

左甲状腺素对淀粉样 β 蛋白所致痴呆模型小鼠空间学习记忆的影响

付爱玲^{1*}, 赵宝全², 邹呈雨¹, 陈 向¹

(1. 西南大学药学院, 重庆 400715; 2. 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要: **目的** 探讨甲状腺激素对淀粉样 β 蛋白 ($A\beta$) 所致痴呆模型小鼠空间学习记忆的影响, 并初步探讨其作用机制。 **方法** 小鼠海马内注射 1.0 μL 的 $A\beta_{1-42}$ 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 制备阿尔茨海默病 (AD) 模型。小鼠一次性 ip 左甲状腺素 (T_4) 5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 后, Morris 水迷宫实验测定对 AD 模型小鼠学习记忆的影响。分别采用比色法、黄嘌呤氧化酶法、碱性羟胺法和硫代巴比妥酸法检测小鼠海马胆碱乙酰转移酶 (ChAT) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 活性, 以及乙酰胆碱 (ACh) 和丙二醛 (MDA) 含量。 **结果** 与正常对照组比较, AD 模型小鼠空间学习记忆能力受损。与 AD 模型组比较, T_4 治疗组小鼠在第 3 次到第 6 次训练中, 在水迷宫中找到平台的时间明显缩短 [(105 \pm 9) vs (64 \pm 18) s; (90 \pm 11) vs (44 \pm 14) s; (71 \pm 14) vs (28 \pm 12) s; (65 \pm 11) vs (23 \pm 12) s]; ChAT 活性升高 [(21.9 \pm 6.7) vs (43.9 \pm 9.4) $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ 蛋白]; SOD 活性增高 [(2.40 \pm 0.12) vs (3.52 \pm 0.24) $\text{MU}\cdot\text{g}^{-1}$ 蛋白]; ACh 含量上升 [(4.74 \pm 0.60) vs (7.46 \pm 0.91) $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 蛋白]; MDA 减少 [(1.37 \pm 0.06) vs (0.74 \pm 0.09) $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ 蛋白]。 **结论** T_4 可明显改善 $A\beta_{1-42}$ 所致痴呆模型小鼠空间学习记忆, 其机制可能与增加脑内胆碱能神经功能, 减少自由基损伤有关。

关键词: 甲状腺素; 阿尔茨海默病; 淀粉样 β 蛋白; 学习障碍; 记忆障碍

中图分类号: R963, R977.14

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2009)05-0357-05

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2009.05.004

收稿日期: 2009-02-19 接受日期: 2009-06-08

作者简介: 付爱玲 (1973 -), 女, 河南省人, 博士, 主要从事生化药理学研究。

* 联系作者。 E-mail: Fuailing1008@yahoo.com.cn

Tel: (023)68251225

阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD), 主要是以学习记忆等认知障碍为特征的老年性疾病。其主要临床表现为进行性认知功能障碍和记忆力衰退, 性格和行为改变, 意识错乱, 思考及判断力丧失, 生活自理能力丧失等。本病病程较长, 给社会、家庭和患者带来沉重的负担。随着人类寿命的延长, 以及世界老龄化时代的到来, 早发性痴呆症发病率日渐上升。寻找治疗 AD 的有效药物, 已引起国际医学界和制药业等的普遍关注。

甲状腺激素 (thyroid hormone, TH) 对于脑的发育成熟, 以及促进和维持动物学习记忆等智能活动极为重要^[1]。在哺乳动物的整个生命过程中, TH 缺乏均会导致智力低下或智力减退, 提示 TH 与 AD 可能具有密切联系。然而, 关于 TH 和 AD 之间的相互关系尚存在争论。一些研究认为, 血清和脑脊液中低 TH 水平与 AD 有关^[2], 但一些报道认为脑脊液中高水平的 TH 是 AD 发生发展的危险因素^[3], 甚至另有研究认为, TH 与 AD 之间不存在任何明显的联系^[4]。至今, 尚无直接的证据表明 TH 对 AD 有治疗作用。

本研究采用给小鼠海马内注射淀粉样 β 蛋白片段 1~42 (amyloid β -protein fragment 1-42, $A\beta_{1-42}$) 制作 AD 模型, 采用左甲状腺素 (levothyroxine, T_4) 检测 TH 对 AD 模型小鼠学习记忆和认知能力的作用, 测定 T_4 治疗前后 AD 模型小鼠大脑皮质胆碱乙酰转移酶 (choline acetyltransferase, ChAT) 和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性、乙酰胆碱 (acetylcholine, ACh) 与丙二醛 (malonic dialdehyde, MDA) 含量的变化。

1 材料与方 法

1.1 药品、动物与仪器

T_4 和 $A\beta_{1-42}$ 均购自 Sigma 公司。将 T_4 先溶于少量的 NaOH 溶液中, 然后用 HCl 调整 pH 为 7.4。ChAT 与 SOD 活性测定试剂盒、ACh 与 MDA 含量测定试剂盒购

自南京建成生物工程研究所。其他试剂为化学纯。

健康昆明种小鼠, 雄性, 体重 23 ~ 27 g, 重庆医科大学实验动物中心提供。水迷宫视频跟踪分析仪与 ZZ-6 小鼠自主活动测试仪均为成都泰盟科技有限公司产品; 内切式匀浆机为宁波新芝生物科技股份有限公司产品。

1.2 动物模型的制备

参照文献[5]的方法, 将 $A\beta_{1-42}$ 溶于灭菌的 PBS 溶液中 ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 密封后, 置 37°C 温箱中 3 d 使其成凝聚态。将小鼠用戊巴比妥钠 ($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, ip) 麻醉后, 在脑立体定位仪上双侧海马 (Bregma 点后 2.3 mm, 旁开 2.1 mm, 深度 1.8 mm) 内各注射 $1.0 \mu\text{L}$ 凝聚态 $A\beta_{1-42}$ $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。给药速度为 $0.5 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 。对照组小鼠海马内注射等量 PBS。造模后第 7 天进行 Morris 水迷宫检测。

1.3 实验分组

34 只小鼠分为 3 组: 正常对照组, 模型组, T_4 治疗 ($A\beta_{1-42} + T_4$) 组。参考文献[6-7]在 AD 模型形成第 4 天一次性 ip 给予小鼠 T_4 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

1.4 水迷宫实验

采用 MT-200 水迷宫视频跟踪分析仪进行测试。Morris 水迷宫水深 25 cm, 水温 $21 \sim 23^\circ\text{C}$ 。水中加入对小鼠无害的染料, 使小鼠看不到隐藏在水面下的平台。室内温度控制在 $26 \sim 28^\circ\text{C}$ 。四周墙壁上做上明显的标记, 以便小鼠能够根据标记辨认方向。实验过程中室内所有物体的摆放位置固定, 以免对小鼠产生干扰。实验时平台位置固定不变, 置于第一象限中央。选择第二, 三, 四象限的池壁中点作为入水点, 实验时将动物面朝池壁轻轻放入水中, 避免应激和将小鼠头部浸入水中。若小鼠在 120 s 内找到平台, 在平台上停留 30 s, 然后放回笼内休息; 若 120 s 内找不到平台, 将其引导至平台上, 30 s 后取下, 潜伏期记为 120 s。入水点的顺序随机分配, 每天上下午各 1 次, 每次为 1 个时段 (session), 进行 3 d, 共 6 个时段。记录小鼠找到平台所需要的时间。

1.5 自主活动测试

在使用 Morris 水迷宫进行学习记忆实验的 3 d 内分别进行自主活动测试。采用 ZZ-6 小鼠自主活动测试仪。测试前让动物先在反应箱中适应 5 min, 然后记录 20 min 内小鼠的活动次数和站立次数。

1.6 生化指标的测定

测试完成 24 h 后, 将小鼠处死, 于冰浴中分离

双侧海马, 置于 -20°C 冷冻备用。测定时在冰浴中用冰冷的生理盐水于内切式匀浆机中 $500 \times \text{g}$, $5 \text{ s} \times 2$ 次, 间隔 30 s, 制成 10% (W/V) 的匀浆, 立即进行测定。分别采用比色法、黄嘌呤氧化酶法、碱性羟胺法和硫代巴比妥酸法检测小鼠海马 ChAT 和 SOD 活性, 以及 ACh 和 MDA 含量。采用 Lowry 等^[7]方法测定蛋白含量。

1.7 统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用双因素重复测量方差分析和 one-way ANOVA 进行统计学处理。

2 结果

2.1 左甲状腺素对痴呆小鼠逃避潜伏期与游泳路程的影响

Morris 水迷宫测试结果显示, 在训练过程中, 随着训练次数的增加, 各组小鼠找到隐蔽平台所需的时间逐渐减少。从第 3 次训练开始, 模型组小鼠找到平台的时间与游泳路程显著长于正常对照组小鼠 (图 1A, B), 提示 $A\beta_{1-42}$ 对小鼠空间学习和记忆能力有损害作用。给予 T_4 后, 逃避潜伏期与游泳路程明显缩短, 表明 T_4 具有增强记忆及认知的作用。

2.2 左甲状腺素对痴呆小鼠自主活动的影响

图 2 结果显示, 模型组、 T_4 治疗组和正常对照组的自主活动次数无统计学差异, 提示 T_4 治疗组小鼠在水迷宫实验中表现出的逃避潜伏期与游泳路程缩短不是由于活动能力改变引起的, 而是增强学习记忆能力的直接表现。

2.3 左甲状腺素对痴呆小鼠海马中 ChAT 及 ACh 含量的影响

表 1 结果表明, 模型组小鼠脑组织中 ChAT 酶活性降低, ACh 水平显著下降。给予 T_4 治疗后, ChAT 活性明显恢复, ACh 含量明显上升。

2.4 左甲状腺素对痴呆小鼠海马内 MDA 含量及 SOD 活性的影响

表 2 结果表明, 模型组小鼠脑内 MDA 含量与正常对照组相比明显增多, SOD 活性明显降低。 T_4 治疗后 MDA 含量减少, SOD 增高, 提示 T_4 可能也通过影响自由基和脂质过氧化产物 MDA 的生成来发挥作用。

3 讨论

神经病理学研究证实, AD 患者脑内出现大量的

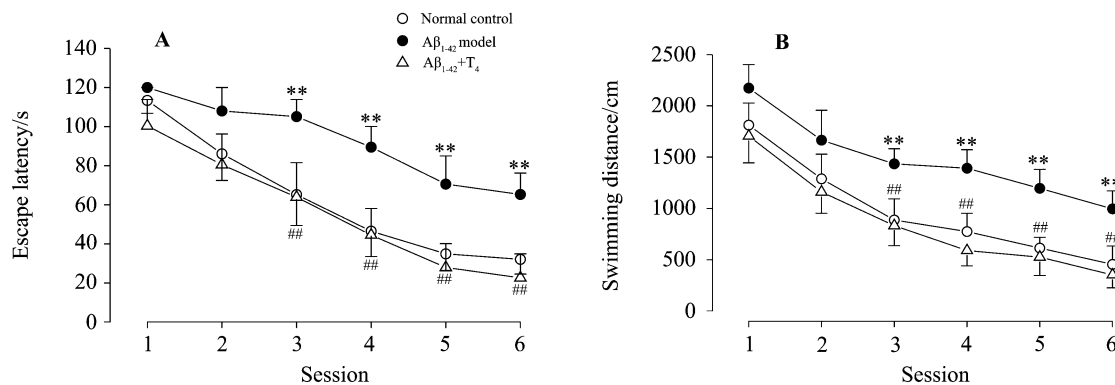


Fig 1. Effects of levothyroxine (T₄) on spatial learning and memory in dementia mice. The mice were divided into 3 groups including normal saline (NS), amyloid beta-protein fragment 1-42 (Aβ₁₋₄₂) and Aβ₁₋₄₂ + T₄ group. Mice in Aβ₁₋₄₂ group were injected 1.0 μL Aβ₁₋₄₂ 10 mmol·L⁻¹ intrahippocampally dementia. Mice in Aβ₁₋₄₂ + T₄ group were ip injected T₄ 5 mg·kg⁻¹ on 4th day after administration Aβ₁₋₄₂. The control animals were injected with NS in parallel. Animal receiving a complete test process every time during 6 tests is called a session. $\bar{x} \pm s$, $n = 10 - 12$. ** $P < 0.01$, compared with normal control group; # $P < 0.01$, compared with Aβ₁₋₄₂ model group.

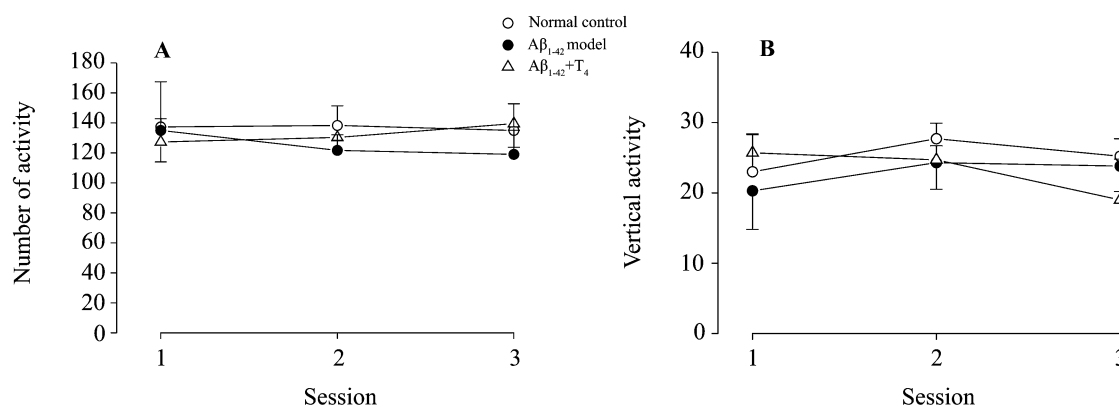


Fig 2. Effect of T₄ on spontaneous activity of dementia mice. See Fig 1 for the treatment. $\bar{x} \pm s$, $n = 10 - 12$. There is no significant difference among the groups.

Tab 1. Influence of T₄ on choline acetyltransferase (ChAT) activity and acetylcholine (ACh) content in hippocampus of dementia mice

Group	ChAT/ μmol·g ⁻¹ protein	ACh/ g·g ⁻¹ protein
Normal control	50.8 ± 10.8	7.35 ± 0.58
Aβ ₁₋₄₂ model	21.9 ± 6.7**	4.74 ± 0.60**
Aβ ₁₋₄₂ + T ₄	43.9 ± 9.4##	7.46 ± 0.91##

See Fig 1 for the treatment. $\bar{x} \pm s$, $n = 5 - 6$. ** $P < 0.01$, compared with normal control; ## $P < 0.01$, compared with Aβ₁₋₄₂ model group.

Tab 2. Effects of T₄ on superoxide dismutase (SOD) activity and malonic dialdehyde (MDA) content in hippocampus of dementia mice

Group	SOD/ MU·g ⁻¹ protein	MDA/ μmol·g ⁻¹ protein
Normal control	3.91 ± 0.17	0.87 ± 0.08
Aβ ₁₋₄₂ model	2.40 ± 0.12*	1.37 ± 0.06#
Aβ ₁₋₄₂ + T ₄	3.52 ± 0.24*	0.74 ± 0.09#

See Fig 1 for the treatment. $\bar{x} \pm s$, $n = 5 - 6$. * $P < 0.05$, compared with normal control group; # $P < 0.05$, compared with Aβ₁₋₄₂ model group.

老年斑和神经纤维缠结,而 Aβ 是斑块的主要成分。

有理论认为, Aβ 沉积是引起 AD 的主要病因之

—^[9]。有研究表明,凝聚态 $A\beta_{1-42}$ 注射后可导致类似于 AD 的神经病理以及生化过程的改变,引起脑神经元退化和死亡^[10]。一次性脑室注射 5 μL 凝聚态 $A\beta_{1-42}$ ($2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 可导致被动回避和空间学习记忆能力受损^[11]。脑内注射凝聚态 $A\beta_{1-42}$ 是制做 AD 动物模型和研究 AD 病理生理过程的重要方法^[12]。本研究结果显示,模型小鼠学习记忆功能受损,在水迷宫中的逃避潜伏期与游泳距离明显延长。给予 T_4 后,小鼠的学习记忆能力恢复正常。

$A\beta$ 神经毒性的主要原因之一是损害了脑内的胆碱能神经元^[13]。中枢胆碱能系统在学习、记忆等认知活动中起重要作用。AD 患者胆碱能神经细胞明显丢失,胆碱能神经纤维发生退变,导致中枢胆碱能系统功能紊乱,皮质、基底前脑的 ChAT 表达减少,并以海马最为明显,ACh 的生成和释放量降低。ACh 是脑中与学习记忆等智能状态相关的重要分子。本研究结果表明, $A\beta_{1-42}$ 小鼠大脑皮质和海马中的 ACh 含量都显著低于正常对照组,提示胆碱能神经元减少、突触丢失。

TH 和 ACh、胆碱能神经功能之间具有非常密切的联系。TH 能影响特异性胆碱能核团及它们的通路,尤其在基底前脑和海马。给予东莨菪碱引起认知损伤的大鼠 T_4 2.5 或 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,连续给药 4 d,可显著改善其空间学习记忆能力,提示 TH 可通过胆碱能神经发挥提高认知功能的作用^[6]。另外,TH 通过增加多种神经营养因子的基因表达,以及调节它们的受体数量而发挥作用,尤其是与胆碱能神经活性密切联系的神经生长因子^[14],如单次给予 T_4 可增加脑内神经生长因子的浓度^[7]。在本研究中,单次给予 T_4 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 后,逆转了由于 $A\beta_{1-42}$ 所致的 ChAT 活性和 ACh 含量降低,胆碱能神经功能恢复正常。

根据 AD 的氧化自由基学说,在脑内 $A\beta$ 通过诱导产生自由基、促进细胞凋亡、释放大量细胞因子和多种炎性产物等毒性作用损伤神经元^[15]。脑室注射 $A\beta_{1-42}$ 后,使脑内 MDA 增多,SOD 活性降低^[16]。本研究结果显示,小鼠给予 T_4 后,MDA 减少,SOD 活性增加,提示 TH 可能也通过影响自由基损伤来发挥作用。

总之,本研究结果表明, T_4 通过调节胆碱能神经元,升高神经递质 ACh 含量;并通过降低 MDA 含量和提高 SOD 活性,使神经元免受自由基损伤,从而最终逆转了由于 $A\beta_{1-42}$ 所致动物空间学习记忆障碍。

4 参考文献:

- [1] Ahmed OM, El-Gareib AW, El-Bakry AM, Abd El-Tawab SM, Ahmed RG. Thyroid hormones states and brain development interactions[J]. *Int J Dev Neurosci*, 2008, **26**(2):147–209.
- [2] van den Beld AW, Visser TJ, Feelders RA, Grobbee DE, Lamberts SW. Thyroid hormone concentrations, disease, physical function, and mortality in elderly men [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, **90**(12):6403–6409.
- [3] Kalmijn S, Mehta KM, Pols HA, Hofman A, Drexhage HA, Breteler MM. Subclinical hyperthyroidism and the risk of dementia. The Rotterdam study[J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2000, **53**(6):733–737.
- [4] de Jong FJ, den Heijer T, Visser TJ, de Rijke YB, Drexhage HA, Hofman A, et al. Thyroid hormones, dementia, and atrophy of the medial temporal lobe[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, **91**(7):2569–2573.
- [5] Stephan A, Laroche S, Davis S. Generation of aggregated β -amyloid in the rat hippocampus impairs synaptic transmission and plasticity and causes memory deficits [J]. *J Neurosci*, 2001, (2):5703–5714.
- [6] Smith JW, Evans AT, Costall B, Smythe JW. Thyroid hormones, brain function and cognition: a brief review [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2002, **26**(1):45–60.
- [7] Walker P, Weichsel ME Jr, Fisher DA, Guo SM, Fisher DA. Thyroxine increases nerve growth factor concentration in adult mouse brain [J]. *Science*, 1979, **204**(4391):427–429.
- [8] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent [J]. *J Biol Chem*, 1951, **193**(1):265–275.
- [9] Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics [J]. *Science*, 2002, **297**(5580):353–356.
- [10] Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease [J]. *Lancet*, 2006, **368**(9533):387–403.
- [11] Maurice T, Lockhart BP, Privat A. Amnesia induced in mice by centrally administered beta-amyloid peptides involves cholinergic dysfunction [J]. *Brain Res*, 1996, **706**(2):181–193.
- [12] Phinney AL, Horne P, Yang J, Janus C, Bergeron C, Westaway D. Mouse models of Alzheimer's disease: the long and filamentous road [J]. *Neurol Res*, 2003, **25**(6):590–600.

- [13] Kar S, Slowikowski SP, Westaway D, Mount HT. Interactions between beta-amyloid and central cholinergic neurons: implications for Alzheimer's disease [J]. *J Psychiatry Neurosci*, 2004, **29**(6):427-441.
- [14] Stéphan A, Laroche S, Davis S. Generation of aggregated beta-amyloid in the rat hippocampus impairs synaptic transmission and plasticity and causes memory deficits [J]. *J Neurosci*, 2001, **21**(15):5703-5714.
- [15] Yatin SM, Varadarajan S, Link CD, Butterfield DA. *In vitro* and *in vivo* oxidative stress associated with Alzheimer's amyloid beta-peptide (1-42) [J]. *Neurobiol Aging*, 1999, **20**(3):325-300.
- [16] Fu AL, Dong ZH, Sun MJ. Protective effect of *N*-acetyl-L-cysteine on amyloid beta-peptide-induced learning and memory deficits in mice [J]. *Brain Res*, 2006, **1109**(1):201-206.

Effects of levothyroxine on spatial learning and memory deficiency of amyloid β -protein-induced dementia mice

FU Ai-Ling^{1*}, ZHAO Bao-Quan², ZHOU Cheng-Yu¹, CHEN Xiang¹

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: AIM To investigate the effects and mechanisms of thyroid hormones on spatial learning and memory deficiency of amyloid β -protein ($A\beta$)-induced dementia mice. **METHODS** Mice were injected intrahippocampally $1.0 \mu\text{L } A\beta_{1-42} 10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ to prepare dementia mice model. Levothyroxine (*l*-thyroxine, T_4) $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ were given ip to dementia mice, and the ability of learning and memory was examined by Morris water maze test. The activities of choline acetyltransferase (ChAT) and superoxide dismutase (SOD) were determined respectively by colorimetric method and xanthine oxidase method, the levels of acetylcholine (ACh) and malonic dialdehyde (MDA) were examined respectively by hydroxylamine colorimetric method and thiobarbituric acid method. **RESULTS** Compared with normal control group, the ability of spatial learning and memory was remarkably impaired in the AD model mice. Compared with the dementia mice, the escape latency of T_4 -treated mice in water maze test was significantly shortened from the third to the sixth training [$(105 \pm 9) \text{ vs}$

$(64 \pm 18) \text{ s}$; $(90 \pm 11) \text{ vs } (44 \pm 14) \text{ s}$; $(71 \pm 14) \text{ vs } (28 \pm 12) \text{ s}$; $(65 \pm 11) \text{ vs } (23 \pm 12) \text{ s}$], the activities of ChAT [$(21.9 \pm 6.7) \text{ vs } (43.9 \pm 9.4) \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ protein}$] and SOD [$(2.40 \pm 0.12) \text{ vs } (3.52 \pm 0.24) \text{ MU} \cdot \text{g}^{-1} \text{ protein}$], and the level of ACh [$(4.74 \pm 0.60) \text{ vs } (7.46 \pm 0.91) \text{ g} \cdot \text{g}^{-1} \text{ protein}$] were increased, while the level of MDA [$(1.37 \pm 0.06) \text{ vs } (0.74 \pm 0.09) \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ protein}$] was decreased in T_4 -treated mice. **CONCLUSION** The results of the present study suggested that T_4 improve learning and memory deficiency of $A\beta_{1-42}$ -induced dementia mice. The mechanisms of T_4 treating AD might be associated with increasing cholinergic function and protecting from the damage of free radicals in the brains of dementia mice.

Key words: thyroxine; Alzheimer disease; amyloid β -protein; learning disorders; memory disorders

* Corresponding author.