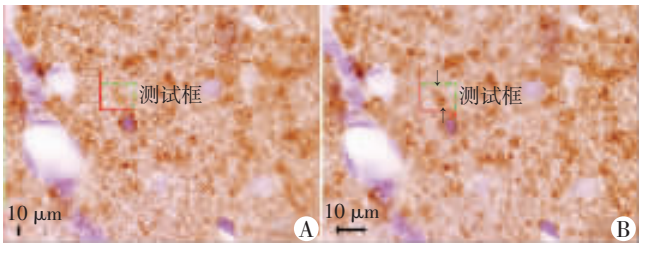
A 2.1 μm 位置；B 3.1 μm 位置；↑：示被计数的神经元

图 1 海马结构的尼氏染色切片 CA_1 区神经元数目的计数

1.4.4 突触数目的计算 根据以上的测量数据和设置参数，在每个测试框内，依照光学体视框的计数原则计数突触的数目(图 2)。运用光学分合法，按照公式计算突触的总数目[14]：

$$N(total) = \sum Q^{-} \times 1/ssf \times 1/asf \times 1/tsf$$

$\sum Q^{-}$代表此亚区运用光学体视框最后计数的突触总数；ssf 为切片抽样分数；asf 为此亚区突触的面积抽样分数；tsf 为此亚区突触的厚度抽样分数(H/T)；T 为免疫组织化学染色切片的平均厚度(μm)；H 为光学体视框的高度(μm)。



A 2.1 μm 位置；B 2.7 μm 位置；↑：示被计数的突触

图 2 海马结构的免疫组织化学染色(S-P)切片 DGiml 区突触数目的计数

2 结果

2.1 神经元细胞形态

突触素免疫阳性染色呈棕黄色颗粒状或点状沉积，呈现明显的免疫板层分布，CA_1 区以多形层和辐射层染色最深，腔隙层和分子层染色次之，椎体细胞层不显色；齿状回内分子层染色最深，外分子层染色次之，颗粒细胞层不显色。在 1 000 倍油镜下观察组织化学染色的切片，可见神经元内蓝紫色的核膜、深色的核仁及胞质中斑块状的尼氏体。由于神经元与神经胶质细胞的形态特点较易区别，切片上超过 99% 的尼氏染色显示的神经元可以被清晰地辨认。

2.2 海马结构 CA_1 和 DG 区内神经元数目

18 月龄雌性大鼠海马结构 CA_1 区的神经元数目为[$(3.17 \times 10^5) \pm (2.23 \times 10^4)$]；DG 区的神经元数目为[$(1.70 \times 10^6) \pm (1.87 \times 10^5)$]。

2.3 海马结构 CA_1、CA_1sr、DGiml 和 DGoml 内突触数目

18 月龄雌性大鼠海马结构 CA_1 的突触数目为[$(1.04 \times 10^8) \pm (5.39 \times 10^6)$]；$CA_1$ srd 的突触数目为[$(4.36 \times 10^7) \pm (3.78 \times 10^6)$]；DGiml 的突触数目为[$(1.87 \times 10^7) \pm (1.81 \times 10^6)$]；DGoml 的突触数目为[$(4.48 \times 10^7) \pm (7.29 \times 10^5)$]。

3 讨论

过去的研究一直认为海马结构神经元的减少是大脑衰老的标志[8,15]。自 1984 年新的体视学发展以来[16-17]，运用新的体视学研究发现老年海马并不存在神经元数目的显著性减少，并与老年认知功能的下降不相关[7,18-19]。新的体视学方法已成为现代神经科学研究的重要工具。我们把组织化学方法、免疫组织化学方法和新的体视学方法结合起来，建立了定量研究海马结构神经元数目和突触数目的体视学方法，并运用该方法观察了 5 只大鼠海马结构 CA_1 和 DG 的神经元数目，以及 CA_1、CA_1sr、DGiml 及 DGoml 的突触数目，为以后对正常老年和各种神经系统退行性疾病状态下海马结构神经元数目和突触数目改变的相关研究提供了非常有用的研究手段。突触素是一种相对分子质量为 38×10^3 的钙结合糖蛋白，特异性位于轴突终末端的突触前囊泡膜上，是一种重要的囊泡膜标志蛋白[20-21]。突触素免疫反应性的增加常被用作突触前终扣增加的标志[22-24]。电子显微镜是用于研究突触的各种参数的传统方法，虽然电子显微镜下超微结构的研究的确是观察突触超微结构的唯一有效方法[25]，但是使用电子显微镜进行突触的定量研究是十分昂贵的。我们使用突触素单克隆抗体对突触素进行免疫组化染色，在光镜下观察突触素免疫阳性小结的数目，在很大程度上反映了突触数目的变化，也是国际上常用的研究方法。但是，我们必须承认突触素免疫阳性小结数目不等于电镜下获得的突触数目。

在本实验中，我们采用光学分合法对海马结构内神经元数目和突触数目进行分析。光学分合法就是分合法与光学体视框结合在一起的一种研究器官内待测粒子数目的体视学方法；光学体视框利用高数值孔径的油镜(NA = 1.40)在厚切片内不断聚焦，然后运用体视框原理进行粒子的抽取和计数，分合法则首先运用均匀随机抽样，然后通过抽样所得样本中计数的粒子数和均匀随机抽样分数最终得到粒子总数。在方法学上，本研究所描述的研究方法比之于与以往的相关研究具有以下优势。

3.1 均匀系统随机抽样

之前研究者对海马结构突触的观察仅选择了自己

感兴趣的区域或形态较为标准的剖面进行研究[26]，然而在这些理想区域内进行的研究所得到的结论仅能代表该理想区域所发生的改变，并不能说明海马结构内某一区域或整个海马结构的改变情况。本方法严格遵循均匀系统随机抽样原则，通过均匀系统随机抽样保证所研究的整个研究区域的各个部分有均等的机会被抽取。我们在包含海马结构的连续切片中，每 10 张切片抽取 1 张，第 1 张在 1 ~ 10 之间随机选取；1 000 倍油镜下，在随机抽取的切片上系统随机地抽取视野，第 1 个视野的位置随机选择，然后视野在 X 轴、Y 轴方向每次以同样的距离随机移动，等距随机选取测量的视野。随机抽样保证整个研究区域的各个部分有均等的机会被抽取，是本实验能够得到海马结构内神经元数目和突触数目无偏测量结果的重要保障。

3.2 计算总量而非密度值

以往一些在电镜下的研究，基于二维切片的观察获得海马结构内突触的密度信息，并以密度值来反映总量[27]。但密度值不能提供总量的信息，它们仅仅表示参照空间与所研究参数的总量是否平行改变。密度的改变不仅可以来源于总量的改变，还可以是体积的变化的结果；密度的增加可以源于参照空间体积的皱缩，而研究对象的总数则下降或并无变化；所以密度资料可能误导结果，根据密度值很难得出准确的生物学结论。在本研究中，我们运用光学分合法计算出海马结构各亚区神经元和突触的总数，由三维定量方法得到的结果真实地反映了海马结构内神经元和突触的数目。由于海马结构内神经元和突触的数目不会随海马结构体积的改变而改变，而且运用光学分合法计算神经元和突触数目的过程不需要体积参数，因此计算结果也与组织因皱缩或者肿胀造成的组织变形无关。所以当正常组织和病理组织对于脱水的反映不同，或者进行石蜡包埋使得组织的皱缩较大时，本方法可以用于解决组织皱缩问题。

另外，一些研究基于免疫印迹法对海马结构的突触素水平进行半定量的估计[27-28]，免疫印迹法得出的半定量信息难以准确地反应突触数目的变化，且无法分别研究海马结构各亚区（如 CA_1、CA_1sr）突触数目的变化。运用新的体视学方法则可以解决上述问题，我们能够分别研究海马结构各亚区突触绝对数目的变化。同时，还可以计算海马结构各亚区神经元数目，计算海马结构各亚区的突触数目与神经元数目的比值，观察神经元数目与突触数目变化的关系。

综上所述，本研究严格遵循无偏体视学的各种抽样原则，建立了定量研究海马结构内神经元和突触数目的研究方法，为深入研究正常老年和各种神经系统退行性疾病状态下海马结构内神经元和突触数目的改变提供了有效的工具。

参考文献：

[1] Barnes C A. Spatial learning and memory processes: the search for their neurobiological mechanisms in the rat [J]. Trends Neurosci, 1988, 11(4): 163-169.

[2] Barnes C A. Aging and the physiology of spatial memory [J]. Neurobiol Aging, 1988, 9(5/6): 563-568.

[3] deToledo-Morrell L, Geinisman Y, Morrell F. Age-dependent alterations in hippocampal synaptic plasticity: relation to memory disorders [J]. Neurobiol Aging, 1988, 9(5/6): 581-590.

[4] Gallagher M, Nicolle M M. Animal models of normal aging: relationship between cognitive decline and markers in hippocampal circuitry [J]. Behav Brain Res, 1993, 57(2): 155-162.

[5] Geinisman Y, Detoledo-Morrell L, Morrell F, *et al*. Hippocampal markers of age-related memory dysfunction: behavioral, electrophysiological and morphological perspectives [J]. Prog Neurobiol, 1995, 45(3): 223-252.

[6] Calhoun M E, Kurth D, Phinney A L, *et al*. Hippocampal neuron and synaptophysin-positive bouton number in aging C57BL/6 mice [J]. Neurobiol Aging, 1998, 19(6): 599-606.

[7] West M J, Coleman P D, Flood D G, *et al*. Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease [J]. Lancet, 1994, 344(8925): 769-772.

[8] Morrison J H, Hof P R. Life and death of neurons in the aging brain [J]. Science, 1997, 278(5337): 412-419.

[9] Calhoun M E, Mao Y, Roberts J A, *et al*. Reduction in hippocampal cholinergic innervation is unrelated to recognition memory impairment in aged rhesus monkeys [J]. J Comp Neurol, 2004, 475(2): 238-246.

[10] 卢伟，杨姝，李琛，等. 大鼠海马结构内有髓神经纤维老年性改变的体视学研究 [J]. 解剖学报，2009，40(6)：851-856.

[11] Bennett J L, McRae P A, Levy L J, *et al*. Long-term continuous, but not daily, environmental enrichment reduces spatial memory decline in aged male mice [J]. Neurobiol Learn Mem, 2006, 85(2): 139-152.

[12] Frick K M, Fernandez S M. Enrichment enhances spatial memory and increases synaptophysin levels in aged female mice [J]. Neurobiol Aging, 2003, 24(4): 615-626.

[13] Gundersen H J, Jensen E B, Kieu K, *et al*. The efficiency of systematic sampling in stereology--reconsidered [J]. J Microsc, 1999, 193(Pt 3): 199-211.

[14] West M J, Slomianka L, Gundersen H J. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator [J]. Anat Rec, 1991, 231(4): 482-497.

[15] Peters A, Morrison J H, Rosene D L, *et al*. Feature article: are neurons lost from the primate cerebral cortex during normal aging? [J]. Cereb Cortex, 1998, 8(4): 295-300.

[16] Gundersen H J, Bagger P, Bendtsen T F, *et al*. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis [J]. APMIS, 1988, 96(10): 857-881.

[17] Gundersen H J, Bendtsen T F, Korbo L, *et al*. Some new, simple

and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis[J]. APMIS, 1988, 96(5): 379-394.
[18] Rapp P R, Gallagher M. Preserved neuron number in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(18): 9926-9930.
[19] Rasmussen T, Schliemann T, Sorensen J C, *et al*. Memory impaired aged rats: no loss of principal hippocampal and subicular neurons [J]. Neurobiol Aging, 1996, 17(1): 143-147.
[20] Jahn R, Schiebler W, Ouimet C, *et al*. A 38, 000-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985, 82(12): 4137-4141.
[21] Wiedenmann B, Franke W W. Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38, 000 characteristic of presynaptic vesicles[J]. Cell, 1985, 41(3): 1017-1028.
[22] Chen K S, Masliah E, Mallory M, *et al*. Synaptic loss in cognitively impaired aged rats is ameliorated by chronic human nerve growth factor infusion[J]. Neuroscience, 1995, 68(1): 19-27.
[23] Eastwood S L, Burnet P W, McDonald B, *et al*. Synaptophysin gene expression in human brain: a quantitative in situ hybridization and immunocytochemical study[J]. Neuroscience, 1994, 59(4): 881-892.
[24] Terry R D, Masliah E, Salmon D P, *et al*. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment[J]. Ann Neurol, 1991, 30(4): 572-580.
[25] DeKosky S T, Scheff S W, Styren S D. Structural correlates of cognition in dementia: quantification and assessment of synapse change [J]. Neurodegeneration, 1996, 5(4): 417-421.
[26] Long L H, Liu R L, Wang F, *et al*. Age-related synaptic changes in the CA1 stratum radiatum and spatial learning impairment in rats[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2009, 36(7): 675-681.
[27] Ypsilanti A R, Girao-da-Cruz M T, Burgess A, *et al*. The length of hippocampal cholinergic fibers is reduced in the aging brain[J]. Neurobiol Aging, 2008, 29(11): 1666-1679.
[28] Wang R, Tang Y, Feng B, *et al*. Changes in hippocampal synapses and learning-memory abilities in age-increasing rats and effects of tetrahydroxystilbene glucoside in aged rats[J]. Neuroscience, 2007, 149(4): 739-746.

(收稿:2010-11-22 修回:2010-12-23)
(编辑 邓强庭)

(上接1327页)

3 讨论

DR是糖尿病常见且严重的并发症之一。其病理改变包括视网膜毛细血管周细胞选择性的丢失、基底膜增厚、微血管瘤和新生血管形成等。DR的发病机制复杂,近来对DR的研究多关注于生长因子变化在其发病中的作用,而生长因子中最重要的因子是VEGF[3]。视网膜微循环障碍首先造成组织缺氧,进而通过不同途径增强VEGF的表达。VEGF与血管增生密切相关,在体内以旁分泌和自分泌方式发挥作用,广泛存在于眼、肾脏等多种组织,是目前所知最强的促血管内皮细胞生长的因子。在DR的发生、发展过程中,VEGF主要上调视网膜血管细胞间黏附分子-1(ICAM-1)的表达,促使白细胞广泛黏附于视网膜微血管,使内皮细胞之间的紧密连接受到破坏,进而引起血-视网膜的损伤;其次VEGF可加强主动运输,增加血-视网膜屏障渗透性;此外VEGF还增强细胞通透性,导致大分子物质如纤维蛋白原等进入细胞外基质,纤维蛋白凝胶形成增多,并支持基质细胞的内向生长,最终形成新生血管[1]。临床研究表明DR患者慢性高血糖可引起VEGF的高表达[4]。DR患者VEGF表达水平增高,且随着DR严重程度的增加,这种趋势越明显[5],我们的研究结果表明:DR患者血清的VEGF明显增高,与对照组比较差异有显著性,与上述研究结果一致,提示血清中的VEGF参与了DR的发生、发展,且与病情严重程度有密切关系,测定DR患者血清VEGF水平可能有助于评价视网膜病变的程度。糖尿病视网膜病变患者体内VEGF水平增高的机制目前尚不清楚,可能与视网膜缺氧及高血糖状态等有关[6]。

通脉糖眼明胶囊为本课题组研制的院内制剂,经多年临床使用,疗效显著,可以明显促进视网膜神经电生理的恢复,改善视网膜功能,方中以黄芪、生地、枸杞、女贞子等滋补肝肾、益气养阴以治其本;方中三七行血散瘀,青葙子清肝明目以治其标,全方合用,标本兼治,共奏益气养阴、明目退翳之功。有研究表明抑制VEGF表达,可以阻止早期血-视网膜屏障的破坏,本研究通过观察通脉糖眼明胶囊对DR患者血清VEGF水平的影响,探讨通脉糖眼明胶囊治疗DR的可能机制,结果显示:DR患者治疗前VEGF水平显著升高,与正常组比较,差异有统计学意义($P<0.01$);治疗8周后VEGF水平下降,与治疗前相比差异有统计学意义($P<0.01$);通脉糖眼明胶囊治疗组VEGF水平下降尤为显著,与对照组相比,差异有统计学意义($P<0.01$),提示通脉糖眼明胶囊可能通过降低血清中VEGF水平,阻止早期血-视网膜屏障的破坏,从而延缓DR的发生、发展。

参考文献:

[1] Yamagishi S, Abe R, Jinnouchi Y, *et al*. Pigment epithelium-derived factor inhibits vascular endothelial growth factor-induced vascular hyperpermeability both in vitro and in vivo[J]. J Int Med Res, 2007, 35(6): 896-899.
[2] 徐寒松,孔德明,李雪梅,等. 通脉糖眼明胶囊治疗单纯型糖尿病性视网膜病变临床研究[J]. 中华中医药杂志, 2006, 21(9): 567-569.
[3] 韦旭,孙继玮. 影响2型糖尿病患者视网膜病变的临床因素分析[J]. 中国全科医学, 2008, 11(8B): 1482-1484.
[4] Grant M B, Afzal A, Spoerri P, *et al*. The role of growth factors in the pathogenesis of diabetic retinopathy[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2004, 13(10): 1275-1293.
[5] Cavusoglu A C, Bilgili S, Alaluf A, *et al*. Vascular endothelial growth factor level in the serum of diabetic patients with retinopathy[J]. Ann Ophthalmol (Skokie), 2007, 39(3): 205-208.
[6] Funatsu H, Yamashita H. Pathogenesis of diabetic retinopathy and the renin-angiotensin system[J]. Ophthalmic Physiol Opt, 2003, 23(6): 495-501.

(收稿:2011-03-01 修回:2011-03-29)
(编辑 王小宴)