

β -淀粉样多肽低分子量寡聚体对大鼠学习记忆功能的影响*

刘盈盈^{1,2} 杨玲^{1,2} 杨建光¹ 张高^{1,2△}

(1 贵州省生物研究所 贵州 贵阳 550028 2 贵州科学院蛋白质工程实验室 贵州 贵阳 550081)

摘要 目的:探究 A β 低分子量寡聚体对大鼠学习记忆功能的影响;方法:双侧海马内一次性注射 A β 低分子量寡聚体,15 天后开始进行行为测试,测试方法采用跳台实验法、穿梭实验法和 Morris 水迷宫法;结果:跳台实验结果显示,与对照组比较,A β 组跳台潜伏期短,错误次数多,差异有统计学意义($P<0.05$);穿梭实验结果显示,与对照组比较,A β 组由明箱进入暗箱的潜伏期短,错误次数多,差异有统计学意义($P<0.05$);水迷宫实验结果显示,与对照组比较,A β 组潜伏期长,跨越原平台次数少,差异有统计学意义($P<0.01$)。结论:A β 组大鼠学习记忆能力和空间分辨能力降低,A β 低分子量寡聚体在大鼠体内表现出较强的毒性作用。

关键词 β -淀粉样多肽;低分子量寡聚体;学习记忆

中图分类号:Q95-3 R338.64 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2012)01-49-03

The Effect on Rat Learning and Memory of LMW A β Oligomers*

LIU Ying-ying^{1,2}, YANG Ling^{1,2}, YANG Jian-guang¹, ZHANG Gao^{1,2△}

(1 Guizhou Institute of Biology, Guiyang 5500081, China;

2 Protein Engineering Laboratory of Guizhou Academy of Sciences, Guiyang 550028, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of low molecular weight oligomers of β -amyloid peptide on the rat learning and memory. **Methods:** LMW A β oligomers was microinjected into bilateral hippocampus at once. And behavioral tests were carried out after 15 days. Step-down test, Shuttle-box test and Morris water maze test were used to evaluate rat learning and memory function. **Results:** Step-down test showed that the rats in A β made notable errors compared with the control group ($P<0.05$) and the incubation period (jumping from the platform) significantly reduced ($P<0.05$). Shuttle-box test showed that compared with the control group, the rats in A β made notable errors ($P<0.05$) and the incubation period (entering in dark chamber from light chamber) significantly reduced ($P<0.05$). Morris water maze test indicated that the incubation period of finding platform significantly extended ($P<0.01$) and frequency passing through the prior platform was less in A β group ($P<0.01$). **Conclusions:** Microinjection of LMW A β oligomers into rat hippocampus may induce the learning and memory dysfunction, and LWM A β oligomers induced an impairment in rat spatial resolution. In a word, LWM A β oligomers had strong toxic effects on the rat learning and memory.

Key words: β -amyloid peptide; LMW Oligomers; Learning and Memory

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R338.64 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)01-49-03

前言

阿尔兹海默氏病(Alzheimer's disease, AD)是中枢神经系统一种常见的神经系统退行性疾病,也是痴呆最常见的类型^[1]。全世界有 3,500 万人患有老年痴呆症,其中 2,700 万是受 AD 影响^[2,3]。AD 主要病理改变之一为老年斑^[4]。聚集的 β 淀粉样多肽(A β)纤维是老年斑构成核心,也导致 AD 患者神经退行性病变和认知障碍^[5]。在 AD 的发病过程中,A β 分子经历了从可溶状态到不溶性纤维的转变。研究证实,A β 神经毒性主要来自于可溶性 A β 寡聚体^[6-12]。可溶性寡聚体既包括低分子量寡聚体,如二聚体、三聚体和四聚体等,也包括由 10~20 个甚至更多单体构成的球形寡聚体^[13-15],以及由寡聚体串连形成的原纤维(protofibrils),但是,究竟是哪种聚集形式 A β 寡聚体有明显的体内毒性作用的研究尚未见报道。本研究拟探究 A β 低分子量

寡聚体在大鼠体内毒性的作用,为 A β 的毒性作用机理研究和筛选防治 AD 的药物提供新的线索。

1 材料与方法

1.1 实验动物和分组

10 月龄 Sprague-Dawley(SD)大鼠,购自贵阳医学院实验动物中心。Morris 水迷宫剔除原地打转的大鼠,筛选出游泳迅速灵活的 SD 大鼠,体重 250 g~300 g,随机分为对照组和 A β 组,每组 5 只。

1.2 A β 低分子量寡聚体制备

用无菌生理盐水将 A β 1-42(Sigma 公司)稀释成 2 μ g/ul,37 $^{\circ}$ C 孵育。

1.3 大鼠脑室一次性注射 A β

SD 大鼠用 30 g/L 的戊巴比妥钠(40mg/kg)麻醉后,头顶部

* 基金项目 贵州省科学技术基金(黔科合 J 字[2009]2153 号)。

作者简介 刘盈盈(1979-),女,硕士,助理研究员,主要研究方向:生物技术,电话:13885147895,Email:lying_127@163.com

△通讯作者 张高,E-mail:229312608@qq.com

(收稿日期 2011-06-10 接受日期 2011-07-05)

去毛,消毒皮肤并切开,在颅骨上用牙钻对称打两个孔(AP-3.5 mm,ML± 2.0 mm,DV2.7 mm)即为海马区注射点,每侧注射 5 ul(10 ug)Aβ,在 5min 内注完,并留针 5 min,以使 Aβ 充分弥散,然后缓慢撤针。用牙托粉填补针孔,缝合皮肤并消毒。

对照组在海马内注射等量的生理盐水,方法同上。单笼饲养至大鼠完全清醒。术后第 15 天开始进行行为测试。

1.4 跳台实验法^[16]

将实验大鼠放入反应箱内适应 5 min 后,轻放于箱内的平台上,当大鼠从台上跳下在箱内自由活动时,四肢将接触箱底的不锈钢栅,立即给予 40 V 电刺激 3 s,大鼠为逃避电刺激可能再跳回平台,部分大鼠会再次或多次跳至不锈钢栅上,受到电击后又迅速跳回平台,如此训练 5 min,记录 5 min 内大鼠触电次数,即累积错误次数,作为学习成绩。24 h 后,直接将大鼠置于平台上,记录第一次跳下平台的时间,即平台潜伏期,同时记录 5 min 内大鼠跳下平台的错误次数,作为记忆成绩。

1.5 穿梭实验法^[16]

先将大鼠放入穿梭箱内适应 3 min。将大鼠背对洞口放入明箱,避暗习性使大鼠本能地选择进入暗箱,大鼠进入暗箱后立即通以 36 V 交流电,其受到电击后逃避反应为进入明箱,部分大鼠会再次或多次进入暗箱,受到电击后又迅速逃回明箱,如此训练 5 min,记录 5 min 内每只大鼠受到电击的次数,或称错误次数,作为学习成绩。24 h 后在暗箱底部铜栅通电的情况下,将大鼠背对洞口放入明箱,记录第 1 次进入暗箱的潜伏期和 3 min 内的错误次数,作为记忆成绩。

1.6 Morris 水迷宫法^[16]

Morris 水迷宫主要由一直径 120 cm,高 50 cm 的不锈钢制成的圆形水池和一个可移动位置的平台组成。使用时预先在水池中注入清水,然后加入溶有新鲜奶粉的水溶液,使池水成为不透明的乳白色,再注入清水使水面高出平台 1 cm,水温控制在 24± 0.5 ℃,平台置于某一象限的中间,所有实验均在上午 9 点~下午 3 点之间进行。训练前 1 天,水池中不放置平台,将大鼠放入水中 180 s,自由游泳适应环境。

定位航行实验,历时 5 天,每天训练 4 次,从离平台最远的象限,在固定的同一入水点把大鼠背对平台投入水中,计时 2 min。系统自动记录大鼠入水后 2 min 内找到平台的时间,即逃避潜伏期,若大鼠 2 min 内未找到平台,则将其置于平台上并停留数秒,逃避潜伏期记录为 2 min。取每天逃避潜伏期的平均值作为该天的学习成绩。

空间搜索实验:第 5 天下午撤出平台,任选一个入水点将大鼠面向池壁放入水中,记录 2 min 内初次找到原平台位置的时间和穿越平台的次数,作为记忆成绩。

2 结果

2.1 跳台实验结果

跳台实验结果(见表 1)表明,Aβ 寡聚体可引起大鼠跳台作业障碍,表现为:训练 5 min 内,Aβ 寡聚体灌注组较对照组,大鼠触电次数多,学习成绩差,24 h 后重做测验,Aβ 寡聚体灌注组较对照组,潜伏期短,5 min 内大鼠跳下平台的错误次数多,记忆成绩差。差异均具有统计学意义(P<0.05)。

表 1 Aβ 海马注射对大鼠学习记忆的影响(跳台实验)($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of Aβ injection on the learning and memory in rat hippocampus by step-down test($\bar{x} \pm s$)

Group	Records of studies (Number of errors)	Memory scores after 24 h	
		Latency (s)	Number of errors
Control group	2.50± 1.09	170.25± 18.50	1.25± 0.84
Aβ group	5.12± 1.28*	54.55± 23.04*	3.75± 0.96*

注: * 与对照组相比 P<0.05; Note: *vs control group P<0.05

2.2 穿梭实验结果

表 2 可见,Aβ 寡聚体灌注组学习成绩中发生的错误次数高于对照组,差异具有统计学意义(P<0.05)。24 h 后的记忆成

绩中,Aβ 寡聚体灌注组由明箱进入暗箱的潜伏期短于对照组,错误次数多于对照组,且差异均具有统计学意义(P<0.05)。Aβ 组的学习成绩和记忆成绩都差于对照组。

表 2 Aβ 海马注射对大鼠学习记忆的影响(穿梭实验)($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of Aβ injection on the learning and memory in rat hippocampus by shuttle-box test($\bar{x} \pm s$)

Group	Records of studies (Number of errors)	Memory scores after 24 h	
		Latency (s)	Number of errors
Control group	1.17± 0.41	165.60± 40.85	1.15± 0.50
Aβ group	3.25± 1.20*	85.17± 37.22*	5.60± 2.06*

注: * 与对照组相比 P<0.05; Note: *vs control group P<0.05

2.3 水迷宫实验结果

Morris 水迷宫定位航行实验显示,第一天,两组的潜伏期

相比差异无显著性。从第 2 天开始,对照组的潜伏期较 Aβ 寡聚体灌注组潜伏期开始缩短。第 3 天,Aβ 组的潜伏期明显较对

照组长(P<0.01)。第 4、5 天 Aβ 组的潜伏期明显较对照组长 (P<0.01) ,见图 1。

第 5 天下午撤出平台 ,观察大鼠的空间探索能力 结果如表 3 所示 ,对照组大鼠能够依靠空间线索迅速找到原平台位置 ,且跨越原平台的平均次数约为 Aβ 组的 3 倍。Aβ 组初次找到原平台的时间明显长于对照组(P<0.01)。

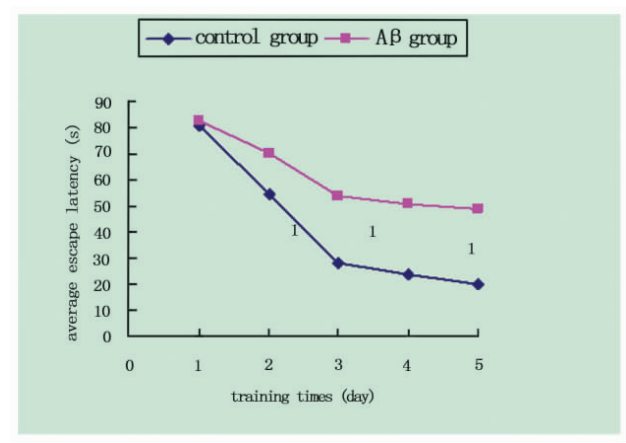


图 1 大鼠平均逃避潜伏期 :与对照组相比 , $P<0.01$
Fig.1 The average escape latency of rats vs control group $P<0.01$

3 讨论

有关 Aβ 可溶性寡聚体神经毒性的研究已引起越来越多

的重视 ,成为目前 AD 病因病理学研究中的热点问题之一。在整体水平、转基因动物和体外研究方面都不断有相关的报道。例如 ,在通过组织形态学确认的 AD 病例中 ,Western 染色的定量研究发现可溶性 Aβ 比对照组增加 3 倍 ,特别是可溶性 Aβ 与 NFT 密度有直接关系 ,用 Aβ 特异性抗体被动免疫的 AβPP 转基因鼠能迅速恢复记忆损害 ,而不影响脑组织中淀粉样沉积的总量 ,此外 ,发现 Aβ1-42 的球形寡聚体能抑制海马神经元的长潜伏时诱发电位 ,说明它能损害神经信号传导功能。但相比较而言 ,对 Aβ 低分子量寡聚体和其他中间寡聚体的体内毒性研究报道较少。Aβ 通常以 Aβ1-40 和 Aβ1-42 两种形式存在。研究证实 ,Aβ1-42 较 Aβ1-40 更容易聚集 ,聚集的 Aβ1-42 是构成老年斑的基本成分。Aβ1-42 倾向于形成斑块样的沉积 ,而 Aβ1-40 则更易于形成典型的纤维状结构。所以 Aβ1-42 构成老年斑的核心 ,Aβ1-40 主要起到延长纤维的作用。本研究同时采用了跳台、穿梭和迷宫法 ,探究了 Aβ1-42 低分子量寡聚体对大鼠学习记忆功能的影响 ,实验结果表明 ,Aβ 低分子量寡聚体海马注射后引起了大鼠学习记忆障碍 ,不仅表现为主动回避性条件反射异常 ,也表现出大鼠空间分辨力降低。本研究的科学意义在于 ,探究了 Aβ1-42 低分子量寡聚体的体内毒性作用 ,为 Aβ 的毒性作用机理研究提供新的线索 ,为深入探索 Aβ 聚集的分子机理、了解 AD 发生的分子基础提供一定的理论依据 ,为筛选防治 AD 的药物提供新的线索。

表 3 大鼠空间探索实验结果($\bar{x} \pm s$)
Table 3 Results of spatial probe test of rats($\bar{x} \pm s$)

Group	Initial time taken to reach the hidden prior platform(s)	Frequency passing through the prior platform(times)
Control group	9.74± 3.38	20.57± 5.56
Aβ group	43.36± 6.87*	7.55± 3.27*

注 : * 与对照组相比 $P<0.01$; Note : *vs control group $P<0.01$

参考文献(Reference)

[1] Frost D. Co-incorporation of A beta40 and A beta42 to form mixed pre-fibrillar aggregates [J]. Eur J Biochem, 2003, 270(4):654-663

[2] Prince M, Jackson J, Ferri CP, et al. Alzheimer's disease international world alzheimer report [C]. In: International AsD (ed), 2009, 1-96

[3] Gillete GS, Abellan VKG, Andrieu S, et al. Prevention of progression to dementia in the elderly rationale and proposal for a health promoting memory consultation (An IANA Task Force) [J]. J Nutr Health Aging, 2008,12 :520-529

[4] Selkoe DJ. Folding proteins in fatal ways [J]. Nature, 2003, 426: 900-904

[5] Delacourte A, Buee L. Tau pathology: a marker of neurodegenerative disorders [J]. Curr Opin Neurol, 2000, 13:371-376

[6] Kaye R, Head E, Thompson JL, et al. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis [J]. Science, 2003, 300:486-489

[7] Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister J, et al. Natural oligomers of the amyloid beta protein specifically disrupt cognitive function [J]. Nature Neurosci, 2005, 8:79-84

[8] Kokubo H, Kaye R, Glabe CG, et al. Soluble Aβ oligomers ultra-structurally localize to cell processes and might be related to synaptic dysfunction in Alzheimer's disease brain [J]. Brain Res, 2005, 1031(2):222- 228

[9] Chimon S, Shaibat MA, Jones CR, et al. Evidence of fibril-like beta-sheet structures in a neurotoxic amyloid intermediate of Alzheimer's beta amyloid [J]. Nat Struct Mol Biol, 2007, 14: 1157-1164

[10] Martins IC, Kuperstein I, Wilkinson H, et al. Lipids revert inert Aβ amyloid fibrils to neurotoxic protofibrils that affect learning in mice [J]. EMBO J, 2008, 27:224-233

[11] Masafumi S, Tamotsu Z, Hiroshi U, et al. Formation of highly toxic soluble amyloid beta oligomers by the molecular chaperone prefoldin [J]. FEBS Journal,2008, 275:5982-5993

(下转第 68 页)

参考文献(References)

- [1] Parkin M, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics 2002 [J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55 (2): 74-78
- [2] Han XJ, Dong BW, Liang P, et al. Local cellular immune response induced by ultrasoundguided tumor bed superantigen injection after percutaneous microwave coagulation therapy for liver cancer [J]. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi, 2009,31(8):602-606
- [3] Li YX, Lin ZB, Tan HR. Wild type p53 increased chemosensitivity of drug-resistant human hepatocellular carcinoma Bel7402/5-FU cells [J]. Acta Pharmacol Sin, 2008, 25(1): 76-82
- [4] 吴鹏飞. 抑癌基因 p53 与原发性肝癌的研究进展[J]. 河南医学研究, 2010,19(3):374-375
Wu Peng-fei. Tumor suppressor gene p53 and primary hepatic carcinoma research progress[J]. Henan Medical Research, 2010,19(3): 374-375
- [5] Efeyan A, Serrano M. p53 guardian of the genome and policeman of the oncogenes [J]. Cell Cycle, 2007, 6(9): 1006-1010
- [6] Akere A, Otegbayo JA. Evaluation of the pattern and prognostic implications of anti-p53 in hepatocellular carcinoma [J]. Singapore Med J, 2007, 48(1): 41-44
- [7] Green DR, Kroemer G. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53 [J]. Nature, 2009, 458 (7242): 1127-1130
- [8] Li-Ping Song, Yue-Ping Li, Ning Wang, et al. NT4(Si)-p53(N15)antennapedia induces cell death in a human hepatocellular carcinoma cell line [J]. World Journal of Gastroenterology, 2009, 15 (46):5813-5820
- [9] 张艳玲, 梁后杰, 肖文华, 等. 细胞凋亡、PCNA、p53 和 Fas 与肝细胞癌临床病理特征关系的研究 [J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(24): 2191-2192
- Zhang Yan-ling, Liang Hou-jie, Xiao Wen-hua, et al. Relationship of apoptosis, proliferation, p53, and Fas with clinicopathological characteristics in human hepatocellular carcinoma [J]. Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae, 2004, 26(24): 2191-2192
- [10] Shangary S, Wang S. Targeting the MDM2-p53 interaction for cancer therapy [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(17): 5318-5324
- [11] Shangary S, Qin D, McEachern D, et al. Temporal activation of p53 by a specific MDM2 inhibitor is selectively toxic to tumors and leads to complete tumor growth inhibition [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105 (10): 3933-3938
- [12] Shangary S, Wang S. Targeting the MDM2-p53 interaction for cancer therapy [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14 (17): 5318-5324
- [13] Scoumanne A, Chen X. Protein methylation: a new mechanism of p53 tumor suppressor regulation [J]. Histol Histopathol, 2008, 23 (9): 1143-1149
- [14] Lu C, El-Deiry WS. Targeting p53 for enhanced radio- and chemosensitivity [J]. Apoptosis, 2009, 14 (4): 597-606
- [15] 喻宏, 钟仁华, 黄振. P53、AR、ER 在原发性肝癌、癌旁组织中的表达及意义 [J]. 国际医药卫生导报, 2006, 12(24): 12-14.
Yu Hong, Zhong Renhua, Huang Zhenling. The Association Study and its Clinical Significance of the Expression of P53, AR and ER in the Primary Hepatocellular Carcinoma (liver cancer) and Surrounding Tissue [J]. International Medicine & Health Guidance News, 2006, 12 (24): 12-14
- (上接第 51 页)
- [12] Carrotta R, Di Carlo M, Manno M, et al. Toxicity of recombinant beta-amyloid prefibrillar oligomers on the morphogenesis of the sea urchin *Paracentrotus lividus* [J]. FASEB J, 2006, 20: 1916-1924
- [13] Kaye R, Head E, Thompson J L, et al. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis [J]. Science, 2003, 300: 486-489
- [14] Harper JD, Wong SS, Lieber CM, et al. Assembly of A β amyloid protofibrils: An in vitro model for a possible early event in Alzheimer's disease [J]. Biochemistry, 1999, 38: 8972-8980
- [15] Selkoe HJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics [J]. Science, 2002, 297: 353-356
- [16] Rudi D'Hooge, Peter P De Deyn. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory [J]. Brain Research Reviews, 2001, 36(1): 60-90