

神经疾病发病机制研究

DOI: 10.11699/cyxb20130610

梓醇对 APP/PS1 双转基因小鼠焦虑行为和脑内神经元的影响

宋 冲¹, 楚亚楠¹, 贺桂琼², 刘 刚¹, 王凌晞¹, 周泽芬¹, 姚秋会¹

(重庆医科大学 1. 重庆市神经生物学重点实验室; 2. 基础医学院解剖教研室, 重庆 400016)

【摘要】目的:观察梓醇对 APP/PS1 双转基因小鼠焦虑行为和脑内神经元的影响。**方法:**将 3 月龄的 APP/PS1 双转基因小鼠按随机数字表法分为梓醇治疗组和生理盐水对照组, 每组 10 只, 用梓醇[5 mg/(kg·d)]和等量生理盐水腹腔注射阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)模型小鼠 3 周, 应用高架十字迷宫检测两组小鼠的焦虑情绪的变化; 应用免疫组织化学染色和 Western blot 检测脑内神经元及突触相关蛋白的表达变化。**结果:**与生理盐水对照组比较, 梓醇治疗组小鼠进入开放臂的次数($P=0.000\ 2$, $t=4.742$)和时间($P=0.001$, $t=3.936$)显著增加, 神经元数量($P=0.028\ 4$, $t=2.872$)及突触蛋白表达($P=0.002$, $t=5.265$)明显增多。**结论:**梓醇治疗能显著缓解 AD 模型小鼠的焦虑情绪, 这种改善作用可能是通过改善神经元及突触的丢失来实现的。

【关键词】梓醇; 阿尔茨海默病; 焦虑行为; 神经元; 突触

【中国图书分类法分类号】R285.5

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-01-07

Effects of catalpol on anxious behaviors and neurons in APP/PS1 double transgenic mice

SONG Chong¹, CHU Yanan¹, HE Guiqiong², LIU Gang¹, WANG Lingxi¹, ZHOU Zefen¹, YAO Qiuhui¹

(1. Chongqing Key Laboratory of Neurobiology; 2. Teaching and Research Section of Anatomy,

Basic Medical College, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To research whether catalpol affect anxious behaviors and neurons in APP/PS1 double transgenic mice. **Methods:** Three-month old APP/PS1 double transgenic mice were randomly divided into catalpol-treated and saline-treated groups ($n=10$). 5 mg/(kg·d) of catalpol and the same amount of saline were peritoneally injected into Alzheimer's disease (AD) model mice for 3 weeks. Elevated plus-maze test was performed to test autonomic behaviors of AD model mice; immunohistochemical staining and Western blot were used to detect number of neurons and expressions of NeuN and PSD95 in the brain of mice. **Results:** Compared with those of saline-treated AD model mice, open arm entries ($P=0.000\ 2$, $t=4.742$) and open arm time ($P=0.001$, $t=3.936$) catalpol-treated AD mice were significantly decreased ($P=0.028\ 4$, $t=2.872$), number of neurons were significantly increased ($P=0.028\ 4$, $t=2.872$) and expressions PSD95 were also increased ($P=0.002$, $t=5.265$). **Conclusions:** Catalpol can significantly reduce anxious behaviors, which shows that catalpol may exert its neuroprotection through suppressing the wide loss of neurons and synapses in the brain of APP/PS1 double transgenic mice.

【Key words】catalpol; Alzheimer's disease; anxious behaviors; neurons; synapses

作者介绍: 宋 冲, Email: songchong1986@hotmail.com,

研究方向: 阿尔茨海默病的防治研究。

通信作者: 贺桂琼, Email: guiqionghe@hotmail.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 30970986); 教育部“新世纪优秀人才”支持计划资助项目(编号: NCET-11-1084); 重庆市首届优秀人才资助计划资助项目[编号: 渝教人(2009)2 号]; 留学人员科技活动项目择优资助项目[编号: 渝人社办[2011]235 号]。

cation and synthesis of SorLA are stimulated by its ligand head activation[J]. J Cell Sci, 2000, 113(Pt24): 4475-4485.

[6] Hermy G, Plath N, Hubner C A, et al. The three sorCS genes are differentially expressed and regulated by synaptic activity[J]. J Neurochem, 2004, 88(6): 1470-1476.

[7] Scherzer C R, Offe K, Gearing M, et al. Loss of apolipoprotein E receptor CR11 in Alzheimer disease[J]. Arch Neurol, 2004, 61: 1200-1205.

[8] Andersen O M, Reiche J, Schmidt V, et al. Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(38): 13461-13466.

[9] Jacobsen L, Madsen P, Jacobsen C, et al. Activation and functional

characterization of the mosaic receptor SorLA/LR11[J]. Biol Chem, 2001, 276(25): 22788-22796.

[10] Bali J, Gheini A H, Zurbruggen S, et al. Role of genes linked to sporadic Alzheimer's disease risk in the production of β -amyloid peptides[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(38): 15307-15311.

[11] Lintzel J, Franke I, Riedel I B, et al. Characterization of the VPS10 domain of SorLA/LR11 as binding site for the neuropeptide HA[J]. Biol Chem, 2002, 383(11): 1727-1733.

(责任编辑: 关蕴良)

随着全世界老龄化程度的不断加深,阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)已成为严重危害老年人身心健康的主要疾病之一。AD 是一类以进行性认知功能障碍、记忆力减退及精神行为改变(如焦虑、抑郁和妄想)为主要临床表现的慢性神经退行性疾病,是临床最为常见的痴呆类型。大量神经元和突触的丢失是 AD 脑内最典型的病理变化之一^[1]。目前临床上尚无有效的治疗药物,随着中医药研究的不断深入,多种中药被发现对 AD 具有比较理想的防治作用。梓醇是中药地黄的主要活性成分之一,研究表明,梓醇具有抗凋亡、抗氧化、促神经营养因子保护神经细胞、促血管新生等多种药理作用^[2-5],但其能否改善 APP/PS1 双转基因小鼠的精神行为障碍,能否减少 AD 模型小鼠脑内神经元的丢失目前国内外鲜有报道,本文拟采用梓醇处理 AD 模型小鼠,并结合行为学、免疫组织化学和 Western blot 技术检测梓醇对 AD 模型小鼠的改善作用并初步探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

主要试剂: β -actin 鼠抗单克隆抗体(Santa cruz, sc-47778, 1:400); NeuN 鼠抗单克隆抗体(Millipore, MAB377B, 1:400); Post Synaptic Density protein 95 (PSD95) 兔抗多克隆抗体(Millipore, MAB1598, 1:1 500); 山羊抗兔和山羊抗小鼠 IgG 二抗(碧云天); ECL 发光试剂(碧云天); 显影定影粉(康为世纪); 医用胶片(柯达)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与处理 3 月龄雄性 APP/PS1 双转基因小鼠 20 只, 购自中国医学科学院实验动物研究所, 随机分为梓醇治疗组、生理盐水对照组, 分笼喂养于光照/黑暗为 12 h/12 h 的恒温环境, 自由摄食和饮水。梓醇治疗组小鼠给予 5 mg/(kg·d) 梓醇腹腔注射, 另一组注射等量生理盐水作对照。每天上午固定时间给药, 持续 3 周, 并记录小鼠的体质量变化。所有实验遵循重庆医科大学实验动物使用相关伦理要求。

1.2.2 高架十字迷宫检测小鼠的焦虑行为 选择的高架十字迷宫是国际上通用的程序^[6], 由 2 个相对的开放臂(30 cm × 6 cm)、2 个相对的封闭臂(30 cm × 6 cm × 15 cm)、1 个连接 4 只臂的中央平台(10 cm × 10 cm) 和围绕在开放臂边缘的 1 cm 高的矮挡板组成(目的是防止动物在探究过程中不慎滑下迷宫)。迷宫底板距实验室地面 50 cm。将小鼠置于迷宫的中央平台处, 使其头部正对其中 1 个开放臂, 释放后即开始记录下述指标: (1) 进入开放臂次数(open arm entry, OE); 进入到任一开放臂的次数, 以小鼠 4 个爪子均进入到臂内为准, 中途 1 个爪子从该臂中完全退出则为该次进入活动完成; (2) 进入开放臂时间(open arm time, OT); 进入到任一开放臂的时间; (3) 进入封闭臂次数(close arm entry, CE); 进入到任一封闭臂的次数, 以小鼠 4 个爪子均进入到臂内为准;

(4) 进入封闭臂时间(close arm time, CT)。由此分别计算出: (1) 进入开放臂和封闭臂的总次数(OE+CE); (2) 进入开放臂次数百分比(OE%); 即开放臂进入次数/(OE+CE) × 100%; (3) 开放臂停留时间百分比(OT%), 即开放臂停留时间/(OT+CT) × 100%。每只小鼠测试 5 min。中间用湿布擦拭迷宫, 清除粪便, 继而用干布擦净后再进行下 1 只小鼠的测试。

1.2.3 免疫组织化学 小鼠在行为学实验结束后, 经 2% 水合氯醛麻醉, 断头, 冰上取脑, 左侧脑组织加裂解液匀浆用于 Western blot, 右侧脑组织放入 4% 多聚甲醛固定 72 h, 30% 蔗糖脱水, 待组织块沉底后, 恒冷切片机冠状位连续切片, 片厚 20 μ m。待切片干后 1 × PBST 漂洗 5 min × 3 次, 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育 12 h, 阴性对照用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)代替一抗工作液。1 × PBST 漂洗 10 min × 3 次, 滴加山羊抗小鼠二抗工作液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 1 × PBST 漂洗 10 min × 3 次, 二氨基联苯胺显色, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 封片后光镜下采集图像并观察。

1.2.4 Western blot 取 1.5 ml 组织蛋白抽提液加入左侧脑组织后冰上充分匀浆, 4 $^{\circ}$ C 12 000 g 离心 15 min, 取上清。BCA 法测定总蛋白浓度。取 50 μ g 蛋白进行十二烷基硫酸钠凝胶电泳, 然后将蛋白转至聚偏二氟乙烯膜, 封闭液室温摇床封闭 1 h, BACE1 一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜, 1 × PBST 漂洗 15 min × 3 次; 二抗 37 $^{\circ}$ C 摇床 1 h, 1 × PBST 漂洗 15 min × 3 次, 滴加 ECL 发光试剂于聚偏二氟乙烯膜上, 反应约 3 min, 在暗室中胶片显影, 扫描后对蛋白条带进行分析。

1.2.5 统计学处理 用 Image Pro Plus 6.0 软件对免疫组化标记的 NeuN 免疫阳性细胞数量进行分析, 每只小鼠随机测量 5 张切片, 每张切片随机选取 5 个视野进行分析; Western blot 测量条带灰度值。采用 Prism 5.0 统计软件分析实验数据, 计量资料用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用两独立样本 t 检验对 2 组数据进行分析。以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 梓醇处理后 APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠焦虑行为的改变

OE+CE 即总的入臂次数, 标志着大鼠的运动能力, 2 组小鼠无明显差异。然而, 与生理盐水对照组相比, 梓醇治疗组 OE% 和 OT% 显著增加 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 2 组小鼠 OE+CE、OE% 和 OT% 的比较 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab.1 Comparison on OE+CE, OE% and OT% of mice in two groups ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	OE+CE (次)	OE%	OT%
生理盐水对照组	23.90 ± 2.35	30.73 ± 2.78	14.00 ± 2.30
梓醇治疗组	23.40 ± 1.68	50.35 ± 3.07	25.27 ± 1.71
t 值	0.865 0	0.000 2	0.001 0
P 值	0.173	4.742	3.936

2.2 梓醇处理后 APP/PS1 双转基因小鼠脑内神经元的改变

为了检测梓醇治疗是否影响了 AD 小鼠脑内神经元以及突触的数量与表达, 实验采用成熟神经元的标记物 NeuN 和突触的主要支架蛋白 PSD95 进行了实验检测, 免疫组化

结果显示:与生理盐水对照组(33.18 ± 1.76)个相比,梓醇治疗组小鼠脑内海马和皮质内神经元数量(44.67 ± 2.03)个,明显增多($t=2.872, P=0.0284$);Western blot 结果显示:NeuN 和 PSD95 蛋白水平的表达也明显增强,差别均具有统计学意义(NeuN: $t=10.94, P=0.002$, PSD95: $t=5.265, P=0.002$)。见图 1。

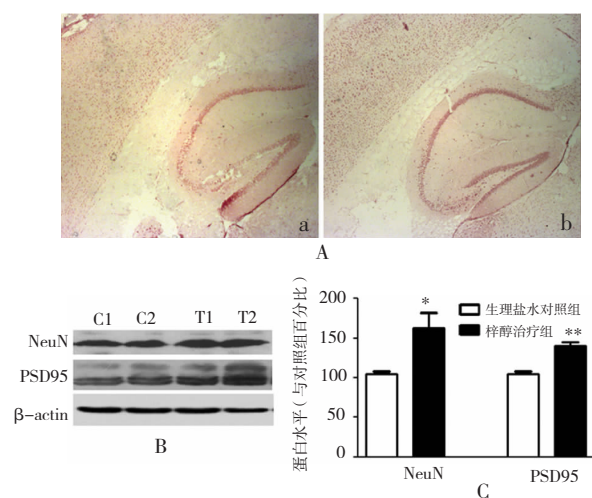


图 1 2 组小鼠脑内 NeuN 阳性神经元及 PSD95 蛋白表达的比较
Fig.1 Comparison on expressions of positive neurons of NeuN and PSD95 protein in the brain of APP/PS1 mice in two groups

图 1 2 组小鼠脑内 NeuN 阳性神经元及 PSD95 蛋白表达的比较
Fig.1 Comparison on expressions of positive neurons of NeuN and PSD95 protein in the brain of APP/PS1 mice in two groups

3 讨论

AD 是一类以进行性认知功能障碍、记忆力减退及精神行为改变(如焦虑、抑郁和妄想)为主要临床表现的慢性神经退行性疾病,是临床最为常见的痴呆类型。大脑皮质和海马区域 β 淀粉样蛋白($\text{amyloid-}\beta$ peptide, $A\beta$) 沉积形成老年斑(senile plaques, SP), Tau 蛋白过度磷酸化形成神经原纤维缠结与神经元和突触的大量丢失是 AD 患者脑内典型的病理特征。

本实验所采用的小鼠为携带有突变 APP(APP695 swe)和 PS1(PSEN1 Δ 9)的双重转基因 AD 模型小鼠,能够很好的模拟 AD 患者脑内的主要病理过程^[7-8],是目前研究 AD 发病机制及进行药物筛选的理想动物模型。此类小鼠在 3 月龄开始出现行为学改变,4 个月时在皮层和海马内可见典型的 SP 等病理特征^[9]。因此,本实验在病理特征出现前开始使用梓醇处理小鼠。

梓醇是从中药地黄根部分离出来的一种小分子糖苷,是地黄的主要活性成分之一,分子量为 362.45 Da,具有抗炎、止痛、抗肿瘤、抗衰老等多种药理作用。现代研究表明,梓醇对 D-半乳糖^[10]、 $A\beta$

脑内注射^[11]等所致的急性痴呆动物模型具有一定的防治作用,而 AD 是一个慢性进行性神经系统变性疾病,因此,D-半乳糖等所致的急性痴呆模型具有较大的局限性。本研究从行为学、形态学和蛋白水平检测梓醇对 APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠的焦虑行为、神经元及突触的影响。

本实验引入的高架十字迷宫模型,为抗焦虑研究中较为公认的非条件反射模型,在高架十字迷宫模型上,动物对新奇环境的探究习性与对高悬开臂的恐惧形成动物的矛盾冲突状态反映动物的焦虑情绪,它以进入 OE%和在 OT%反映动物的焦虑状态。本实验显示,通过梓醇的长期治疗,小鼠在开臂内的运动时间增加了约 11%,小鼠进入开臂的次数增加了约 19%,显示出明确的抗焦虑作用。

大量研究表明,抑郁症患者大脑皮质、海马、杏仁核等相关脑区的形态结构出现改变,前额叶皮质体积和细胞数量减少,海马结构发生改变,功能受到影响,由此揭示了焦虑、抑郁等情绪的发生与神经可塑性紧密相关^[12]。为了验证梓醇对焦虑情绪的改善是否与神经元及突触的变化有关,本实验采用成熟神经元的标记物 NeuN 进行了免疫组织化学染色。结果显示,梓醇治疗组小鼠皮质和海马等区域的神经元数量显著多生理盐水对照组。同时本研究还采用 Western blot 检测了突触的主要支架蛋白 PSD95 和 NeuN 的蛋白水平的表达,结果验证了梓醇治疗组的 AD 模型小鼠脑内 PSD95 和 NeuN 的表达明显强于生理盐水对照组。

如前所述,在 AD 发病的早期应用梓醇进行干预可显著维持神经元的存活,从而减少神经元的丢失,而神经元丢失的减少是由两方面引起的:神经元凋亡的抑制和(或)神经元增殖能力的加强,梓醇对神经元的保护作用究竟是通过影响哪一方面的途径亦或是同时影响凋亡和增殖,这将是本课题下一步的研究内容。

综上所述,5 mg/(kg·d)的梓醇治疗可显著缓解 AD 模型小鼠的焦虑情绪,显著减少 AD 小鼠脑内神经元和突触的丢失,本实验为梓醇防治 AD 提供了可靠的实验室依据。

参 考 文 献

- [1] Luque F A, Jaffe S L. The molecular and cellular pathogenesis of dementia of the Alzheimer's type an overview[J]. Int Rev Neurobiol, 2009, 84: 151-165.
- [2] Wang Z, Liu Q, Zhang R, et al. Catalpol ameliorates beta amyloid-induced degeneration of cholinergic neurons by elevating brain-derived neurotrophic factors[J]. Neuroscience, 2009, 163(4): 1363-1372.

神经疾病发病机制研究

DOI:10.11699/cyxb20130611

中枢神经系统炎症对抗原递呈细胞白细胞介素-27 表达影响

黄 琦, 秦新月

(重庆医科大学附属第一医院神经内科, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨在炎症因子与凋亡细胞刺激下对中枢神经系统抗原递呈细胞白细胞介素(interleukin, IL)-27 的表达调控。**方法:**用脂多糖(lipo-polysaccharide, LPS)、干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)和 X 射线诱导凋亡细胞对小鼠小胶质细胞和骨髓源树突状细胞刺激。采用实时定量 PCR 法,检测不同刺激组小胶质细胞和树突状细胞 p28 基因 mRNA 的转录水平。Western blot 法检测不同刺激组细胞 IL-27 蛋白表达水平。**结果:**LPS 刺激和 LPS 与 IFN- γ 共刺激的小胶质细胞和树突状细胞 p28 mRNA 表达与空白组相比明显升高(小胶质细胞: $P_{LPS\ 0.50\ \mu g/ml}=0.029$; $P_{LPS+IFN-\gamma}=4\times 10^{-7}$;树突状细胞: $P_{0.50\ \mu g/ml}=0.021$; $P_{LPS+IFN-\gamma}=8\times 10^{-7}$),凋亡细胞预刺激组 p28 基因 mRNA 转录水平明显低于 LPS 和 IFN- γ 刺激组,差异有统计学意义(小胶质细胞: $P_{LPS+凋亡细胞}=1.2\times 10^{-4}$; $P_{IFN-\gamma+LPS+凋亡细胞}=1\times 10^{-7}$;树突状细胞: $P_{LPS+凋亡细胞}=3\times 10^{-4}$; $P_{IFN-\gamma+LPS+凋亡细胞}=2\times 10^{-7}$)。IL-27 蛋白表达水平在 LPS 和 IFN- γ 刺激组明显增加(小胶质细胞: $P_{LPS\ 0.25\ \mu g/ml}=0.022$; $P_{LPS+IFN-\gamma}=8\times 10^{-7}$;树突状细胞: $P_{LPS\ 0.50\ \mu g/ml}=0.021$; $P_{LPS+IFN-\gamma}=2\times 10^{-7}$),在凋亡细胞预刺激组表达下降(小胶质细胞: $P_{LPS+凋亡细胞}=9.6\times 10^{-5}$; $P_{IFN-\gamma+LPS+凋亡细胞}=3\times 10^{-7}$;树突状细胞: $P_{LPS+凋亡细胞}=0.001$; $P_{IFN-\gamma+LPS+凋亡细胞}=1.1\times 10^{-5}$)。**结论:**中枢抗原递呈细胞在 LPS 和 IFN- γ 刺激下 IL-27 p28 mRNA 和 IL-27 蛋白表达增加,吞噬凋亡细胞后 IL-27 p28 mRNA 和 IL-27 蛋白表达下降。

【关键词】小胶质细胞;树突状细胞;凋亡细胞;抗原递呈细胞;白细胞介素-27**【中国图书分类法分类号】**R392.11;R741.02**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2012-12-07

作者介绍:黄 琦,Email:freemighthuang@163.com,

研究方向:神经病学免疫。

通信作者:秦新月,Email:qinxinyue@yahoo.com。

基金项目:国家自然科学基金面上资助项目(编号:81271307)。

- [3] Zhang X, Liu W, Niu X, et al. Systemic administration of catalpol prevents D-galactose induced mitochondrial dysfunction in mice[J]. *Neurosci Lett*, 2010, 473(3): 224-228.
- [4] Zhu H F, Wan D, Luo Y, et al. Catalpol increases brain angiogenesis and up-regulates VEGF and EPO in the rat after permanent middle cerebral artery occlusion[J]. *Int J Biol Sci*, 2010, 6(5): 443-453.
- [5] Liang J H, Du J, Xu L D, et al. Catalpol protects primary cultured cortical neurons induced by Abeta(1-42) through a mitochondrial-dependent caspase pathway[J]. *Neurochem Int*, 2009, 55(8): 741-746.
- [6] Pellow S, Chopin P, File S E, et al. Validation of open/closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat[J]. *J Neurosci Methods*, 1985, 14(3): 149-167.
- [7] 李广诚, 杨 聘, 董克礼. 两种不同老年痴呆模型鼠学习记忆能力和探索行为的比较[J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2008, 17(2): 109-110.
- Li G C, Yang P, Dong K L. A comparative study on spatial learning and memory and explore behavior between two kinds of Alzheimer's disease model[J]. *Chinese Journal of Behavioral Medical and Brain Science*, 2008, 17(2): 109-110.
- [8] Götz J, Ittner L M. Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2008, 9(7): 532-544.
- [9] 宗园媛, 王晓映, 王海林, 等. APP/PS 双转基因阿尔茨海默病小

- 鼠模型的老年斑及行为学动态分析[J]. *中国比较医学杂志*, 2008, 18(9): 8-12.
- Zong Y Y, Wang X Y, Wang H L, et al. Continuous analysis of senile plaque and behaviors in APP/PS1 double-transgenic gene mouse model of Alzheimer disease[J]. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2008, 18(9): 8-12.
- [10] Zhang X L, An L J, Bao Y M, et al. D-galactose administration induces memory loss and energy metabolism disturbance in mice: Protective effects of catalpol[J]. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46(8): 2888-2894.
- [11] 刘 硕, 胡雅儿, 夏宗勤. 小鼠脑内注射 A β 25-35 记忆和 M 受体变化及梓醇的调节作用[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2007, 27(8): 945-948.
- Liu S, Hu Y E, Xia Z Q. Changes of memory and M receptor injection of A β 25-35 into basal ganglion region of forebrain and effect of catalpol[J]. *Journal of Shanghai Jiaotong University (Medical Science)*, 2007, 27(8): 945-948.
- [12] 奚耕思, 张武会. 抑郁症发生机制研究进展[J]. *陕西师范大学学报(自然科学版)*, 2011, 39(6): 64-71.
- Xi G S, Zhang W H. Research advances on mechanisms of depression[J]. *Journal of Shaanxi Normal University (Natural Science Edition)*, 2011, 39(6): 64-71.

(责任编辑:关蕴良)