

· 基础研究 ·

运动对快速老化小鼠海马 β -淀粉样蛋白及淀粉样蛋白前体蛋白的影响

吴冰洁 姜建勇 孙咏虹 岳巍 张玉森 刘敏 顾平 王铭维

【摘要】目的 研究运动对快速老化小鼠(SAMP)8 海马 β -淀粉样蛋白(A β)及淀粉样蛋白前体蛋白(APP)的影响,以探讨运动改善阿尔茨海默病(AD)学习记忆功能的机制。**方法** 将 40 只 3 月龄 SAMP8 小鼠采用单纯随机抽样法分为运动组和对照组,运动组进行跑笼运动训练,第 1 个月每周训练 5 d,每天 10 min,第 2 个月每周训练 5 d,每天 20 min。2 个月后采用 H-E 染色观察 2 组小鼠海马神经元形态改变;免疫组织化学技术检测海马 A β 免疫阳性细胞的表达;逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术检测海马 APP mRNA 的表达水平。**结果** 对照组 5 月龄 SAMP8 小鼠海马部分神经元细胞变性、死亡,核浓缩,空泡变性;运动组偶有神经元细胞变性、死亡,大部分细胞形态正常。运动组海马 A β 免疫阳性细胞表达水平为(0.192 ± 0.018),明显低于对照组的(0.274 ± 0.017)($P < 0.05$);运动组海马 APP mRNA 表达水平为(0.168 ± 0.059),明显低于对照组的(0.574 ± 0.115)($P < 0.01$)。**结论** 运动可以延缓 SAMP8 小鼠海马神经元变性,降低海马 A β 及 APP 的表达,这可能是运动改善 AD 学习记忆功能的重要机制之一。

【关键词】 运动; 快速老化; β -淀粉样蛋白; 淀粉样蛋白前体蛋白; 阿尔茨海默病

Effects of movement on hippocampus β -amyloid protein and amyloid precursor protein in senescence-accelerated/prone mice WU Bing-jie*, JIANG Jian-yong, SUN Yong-hong, YUE Wei, ZHANG Yu-miao, LIU Min, GU Ping, WANG Ming-wei. * Department of Rehabilitation Medicine, The 2nd Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China

Corresponding author: WANG Ming-wei, Email: wmw@jyy.com.cn

【Abstract】 Objective To explore the effects of movement on hippocampal β -amyloid protein (A β) and amyloid precursor protein (APP) in senescence-accelerated and senescence-prone (SAMP8) mice, and the mechanism by which movement improves learning and memory in mice with a model of Alzheimer's disease. **Methods** Forty 3-month-old SAMP8 mice were divided randomly into a movement group and a control group. The movement group was trained with a running wheel 10 min daily, 5 days a week in the first month, and 20 min daily in the second month. Morphological changes in the hippocampus were observed under the microscope after HE staining. The expression of A β in the hippocampus was detected by immunohistochemical methods and APP mRNA expression was detected by RT-PCR two months later. **Results** HE staining showed neuron degeneration and death, chromatin condensation and vacuolar degeneration in the hippocampus of the 5-month-old SAMP8 mice of the control group. The movement group showed less neuron degeneration and death, and the morphology of most cells was normal. The expression of A β in the hippocampus of the 5-month-old SAMP8 mice in the movement group was significantly lower than that in the control group. APP mRNA expression levels in the movement group were also significantly lower. **Conclusions** Movement can delay neuron degeneration and down-regulate A β and APP mRNA expression levels in the hippocampus of SAMP8 mice. It may be an important mechanism by which movement improves learning and memory in mice with a model of Alzheimer's disease.

【Key words】 Movement; Senescence; β -Amyloid protein; Amyloid precursor protein; Alzheimer's disease

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2011.01.002

基金项目:河北省卫生厅医学科学研究重点课题(20090092)

作者单位:050000 石家庄,河北医科大学第二医院康复医学科(吴冰洁、姜建勇、孙咏虹、岳巍、张玉森、刘敏);河北医科大学第一医院神经内科(王铭维、顾平);河北省脑老化与认知神经科学实验室(王铭维、顾平、吴冰洁)

通信作者:王铭维,Email:wmw@jyy.com.cn

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是以学习记忆和认知功能障碍为主要表现的一种神经变性疾病。老年斑是 AD 脑组织主要病理特征之一,其核心是 β 淀粉样蛋白(β -amyloid protein, A β)^[1],而 A β 则来源于其前体物质——淀粉样蛋白前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)。研究表明,APP 的过度表达

能引起神经元病变,如在离体实验中导致神经元样细胞死亡,及在在体研究中实验动物脑内出现淀粉样物质沉积并导致认知损害^[2]。APP 的过度表达及异常途径的裂解可能是 A β 沉积形成及 AD 发病的始动因素^[3]。

快速老化小鼠 (senescence accelerated mouse/prone, SAMP) 是研究衰老及衰老相关性疾病的理想动物模型之一。其中, SAMP8 具有寿命短、老化快、躯体和脑组织老化病理改变典型等特点,其作为一种比较理想的 AD 模型正被广泛应用^[4-5]。我们的前期研究证实,5 月龄 SAMP8 表现出一定的学习记忆能力受损,而运动可显著改善 SAMP8 小鼠的学习记忆能力^[6]。本实验通过采用免疫组织化学技术检测海马 A β 免疫阳性细胞表达,采用逆转录-聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 技术检测海马 APP mRNA 的表达,旨在探讨运动改善 AD 学习记忆功能的可能机制。

材料与方法

一、动物及分组

SAMP8 小鼠由香港中文大学解剖系姚大卫教授赠送。所有小鼠均接受标准啮齿类动物食物并自由进水。入选小鼠经过预选,有明显缺陷(如外部肿瘤、运动能力受限)者被剔除。入选雄性 3 月龄 SAMP8 小鼠 40 只,体重 (26.39 ± 1.95) g。采用单纯随机抽样法将小鼠分为运动组和对照组,每组 20 只。

二、运动训练方法

运动组每日进行跑笼运动训练,使用直径 15 cm、栅距 1 cm 的圆形跑笼(图 1),将小鼠放入跑笼后,自其开始主动运动后计时。第 1 个月每周训练 5 d,每天 10 min;第 2 个月每周训练 5 d,每天 20 min。对照组常规饲养,不做任何运动。2 个月后取材进行相关检测。

三、H-E 染色及免疫组织化学检测

每组取 10 只小鼠,采用 4% 水合氯醛 (0.03 mg/g 体重) 麻醉;快速开胸暴露心脏,经左心室插管,剪开右心耳,灌注生理盐水,待冲净血液后,灌注 4% 多聚甲醛;断颈取脑,标本固定于 4% 多聚甲醛中;24 h 后将固定好的组织块脱水、透明、石蜡包埋,行 6 μ m 厚连续冠状切片。H-E 染色:苏木精、伊红染色,常规脱水、透明、封片。免疫组织化学检测:采用 SP 法染色,具体操作步骤参照试剂盒说明书(兔抗 IgG 多克隆抗体购自美国 Santa Cruze 公司,SP9001 试剂盒购自北京中山生物技术有限公司),3,3'-二氨基联苯显色,常规脱水、透明、封片。阴性对照用磷酸盐缓冲液替代一抗,余步骤相同。于光学显微镜下观察海马神经元形

态改变及 A β 免疫组织化学阳性产物的分布,在相同的放大倍数下,每个标本计数 3 张切片,每个切片计数 10 个视野,应用厦门产 Motic Med 6.0 数码医学图像分析系统测定海马 CA3 区免疫反应产物的光密度值,反映 A β 免疫阳性细胞的表达。

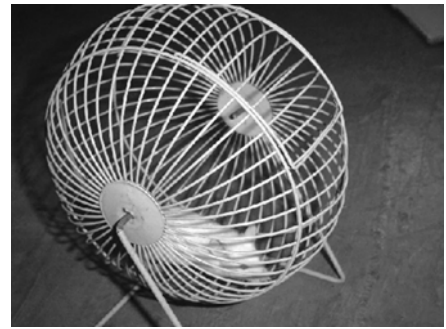


图 1 跑笼运动

四、RT-PCR 检测

每组取 10 只小鼠快速断颈,迅速取出脑组织,冰台上分离两侧海马,液氮中冻存备用。用 Trizol 法提取总 RNA,以 β -actin 为内参照, β -actin 上游引物序列为 5'TCG GGG CAT CGG AAC CGC TCA 3',下游引物序列为 5'GAG ACC TTC AAG ACC CCA GCC 3',扩增片段长度 404 bp;APP 上游引物序列为 5'ATC GCC ATG TTC TGT GGT AAA 3',下游引物序列为 5'CCA ACT AGG CAA CGG TAA GGA 3',扩增片段长度 260 bp。采用 RT-PCR 技术测定 mRNA 的相对表达量。总 RNA 提取试剂盒、RT 试剂盒、PCR 试剂盒均为 Fermentas 公司产品,Taq DNA 聚合酶、dNTP 等 PCR 反应体系购自 Promega 公司,APP 引物由上海生工生物工程技术有限公司鉴定、合成。应用江苏产捷达凝胶成像分析系统分析目的 RNA 扩增产物与内参照 β -actin 的 RNA 扩增产物的积分光密度值 (integrated optical density, IOD),计算二者的比值 ($IOD_{\text{目的基因}} / IOD_{\beta\text{-actin}}$),作为目的 RNA 的相对表达量。

五、统计学分析

所有数据处理均采用 SPSS 10.0 版统计分析软件,数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用方差分析检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

一、海马形态改变

H-E 染色可见对照组 SAMP8 小鼠海马部分神经元细胞变性、死亡,核浓缩,空泡变性;运动组偶有神经元细胞变性、死亡,大部分细胞形态正常,见图 2。

二、A β 免疫阳性细胞的表达

免疫组织化学染色后,光镜下 2 组小鼠海马 CA1、

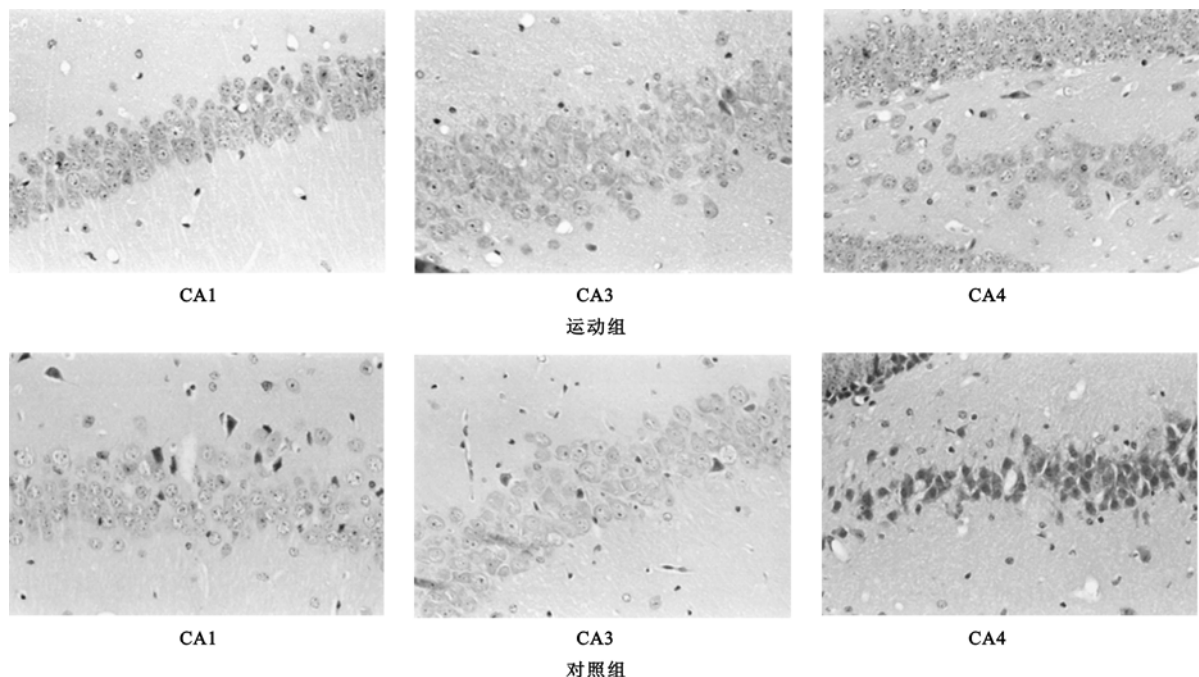


图2 SAMP8 海马形态学观察(H-E 染色, ×400)

CA3 和 CA4 区均可见阳性反应物(棕黄色颗粒),分布于神经元胞膜和胞浆中,以海马 CA3 区最明显。运动组海马 CA3 区 Aβ 免疫阳性细胞数目较少,着色较浅,免疫阳性反应产物的平均光密度值为(0.192 ± 0.018);对照组 Aβ 免疫阳性细胞数目较多,胞浆着色明显加深,并且出现细胞外阳性着色,免疫阳性反应产物的平均光密度值为(0.274 ± 0.017)。运动组海马 CA3 区 Aβ 免疫阳性反应产物的平均光密度值明显低于对照组($P < 0.05$)。见图 3。

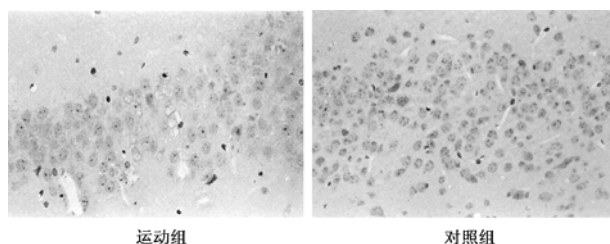


图3 SAMP8 海马 CA3 区 Aβ 表达(免疫组织化学染色, ×400)

三、海马 APP mRNA 的表达

2 组小鼠海马组织在 260 bp 处可见一特异性条带,与预期结果一致。运动组 APP mRNA 表达量为(0.168 ± 0.059),明显低于对照组的(0.574 ± 0.115) ($P < 0.01$)。见图 4。

讨 论

AD 的主要病理特征为脑组织 Aβ 积聚过度。越来越多的研究证明,AD 患者脑内 Aβ 浓度增高,导致脑功能障碍,从而引起早发性学习记忆能力障碍^[7-8]。

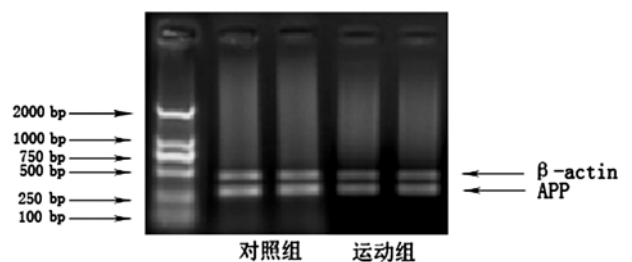


图4 2 组 SAMP8 小鼠海马 APP mRNA 电泳图

而过量表达 APP 的转基因鼠模型与 AD 模型几乎具有完全相同的学习记忆缺陷和病理改变^[9-10],因此认为 APP 表达量的增高也是 AD 的主要病理特征之一。并由此推测 APP 的过度产生,可使细胞内 Aβ 产生增多、积聚,对成熟神经元起毒性作用,引起神经细胞变性、死亡,从而造成学习记忆功能减退、认知功能障碍等,导致痴呆的发生^[11]。

快速老化小鼠是日本京都大学 Takeda 等人通过对 AKR/J 系小鼠进行选择性地近交繁育、筛选得到的品系,分为两个亚系,即 P 系和 R 系。前者称为 SAMP,表现为脱毛、皮肤粗糙、学习记忆能力障碍及生存期缩短等衰老现象;后者称为抗快速老化小鼠(senescence accelerated mouse/resistance, SAMR),有正常的衰老过程。SAMP 中的每一个亚系都具有特殊的病理或行为学特征,其中 SAMP8 显示出早期老化和加速老化的特点,早在 2 月龄就开始出现学习记忆功能衰退,并随年龄增长而加重^[12-13]。有研究还发现,SAMP8 小鼠海马 Aβ 和 APP mRNA 表达亦随年龄增长而增加,老龄期还可出现 Aβ 斑块沉积^[14]。

Morley 等^[15-16] 使用抗 A β 抗体脑室内注射,发现 SAMP8 小鼠认知和记忆能力得到明显改善;而 12 月龄 SAMP8 小鼠海马内 APP 的表达量是 4 月龄鼠的 4 倍。Kumar 等^[17] 进一步证实, SAMP8 小鼠海马中 APP 表达量的显著升高始于 8 月龄。因此,我们推测 A β 和 APP 在 SAMP8 小鼠认知和记忆减退中起着重要作用。

本实验发现,光镜下 SAMP8 小鼠海马 CA1 区部分神经元细胞变性、死亡,多表现为核浓缩,空泡变性。推测可能与 A β 的过度表达导致神经元不可逆性损伤有关,而大量神经元缺失又可导致脑的不可逆性损伤,最终造成 AD 患者的认知功能障碍。但具体机制尚有待于我们进一步研究。

近年来,AD 的康复治疗越来越受到重视。有研究发现,运动训练可对抗认知功能缺损、增加大脑的“认知储备”,使 AD 的发生率下降 60%^[18-19]。我们前期的研究也已证实,运动训练可显著改善 SAMP8 小鼠的学习和记忆能力^[6]。Adlard 等^[20] 研究发现, TgCRND8 转基因 AD 模型小鼠随意跑笼运动 5 个月后,酶联免疫吸附测定法检测发现,海马 A β 1 ~ 40 减少 35%, A β 1 ~ 42 减少 22%;而 APP 蛋白表达与对照组比较,差异无统计学意义。本研究检测了 5 月龄 SAMP8 小鼠海马 A β 免疫阳性细胞表达及 APP mRNA 的表达,结果显示运动组上述指标均明显低于对照组 ($P < 0.05$)。

海马是与认知能力关系最密切的部位,脑损害时,海马又是最易受影响的脑区之一。AD 导致认知能力明显下降的可能机制有以下几个方面:①海马 CA1 区神经元丧失;②白质损害引起信号传导障碍;③突触数量和结构异常。我们推测, SAMP8 小鼠海马 A β 增多、沉积及 APP mRNA 表达增高所致神经元不可逆损伤,可能是 SAMP8 学习、记忆能力减退的可能机制之一;而运动训练可通过延缓 SAMP8 小鼠海马神经元变性,降低海马 A β 及 APP 的表达来改善其学习记忆功能。

参 考 文 献

- [1] 王德生,张守信.老年性痴呆.北京:人民卫生出版社,2002:28-32.
- [2] Delacourte A, Sergeant N, Wattez A, et al. Tau aggregation in the hippocampal formation: an aging or a pathological process? *Exp J Gerontol*, 2002, 37: 1291-1296.
- [3] Bayer TA, Wirths O, Majtenyi K, et al. Key factors in Alzheimer's diseases: beta-amyloid precursor protein processing, metabolism and intraneuronal transport. *Brain Pathol*, 2001, 11: 1-11.
- [4] Zhang L, Li Q, Wolff LT, et al. Changes of brain activity in the aged SAMP mouse. *Biogerontology*, 2007, 8: 81-88.
- [5] Colas D, Gharib A, Bezin L, et al. Regional age-related changes in neuronal nitric oxid synthase (nNOS), messenger RNA levels and activity in SAMP8 brain. *BMC Neurosci*, 2006, 7: 81-84.
- [6] 吴冰洁,王铭维,顾平,等.丰富环境结合运动训练对快速衰老小鼠学习记忆能力的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2008, 30: 8-11.
- [7] Gitter BD, Cox LM, Rydel RE, et al. Amyloid β peptide potentiates cytokine secretion by interleukin-1 β -activated human astrocytoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 10738-10741.
- [8] Takahashi RH, Milner TA, Li F, et al. Intraneuronal Alzheimer A β 42 accumulates in multivesicular bodies and is associated with synaptic pathology. *Am J Pathol*, 2002, 161: 1869-1879.
- [9] Games D, Adams D, Alessandrini R, et al. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature*, 1995, 373: 523-527.
- [10] Hsiao KK, Borchelt DR, Olson K, et al. Age-related CNS disorder and early death in transgenic FVB/N mice overexpressing Alzheimer amyloid precursor proteins. *Neuron*, 1995, 15: 1203-1218.
- [11] Nakayama T, Sawada T. Involvement of microtubule integrity in memory impairment caused by colchicines. *Pharmacol Biochem Behav*, 2002, 71: 119-138.
- [12] Petursdottir AL, Farr SA, Morley JE, et al. Lipid peroxidation in brain during aging in the senescence accelerated mouse (SAM). *Neurobiol Aging*, 2007, 28: 1170-1178.
- [13] Brandewiede J, Schachner M, Morellini F. Ethological analysis of the senescence-accelerated P/8 mouse. *Behav Brain Res*, 2005, 158: 109-121.
- [14] Cho HS, Kim SS, Choi W, et al. Age-related changes of mRNA expression of amyloid precursor protein in the brain of senescence accelerated mouse. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 1995, 112: 399-404.
- [15] Morley JE, Farr SA, Flood JF. Antibody to amyloid β protein alleviates impaired acquisition, retention, and memory processing in SAMP8 mice. *Neurobiol Learn Mem*, 2002, 78: 125-138.
- [16] Morley JE, Kumar VB, Bernardo AE, et al. Beta-amyloid precursor polypeptide in SAMP8 mice affects learning and memory. *Peptides*, 2000, 21: 1761-1767.
- [17] Kumar VB, Farr SA, Flood JF, et al. Site-directed antisense oligonucleotide decreases the expression of amyloid precursor protein and reverses deficits in learning and memory in aged SAMP8 mice. *Peptides*, 2000, 21: 1769-1775.
- [18] Laurin D, Verreault R, Lindsay J, et al. Physical activity and risk of cognitive impairment and dementia in elderly persons. *Arch Neurol*, 2001, 58: 498-504.
- [19] Studenski S, Carlson MC, Fillit H, et al. From bedside to bench: does mental and physical activity promote cognitive vitality in late life? *Sci Aging Knowledge Environ*, 2006, 28: 21-23.
- [20] Adlard PA, Perreau VM, Pop V, et al. Voluntary exercise decreases amyloid load in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 2005, 25: 4217-4221.

(修回日期:2010-09-20)

(本文编辑:吴倩)