

论著

文章编号:1000-5404(2012)09-0870-04

丙戊酸钠对 APP/PS1 转基因小鼠自主活动及脑形态结构的影响

陈通¹, 龙志敏¹, 汪克建¹, 赵蕾¹, 贺桂琼^{1,2} (400016 重庆, 重庆医科大学基础医学院: 解剖教研室¹, 神经科学研究中心²)

[摘要] 目的 研究丙戊酸钠(valproic acid, VPA)对 APP/PS1 双转基因阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)模型小鼠自主活动及脑组织形态结构的影响,探讨 VPA 对 AD 的保护作用及可能机制。方法 将 3 月龄 APP/PS1 双转基因小鼠及同窝野生型小鼠分为 VPA 处理组和生理盐水对照组,运用 VPA [30 mg/(kg·d)] 和等量生理盐水腹腔注射 4 周。旷场实验观察各组小鼠的自主活动能力;尼氏染色、透射电镜观察各组小鼠脑组织的病理改变。结果 行为学结果显示:与野生型小鼠相比,AD 模型小鼠自主活动明显减少($P < 0.05$);野生型小鼠 VPA 处理组与对照组自主活动无明显差异($P > 0.05$);而 AD 模型小鼠 VPA 处理组比对照组的自主活动明显减少($P < 0.05$)。尼氏染色显示:AD 模型小鼠脑内神经元密度显著低于野生型小鼠。AD 模型小鼠中,对照组脑内神经细胞明显肿胀,尼氏小体明显减少而致细胞质淡染,神经细胞密度降低(85.2 ± 13.3);而 VPA 处理组脑内神经元肿胀程度明显减轻,神经元数量显著回升(116.9 ± 16.2 , $P < 0.05$),但 VPA 不影响野生型小鼠脑内的神经元数量及形态(VPA 处理组: 142.2 ± 24.4 vs 生理盐水对照组: 136.7 ± 23.1 , $P > 0.05$)。电镜结果显示 AD 模型小鼠对照组脑内神经元细胞核、线粒体及神经毡肿胀明显,突触结构稀疏;而 AD 模型小鼠 VPA 处理组脑内神经元细胞核、线粒体及神经毡的水肿明显减轻,突触结构清晰。结论 VPA 可显著减少 APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠的自主行为,显著减轻躁狂症状;VPA 可改善 APP/PS1 双转基因小鼠脑内神经细胞的形态结构,减少肿胀的神经元并抑制神经元数量的减少。

[关键词] 丙戊酸钠;自主活动;神经元;阿尔茨海默病

[中图分类号] R-332; R745.702; R971.6

[文献标志码] A

Effect of valproic acid on autonomous behaviors and cerebral morphology and structure in APP/PS1 double transgenic mice

Chen Tong¹, Long Zhimin¹, Wang Kejian¹, Zhao Lei¹, He Guiqiong^{1,2} (¹Department of Anatomy, ²Institute of Neuroscience, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[Abstract] **Objective** To investigate whether valproic acid (VPA) can affect autonomic activity and cerebral morphology and structure in the APP/PS1 double transgenic Alzheimer's disease (AD) mouse model, so as to explore the neuroprotective effect of VPA on AD. **Methods** Three-month old APP/PS1 double transgenic AD model mice and its wild-type littermates were randomly divided into two groups (VPA-treated group and saline-treated group), VPA [30 mg/(kg·d)] and the same amount of normal saline were peritoneally injected into mice for 4 weeks. Open field test was used to examine autonomous behaviors of AD model and wildtype mice. Nissl staining and transmission electron microscopy (TEM) were applied to observe the morphological structures in the brains of AD model mice. **Results** Open field test revealed that the autonomic activities of AD mice showed an obvious decrease when compared to wild-type mice ($P < 0.05$), the autonomic activities of VPA-treated mice were decreased significantly compared with the saline-treated controls ($P < 0.05$), while the autonomic activities of both VPA-treated and saline-treated wild-type mice showed no difference. Nissl staining showed that neuronal cells in the brain of AD model mice were greatly decreased compared with wild-type mice. Furthermore, neuronal cells in the brain of saline-treated AD model mice were severely reduced in number (85.2 ± 13.3), and a large number of neurons became swollen and round, the nuclei were slightly stained, and the cytoplasm was pale in which Nissl bodies were reduced significantly. Administration of VPA notably suppressed the enhanced neuronal swelling and rescued the neuronal loss (116.9 ± 16.2 , $P < 0.05$). VPA did not exert effect on the morphology and number of neuronal cells in the brain of both saline-

[基金项目] 国家自然科学基金(30970986)

[通信作者] 贺桂琼, E-mail: guiqionghe@hotmail.com

treated and VPA-treated wildtype mice (142.2 ± 24.4 vs 136.7 ± 23.1 , $P > 0.05$). TEM revealed that the cytoplasm, nucleus, part of mitochondria and neuropil in AD mice became obviously swollen, which were partially rescued by VPA. Meanwhile, the structure of synapse became clearer in VPA-treated mice. **Conclusion**

VPA reduces the autonomous behavior and relieves manic symptoms in AD model mice. VPA may not only change the morphology of neuronal cells, but also rescue the neuronal loss in the brains of AD model mice.

[**Key words**] valproic acid; autonomous behaviors; neuron; Alzheimer's disease

Supported by the National Nature Science Foundation of China (30970986). Corresponding author: He Guiqiong, E-mail: guiqionghe@hotmail.com

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种发生于老年期前后的神经退行性疾病,是临床最为常见的痴呆类型,临床表现为进行性认知功能障碍、学习记忆力减退及性格行为改变。由 β 淀粉样蛋白(β amyloid peptide, A β)、tau蛋白过度磷酸化在细胞内聚集形成的神经元纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFTs)及大量的神经元是AD脑的典型病理损害。其中A β 是淀粉样蛋白前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)分别经 β -分泌酶和 γ -分泌酶相继水解产生^[1]。BACE1决定 β -分泌酶的活性,是该酶的主要形式; γ -分泌酶是一多亚基复合物,包括早老素(presenilin, PS)、Nicastrin、Aph-1和Pen-2等蛋白^[2],其中PS1 NTF/CTF异二聚体是 γ -分泌酶的催化活性中心,PS1的异常突变是引起家族性AD的主要原因^[3]。

目前有很多关于AD发病机制的学说,如A β 沉积学说、胆碱能损伤学说、基因突变学说、自由基损伤学说等,其中较为公认的是“A β 沉积学说”^[4],但尚无一个学说能全面解释AD的病理过程,导致AD的治疗仍缺乏特异性。近期一系列研究发现,糖原合成酶激酶-3(glycogen synthase kinase 3 β , GSK-3 β)同时参与AD病理特征SP和NFT的形成及神经元凋亡。不少学者提出了AD发病机制的新学说,即“GSK-3 β 学说”^[5-7]。研究已证实,GSK-3 β 是引起tau蛋白磷酸化的主要激酶,其活性增强是NFT形成的重要机制^[6-8];GSK-3 β 对促进A β 在AD患者脑中蓄积起重要作用,GSK-3 β 表达或活性异常可导致APP代谢过程中A β 的生成增多^[9];GSK-3 β 可能参与学习记忆形成的机制,持续激活GSK-3 β 可引起大鼠学习记忆障碍^[10]。可见,GSK-3 β 被认为是AD的潜在性治疗靶点,开展以GSK-3 β 为靶点的研究将为AD的防治开辟新途径。

丙戊酸钠(valproic acid sodium salt, VPA)是临床上常用的一线抗癫痫药。近年来对VPA的研究已突破了抗癫痫的范畴,发现VPA具有复杂的药理作用,如具有神经保护和抗凋亡作用。新近研究发现,VPA是一种选择性的GSK-3 β 抑制剂^[11]。前期研究发现VPA可显著减少A β 的产生及SP的形成^[12],那么,VPA是否影响AD模型鼠的自主行为及脑神经元的变化尚不可知。

本研究拟用VPA处理APP/PS1双转基因AD模型小鼠,通过行为学及形态学手段检测VPA对AD模型小鼠的自主活动及脑组织形态结构的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

B6C3-Tg(携带APP^{swe},PSEN1 Δ 9)双转基因AD模型鼠购自美国国立Jackson动物中心。取3月龄雄性APP/PS1转基因小鼠(22只,体质量25~30g)及同窝野生型小鼠(20只,体质量25~30g),分为VPA处理组和生理盐水对照组,分笼喂养于光照/黑暗为12h/12h的恒温环境,自由摄食和饮水。参照文献^[12]方法,VPA处理组小鼠给予VPA[30mg/(kg·d)]腹腔注射,对照组小鼠注射相同剂量的生理盐水。每天上午固定时间给药,持续4周,并记录小鼠的体质量变化。实验遵循重庆医科大学实验动物使用相关伦理要求。

1.2 旷场实验检测小鼠的自主行为

实验室光线充足,室温为20℃左右。实验箱为50cm×50cm的旷场,周边的颜色为白色(与实验动物的颜色相反),旷场底部被分成面积相等的正方形格子(16块),沿墙的格子为外周格,余为中央格。实验过程中,小鼠被放置在中央格,利用旷场上方的摄像机记录动物在特定时间内的活动情况。通过计算机追踪分析软件来分析小鼠在特定时间内(时间设定为5min)的活动状态。观察指标:方格间穿行次数(动物的前后肢从1个格进入另1个格为穿行1次)、直立次数(动物双前肢放在墙壁上或动物双前肢同时离地为直立1次)、穿过中央格的次数、中央格停留时间。

1.3 形态学检测

自主行为实验结束后,每组选取5只小鼠进行形态学检测。小鼠经2%水合氯醛腹腔麻醉,经左心室快速灌注生理盐水50ml冲洗血液,然后用4%多聚甲醛40ml灌注预固定,取脑入4%多聚甲醛后固定48h,梯度酒精脱水后,石蜡包埋,用石蜡切片机冠状切片(片厚10 μ m)。

尼氏染色:取石蜡切片,二甲苯脱蜡,常规水化;1×PBS冲洗3次(5min/次);微波煮沸抗原修复后,1×PBS冲洗3次(5min/次);0.1%焦油紫染色5~15min(37℃);经蒸馏水冲洗后,用95%酒精分化,直至尼氏小体呈紫色,再用100%酒精脱水,二甲苯透明后封片,光镜下观察。

透射电镜:小鼠用含4%多聚甲醛、2.5%戊二醛的灌注液固定后,取小鼠海马CA1区组织块(1mm³),经2.5%戊二醛中固定(2h)、1%四氧化锇后固定,酒精丙酮梯度脱水,环氧树脂618[#]包埋聚合,半薄切片定位,超薄切片,铅铀染色,透射电镜HITACHI-7500观察脑组织超微结构。

1.4 统计学处理

采用SPSS 17.0统计软件,对尼氏染色中各组小鼠脑内神经元密度的变化进行计数,经过正态分布检验后对实验数据进行方差分析和t检验。

2 结果

2.1 VPA处理后AD模型小鼠的自主活动改变

旷场实验中,格子数代表动物的兴奋性;站立的次数代表动物对陌生环境的适应能力。与野生型小鼠相比,AD模型组小鼠(无论VPA处理组还是生理盐水对照组)的活动量明显增加,活动无规律性($P < 0.05$);但AD模型小鼠VPA处理组的活动量比AD模型小鼠对照组明显减少($P < 0.05$),而两组野生型小鼠的活动量无显著差异($P > 0.05$)。见表1。

表1 旷野实验中各组小鼠中央区活动时间/总时间及活动路程/总路程的比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	中央区活动时间/总时间	中央区活动路程/总路程
野生型小鼠对照组	10	2.58 ± 0.96	4.07 ± 0.79
野生型小鼠VPA处理组	10	2.35 ± 0.64	3.98 ± 0.25
AD模型小鼠对照组	11	7.76 ± 0.32 ^a	9.78 ± 0.52 ^a
AD模型小鼠VPA处理组	11	3.41 ± 0.53 ^{ab}	5.83 ± 0.19 ^{ab}

a: $P < 0.05$,与野生型小鼠相应组比较;b: $P < 0.05$,与AD模型小鼠对照组比较

2.2 VPA处理后各组小鼠脑内神经元变化

尼氏染色结果显示,野生型小鼠脑内神经元数量明显多于AD模型小鼠脑内的神经元。野生型小鼠VPA处理组及对照组脑内的神经元数量无明显差异(142.2 ± 24.4 vs 136.7 ± 23.1 , $P > 0.05$)。AD模型小鼠中,对照组小鼠大脑皮质和海马神经细胞密度降低(85.2 ± 13.3),皮质出现大量肿胀的神经细胞,

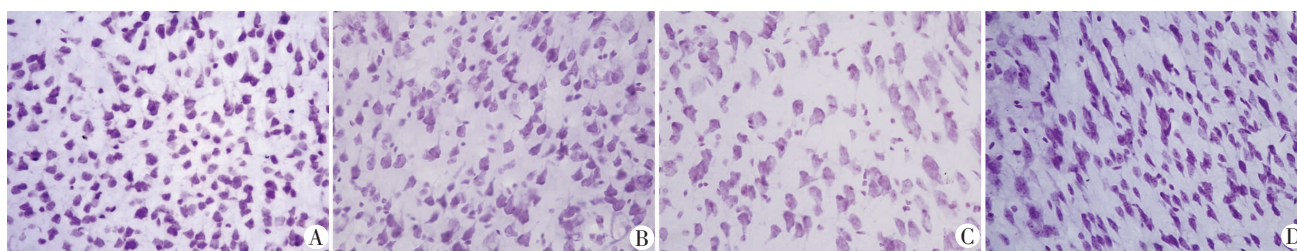
丧失典型的多极形状而变为圆形,细胞核偏位,细胞质淡染呈苍白均质状,内有较多空泡,尼氏小体明显减少;VPA处理组小鼠脑内肿胀的神经元明显减少,细胞质内尼氏小体增加,神经元密度显著增加(116.9 ± 16.2 , $P < 0.05$)。见图1。

2.3 VPA处理后各组小鼠脑组织超微结构变化

取各组小鼠脑组织进行透射电镜观察,结果显示,野生型小鼠生理盐水对照组和VPA处理组海马神经元无明显肿胀(图2A、B)。而AD模型小鼠海马神经元出现不同程度的肿胀,其中生理盐水对照组AD模型小鼠海马神经元肿胀较明显,细胞核空化,异染色质轻度边集,细胞质轻度肿胀,线粒体肿胀,部分呈现空泡样变,突触结构稀松,神经毡出现明显肿胀(图2C);VPA处理组小鼠海马区肿胀神经元减少,细胞核呈圆形或椭圆形,染色质分布均匀,线粒体肿胀明显减轻,突触结构清楚;神经毡肿胀减轻(图2D)。

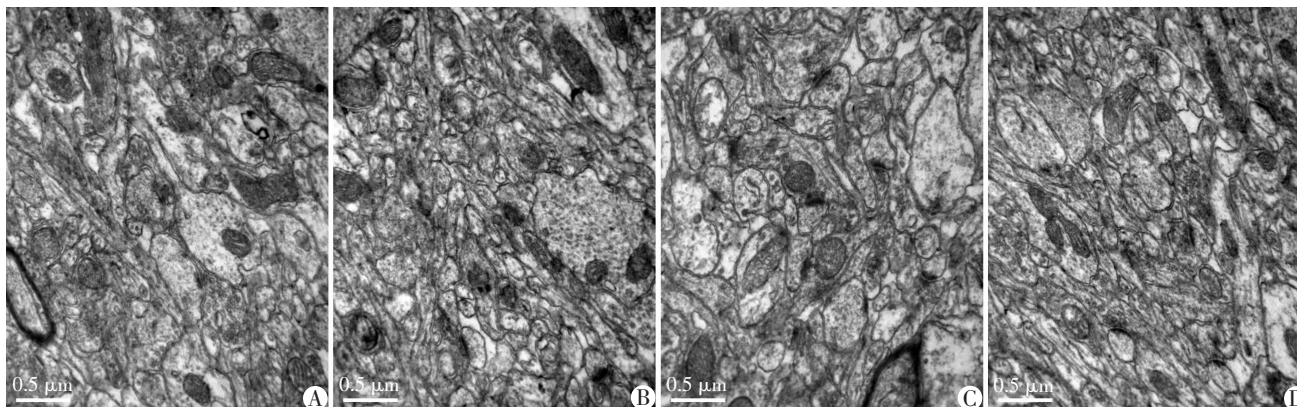
3 讨论

近10年来对AD转基因小鼠模型的培养,为研究AD的病理过程及AD的药物筛选提供了理想的工具。目前所用的转基因AD模型小鼠有APP、PS1单转基因及APP/PS1双转基因小鼠,而后者不仅脑内出现老年斑时间早,而且出现的量呈进行性增多,是目前研究AD病理改变的理想模型^[13]。本实验采用的AD模型小鼠为APP/PS1双转基因小鼠B6C3-Tg,该种系小鼠与其他AD模型鼠的显著区别在于其行为学及脑组织形态改变出现的时间早(3个月)^[14]。本研究应用的VPA已证实能够选择性抑制GSK-3 β 活性^[9]。为检测VPA是否改变AD模型小鼠的兴奋性增强、烦躁不安



A:野生型小鼠对照组;B:野生型小鼠VPA处理组;C:AD模型小鼠对照组;D:AD模型小鼠VPA处理组

图1 尼氏染色观察各组小鼠脑内神经细胞形态结构及数量的变化 (LM ×400)



A:野生型小鼠对照组;B:野生型小鼠VPA处理组;C:AD模型小鼠VPA处理组;D:AD模型小鼠对照组

图2 AD模型小鼠VPA处理组及对照组脑组织超微结构的变化

等自主行为,本研究在药物处理后进行旷场实验。该方法是评价实验动物在新奇环境中的自主行为、探究行为及紧张度的一种有效方法^[15]。以实验动物在新奇环境中某些行为发生的频率和持续时间等为指标,反映实验动物在陌生环境中的自主行为与探究行为。通常情况下,小鼠具有趋暗习性,在旷场实验中主要表现为在边缘区活动。而本实验观察到,生理盐水对照组AD小鼠在旷场中毫无目的地奔跑,在中央区出现的次数明显高于正常野生型小鼠,说明AD模型小鼠易出现激惹、烦躁不安等情绪改变。根据小鼠的活动总数、直立次数以及在中央区出现的概率等几项指标,我们发现VPA处理组AD模型小鼠的自主活动较对照组明显减弱,但VPA对野生型小鼠的自主活动无影响,提示VPA可显著减少AD模型小鼠的烦躁、易激惹等情绪变化。

本组形态学染色结果显示,AD模型小鼠对照组大脑皮质和海马区的神经元出现显著的形态结构的改变,包括神经元细胞体肿胀、变圆、核偏位,细胞质中尼氏小体减少,推测可能系AD模型小鼠脑神经元内出现了中央性尼氏小体溶解(central chromatolysis)现象,而尼氏小体溶解可能源于神经元胞体与突起的断离所致,此系神经元凋亡的原因之一。VPA处理组AD模型小鼠脑内神经元胞体和突起肿胀明显减轻,细胞质内尼氏小体数量明显增加。检测超微结构显示,AD模型小鼠对照组海马突触形态不一,结构稀松,说明AD模型小鼠脑内突触出现了损害,而突触的损伤可直接导致神经信号传导障碍,引起学习记忆能力的降低。而VPA处理后AD模型小鼠海马区突触结构清楚,提示VPA对突触具有修复作用,这与本课题组前期工作中发现的VPA可改善AD模型小鼠学习记忆障碍的结果相吻合^[16]。线粒体形态和功能的改变是导致AD能量代谢障碍的重要因素,其损伤与AD脑内特征性病理改变的出现密切相关^[17],因此,保护或改善线粒体的结构和功能,将有利于AD症状的改善和恢复。本实验发现4月龄AD模型小鼠脑组织神经元内线粒体已出现肿胀,提示线粒体已受到损害,而VPA处理组小鼠脑内肿胀的线粒体得到不同程度的减轻。以上结果表明,VPA可促进损伤神经元的修复。

本研究提示VPA可通过减轻线粒体及突触的损害来增强AD模型小鼠脑神经元的抗损伤机制和修复能力,以维持脑组织结构和功能的正常,从而改善AD模型小鼠的学习记忆能力,改善兴奋、烦躁不安等情绪变化。本研究为将VPA用于AD的临床防治提供了实验依据。

参考文献:

- [1] O'Brien R J, Wong P C. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease[J]. *Annu Rev Neurosci*, 2011, 34: 185-204.
- [2] Epis R, Marcello E, Gardoni F, et al. Alpha, beta- and gamma-secretases in Alzheimer's disease[J]. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2012, 4: 1126-1150.
- [3] Li Y M, Lai M T, Xu M, et al. Presenilin 1 is linked with gamma-secretase activity in the detergent solubilized state[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(11): 6138-6143.
- [4] Karran E, Mercken M, De Strooper B. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2011, 10(9): 698-712.
- [5] Hooper C, Killick R, Lovestone S. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease[J]. *J Neurochem*, 2008, 104(6): 1433-1439.
- [6] DaRocha-Souto B, Coma M, Perez-Nievas B G, et al. Activation of glycogen synthase kinase-3 beta mediates β -amyloid induced neuritic damage in Alzheimer's disease[J]. *Neurobiol Dis*, 2012, 45(1): 425-437.
- [7] Kockeritz L, Doble B, Patel S, et al. Glycogen synthase kinase-3—an overview of an over-achieving protein kinase[J]. *Curr Drug Targets*, 2006, 7(11): 1377-1388.
- [8] Lucas J J, Hernandez F, Gomez-Ramos P, et al. Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice[J]. *EMBO J*, 2001, 20(1/2): 27-39.
- [9] Muyliaert D, Terwel D, Borghgraef P, et al. Transgenic mouse models for Alzheimer's disease: the role of GSK-3B in combined amyloid and tau-pathology[J]. *Rev Neurol (Paris)*, 2006, 162(10): 903-907.
- [10] Hooper C, Markevich V, Plattner F, et al. Glycogen synthase kinase-3 inhibition is integral to long-term potentiation[J]. *Eur J Neurosci*, 2007, 25(1): 81-86.
- [11] Williams R S, Cheng L, Mudge A W, et al. A common mechanism of action for three mood-stabilizing drugs[J]. *Nature*, 2002, 417(6886): 292-295.
- [12] Qing H, He G, Ly P T, et al. Valproic acid inhibits A β production, neuritic plaque formation, and behavioral deficits in Alzheimer's disease mouse models[J]. *J Exp Med*, 2008, 205(12): 2781-2789.
- [13] 宋敏,唐军,李达兵,等. PS1/APP双转基因阿尔茨海默病模型传代小鼠的基因型鉴定及其组织学分析[J]. *第三军医大学学报*, 2006, 28(14): 1453-1456.
- [14] Gao B, Long Z, Zhao L, et al. Effect of normobaric hyperoxia on behavioral deficits and neuropathology in Alzheimer's disease mouse model[J]. *J Alzheimers Dis*, 2011, 27(2): 317-326.
- [15] Swiergiel A H, Dunn A J. Effects of interleukin-1beta and lipopolysaccharide on behavior of mice in the elevated plus-maze and open field tests[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2007, 86(4): 651-659.
- [16] 龙志敏,赵蕾,姜蓉,等. 丙戊酸钠对雌雄APP/PS1双重转基因小鼠行为学及老年斑的影响[J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2011, 20(30): 205-207.
- [17] Reddy P H, Beal M F. Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease[J]. *Trends Mol Med*, 2008, 14(2): 45-53.

(收稿:2011-11-27;修回:2012-02-05)

(编辑 王小寒)