

文章编号:1000-5404(2013)04-0311-05

论著

## 阿尔茨海默病小鼠脑中 p75 神经营养因子受体和老年斑的表达

曾凡,姚秀卿,王叶冉,梁春荣,胥娟,胡功玲,周华东,王延江 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所神经内科)

**[摘要]** 目的 探讨阿尔茨海默病(alzheimer's disease, AD)中 p75 神经营养因子受体(p75 neurotrophin receptor, p75NTR)表达和老年斑形成的时相关系及变化情况。方法 取3、6、9月龄雄性 B6C3-Tg( APPSwePSEN1dE9)85Dbo/J 转基因小鼠及同窝野生型小鼠脑组织,采用刚果红、免疫组化和荧光染色方法观察脑中老年斑和变性 p75NTR 阳性神经纤维的表达以及共定位情况,并分别通过 ELISA、Western blot 方法检测脑匀浆中总  $\beta$  淀粉样蛋白(amyloid- $\beta$ , A $\beta$ )和 p75NTR 蛋白水平。结果 转基因小鼠3月龄时皮层、海马未见老年斑形成,6月龄时皮层和海马可见少量老年斑形成,在9月龄时此处老年斑沉积明显增多。ELISA 检测结果提示 A $\beta$  水平随小鼠月龄增加而增多。与同龄野生型小鼠相比,3月龄转基因小鼠皮层和海马可见 p75NTR 阳性神经纤维增多,且部分神经纤维末梢变性膨大;6月龄者皮层、海马 p75NTR 阳性神经纤维增多,出现部分呈不规则球形的变性神经末梢;9月龄者皮层、海马 p75NTR 变性神经末梢显著增多。野生型小鼠在各年龄段均未见变性的 p75NTR 阳性神经末梢。Western blot 结果表明转基因和野生型小鼠脑内 p75NTR 水平均随着年龄增加而增加,且同月龄间相比前者高于后者( $P < 0.01$ )。共聚焦显微镜观察到 p75NTR 阳性的变性神经末梢位于老年斑中心部位,而不表达 p75NTR 的变性神经末梢位于老年斑外周。结论 在转基因小鼠脑内 A $\beta$  能增加 p75NTR 的表达;p75NTR 阳性神经纤维早于老年斑出现,且在老年斑形成后位置靠近老年斑中心,提示其促进了 A $\beta$  沉积的起始过程。

**[关键词]** 阿尔茨海默病;p75 神经营养因子受体; $\beta$  淀粉样蛋白;老年斑

**[中图分类号]** R341;R745.7;R758.4

**[文献标志码]** A

## Expression profile of p75NTR and senile plaque formation in brain of AD transgenic mice

Zeng Fan, Yao Xiuqing, Wang Yeran, Liang Chunrong, Xu Juan, Hu Gongling, Zhou Huadong, Wang Yanjiang (Department of Neurology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

**[Abstract]** **Objective** To compare the expression profile of p75 neurotrophin receptor (p75NTR) and senile plaque formation in a mouse model of Alzheimer's disease (AD). **Methods** Brain sections and homogenates from male B6C3-Tg ( APPSwePSEN1dE9) 85Dbo/J transgenic mice and their male wild type littermates aged 3, 6, or 9 months old ( $n = 6$  for each age) were subjected in this study. The senile plaques, degenerated p75NTR positive neurites and their colocalization were illustrated using Congo red, immunohistochemical and fluorescence staining. ELISA and Western blot analysis were applied to detect the expression level of total A $\beta$  and p75NTR in brain homogenates. Confocal microscopy was used to observe the special distribution of senile plaque, p75NTR positive and negative degenerated neurites. **Results** In the brain of AD transgenic mice, the senile plaques appeared firstly at 6 months in the cortex and hippocampus, where the burden of senile plaques increased at 9 months. It showed an age-dependent increase of A $\beta$  in both Congo red staining and ELISA measures. Meanwhile, the onset of degenerated p75NTR positive neurites occurred as early as 3 months when senile plaques were not yet formed, mainly in the cortex and hippocampus. The expression of p75NTR was elevated with the increase of age in both AD transgenic mice and their wild type littermates, which was even higher in

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30973144)

**[通信作者]** 王延江, E-mail: yanjiang\_wang@tmmu.edu.cn

**[优先出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121211.1308.006.html>(2012-12-11)

transgenic mice. Confocal microscopy showed that p75NTR positive degenerated neurites located in the center of senile plaques while p75NTR negative degenerated neurites were at the periphery of the plaques. **Conclusion** p75NTR expression increases with aging, and is further activated by A $\beta$ . The degenerated p75NTR positive neurites appear much earlier in the cortex and hippocampus than the formation of A $\beta$  plaques, suggesting that p75NTR may promote the initiation of senile plaque formation.

[ **Key words** ] Alzheimer's disease; p75NTR; amyloid- $\beta$ ; senile plaque

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30973144). Corresponding author: Wang Yanjiang, E-mail: yanjiang\_wang@tmmu.edu.cn

阿尔茨海默病(alzheimer's disease, AD)是最常见的痴呆类型,已成为影响老年人健康和生命的重要疾病。 $\beta$ 淀粉样蛋白(amyloid- $\beta$ , A $\beta$ )是AD的核心致病物质,其在脑内沉积形成老年斑是AD的重要病理特征,也是引起脑内神经元变性死亡和痴呆发生的重要原因<sup>[1]</sup>。深入了解A $\beta$ 沉积的发生过程对于阐明AD发生机制和制定防治措施具有重要科学意义。

近年研究发现p75神经营养因子受体(p75 neurotrophin receptor, p75NTR)在介导A $\beta$ 神经毒性和老年斑的产生、沉积、清除等多个AD病理过程中发挥了重要作用。生理条件下,p75NTR在脑内仅表达于血管壁植物神经纤维、基底前脑胆碱能神经元及其投射纤维;而病理条件下,如AD、脑内炎症和颅脑创伤等情况,其它受累神经元也可表达p75NTR。老年斑的形成仅发生在大脑皮层、海马和脑内血管壁,原因尚不清楚。其中前二者为基底前脑胆碱能神经元纤维投射部位,血管壁受植物神经纤维支配,而这些神经元都表达p75NTR。我们的前期研究发现p75NTR阳性的变性神经末梢位于老年斑中心,不表达p75NTR的变性神经末梢位于老年斑周边,且p75NTR通路可促进A $\beta$ 产生<sup>[2]</sup>,提示p75NTR可能参与了老年斑的形成。但目前尚不清楚p75NTR阳性的变性神经末梢和老年斑形成之间的因果关系。为此,本研究探讨了p75NTR表达与老年斑形成的时相关系及在小鼠脑内的变化情况。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

采用美国Jackson动物中心提供的雄性B6C3-Tg(APP-SwePSEN1dE9)85Dbo/J品系双转基因小鼠18只,3、6、9月龄3组各6只,该小鼠携带人致病型淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)和早老素1(presenilin 1, PS1)基因;同窝野生型雌性小鼠18只,分组同前。

### 1.2 主要试剂

刚果红,p75NTR抗体(A $\beta$  9650,由纽约大学Chao M教授提供),A $\beta$ 检测ELISA试剂盒(Covance),针对p75NTR全长的多克隆抗体(G3231, Promega)。

### 1.3 取材

用0.08 g/kg戊巴比妥钠将小鼠深度麻醉后,开胸从左心室以100 mL磷酸盐缓冲液配制的0.1% NaNO<sub>2</sub>进行灌注,以扩张血管达到更好的灌注效果。解剖取出脑组织后于4%多聚甲醛中固定24 h,并置于30%蔗糖溶液中24 h抗冻保护。后将脑组织在矢状面切开分成对称的两部分,其中一半在冰冻切片机下行冠状面切片,厚度35  $\mu$ m。切好后将脑片置于含0.1%叠氮化钠的PBS溶液中4  $^{\circ}$ C保存备用;另一半用含有蛋白酶抑制剂的SDS制成匀浆,用于后续ELISA和Western blot实验。

### 1.4 组织病理分析

刚果红染色:在室温下用氯化钠工作溶液(含有80%酒精和0.01% NaOH的饱和氯化钠溶液)处理切片20 min,后直接置于刚果红工作液(用上述氯化钠工作溶液制成的饱和刚果红溶液)中处理1 h,在无水酒精中快速脱水,常规透明、封片。

免疫组化染色:用p75NTR抗体(1:1 000)检测p75NTR阳性神经纤维表达,采用漂片法进行免疫组化染色。脑片在4  $^{\circ}$ C下用一抗孵育过夜,后加入生物素化二抗37  $^{\circ}$ C下孵育2 h,漂洗后采用ABC试剂盒(vector laboratories)以DAB为底物显色,常规贴片、脱水并封片。Olympus显微镜观察,在光强度和聚光器设置保持不变的条件下摄片。用人工计数和Image J软件定量分析转基因小鼠脑内老年斑表达情况。

A $\beta$ 致密斑、p75NTR阳性纤维及其他p75NTR阴性神经纤维荧光染色:取6月龄小鼠脑片贴于玻片,阴干后浸入现配1%硫黄素S(Sigma)中染色10 min,PBS洗片,50%甘油封片,在荧光共聚焦显微镜下观察A $\beta$ 致密斑。另采用A $\beta$  9650、antibody N52染色以显示p75NTR阳性神经纤维及其他p75NTR阴性神经纤维,同样在荧光共聚焦显微镜下观察。

### 1.5 ELISA检测脑组织A $\beta$ 水平

将脑匀浆在4  $^{\circ}$ C下10<sup>5</sup>  $\times$  g下离心1 h,收集上清,依照说明书(Covance)用ELISA方法检测总A $\beta$ 水平。根据不同小鼠脑匀浆湿质量,总A $\beta$ 水平以“pg/mg”单位表示。

### 1.6 Western blot检测脑组织p75NTR水平

将脑匀浆直接上样在8%~12%的SDS-PAGE中电泳,采用兔源多克隆抗体(G3231, Promega)检测全长p75NTR,同时检测 $\beta$ -actin作为内参。用Image J软件分析各条带的光密度值,蛋白的相对定量结果以“实验条带光密度值/ $\beta$ -actin条带光密度值”的形式表示。

### 1.7 统计学分析

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 18.0统计软件对各月龄

转基因和野生型小鼠间 p75NTR 表达水平进行两独立样本 *t* 检验;对不同月龄小鼠老年斑、脑匀浆总 A $\beta$  水平和 p75NTR 表达水平进行单因素方差分析,组间两两比较行 LSD 检验。

## 2 结果

### 2.1 不同月龄转基因小鼠脑组织切片老年斑表达情况

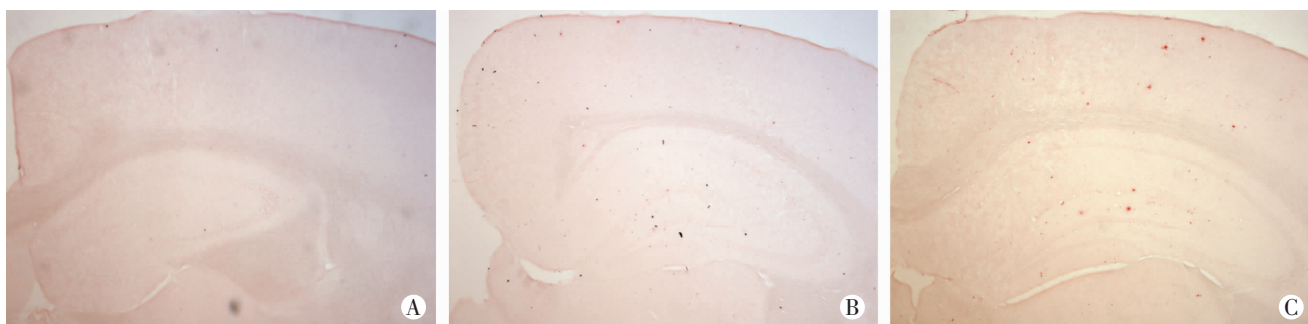
刚果红染色可显示脑内致密的老年斑。染色后可见橘红色的细胞外沉淀物于6月龄开始出现,呈斑块样聚集,主要分布在皮层和海马,大小不一。在9月龄时老年斑沉积明显增多,总体呈随小鼠月龄增加而增多的趋势。由于3、6月龄转基因小鼠脑中老年斑数量很少,故采用人工计数得出其数量分别为0、(4.60  $\pm$  1.10)/切片。9月龄转基因小鼠脑片的斑块数量用 Image J 软件分析,为(100.90  $\pm$  12.42)/mm<sup>2</sup>。同样表明老年斑数量随小鼠月龄增加呈增多趋势。见图1。

### 2.2 不同月龄转基因小鼠脑组织总 A $\beta$ 水平

脑组织先后采用 TBS、SDS 和 Formic Acid 提取,得到不同溶解状态的 A $\beta$ ,然后分别采用 ELISA 法检测其水平,不同提取成分中 A $\beta$  浓度之和为总 A $\beta$  水平。根据 ELISA 实验结果,3、6、9月龄转基因小鼠脑匀浆内总 A $\beta$  浓度分别为(289.54  $\pm$  82.02)、(6380.40  $\pm$  1894.19)、(18354.21  $\pm$  4254.61)pg/mg,其水平随月龄增加而升高,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。

### 2.3 不同月龄小鼠脑组织切片 p75NTR 阳性神经纤维的表达情况

在3月龄时转基因小鼠皮层和海马内均可见增粗的 p75NTR 阳性神经纤维,部分神经纤维末梢变性增大。在6月龄时此处可见少量类圆形的增粗膨大的变性神经末梢,9月龄时这些变性神经末梢显著增多。而野生型小鼠在这个3个月相点内均未见 p75NTR 阳性变性神经末梢。见图2、3。



A:3月龄;B:6月龄;C:9月龄

图1 不同月龄转基因小鼠的皮层和海马老年斑形态学表现(刚果红  $\times 40$ )

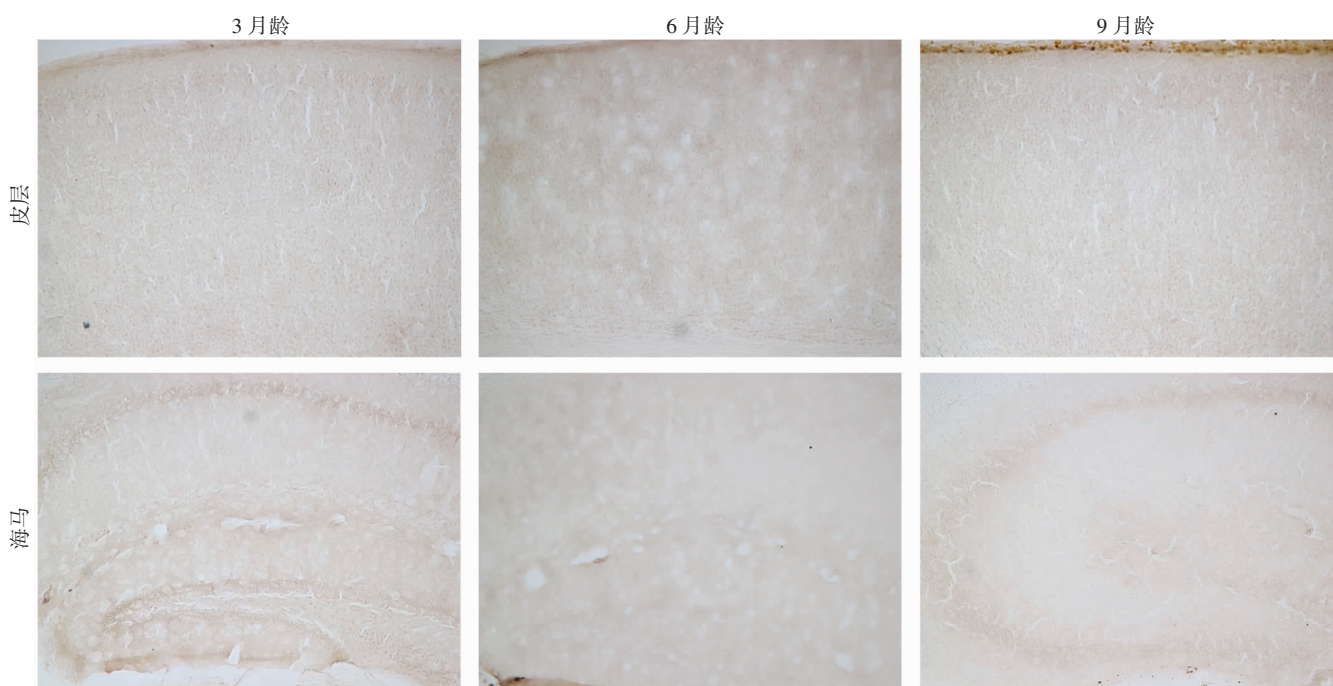


图2 不同月龄野生型小鼠皮层和海马内 p75NTR 免疫组化染色观察 (ABC  $\times 40$ )

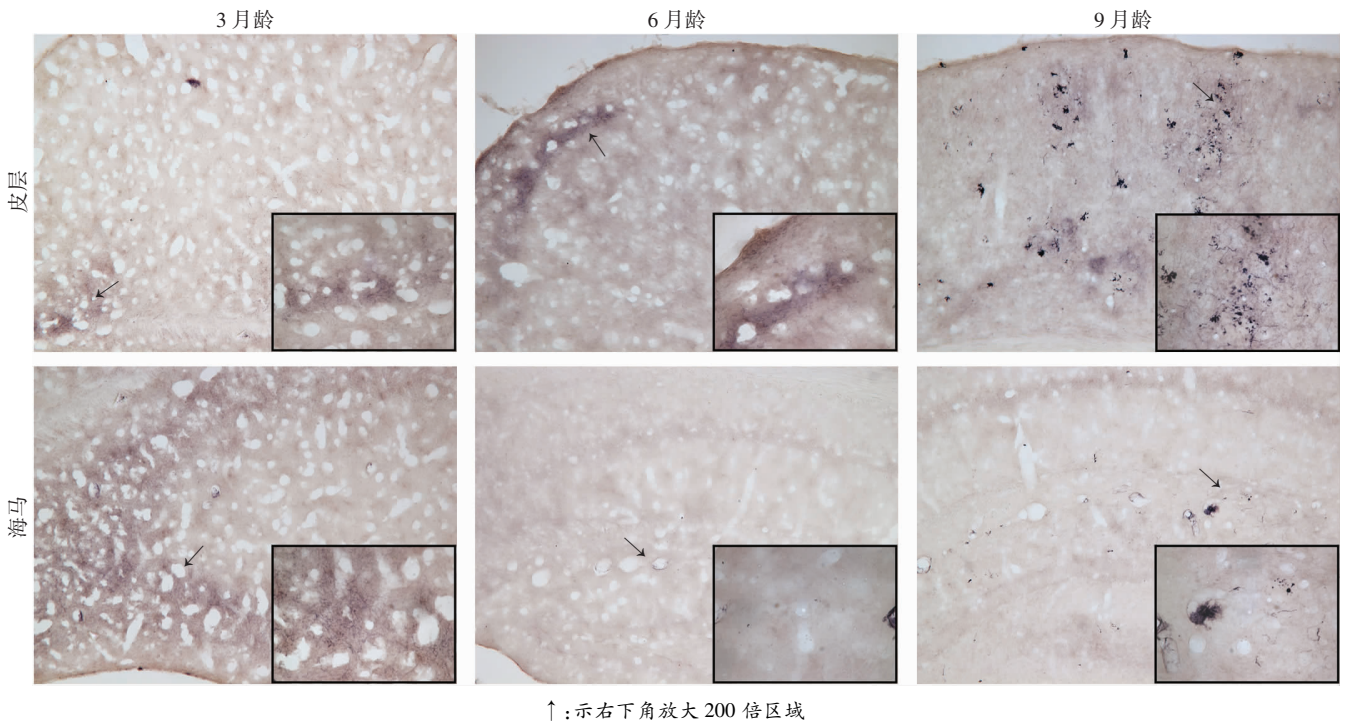
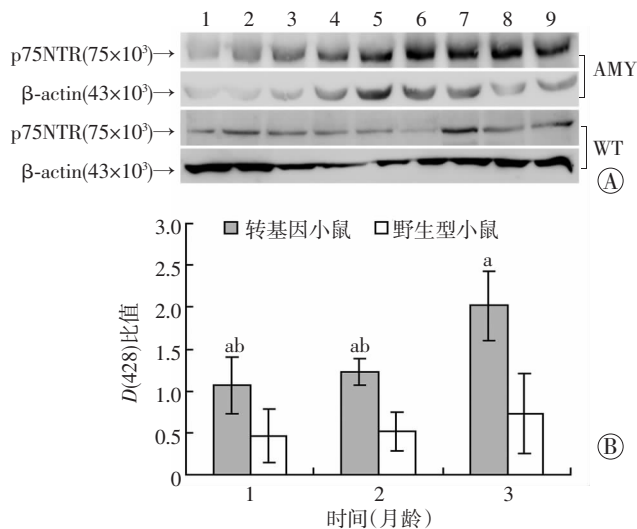


图3 不同月龄转基因小鼠皮层和海马内 p75NTR 免疫组化染色观察 (ABC ×40)

2.4 不同月龄小鼠脑组织匀浆 p75NTR 表达情况比较

Western blot 结果表明,在转基因小鼠脑内 p75NTR 的表达随月龄的增加而增多,9月龄组与3、6月龄组相比差异均具有统计学意义( $P < 0.01$ )。各月龄转基因小鼠脑内 p75NTR 表达水平较野生型增多,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。野生型小鼠脑内 p75NTR 表达也呈逐渐增高趋势( $P > 0.05$ )。见图4。



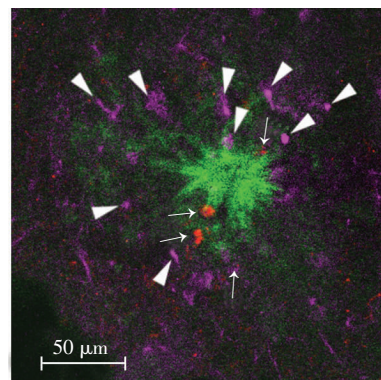
A: Western blot 检测结果 1~3:3只3月龄小鼠;4~6:3只6月龄小鼠;7~9:3只9月龄小鼠;B: 半定量分析结果 a:  $P < 0.01$ , 与野生型小鼠比较;b:  $P < 0.01$ , 与9月龄比较

图4 Western blot 检测不同月龄小鼠脑匀浆 p75NTR 蛋白表达水平

2.5 6月龄转基因小鼠脑片老年斑、p75NTR 阳性纤维和 p75NTR 阴性的其他神经纤维共定位情况

我们对6月龄(即老年斑形成初期)转基因小鼠脑内的老

年斑进行分析,发现 p75NTR 阳性纤维(红色)靠近老年斑(绿色)中心,而 p75NTR 阴性的其他神经纤维(紫色)多位于老年斑周围。提示 p75NTR 纤维参与了老年斑的形成。见图5。



绿色荧光示老年斑(硫黄素S);↑:示 p75NTR 阳性纤维(Aβ 9650);△:示 p75NTR 阴性神经纤维(antibody N52)  
图5 老年斑、p75NTR 阳性纤维和 p75NTR 阴性神经纤维共定位观察

3 讨论

Aβ 在脑内沉积形成老年斑是 AD 发生的重要病理过程,但其调控机制尚不清楚。目前研究表明,多种影响因素参与了脑内老年斑的产生和清除。血脑屏障上的相关受体,主要包括低密度脂蛋白受体相关蛋白1(low-density lipoprotein receptor-related protein 1, LRP-1)和晚期糖基化终产物受体(receptor for advanced glycation end-products, RAGEs)等,以及血脑屏障本身的通透性都可通过影响 Aβ 的流入和流出进

而影响老年斑的形成<sup>[3-4]</sup>。另一方面,淀粉样蛋白降解酶(如脑啡肽酶、胰岛素降解酶等)、小胶质细胞等因素亦可抑制A $\beta$ 沉积或促进老年斑清除<sup>[5-6]</sup>。

p75NTR是一种低亲和力神经营养因子受体,与各种配体和细胞内因子相互作用后可对神经系统产生促生存或致凋亡的不同效应<sup>[7]</sup>。在AD病理条件下p75NTR作为一种A $\beta$ 受体在介导A $\beta$ 产生、沉积和神经毒性的过程中起到了重要作用。与我们前期研究<sup>[2]</sup>的结果一致,本实验发现在6月龄转基因小鼠脑内变性的p75NTR阳性神经末梢多位于老年斑中心,而其他不表达p75NTR的变性神经末梢多位于老年斑周边,但不清楚这些p75NTR阳性神经末梢是促进A $\beta$ 沉积和老年斑形成的原因,还是A $\beta$ 沉积所造成的结果。而值得注意的是我们在实验中观察到变性p75NTR阳性纤维的出现及其表达增加先于老年斑形成,提示位于神经末梢胞膜上的p75NTR很可能是A $\beta$ 沉积的1个始动因素。鉴于胞膜上的p75NTR存在A $\beta$ 结合位点,其很可能通过发挥A $\beta$ 的成核作用促进A $\beta$ 沉积。这一机制值得进一步研究。

本实验结果显示,野生型和转基因小鼠脑内p75NTR表达随月龄增加而增多,以后者更为明显,且转基因小鼠脑内p75NTR表达显著高于同龄野生型小鼠,表明A $\beta$ 可以上调脑内p75NTR表达。这同最近研究发现在AD转基因小鼠脑中(尤其是海马处)和细胞培养体系中A $\beta$ 可以刺激p75NTR表达<sup>[8-9]</sup>的结果是一致的。而根据我们前期研究结果p75NTR通路也可促进A $\beta$ 的产生,二者相互促进从而形成一个正反馈关系<sup>[2]</sup>。因此我们推测,在AD脑内早期主要产生A $\beta$ 单体和寡聚体,此时二者并未大量沉积形成老年斑但促进了p75NTR表达;之后位于细胞膜上的p75NTR逐渐增多并发挥成核作用,既促进了A $\beta$ 沉积,又与之形成相互促进表达的恶性循环,最终导致AD脑内A $\beta$ 过度产生。此外,我们之前的研究表明将在敲除小鼠p75NTR胞外段基因后脑内A $\beta$ 沉积增多,将重组p75NTR胞外段注射到AD转基因小鼠海马处可减少局部老年斑形成<sup>[2]</sup>,同时其能够抑制A $\beta$ 和神经生长因子前体(pro-nerve growth factor, proNGF)的致凋亡效应<sup>[10]</sup>。这表明与位于细胞膜的p75NTR不同,由神经元释放的可溶性p75NTR胞外段能够抑制A $\beta$ 聚集并促进A $\beta$ 清除,二者对A $\beta$ 沉积具有相反的调控作用<sup>[11-12]</sup>。

近年研究报道,在AD脑内p75NTR不仅介导了A $\beta$ 诱导的神经末梢变性和神经元死亡<sup>[13-14]</sup>,还同时参与了神经元的细胞周期再入及神经干细胞的消耗<sup>[11, 15]</sup>。综合前述关于p75NTR对A $\beta$ 代谢和沉积的调控作用,可见p75NTR在AD发生的多个关键环节

中发挥了重要作用,很可能是AD防治的一个重要靶点,值得进一步探索。

#### 参考文献:

- [1] Hardy J, Selkoe D J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics[J]. *Science*, 2002, 297(5580): 353-356.
- [2] Wang Y J, Wang X, Lu J J, et al. p75NTR regulates Abeta deposition by increasing Abeta production but inhibiting Abeta aggregation with its extracellular domain[J]. *J Neurosci*, 2011, 31(6): 2292-2304.
- [3] Silverberg G D, Miller M C, Messier A A, et al. Amyloid deposition and influx transporter expression at the blood-brain barrier increase in normal aging[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2010, 69(1): 98-108.
- [4] Ujiie M, Dickstein D L, Carlow D A, et al. Blood-brain barrier permeability precedes senile plaque formation in an Alzheimer disease model[J]. *Microcirculation*, 2003, 10(6): 463-470.
- [5] Simard A R, Soulet D, Gowing G, et al. Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease[J]. *Neuron*, 2006, 49(4): 489-502.
- [6] Nalivaeva N N, Belyaev N D, Zhuravin I A, et al. The Alzheimer's amyloid-degrading peptidase, neprilysin: can we control it? [J]. *Int J Alzheimers Dis*, 2012, (2012): 383-396.
- [7] Chen Y, Zeng J, Cen L, et al. Multiple roles of the p75 neurotrophin receptor in the nervous system[J]. *J Int Med Res*, 2009, 37(2): 281-288.
- [8] Chakravarthy B, Gaudet C, Menard M, et al. Amyloid-beta peptides stimulate the expression of the p75 (NTR) neurotrophin receptor in SHSY5Y human neuroblastoma cells and AD transgenic mice [J]. *J Alzheimers Dis*, 2010, 19(3): 915-925.
- [9] Perez S E, He B, Muhammad N, et al. Cholinergic basal forebrain system alterations in 3xTg-AD transgenic mice [J]. *Neurobiol Dis*, 2011, 41(2): 338-352.
- [10] Wang Y J, Valadares D, Sun Y, et al. Effects of proNGF on neuronal viability, neurite growth and amyloid-beta metabolism[J]. *Neurotox Res*, 2010, 17(3): 257-267.
- [11] Zeng F, Lu J J, Zhou X F, et al. Roles of p75NTR in the pathogenesis of Alzheimer's disease: a novel therapeutic target [J]. *Biochem Pharmacol*, 2011, 82(10): 1500-1509.
- [12] Zhou X F, Wang Y J. The p75NTR extracellular domain: a potential molecule regulating the solubility and removal of amyloid-beta [J]. *Prion*, 2011, 5(3): 161-163.
- [13] Costantini C, Rossi F, Formaggio E, et al. Characterization of the signaling pathway downstream p75 neurotrophin receptor involved in beta-amyloid peptide-dependent cell death [J]. *J Mol Neurosci*, 2005, 25(2): 141-156.
- [14] Knowles J K, Rajadas J, Nguyen T V, et al. The p75 neurotrophin receptor promotes amyloid-beta(1-42)-induced neuritic dystrophy *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Neurosci*, 2009, 29(34): 10627-10637.
- [15] Frade J M, Lopez-Sanchez N. A novel hypothesis for Alzheimer disease based on neuronal tetraploidy induced by p75 (NTR) [J]. *Cell Cycle*, 2010, 9(10): 1934-1941.

(收稿:2012-10-08;修回:2012-12-06)

(编辑 王小寒)