

神经病学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000442

慢性脑缺血对 APP/PS1 双转基因小鼠行为学及脑组织形态学的影响

杜烨鸿, 王凌晞, 姚秋会, 贺桂琼, 骆世芳, 徐明亮

(重庆医科大学神经科学研究中心, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨慢性脑缺血对 APP/PS1 双转基因阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)模型小鼠的行为学以及脑组织形态学的影响。**方法:**将 20 只 3 月龄 APP/PS1 AD 模型小鼠随机分成 2 组, 每组 10 只, 对其中一组采用改良的双侧颈总动脉狭窄术, 另一组双侧颈总动脉未结扎小鼠为假手术对照组。术后 1 个月分别采用 Morris 水迷宫、组织学和免疫组化染色, 检测模型组和假手术组小鼠行为学的改变、海马区神经细胞形态学的改变、海马区神经细胞内 NeuN 和 APP 及 A β 的表达变化。**结果:**行为学实验结果: (1) 可视平台下, 2 组小鼠找到平台的时间($t=1.31, P=0.19$)及搜索的平均路程($t=0.04, P=0.97$)无显著差异; (2) 隐蔽平台下, 脑缺血模型组小鼠(26.39 ± 1.37)找到平台的时间较假手术对照组(20.19 ± 1.19)明显延长($t=3.44, P=0.00$); (3) 空间探索实验中, 经过平台的次数, 脑缺血模型组小鼠(3.11 ± 0.37)较对照组(4.25 ± 0.34)明显减少($t=2.24, P=0.03$)。HE 染色: 脑缺血模型组小鼠海马内神经细胞明显肿胀、细胞排列紊乱。免疫组化结果: 脑缺血模型组小鼠海马内 NeuN 阳性神经元数量(93.40 ± 10.44)较对照组(156.20 ± 24.16)显著减少($t=2.39, P=0.04$); 而 APP-阳性神经元($t=2.35, P=0.047$)、A β 40-阳性神经元($t=2.54, P=0.04$)以及 A β 42-阳性神经元($t=2.476, P=0.04$)较假手术组明显增加。**结论:**本实验新建立的改良双侧颈总动脉狭窄术能导致小鼠慢性脑缺血; 慢性脑缺血可加速 APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠的病理进程。

【关键词】双侧颈总动脉狭窄术; 慢性脑缺血; 阿尔茨海默病; 小鼠

【中图分类号】R332.81

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-07-24

Effect of chronic cerebral ischemia on the behavior and brain morphology of APP/PS1 double transgenic mice

Du Yehong, Wang Lingxi, Yao Qiuhui, He Guiqiong, Luo Shifang, Xu Mingliang

(Institute of Neuroscience, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To explore the effect of chronic cerebral ischemia on the behavioral and brain morphology changes in the APP/PS1 double transgenic Alzheimer's disease (AD) model mice. **Methods:** Totally 20 three-month-old APP/PS1 AD mice randomly divided into model group ($n=10$) and control group ($n=10$). APP/PS1 double transgenic mice in model group were subjected to modified chronic cerebral hypoperfusion with bilateral common carotid artery permanent ligation. Morris water maze test, histologic and immunohistochemistry were used to detect the changes of spatial learning and memory, the hippocampal morphology changes and the expressions of NeuN, APP, A β 40 and A β 42 in the brain of APP/PS1 double transgenic mice with one-month chronic cerebral ischemia and its control counterparts. **Results:** Behavioral experimental results: (1) There was no significant difference between two groups in the escape latency and path in the visible platform tests. (2) The escape latency was significantly longer in model group than in control group in the hidden platform tests. (3) The number of passing times was significantly lower in model group than in control group. HE staining showed obvious swelling of neuron in the hippocampus and disordered cell arrangement in model group. Immunohistochemistry showed that the number of neuron was significantly lower in model mice group than in control group. Expressions of NeuN were significantly lower in model group than in control group. Expressions of APP, A β 40 and A β 42 were significantly higher in model group than in control group. **Conclusion:** A new modified bilateral carotid artery permanent ligation is established, which can lead to chronic cerebral ischemia. Chronic cerebral ischemia may accelerate the pathological progression of APP/PS1 double transgenic AD mice.

【Key words】 bilateral common carotid artery permanent ligation; chronic cerebral ischemia; Alzheimer's disease; mice

作者介绍: 杜烨鸿, Email: dudu0000807@126.com。

研究方向: 阿尔茨海默病发病机制的研究。

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: 81371221); 教育部

“新世纪优秀人才”支持计划(编号: NCET-11-1084); 留

学人员科技活动项目择优资助[渝人社办(2011)235号];

重庆医科大学大学生科研与创新实验项目(编号: 201227)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150112.1652.007.html>

(2015-01-12)

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是老年人群中发病率最高、危害最大的中枢神经系统退行性疾病之一,是临床上痴呆的主要类型,以进行性认知功能障碍、记忆力减退为主要临床特征。AD 有家族性和散发性 2 种类型,前者约占 5%,主要由基因突变引起,后者约占 95%,目前病因尚不清楚,而年龄和血管因素被认为是散发性 AD 的重要危险因素。AD 脑内的特征性病理变化除老年斑、神经原纤维缠结、神经元丢失和胶质细胞活化外,还有脑淀粉样血管病 (cerebral amyloid angiopathy, CAA) 等血管病变,在 AD 早期或超早期即有脑血流减少。那么,慢性脑缺血在 AD 发生发展过程中究竟起什么作用?是引起 AD 的直接原因还是 AD 的一种病理结果?目前尚不清楚。而慢性脑缺血相对于急性、严重的缺血性卒中具有较长的可干预时间窗。因此,弄清慢性脑缺血与 AD 的关系,将为该病的预防和治疗提供新的措施和思路,早期诊断和处理脑低灌注、对可干预的血管危险因素进行干预,不仅可预防心脑血管事件,也将有利于 AD 的防治。

鉴于此,本课题以 APP/PS1 双转基因小鼠为研究对象,通过改良的双侧颈总动脉狭窄术建立慢性缺血模型,观察 AD 模型小鼠在慢性缺血后行为学以及形态学的改变。

1 材料和方法

1.1 动物来源及分组

购买 3 月 APP/PS1 双转基因小鼠雄性 20 只 (购自中国医学科学院实验动物研究所),饲养于重庆医科大学 SPF 级,随机分成脑缺血组和假手术对照组,各 10 只。各组小鼠手术前常规饮食。

1.2 主要试剂及设备

二步法免疫组化试剂盒 (北京中杉金桥);二氨基联苯胺试剂盒 (北京中杉金桥);APP 多克隆抗体 (Abcam 公司,美国);A β 40 多克隆抗体 (Abcam 公司,美国);A β 42 多克隆抗体 (Abcam 公司,美国);NeuN 单克隆抗体 (Millipore 公司,美国)。Morris 水迷宫 (由重庆医科大学大学提供)。

1.3 模型的制备

将小鼠用 3.5% 水合氯醛 (1 mg/kg,腹腔注射)麻醉后,将小鼠仰卧固定于手术台上,常规消毒,切开颈正中皮肤,钝性分离皮下组织,先分离一侧颈总动脉,注意不要牵拉迷走神经,模型组在颈总动脉旁放置鱼线,并且用 2 根细丝线先结扎一端颈总动脉,抽出鱼线,15 min 后,另一侧同样操作,逐层缝合皮肤;而对照组则仅分离双侧颈总动脉,然后缝合皮肤。

1.4 实验方法

1.4.1 慢性脑缺血术后 1 个月行为学测定 术后观察小鼠精神状况、饮食以及成活率,于术后 1 月使用 Morris 水迷宫对小鼠进行空间学习记忆的测定。

可视平台试验:在水池里放入清水,将水池分为 4 个象限 (从右上、左上、左下和右下,分别是 1~4 象限),将平台放于 4 象限中间,使平台高于水面,水温最好控制在 24 ℃ 左右,将小鼠从任一象限放入水中,每个象限各 1 次,每次 1 min,观察小鼠找到平台的时间 (即潜伏期) 以及游泳路径。隐蔽平台试验:与可视平台相同,但是平台要低于水面,若小鼠在 1 min 中内未找到平台,则潜伏期为 1 min,之后要将其放置于平台 10 s,若在 1 min 内找到平台,也要将其在平台上站 10 s,方结束 1 次训练,记录各象限潜伏期。如此训练 5 d。空间探索试验:在隐蔽平台训练结束后 1 d,将平台撤除,然后将小鼠从各象限放入水中,测其 1 min 内经过原始平台的次数以及原始平台所在象限游程占总游程的百分比。

1.4.2 慢性脑缺血术后 1 个月 HE 染色 常规脱蜡,脱水,浸入苏木素 10 min,水冲洗,盐酸酒精分化,流水冲洗,伊红浸染 5 min,流水冲洗脱水,透明,封片。

1.4.3 慢性脑缺血术后 1 个月免疫组织化学染色 常规脱蜡,脱水,PBS 洗 5 min $\times$ 3 次,抗原修复,PBS 洗 5 min $\times$ 3 次,过氧化氢消除抗氧化酶的影响,滴一抗 4 ℃ 过夜,PBS 洗 5 min $\times$ 3 次,滴二抗 37 ℃ 30 min,PBS 洗 5 min $\times$ 3 次,DAB 显色,镜下观察,随机选取 5 个 400 $\times$ 海马区不重叠的视野,计算阳性神经元进行计数。

1.5 统计学处理

使用 SPSS 17.0 软件进行数据处理,数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组比较用 t 检验,对同一因变量进行重复测量时采用重复测量方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

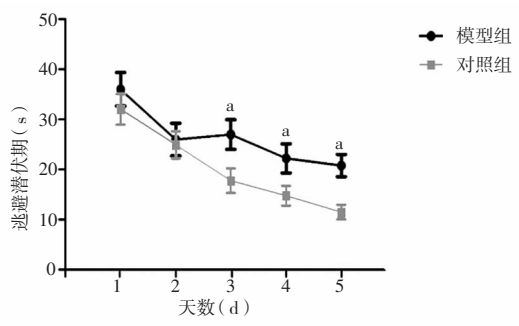
2.1 基本情况

模型组 1 周内饮食精神欠佳,手术 1 月后,模型组存活 9 只,存活率与对照组无统计学差异。

2.2 Morris 水迷宫行为学指标

在第 1 天的可视平台实验中,模型组和假手术组数组小鼠潜伏期 ($t=1.31, P=0.19$) 以及游泳路径 ($t=0.04, P=0.97$) 没有明显差别,说明慢性脑缺血对游泳能力影响较小。

隐蔽平台试验:进行多变量分析结果显示,慢性脑缺血组和假手术组都随着天数的增加,逃避潜伏期逐渐减短,而且各个时间点的数据差异都有统计学意义 (时间的 $F=13.67, P=0.00$),而时间和分组无交互作用,时间因素 (即 1、2、3、4、5 d) 的作用不随分组的不同而不同 (时间 $\times$ 组的 $F=0.868, P=0.49$)。通过对分组的方差分析,结果显示慢性脑缺血组的逃避潜伏期则显著比假手术组长 ($F=12.61, P=0.00$),说明在慢性脑缺血后会对小鼠的空间学习记忆产生一定的影响。见图 1。



a, 与对照组比较, $P < 0.05$

图1 隐蔽平台逃避潜伏期 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

Fig.1 Escape latency of hidden platform ($n=10, \bar{x} \pm s$)

空间探索试验:慢性脑缺血后的小鼠在 60 s 内穿越平台的次数为 (3.11 ± 0.37), 相比与假手术组 (4.25 ± 0.34) 具有显著差异 ($t=2.24, P=0.03, n=10$), 而且慢性脑缺血的小鼠在池内的运动毫无规律可言。这说明慢性缺血后的小鼠可能存在一定程度的记忆力损伤。

2.3 组织学观察

HE 染色显示对照组(假手术组)的 CA1 区的神经元细胞形态正常, 而且排列有序, 细胞边界以及核仁都清晰可见, 细胞核大而圆; 而模型组(改良颈总动脉狭窄组)在海马 CA1 区的细胞排列紊乱, 其中可见到肿胀或者皱缩的神经元, 而且存在细胞核固缩等细胞凋亡的现象, 同时可观察到一些空泡的存在(图 2、图 3)。

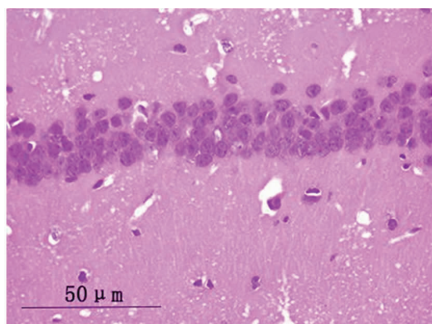


图2 对照组海马 CA1 区 HE 染色 (400 ×)

Fig.2 HE staining of CA1 in the control group (400 ×)

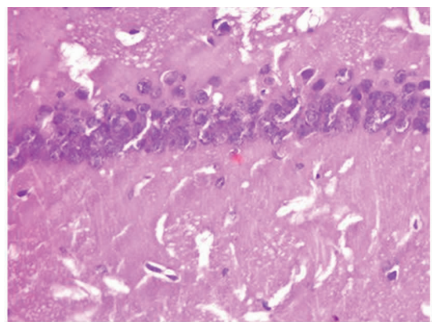


图3 模型组海马 CA1 区 HE 染色 (400 ×)

Fig.3 HE staining of CA1 in the model group (400 ×)

免疫组化检测 NeuN 结果显示:用 NeuN 标记神经元,模型组的神经元数量 (93.40 ± 10.44) 相比与假手术组 (156.20 ± 24.16) 显著降低 ($t=2.39, P=0.04$), 可见慢性脑缺血会影响小鼠脑内成熟神经元的表达数量, 从而造成神经元的减少, 可能与神经元凋亡相关(图 4、图 5)。

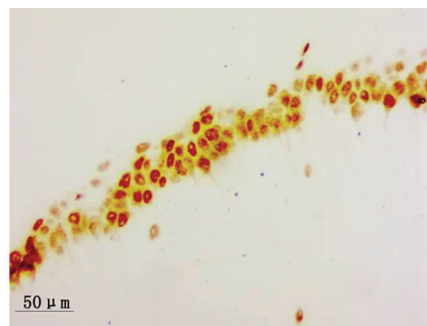


图4 对照组海马 CA1 区 NeuN 的表达
(免疫组化染色, 400 ×)

Fig.4 Expression of NeuN in the CA1 of control group
(immunohistochemistry, 400 ×)

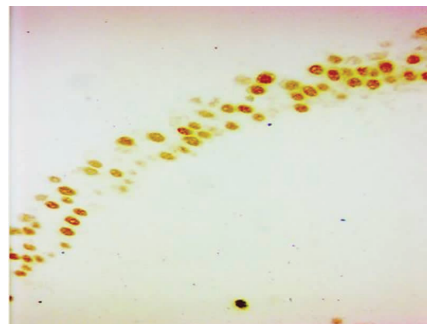


图5 模型组海马 CA1 区 NeuN 的表达
(免疫组化染色, 400 ×)

Fig.5 Expression of NeuN in the CA1 of model group
(immunohistochemistry, 400 ×)

免疫组化检测 APP、Aβ40 和 Aβ42 的结果:APP 在 APP/PS1 双转基因小鼠慢性缺血后脑内的表达明显增高 (134.00 ± 9.46), 与假手术组 (92.80 ± 14.74) 相比具有统计学意义 ($t=2.35, P=0.047$), 在对照组中可见 APP 主要分布于大脑皮质外颗粒层和锥体细胞层, 在模型组中 APP 可见于大脑皮层各层, 而且同时观察到慢性脑缺血后的 AD 模型小鼠脑内 APP 可以表达出老年斑(图 6、图 7)。提示慢性脑缺血与 AD 病程的发生发展相关。Aβ40 和 Aβ42 是 APP 裂解产物, AD 模型小鼠慢性缺血后 Aβ40 在脑内的表达 (115.80 ± 13.42) 显著高于假手术组 (76.40 ± 7.81), 具有统计学意义 ($t=2.54, P=0.04$) (图 8、图 9)。Aβ42 为老年斑的核心, 在 AD 模型小鼠慢性缺血后显著增高 (124.20 ± 8.08), 与假手术组 (86.60 ± 12.86) 相比具有统计学意义 ($t=2.476, P=0.04$) (图 10、图 11)。提示 AD 模型小鼠慢性缺血后可能加速 AD 的病理变化。

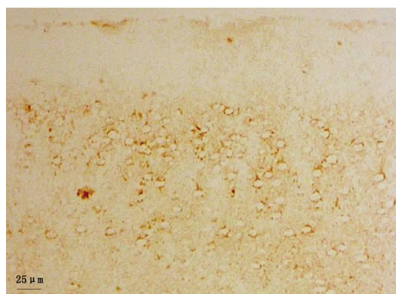


图 6 对照组大脑皮质区 APP 的表达 (免疫组化染色, 200 ×)
Fig.6 Expression of APP in the cerebral cortex of control group
(immunohistochemistry, 200 ×)

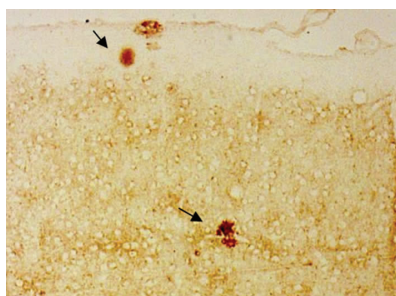


图 7 模型组大脑皮质区 APP 的表达 (箭头所指老年斑)
(免疫组化染色, 200 ×)
Fig.7 Expression of APP in the cerebral cortex of model group
(immunohistochemistry, 200 ×) (SP was indicated by arrow)

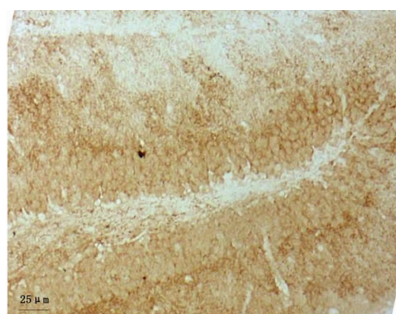


图 8 模型组齿状回区 Aβ40 的表达 (免疫组化染色, 200 ×)
Fig.8 Expression of Aβ40 in the Dentate gyrus of model group
(immunohistochemistry, 200 ×)

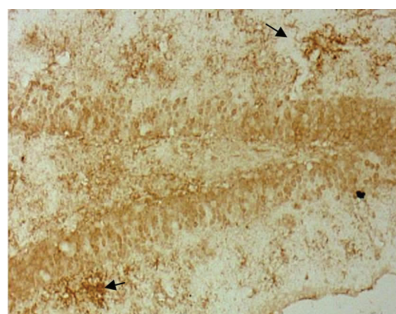


图 9 模型组齿状回区 Aβ40 的表达 (箭头所指老年斑)
(免疫组化染色, 200 ×)
Fig.9 Expression of Aβ40 in the dentate gyrus of model group
(immunohistochemistry, 200 ×) (SP was indicated by arrow)

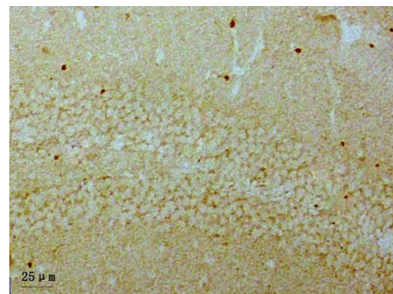


图 10 模型组海马区 Aβ42 的表达 (免疫组化染色, 200 ×)
Fig.10 Expression of Aβ42 in the hippocampus of model group
(immunohistochemistry, 200 ×)

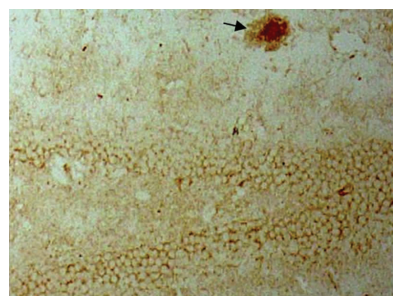


图 11 模型组海马区 Aβ42 的表达 (箭头所指老年斑)
(免疫组化染色, 200 ×)
Fig.11 Expression of Aβ42 in the hippocampus of model group
(immunohistochemistry, 200 ×) (SP was indicated by arrow)

3 讨论

慢性脑缺血是指各种原因引起的长期大脑整体水平的血流量灌注不足(低于 40~60 ml/min)^[1]。长期脑血流量灌注不足可能会使脑组织进行性缺血而引起一些病理变化,包括神经元凋亡^[2]、星形胶质细胞增生^[3]、免疫炎性氧化应激损伤^[4]以及能量代谢^[5]和认知功能^[6]出现障碍等。在 AD 病程的发生发展过程中常常合并脑缺血,脑缺血的患者又会出现一些阿尔茨海默病人的病理特征及行为表现,所以研究清楚缺血与 AD 的关系至关重要。之前常用的缺血动物模型是双侧颈总动脉结扎(2-VO)^[7],但是此方法用于大鼠比较成功,在小鼠中死亡率比较高。大脑中动脉栓塞则适用于急性大脑局灶性脑缺血,不能使全脑缺血。本实验所采用的双侧颈动脉狭窄术与常用的双侧颈动脉结扎有所不同,在颈动脉外放置鱼线,可以有效的降低小鼠的死亡率,容易操作,而且运用甲苯胺蓝灌注证明模型小鼠可以有效的造成全脑的缺血^[8],可见本实验所采取的模式为一

种有效的慢性缺血模型。

APP/PS1 双转基因小鼠具有 AD 患者的一些特征性病理变化,如老年斑的沉积,学习记忆能力的降低,神经元的凋亡,胶质细胞的增生等等,被认为是较为理想的 AD 动物模型。

APP 是淀粉样前体蛋白,主要有 3 种形式:APP695、APP751、APP770^[9]。家族性 AD 中 APP 基因突变可导致 APP 代谢途径的异常,突变的 APP 基因使 APP 蛋白的表达量上调^[11],APP 蛋白表达量的上调又可以反过来提示 AD 病理过程的加重。APP 的代谢则主要包括 2 种途径:一是在第 687 位氨基酸序列位点经过 α -分泌酶裂解为一些可溶性 α APPs 和 C83 片段多肽,而 C83 又经过 γ -分泌酶生成 P3,已经证实 α APPs 可以起到神经营养作用,与学习和记忆功能有关;二是通过 β -分泌酶和 γ -分泌酶的作用,生成 β -淀粉样肽 A β 40 和 A β 42。A β 42 是构成老年斑沉积的核心蛋白,而且是一种不溶性多肽,有很强的神经毒性^[12],但是 A β 42 只有在 A β 40 聚集的情况下才能聚集^[10]。A β 42 聚集后会激活小胶质细胞、自由基和神经毒素,同时会诱导炎症反应,激活凋亡信号通路,使 AD 患者的病情迅速恶化,所以 A β 被认为是 AD 发病过程中的核心环节^[12]。

运用 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠制作慢性脑缺血模型,可以用来探讨慢性脑缺血在 AD 的病理发展过程中究竟起到何种作用,Morris 水迷宫结果显示 AD 小鼠慢性缺血后空间记忆受到的损伤比 AD 小鼠更明显,提示慢性脑缺血影响了 AD 小鼠的空间记忆能力。HE 染色观察到海马区细胞排列紊乱,神经元皱缩,提示慢性脑缺血可能加速了神经元细胞的丢失,neuN 标记成熟神经元显示缺血后神经元数量显著降低,进一步证实慢性脑缺血可能加速了神经元细胞的丢失。A β 通常被认为是 AD 发病过程的核心环节,而该研究中发现 AD 模型小鼠慢性脑缺血后 A β 异常升高,提示慢性脑缺血可能加速了 AD 病程,那么 A β 究竟是如何升高的呢?根据实验结果推测,可能是由于慢性脑缺血引起 APP 的异常增高,从而使其代谢产物 A β 增高,加速了 AD 的病理过程。AD 是发病过程十分复杂的疾病,究竟 AD 患者在慢性脑缺血后是否还有其他机制能够参与到发病过程中来,还需要进一步的研究,但是就目

前研究表明,慢性脑缺血引起 AD 小鼠空间记忆的损伤,引起神经元的减少,APP 和 A β 的异常增高,都提示慢性脑缺血后可能会加速 AD 病程的发生发展。

参 考 文 献

- [1] 王丽晔,陈志刚,罗玉敏.动物慢性脑缺血模型的研究现状[J].中国比较医学杂志,2014,24(4):67-73.
- [2] Feng Z, Lu Y, Wu X, et al. Ligustilide alleviates brain damage and improves cognitive function in rats of chronic cerebral hypoperfusion[J]. J Ethnopharmacol, 2012, 144(2): 313-321.
- [3] Cechetti F, Pagnussat AS, Worm PV, et al. Chronic brain hypoperfusion causes early glial activation and neuronal death, and subsequent long-term memory impairment[J]. Brain Res Bull, 2012, 87(1): 109-116.
- [4] Deng Y, Lu J, Sivakumar V, et al. Amoeboid microglia in the periventricular white matter induce oligodendrocyte damage through expression of proinflammatory cytokines via MAP kinase signaling pathway in hypoxic neonatal rats[J]. Brain Pathol, 2008, 18(3): 387-400.
- [5] Staffen W, Berqmann J, Schonauer U, et al. Cerebral perfusion (HMPAO-SPECT) in patients with depression with cognitive impairment versus those with mild cognitive impairment and dementia of Alzheimer's type: a semiquantitative and automated evaluation[J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2009, 36(5): 801-810.
- [6] Atamna H, Frey WH 2nd. Mechanisms of mitochondrial dysfunction and energy deficiency in Alzheimer's disease[J]. Mitochondrion, 2007, 7(5): 297-310.
- [7] dela Torre JC, Fortin T, Park GA, et al. Chronic cerebrovascular insufficiency induces dementia-like deficits in aged rats[J]. Brain Res, 1992, 582(2): 186-195.
- [8] 王凌晔,刘刚,贺桂琼,等.慢性脑缺血对小鼠脑内星形胶质细胞的影响[J].重庆医科大学学报,2014,39(2):137-141.
- [9] Bandyopadhyay S, Rogers JT. Alzheimer's disease therapeutics targeted to the control of amyloid precursor protein translation: Maintenance of brain iron homeostasis[J]. Biochemical Pharmacology, 2014, 88(4): 486-494.
- [10] Nguyen PV, Woo NH. Regulation of hippocampal synaptic plasticity by cyclic AMP-dependent protein kinases[J]. Prog Neurobiol, 2003, 71(6): 401-437.
- [11] Tanzi RE, Bertram L. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective[J]. Cell, 2005, 120(4): 545-555.
- [12] Goure WF, Krafft GA, Jerecic J, et al. Targeting the proper amyloid-beta neuronal toxins: a path forward for Alzheimer's disease immunotherapeutics[J]. Alzheimers Res Ther, 2014, 6(4): 42.

(责任编辑:关蕴良)