

β -淀粉样蛋白对大鼠学习记忆、病理及 tau 蛋白磷酸化的影响

段立晖¹, 周国庆¹, 孙芳¹, 夏树开², 胡云龙², 林世康²

(1. 南京军区南京总医院老年神经内科, 江苏南京 210002; 2. 南京川博生物科技有限公司, 江苏南京 210061)

[摘要] 目的 研究大鼠海马区内注射 β -淀粉样蛋白($A\beta$)的神经毒性, 建立阿尔茨海默病(AD)动物模型, 探讨 $A\beta$ 毒性机制。方法 选取雌性成年 SD 大鼠 24 只, 随机分为正常对照组、生理盐水组、AD 组, 每组 8 只。Morris 水迷宫检测大鼠学习记忆功能, HE 染色及 Bielschowski 染色法观察海马神经元形态, 免疫组化法观察 tau 蛋白异常磷酸化变化。结果 与正常对照组大鼠相比, AD 组大鼠水迷宫测试结果明显减退($P < 0.01$); 海马 CA1 区神经元纤维形态紊乱, tau 蛋白磷酸化阳性细胞数明显增多($P < 0.01$)。结论 大鼠海马内注射凝集态 $A\beta$ 可产生神经毒性作用, 能较好地模拟 AD 行为和病理表现, 其神经毒性可能是通过 tau 蛋白的异常磷酸化起作用。

[关键词] 阿尔茨海默病; 动物模型; 大鼠; β -淀粉样蛋白; tau 蛋白

中图分类号: R749.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-271X(2009)05-0389-05

The influence of beta-amyloid on learning and memory, histologic changes and tau hyperphosphorylation in rats

DUAN Li-hui¹, ZHOU Guo-qing¹, SUN Fang¹, XIA Shu-kai², HU Yun-long², LIN Shi-kang² (1. Department of Geriatric Neurology, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, PLA, Nanjing 210002, Jiangsu, China; 2. Nanjing Chuanbo biotech Co., Ltd. Nanjing 210061, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective** To explore the neurotoxicity mechanism of beta-amyloid ($A\beta$) by establishment of Alzheimer's disease model with injection $A\beta$ to hippocampus in rats. **Methods** 24 female rats were divided into three groups randomly: normal control group, saline group and AD group with each group 8 rats. The function of learning-memory was tested by Morris water maze. The pathological changes of hippocampus neurons were observed by both H-E staining and Bielschowski staining. The tau hyperphosphorylation was detected by immunohistochemistry staining. **Results** Compared with the normal control group rats, the function of learning-memory in AD group was impaired significantly ($P < 0.01$), the neurofibrils in hippocampus neurons were disordered, and the number of P-tau positive cells was remarkably increased ($P < 0.01$). **Conclusion** The injection of aggregated $A\beta_{25-35}$ to rat hippocampus can produce neurotoxicity, which mimics the performance of AD and pathological characterizations exactly. The tau hyperphosphorylation may be involved in the neurotoxic mechanisms of $A\beta$.

[Key words] Alzheimer's disease; Animal model; Rat; Beta-amyloid; Tau protein

随着阿尔茨海默病(AD)发病率的增高, 研究AD的病因及发病机制已成为当前迫切需求。建立AD动物模型是深入研究AD发病机制的重要手段之一, 但由于目前AD模型制作方法多样且结果差异较大, 因此, 研究合适的动物模型具有重要意义。

近年来, 应用 $A\beta$ 直接脑内注射建立AD模型的方法受到广泛关注, 但由于在 $A\beta$ 凝聚状态及注射脑区的选择上存在差异, 其实验结果均不一致。本实验通过大鼠海马 CA1 区内微量注射凝集态 $A\beta_{25-35}$, 观察大鼠学习记忆和神经元损伤及 tau 异常

基金项目: 南京军区南京总医院科研基金资助项目(2006024)

作者简介: 段立晖(1980-), 男, 北京人, 主治医师, 医学硕士, 从事神经内科专业。

磷酸化,并对 AD 模型进行探讨。

1 材料与方法

1.1 动物分组及试剂 健康雌性成年 SD 大鼠 24 只,由南京军区南京总医院比较医学科提供,15 月龄左右,体重 300 ~ 450 g,术前饲养 1 周,自由饮食,室温 22 ~ 25℃,每天光照 12 小时。将大鼠随机分成 3 组:正常对照组、生理盐水组、AD 组,每组 8 只。 $A\beta_{25-35}$ 多肽片段购自 Alexis 公司,Tau (p-Thr181)、Tau (p-Thr205)、Tau (p-Thr231)、Tau (p-Ser262)、Tau (p-Ser404)、Tau (p-Ser396)多克隆抗体均由南京川博生物科技有限公司提供。

1.2 动物模型制备 AD 组:4% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,用脑立体定位仪取平颅头位固定大鼠,参照包新民等的《大鼠脑立体定位图谱》^[1],确定前囟后 1.4 mm、中线旁 2.5 mm,颅骨表面下 7.2 mm 为海马 CA1 区。用 1 μ l 微量注射器 5 min 内缓慢注入凝聚态 $A\beta_{25-35}$ (按 Giovannelli 等的方法^[2],将 1 mg $A\beta_{25-35}$ 制成 5 nmol/ μ l 浓度,密封后置于 37℃ 细胞培养箱中 96 h 形成凝聚态) 1 μ l 至海马 CA1 区,予以留针 10 min。术后给予青霉素钠盐 5 万单位肌注,每天 1 次,连续 3 天。生理盐水组:同法于海马 CA1 区内注射 1 μ l 灭菌生理盐水。

1.3 行为学检测 采用 Morris 水迷宫法^[3]。于术后 14 天进行水迷宫训练,每日训练 2 次(上下午各 1 次),连续 6 天。训练时按东北、西北、东南、西南 4 个象限依次将大鼠面向池壁放入水中,设定最长游动时间为 120 s,以秒表计时,记录大鼠找到平台所需时间,记为潜伏期。然后撤除平台,选定和平台相对的象限中点为入水点,记录 120 s 内大鼠为搜索平台而穿过平台区的次数(以术后第 20 天的成绩作为测试结果)。

1.4 病理学改变 术后 10 周,断头处死大鼠并取材,接常规方法染色、切片分别用于苏木精-伊红 (HE)染色、Bielschowski 染色(组织切片经脱蜡、逐级乙醇脱水及水洗后,于 37℃ 温箱内用 20% 硝酸银水溶液避光浸染 25 ~ 35 min,随后蒸馏水洗 3 ~ 5 min;10% 甲醛还原数秒钟至切片呈现黄色为止,水洗 3 ~ 5 min;用氨银溶液滴染 20 ~ 40 s,倾去染液,直接用福尔马林液再次还原 1 ~ 2 min;5% 硫代硫酸钠水溶液固定 3 ~ 5 min,水洗 3 ~ 5 min;然后用滤纸将切片周围水分吸干,乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片)和免疫组化染色(按标准 ABC 免疫组织化学染色方法,组织切片于 70℃ 烤片 1 h,常规脱

蜡,用 PBS 冲洗 3 次,每次 3 min;3% H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶 10 min,PBS 冲洗 3 次,每次 3 min;枸橼酸盐缓冲液高压抗原修复,再予 PBS 冲洗 3 次,每次 3 min;用免疫组化笔将各切片的组织圈起,非免疫动物血清孵育 15 min,倾去血清,予一抗 [Tau (p-Thr181)、Tau (p-Thr205)、Tau (p-231)、Tau (p-Ser262)、Tau (p-Ser404)、Tau (p-Ser396)] 4℃ 孵育过夜,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min 后,以相应二抗孵育 10 min;PBS 冲洗 2 次,每次 5 min,单蒸水 4 次,每次 3 min,辣根过氧化物酶孵育 10 min;PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,DAB 显色,苏木素复染,脱水、透明、中性树胶封固。PBS 代替一抗作阴性对照)。光镜下观察海马神经元变化及海马神经元胞体和轴突的改变,每只大鼠取 3 张切片进行免疫组化染色、每张切片高倍镜($\times 400$)下计数海马 CA1 区 5 个视野阳性细胞总数,计算每个视野平均阳性细胞数。

1.5 统计学处理 实验定量结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间均数比较用单因素方差分析,两两组间比较用 t 检验。采用 SPSS 11.5 统计软件进行分析, $P \leq 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 行为学检测结果 AD 组与正常对照组比较,AD 组的逃避潜伏期延长,撤除平台后,AD 组大鼠穿过原平台的次数减少,且差异具有显著性 ($P < 0.01$);生理盐水组与正常对照组比较,无显著差异 ($P > 0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠 Morris 水迷宫实验结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	逃避潜伏期 (s)	穿过平台次数
正常对照组	8	11.9 \pm 1.2	8.4 \pm 1.89
生理盐水组	8	12.3 \pm 1.9 [△]	8.1 \pm 1.88 [△]
AD 组	8	42.7 \pm 2.9 [*]	4.1 \pm 1.43 [*]

注:AD 与正常对照组比较,^{*} $P < 0.01$;与 AD 组比较 [△] $P < 0.01$

2.2 脑组织形态学变化 HE 染色显示,正常对照组大鼠海马神经元呈圆形或椭圆形,排列整齐、紧密,染色较均一,细胞核仁清晰(图 1)。模型组大鼠海马神经元层次明显减少,细胞排列稀疏,细胞核染色较深,核固缩、异形,有较明显的神经细胞脱失,较多胶质细胞增生(图 2)。

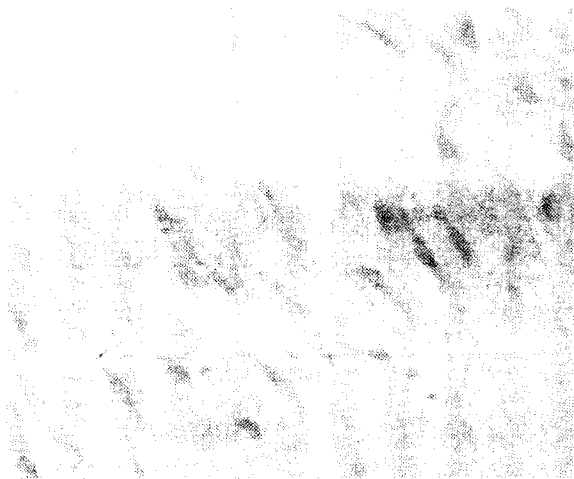


图 1 正常对照组大鼠海马神经元改变
(HE 染色, ×400)

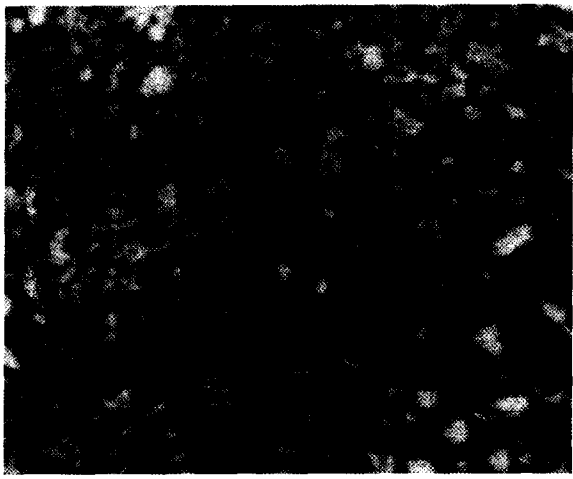


图 3 正常对照组大鼠海马神经元改变
(Bielschowski 染色, ×200)

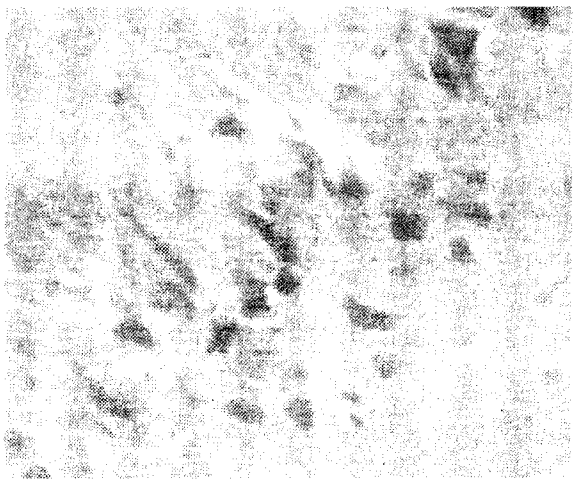


图 2 AD 组大鼠海马神经元改变
(HE 染色, ×400)

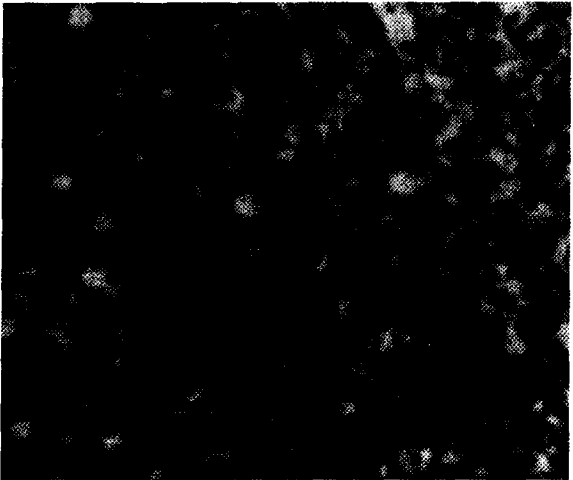


图 4 AD 组大鼠海马神经元改变
(Bielschowski 染色, ×200)

Bielschowski 染色显示,正常对照组大鼠海马结构及神经元形态正常,轴突呈棕褐色,神经元纤维排列有序、较稀疏(图 3)。模型组大鼠海马神经元纤维走行不规则,有融合、断裂现象,银染加深(图 4)。

大鼠海马组织不同位点 tau 蛋白磷酸化水平表明,正常对照组仅检测到少量特异性位点标记的阳性神经元,而模型组 thr181、thr205、thr231、ser262、ser404 及 ser396 阳性表达数量明显增加($P<0.01$),见表 2。

表 2 三组大鼠海马阳性神经元数目比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	thr181	thr205	thr231	ser262	ser404	ser396
正常对照组	8	21.6±4.7	45.3±6.9	54.1±4.3	37.3±3.1	56.4±2.7	22.4±2.3
生理盐水组	8	23.2±3.5 [△]	46.2±3.1 [△]	59.5±4.5 [△]	37.1±2.7 [△]	57.2±2.3 [△]	21.0±1.6 [△]
AD 组	8	45.4±3.1 [*]	106.7±7.6 [*]	79.3±3.2 [*]	67.7±2.9 [*]	97.5±2.9 [*]	46.7±5.8 [*]

注:AD 与正常对照组比较,^{*} $P<0.01$;与生理盐水组比较,[△] $P<0.01$

3 讨 论

3.1 动物模型的选择及意义 目前,用于 AD 研究的模型制作方法主要以下几种:①海马内注射鹅膏

覃氨酸或海藻酸,但此类模型制作操作复杂,且药品价格较高,不易推广。②切断穹隆海马伞或颈后皮下注射 D-半乳糖,此法手术操作复杂,创伤大,死亡率较高。③腹腔注射氯化铝 AlCl₃ 混悬液,该法制

作的模型稳定性差,个体间、组间病理、生化改变等可比性较差。④松果体摘除术,方法操作十分复杂,术后动物死亡率较高,且致痴呆的程度个体差异很大。本实验采用立体定向方法,于大鼠海马 CA1 区注入凝集态 $A\beta_{25-35}$,建立 AD 大鼠模型。此方法具有手术操作简便,创伤小,定位准确,个体间、组间病理、生化改变等可比性较好,术后动物死亡率较低,且致痴呆的程度个体差异小等优点。

正常生理条件下 $A\beta$ 的产生、降解和清除是一个动态平衡的过程。但在 AD 患者脑内,该平衡被破坏,淀粉样前体蛋白(APP)的非 $A\beta$ 源加工途径受抑制, $A\beta$ 源途径被激活,导致 $A\beta$ 生成过多,同时由于 $A\beta$ 清除及降解受限^[4],APP 基因突变或过表达^[5-6],最终导致 $A\beta$ 通过自身聚集而形成难以溶解的沉淀,进而沉积形成老年斑。AD 的病理特征之一为老年斑(SP), $A\beta$ 在脑内聚集并形成老年斑是 AD 神经病理过程中的关键事件,其被认为具有神经毒性,可导致神经元损失及认知功能减退。由于 $A\beta$ 沉积是 AD 发病的关键,所以 $A\beta$ 相关的模型是较为合理的选择。由于海马与学习记忆,尤其是近期记忆功能密切相关,是 AD 中最易受累的脑区之一,故从结构和功能上分析,海马是研究 AD 较理想的靶区。根据 Giovannelli 等^[2]提出 $A\beta_{25-35}$ 是最具毒性片段的假设,本实验选择了大鼠海马内注射 $A\beta_{25-35}$ 。有研究表明, $A\beta$ 在注射后脑组织的损害呈进行性发展,可持续数月^[7]。基于此特点,本实验选择术后 10 周为观察点,并选择与学习记忆关系最密切的海马 CA1 区作为重点观察部位。

本研究发现,予以大鼠海马内注射 $A\beta_{25-35}$ 后,AD 组大鼠的逃避潜伏期延长,撤除平台后,AD 组大鼠穿过原平台的次数减少。同时 H-E 染色组织学显示 AD 组大鼠海马神经元层次明显减少,细胞排列稀疏,细胞核染色较深,核同缩、异形,有较明显的神经细胞脱失,较多胶质细胞增生;Bielschowski 染色显示 AD 组大鼠海马神经元纤维走行不规则,有融合、断裂现象,银染加深,在行为、组织学上均较好地模拟了 AD 行为及病理表现。

本研究应用此法制备大鼠 AD 模型,实验动物死亡率低。同时,此法具有较好的可操作性和重复性,值得在 AD 动物实验研究中推广应用。

3.2 海马神经元损伤与 tau 蛋白异常磷酸化 本实验观察到大鼠海马神经元损伤的变化。注射凝集态 $A\beta_{25-35}$ 后,海马局部神经元出现大片缺失,且神经元纤维走行紊乱,并出现增粗、肿胀、断裂以及轴突

深染等损害表现,说明神经元细胞骨架微管系统发生改变,证实了凝集态 $A\beta_{25-35}$ 对大鼠海马神经元的毒性作用。研究资料也表明, $A\beta$ 可通过诱导细胞凋亡^[8],诱导产生活性自由基从而触发氧化应激反应^[9],影响胆碱能神经系统^[10],诱导 tau 蛋白过度磷酸化^[11]以及炎症或胶质激活^[12]等机制引发 AD。本研究结果明确显示了凝集态 $A\beta_{25-35}$ 海马注射的神经毒性,较好地模拟了 AD 学习记忆障碍、神经元损伤等方面的特征。

AD 主要以进行性痴呆为临床特征,其主要病理改变是在海马和颞叶皮层出现老年斑、神经原纤维缠结和营养不良性轴突改变等。老年斑的形成与 $A\beta$ 在细胞外的过度沉积有关,而神经原纤维缠结则主要由 tau 蛋白异常磷酸化所致。tau 蛋白在 $A\beta$ 诱导神经退行性病变过程中起着重要作用^[13]。

Tau 蛋白共有 21 个 tau-ser 和 tau-thr 磷酸化位点,目前多数研究仅选取 ser199/ser202、ser396、thr231 等特定位点,本研究除选取具有代表性的 ser396、thr231 位点外,还选取了 thr181、thr205、ser262、ser404 等位点进行磷酸化水平研究。本实验发现,给成年大鼠海马内注射凝集态 $A\beta_{25-35}$,利用免疫组化方法发现 AD 组大鼠海马神经元在 thr181、thr205、thr231、ser262、ser404 及 ser396 位点的表达明显高于正常对照组大鼠,说明 $A\beta$ 可以诱导神经元 tau 蛋白发生过度磷酸化,推测 $A\beta$ 可能通过诱导 tau 蛋白过度磷酸化引发 AD,同时 $A\beta$ 产量的增加或改变可能是 AD 发病过程的启动环节,tau 蛋白功能异常改变可能是神经元功能障碍和死亡的必要环节。Rapoport 等^[13]研究发现,tau 蛋白在 $A\beta$ 纤维沉淀引起突触变形的机制中可能起关键性的作用,在 tau 缺失神经元重组表达人类 tau 蛋白,可使神经元对 $A\beta$ 的毒性恢复敏感性。进一步说明, $A\beta$ 和过度磷酸化的 tau 蛋白都是 AD 病理改变中重要的标记性蛋白,二者在 AD 形成过程中相互关联。

参考文献

- [1] 包新民,舒斯云.大鼠脑立体定向图谱[M].北京:人民卫生出版社,1991:47-50.
- [2] Giovannelli L, Casamenti F, Scali C, et al. Differential effects of amyloid peptides beta-(1-40) and beta-(25-35) injections into the rat nucleus basalis[J]. Neuroscience, 1995, 66(4): 781-792.
- [3] Morri SR. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat[J]. J Neurosci Methods, 1984, 11(11): 47-60.
- [4] Carpentier M, Robitaille Y, Des-Groseillers L, et al. Declining expression of neprilysin in Alzheimer disease vasculature: possible

- involvement in cerebral amyloid angiopathy[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2002, 61(10):849-856
- [5] Hashimoto Y, Niikura T, Ro Y, et al. Multiple mechanisms underlie neurotoxicity by different types of Alzheimer's disease mutations of amyloid precursor protein[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(44):34541-34551.
- [6] Moechars D, Lorent K, Van Leuven F. Premature death in transgenic mice that overexpress a mutant amyloid precursor protein is preceded by severe neurodegeneration and apoptosis[J]. *Neuroscience*, 1999, 91(3):819-830.
- [7] 刘志民, 邹俊杰, 沈玉美, 等. 人胚胎外周组织褪黑素受体的鉴定[J]. *第二军医大学学报*, 2001, 22(1):8-11.
- [8] Alvarez AR, Godoy JA, Mullendorff K, et al. Wnt-3a overcomes beta-amyloid toxicity in rat hippocampal neurons[J]. *Exp Cell Res*, 2004, 297(1):186-196.
- [9] Huang X, Atwood CS, Hartshorn MA, et al. A beta peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction[J]. *Am J Pathol*, 2004, 164(6):2163-2174.
- [10] Reyes AE, Chacon MA, Dinamarea MC, et al. Acetylcholinesterase-Abeta complexes are more toxic than Abeta fibrils in rat hippocampus: effect on rat beta-amyloid aggregation, laminin expression, reactive astrogliosis, and neuronal cell loss[J]. *Am J Pathol*, 2004, 164(6):2163-2174.
- [11] Takashima A, Honda T, Yasutake K, et al. Activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3beta by amyloid beta peptide(25-35)[J]. *Neurosci Res*, 1998, 31(4):317-323.
- [12] Li M. beta-Amyloid protein-dependent nitric oxide production from microglial cells and neurotoxicity[J]. *Brain Res*, 1996, 720(1-2):93-100.
- [13] Rapoport M, Dawson HN, Binder LI, et al. Tau is essential to beta-amyloid-induced neurotoxicity[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(9):6364-6369.

(收稿日期:2009-03-08;修回日期:2009-06-09)

(本文编辑:潘雪飞; 英文编辑:王建东)

· 短 篇 ·

甘露醇治疗脑出血性颅高压时机和剂量的选择

初晓玲, 李 祥

(解放军第 81 医院, 江苏南京 210002)

[关键词] 甘露醇; 颅压; 脱水降压; 时机; 剂量

中图分类号: R743.34 文献标识码: B 文章编号: 1672-271X(2009)05-0393-02

甘露醇是目前降低颅内压安全有效的首选药物之一。随着用药时间的推移、相关研究的不断深入, 暴露出的问题更加突出。特别是用药时机和剂量选择上争议较大, 如何对其进行正确把握, 达到安全与有效二者兼顾的目的, 已成为临床工作的一个关注点。为此查阅有关资料并进行相关的统计, 现报告如下。

1 资料与方法

1.1 文献来源 在《万方医药信息系统数据库》以“甘露醇”为关键词检索 1998 至 2009 年文献。共检索到相关文献 1380 篇。通过逐篇筛选, 收集到与本次研究相关的文献 59 篇。

1.2 纳入标准 筛选甘露醇用于治疗脑出血性颅内压升高时, 与用药时机和(或)剂量有关的文献。其中以下情况不予收集: ①用药时机和(或)剂量描述不详的; ②合并其他降颅内压药物的; ③针对儿童进行的研究。

1.3 统计方法 分别对用药时机和剂量的不同选择情况所得出的结论, 按文献的数量所占百分比进行统计学处理。用药时机的统计分别按首剂主张发病时迅速使用和以 6、8、12 和 24 h 为界点使用等 5 个阶段进行(用药界点表示以某个时间点为界, 并主张该时间点后用药); 剂量的统计分别按主张小剂量(0.5 g/kg)和大剂量(1.0 g/kg)应用两个部分进行。

2 结果

59 篇文献中, 涉及用药时机的 27 篇, 涉及用药剂量的 44 篇。关于用药时机的文献中, 快速用药者无报道, 6 h 以后使用者 8 篇, 6 h 以后者 2 篇, 12 h 以后者 6 篇, 24 h 以后者 11 篇; 文献中均主张小剂量(0.5 g/kg)、短间隔(4~6 h)给药。

3 讨论

甘露醇在临床应用过程中, 一直存在很多误区, 如遇到颅压升高立即给予甘露醇, (下转第 416 页)