

# 阿尔茨海默氏病大鼠模型的建立及行为学评价

李萍

(宁波大学 医学院, 浙江 宁波 315211)

**摘要:** 探讨了采用寡聚型  $\beta$ -淀粉样蛋白(寡聚型  $A\beta$ )建立早期阿尔茨海默病(AD)大鼠模型的可能性。实验方法为给 SD 大鼠双侧海马 CA1 区定向注射寡聚型  $A\beta$  (模型组)或生理盐水(对照组), 或不做任何处理(正常组), 分别在第 2 周和第 4 周应用 Morris 水迷宫实验测试其学习记忆能力和评价记忆能力障碍程度。研究结果表明: 模型组大鼠的定位航行试验的逃避潜伏期明显比对照组和正常组的延长( $P<0.01$ ), 空间探索试验的穿越平台次数也明显减少( $P<0.05$ )。认为向大鼠双侧海马 CA1 区定向注射寡聚型  $A\beta$  可成功建立早期 AD 模型, 并在短期内模拟 AD 的神经元损伤和学习记忆功能障碍等行为学特征。

**关键词:** 寡聚型  $\beta$ -淀粉样蛋白; 阿尔茨海默病; 大鼠模型; 海马

中图分类号: R-332

文献标识码: A

文章编号: 1001-5132 (2011) 02-0103-04

阿尔茨海默病(Alzheimer's Disease, AD)也称老年痴呆症, 是发生在老年人的一种中枢神经系统退行性疾病。临床表现为进行性记忆力丧失、认知功能减退以及人格改变<sup>[1]</sup>。该病的典型病理特征是在大脑皮质和海马区域的细胞外出现以  $\beta$ -淀粉样蛋白(beta-amyloid,  $A\beta$ )为核心的老年斑(Senile Plaque, SP)、细胞内神经原纤维缠结(Neurofibrillary Tangle, NFT)等病变<sup>[2]</sup>。AD 的发病原因和机制至今尚不清楚。建立 AD 动物模型是研究 AD 发病机制和药物治疗的重要手段。但是, 完全理想的动物模型目前尚未建立。国内外许多研究者主要是根据 AD 发病机制的几种学说或不同实验目的而建立的。概括起来, 主要的 AD 模型有: (1)以胆碱能学说为基础的 AD 动物模型; (2)与  $A\beta$  有关的 AD 动物模型; (3)转基因动物模型; (4)以自然衰老为基础的 AD 动物模型等。在这几类模型中, 由于  $A\beta$  与其他因素的广泛联系而格外引人注目, 其疾病模型更是受到人们的关注<sup>[3]</sup>。

近几年的研究发现,  $A\beta$  寡聚体的神经毒性要比  $A\beta$  纤维的毒性大得多, 因而有关可溶性  $A\beta$  寡聚体的神经毒性作用日益被重视<sup>[4-5]</sup>。但尚未见采用寡聚型  $A\beta$  建立大鼠 AD 模型报道。为此, 作

者研究探讨建立与人类 AD 早期发病机制相似的、较理想的新型 AD 动物模型的可能性, 为推动老年痴呆研究工作的深入开展提供实验依据和研究材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物及分组

250~300 g 健康 SD 大鼠 34 只, 由宁波大学实验动物中心提供。动物随机分成 3 组: 正常组 10 只, 对照组与 AD 模型组各 12 只。正常组大鼠不做任何处理, 对照组大鼠海马区注射生理盐水, 模型组大鼠海马区注射  $A\beta$  寡聚体。

#### 1.1.2 主要试剂

$A\beta$ 1-42 和 HFIP 六氟丙醇(Sigma 公司)、10% 水合氯醛等。其中  $A\beta$  寡聚体的制备方法为: 将 1 mg  $A\beta$  加入 400  $\mu$ L HFIP 中, 室温孵育 20 min, 取 100  $\mu$ L 溶液移至干净 Eppendorf 管中, 加入 900  $\mu$ L 灭菌去离子水稀释, 室温孵育 20 min。离心 14 000  $g \cdot 15 \text{ min}^{-1}$ , 取上清(pH 2.8~3.5), 转移至另一干净 Eppendorf 管中, 在氮吹仪上用高纯氮气轻柔吹 10~15 min, 使 HFIP 挥发。随后在溶液中加入磁力

搅拌机(Teflon 材料),以 500 转速 22 在磁力搅拌机上搅拌、孵育 48 h. 所得产物(寡聚体)经斑点印迹和 Western 印迹鉴定,可在 4℃ 保存 1 个月.

### 1.1.3 仪器设备

Morris 水迷宫及行为学分析系统软件(上海移数信息科技有限公司);江湾 I 型 C 立体定位仪(第二军医大学);微量注射器(上海精密仪器厂).

## 1.2 方法

### 1.2.1 AD 大鼠模型的制备

将对照组和模型组大鼠,按  $0.35 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  的剂量腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉后,固定于江湾 I-C 型脑立体定位仪上,常规备皮消毒,切开皮肤,暴露前囟. 参照大鼠脑立体定位图谱进行定位<sup>[6]</sup>,选定前囟后 3.3 mm,左右侧旁开 2.0 mm 为海马 CA1 区投影,沿垂直方向双侧埋植套管针,插管深度为 2.4 mm. 1 周后,AD 模型组大鼠,用微量注射针在两侧分别缓慢推注  $5 \mu\text{L}$  A $\beta$  寡聚体,对照组注射等量生理盐水,注射时间持续 10 min,留针 5 min,每天推注 1 次,连续 3 次. 术后单笼饲养.

### 1.2.2 Morris 水迷宫测试

造模后应用 Morris 水迷宫(Morris Water Maze,MWM)进行行为学检测,测试其空间学习和记忆能力. Morris 水迷宫为直径 90 cm、高 40 cm 的圆形水池,水深 30 cm,在水池壁上标明 4 个入水点,由此将其等分为 4 个象限,于第 3 象限中心置一有机玻璃圆形平台,平台低于水面 2 cm,水温  $(24\pm 2)^\circ\text{C}$ . 各组大鼠分别在术后第 2 周(7 d)和第 4 周(26 d)开始水迷宫检测. 测试内容包括: (1)定位

航行试验(place navigation). 历时 5 d,每天训练 2 次. 将大鼠面向池壁分别从 4 个入水点放入池中,测其 90 s 内成功寻找到平台所需时间,即逃避潜伏期(escape latency). 若大鼠入水后 90 s 内未能找到平台,则将其置于平台上并停留 10 s. (2)空间探索试验(spacial probe test). 定位航行试验结束后撤除平台,任选一个入水点将大鼠面向池壁放入水中,记录 90 s 内跨越原平台位置的次数,以及平台象限内大鼠游泳路径的百分比.

### 1.2.3 统计学分析

所得结果经过 SPSS 11 统计软件处理,数据以  $\bar{X}\pm S$  表示,采用  $F$  检验,以  $P<0.05$  为差异有显著意义.

## 2 结果

### 2.1 定位航行试验(逃避潜伏期)

大鼠造模处理后,分别在第 2 周和第 4 周用 Morris 水迷宫测试其定位航行能力. 从表 1、表 2 和图 1 显示的结果可见,正常组和对照组大鼠随训练次数的增加,逃避潜伏期越来越短,2 组间无统计学差异. 模型组大鼠的逃避潜伏期在第 2 周和第 4 周均明显延长于正常组和对照组,差异显著或极显著( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). 特别在后潜伏期(3~5 d),模型组的逃避潜伏期明显比正常组和对照组延长,差异极显著( $P<0.01$ ). 说明模型组大鼠存在明显的学习、记忆功能障碍,而正常组和对照组大鼠具有相同的学习记忆能力,手术不影响大鼠的学习记忆能力.

表 1 各组大鼠建模后第 2 周逃避潜伏期测试结果

组别	数量/只	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
正常组	10	34.87±8.38	13.75±5.78	11.25±3.84 <sup>▲▲</sup>	8.84±5.06 <sup>▲▲</sup>	8.98±5.90 <sup>▲</sup>
对照组	12	32.39±11.98	18.89±10.52	12.58±5.70 <sup>★★</sup>	8.47±3.66 <sup>★★</sup>	7.59±4.66 <sup>★★</sup>
模型组	12	33.25±28.39	28.23±20.89	35.75±25.16	28.29±5.48	28.36±24.45

注: 正常组与模型组相比, <sup>▲</sup> $P<0.05$ , <sup>▲▲</sup> $P<0.01$ ; 对照组与模型组相比, <sup>★</sup> $P<0.05$ , <sup>★★</sup> $P<0.01$ .

表 2 各组大鼠建模后第 4 周逃避潜伏期测试结果

组别	数量/只	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
正常组	10	14.21±4.74 <sup>▲</sup>	11.86±4.56	13.02±3.32 <sup>▲▲</sup>	7.05±5.33 <sup>▲</sup>	8.58±1.67 <sup>▲</sup>
对照组	12	15.8±7.04 <sup>★</sup>	11.34±7.16	11.14±5.43 <sup>★★</sup>	8.55±5.12 <sup>★</sup>	6.18±3.25 <sup>★★</sup>
模型组	12	30.43±15.83	18.13±10.97	26.03±8.87	22.79±19.78	15.54±6.02

注: 同上.

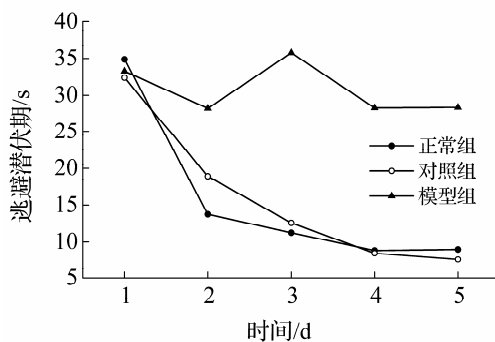


图 1 各组大鼠平均逃避潜伏期 5 d 前后变化

## 2.2 空间探索试验(穿越实验)

由表 3 可见, 在造模后第 2 周和第 4 周, 模型组大鼠在 90 s 内的穿越平台次数均值较正常组和对照组都有所减少, 特别是与对照组比较显著减少( $P < 0.05$ ).

表 3 各组大鼠建模后穿越实验测试结果

组别	数量/只	第 2 周	第 4 周
正常组	10	3.9±2.08	4.2±1.79
对照组	12	4.67±2.19*	4.67±1.63*
模型组	12	2.67±1.23	2.67±2.06

注: 同上.

## 3 讨论

关于 AD 动物模型的建立, 一直是 AD 研究的热点, 尤其是与 A $\beta$  有关的 AD 动物模型的建立更受到人们的关注.

A $\beta$  是老年斑的核心成分, 在 AD 的发病机制中具有关键作用. A $\beta$  主要包括 A $\beta$  40 和 A $\beta$  42 两种分子, 是其前体蛋白(APP)的水解产物. 正常情况下 APP 水解不会形成 A $\beta$ ; 而当编码 APP 的基因发生突变等异常情况下, APP 则容易生成 A $\beta$ , 其分泌量可高于正常人的 4~10 倍<sup>[7]</sup>. A $\beta$  有很强的自聚集性, 当 A $\beta$  浓度过高或脑内微环境发生改变时, 即可由可溶性的  $\alpha$  螺旋转变为不可溶的  $\beta$  折叠结构, 相互聚集, 最终形成不溶性的纤丝和淀粉样沉积. 目前发现的 A $\beta$  聚集方式有单体(monomer)、寡聚型(oligomer)、原纤维(protofibril)和纤维型(fibril)等<sup>[8]</sup>.

以往的研究认为只有聚合成纤维形式的 A $\beta$  对神经元具有毒性作用, 因此, 在应用 A $\beta$  制作 AD 动物模型时, 均采用不溶性的纤维型 A $\beta$  聚集物制作模型. 近年研究结果提示, A $\beta$  在聚集为可溶性寡聚体时即可具有神经毒性作用, 可溶性 A $\beta$  寡聚体

的神经毒性作用远强于其他不可溶性 A $\beta$ <sup>[9]</sup>. AD 的早期学习记忆障碍更可能与可溶性寡聚型 A $\beta$  有关, 应用低剂量的 A $\beta$  42 寡聚型即可对神经细胞产生毒性作用, 导致早期认知功能障碍. 国内外有人应用原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)技术观察到 A $\beta$  寡聚体的各种空间结构特征<sup>[8,10]</sup>. 可溶性 A $\beta$  寡聚体为 AD 发病机制的研究提供了新的方向, 国内有关 A $\beta$  寡聚体的研究尚不多见. 采用可溶性 A $\beta$  寡聚体海马区注射建立大鼠 AD 模型报道更未见到.

实验中我们把 A $\beta$  寡聚体连续 3 次灌注到大鼠海马区, 建立了早期 AD 的动物模型, 经采用 Morris 水迷宫进行定位航行试验和空间探索试验, 证明了模型大鼠的学习记忆能力等行为学具有明显的障碍. 大鼠逃避潜伏期可反映大鼠的空间认知能力, 而大鼠定位游泳轨迹和穿越次数可反映大鼠的空间记忆(近记忆)能力. 逃避时间愈短, 穿越次数越多, 提示动物学习记忆能力愈强, 反之, 则说明学习记忆能力存在障碍.

实验造模后 AD 大鼠在 1 周后就出现神经行为学的异常变化, 在定位航行试验和空间探索试验中, AD 模型组的平均逃避潜伏期显著较正常组和对照组延长(表 1、表 2 和图 1), 穿越平台次数也明显减少, 出现错误次数显著增多(表 3). 这些结果, 提示模型组大鼠在水迷宫试验中学习定位能力显著下降, 存在明显的学习、记忆功能障碍. 实验证明, A $\beta$  寡聚体具有很强神经毒性作用, 小剂量即可引起神经行为学改变, 并在短期内可出现模拟 AD 的神经元损伤和学习记忆功能障碍等行为学特征. 因此, 该模型有效模拟了人类 AD.

另外, 在建立 AD 模型过程中, 作者有以下体会: (1) A $\beta$  寡聚体的配制方法、浓度、注射剂量和次数, 采用本法配制的 A $\beta$  寡聚体, 经检测浓度约为  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 注射剂量采用少量多次要好于一次大剂量注射建模; (2) 定位仪要精确, 技术要熟练, 定位要准确; (3) 动物应选择 250~275 g 大鼠造模较好, 定位较准确; (4) 建模埋管后, 大鼠应单笼饲养, 以免互相咬掉套管, 埋管后应在 1 周内注射药物, 时间较长, 套管易堵塞. 这些实验中的关键问题是值得重视的.

总之, 通过向大鼠海马内注射可溶性 A $\beta$  寡聚

体可以建立早期 AD 的动物模型, 该模型在短期内即可模拟出 AD 的神经元损伤和学习记忆功能障碍等行为学特征, 为研究人类 AD 的发病机制提供了良好研究材料和实验依据。

#### 参考文献:

- [1] 涂荣波, 董军.  $\beta$ -淀粉样蛋白在老年痴呆症发生发展中的作用及其机制[J]. 第四军医大学学报, 2007, 28(1): 91-93.
- [2] 吕良, 钟振国. 阿尔茨海默病淀粉样 $\beta$ 蛋白诱导神经元凋亡的研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2007, 5(6):517-519.
- [3] 罗焕敏, 翁文. 老年性痴呆动物模型的制作与选择[J]. 中国老年多器官疾病杂志, 2007, 6(1):12-17.
- [4] Kaye R, Head E, Thompson J L . Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis[J]. Science, 2003, 301(5641):1847-1849 .
- [5] Florent S, Malaplate Armand C, Youssef I, et al. Docosahexaenoic acid prevents neuronal apoptosis induced by soluble amyloid-beta oligomers[J]. J Neurochem, 2006, 96(2):385-395 .
- [6] 包新民, 舒思云. 大鼠脑立体定位图谱[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991:42 .
- [7] 罗秀萍, 李海彦, 龚相华. 阿尔茨海默病中 $\beta$ -淀粉样蛋白的研究进展[J]. 德州学院学报, 2007, 23(6):84-87.
- [8] 王建秀, 王德生. 原子力显微镜观察不同 $A\beta$ 聚集状态的研究[J]. 中国现代医学杂志, 2008, 18(1):33-35.
- [9] Kokubo H, Kaye R, Glabe C C, et al. Soluble  $A\beta$  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.
- [10] Sunil K, Koel C, Prasenjit S, et al. Atomic force microscopy: A powerful tool for high-resolution imaging of spermatozoa[J]. J Nan Biotechnology, 2005, 27:3-9.

## Establishment and Evaluation of a Rat Model with Alzheimer's Disease Induced by Beta-amyloid Oligome Protein

LI Ping

( Medical School, Ningbo University, Ningbo 315211, China )

**Abstract:** The objective of this research is to establish an animal model for Alzheimer's disease (AD) by  $A\beta$  oligome injected into bilateral subregion in hippocampus of rats. The rats are divided into three groups. The model group is administered in which  $A\beta_{1-42}$  oligome is injected into bilateral subregion in hippocampus. The control group is administered the same way but saline is used instead. The normal group is administered in a totally different way. All the rats in the designated groups are tested with Morris-maze in the separate two-week and four-week period. The data are analyzed with *F* test. The results indicate that the modeled rats show the longer length of the escape latency in navigation test, and a reduced number of times of crossing in the spatial probe test. It may be concluded that rats injected with  $A\beta_{1-42}$  oligome into bilateral subregion in hippocampus may represent a new kind of animal model. Spatial learning and memory disorder may arise in a short time period.

**Key words:** beta-amyloid oligome protein; Alzheimer's disease; animal model; hippocampus

( 责任编辑 史小丽 )