

β-淀粉样肽₁₋₄₀致阿尔茨海默病大鼠模型 N-甲基-D-天冬氨酸受体及亚型表达分析*

岳 静¹ 王 珏^{1,3} 张广军^{1,2} 李延海¹ 王 毅¹

摘要

目的:研究 β-淀粉样肽₁₋₄₀(Aβ₁₋₄₀)致阿尔茨海默病(AD)大鼠模型前额叶 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体及亚型表达与学习记忆之间的关系。

方法:SD 大鼠对照组和实验组各 12 只,分别脑室内注射磷酸盐缓冲液(PBS)和 Aβ₁₋₄₀ 各 10μl。Morris 水迷宫检测其学习记忆能力,免疫荧光组织化学检测各组大鼠前额叶内 NMDA-NR1、NMDA-NR2B 分布,Western 印迹检测各组大鼠前额叶内 NMDA-NR1、NMDA-NR2B 蛋白表达含量。

结果:实验组参考记忆和工作记忆潜伏期明显低于正常组,大鼠前额叶内 NMDA-NR1、NMDA-NR2B 免疫荧光表达量较弱,大鼠前额叶内 NMDA-NR1、NMDA-NR2B 蛋白表达含量实验组低于正常组,其中 NMDA-NR1 差异明显($P < 0.05$)。

结论:Aβ₁₋₄₀ 诱导的 AD 大鼠模型学习记忆功能降低,特别是工作记忆能力明显减弱,与大脑前额叶内 NMDA 受体表达降低有关,从而部分揭示了前额叶中 NMDA 受体在学习记忆功能中可能的参与作用。

关键词 N-甲基-D-天冬氨酸受体; 阿尔茨海默病大鼠模型; Morris 水迷宫; 免疫荧光; Western 印迹

中图分类号:R749.1 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2010)-06-0531-05

The expressions of N-methyl-D-aspartate receptor and subunits in beta-amyloid 1-40 induced Alzheimer's disease model rats/YUE Jing, WANG Jue, ZHANG Guangjun, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2010, 25(6): 531-535

Abstract

Objective: To analysis the relationship between abilities of learning and memory and expressions of N-methyl-D-aspartate(NMDA)/subunits in prefrontal lobe in beta-amyloid peptide(Aβ₁₋₄₀) induced Alzheimer's disease(AD) model rats.

Method: Aβ₁₋₄₀ and phosphate buffered saline (PBS) were infused intracerebroventricularly in 24 Sprague Dawley rats, respectively. Morris water maze was employed to measure rats learning and memory abilities. The distributions and expressions of NMDA -NR1 and NMDA -NR2B in prefrontal lobe were tested by immunofluorescence histochemistry and Western blotting, respectively.

Result: The latency of reference memory decreased in two groups, but the decrease trend of AD model rats was slower than that of PBS-infused control rats ($P < 0.05$). The latency of working memory delayed in AD model rats compared with control rats ($P < 0.05$). The expression of NMDA-NR1 in prefrontal lobe was significantly lower in AD model rats than that in control rats ($P < 0.01$). And the expression of NMDA-NR2B in prefrontal lobe was lower in AD model rats than that in control rats, but there was no statistic difference between them.

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2010.06.009

* 基金项目:国家自然科学基金委员会资助项目(30670660,10872156)

1 西安交通大学生物医学信息工程教育部重点实验室,生命科学与技术学院,康复科学与技术研究中心,西安,710049; 2 空军工程大学理学院; 3 通讯作者

作者简介:岳静,女,在读博士生; 收稿日期:2010-02-22

Conclusion: The learning and memory abilities were destroyed in AD model rats by infusion of $A\beta_{1-40}$, especially the working memory was destructed markedly. This destruction was related with lower expression of NMDA in the prefrontal. It partly revealed that NMDA in prefrontal lobe might participated the maintenance of learning and memory.

Author's address The Key Laboratory of Biomedical Information Engineering of Ministry of Education, and Research Center of Rehabilitation Science and Technology, School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049

Key words N-methyl-D-aspartate; Alzheimer's disease model rat; Morris water maze; immunofluorescence histochemistry; Western blotting

N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)受体是脑内重要的离子型谷氨酸受体,在中枢神经系统的突触传递和可塑性调节中起着重要作用^[1-2]。诱导 NMDA 受体激活能激发长时程增强(long-term potentiation, LTP),而 LTP 又与学习记忆有密切关系。阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是以学习记忆能力下降为主要症状的神经系统退行性疾病,除海马外,前额叶在学习记忆功能中也起重要作用。为进一步了解前额叶 NMDA 受体与学习记忆功能之间的关系,了解 NMDA 受体对哪种记忆能力影响更明显,本研究拟用 β -淀粉样肽(β -amyloid peptide, $A\beta$)诱导 AD 大鼠模型,通过荧光免疫组织化学和 Western 印迹检测 AD 大鼠前额叶 NMDA 受体及亚型的表达,并明确这种表达的变化与其学习记忆能力的关系。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

$A\beta_{1-40}$ 蛋白片段(Sigma 公司, A1075), NMDA-NR1 多克隆抗体(Chemicon 公司, AB5044P), NMDA-NR2B(Chemicon 公司, AB1557P), Actin(C-11)(Santa Cruz, sc-1615)、辣根酶标记山羊抗兔 IgG(中杉金桥, ZB-2301), 罗丹明标记山羊抗兔 IgG(中杉金桥, ZF-0316)。

1.2 动物选择与分组

Morris 水迷宫(Morris Water Maze, MWM)筛选大鼠,淘汰学习成绩过低者(120s 内未找到平台),选择 45 日龄 220—204g Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠 24 只(西安交通大学医学院实验动物中心提供),符合一级清洁标准。随机分为对照组[注射磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)]和实验

组(注射 $A\beta_{1-40}$),每组各 12 只。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组处理与造模:大鼠按体重戊巴比妥钠麻醉后,固定于颅脑立体定位仪(Narishige, SR-5R)上。颅顶区常规备皮消毒后沿颅顶中线切开皮肤,分离软组织和骨膜。于前囟后 1.2mm,中线旁开左右各 1.95mm 处,钻孔打开颅骨^[3]。挑开硬脑膜后,微量进样器沿脑表面进深 3.2mm,入双侧脑室。对照组和实验组分别双侧脑室缓慢注入 PBS 和 $A\beta_{1-40}$ (1mg/ml) 5 μ l。留置 10min 后,缓慢退出微量注射器,缝合伤口并局部涂抹红霉素预防感染。术后连续 3d 肌肉注射青霉素预防感染。术后 1d 自由进食。大鼠脑室内注射 $A\beta_{1-40}$ 11 周后行如下实验流程。

1.3.2 Morris 水迷宫观察大鼠学习记忆能力:①参考记忆(长时记忆):共 5d(第 1—5 天),第 1 天不设置平台,大鼠适应性游泳 2min,水温控制 23 \pm 1 $^{\circ}$ C。第 2—5 天开始记录,每天上下午分别进行 4 次水迷宫检测,每次从不同象限入水,记录大鼠爬上平台所用时间(潜伏期)和距离(潜伏期距离)。第 5 天下午检测完毕后,撤离平台,将大鼠从平台相对象限入水,观察其在 2min 内穿越平台次数;②工作记忆(短时记忆):共 3d(第 6—8 天),每天 4 次,每天更换平台位置。第 1 次不记录,大鼠可自由寻找平台,记录 2—4 次大鼠爬上平台所用潜伏期和潜伏期距离。

1.3.3 免疫荧光组织化学检测前额叶 NMDA 受体及亚型表达:大鼠麻醉后,左心室灌注多聚甲醛 250ml,固定大脑。取脑后蜡块包埋,切片,组织厚度 4 μ m。组织切片脱蜡脱水后,3% 双氧水抑制过氧化物酶,柠檬酸微波修复抗原。一抗(NMDA-NR1, NMDA-NR2B)1:500 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h, PBS 洗涤后,二抗(罗丹明标记山羊抗兔 IgG)1:100 37 $^{\circ}$ C 孵育 1.5h,

PBS 洗涤后,封片,免疫荧光显微镜下观察 NMDA 受体表达分布。

1.3.4 Western 印迹检测前额叶 NMDA 受体及亚型表达:大鼠麻醉后迅速断头冰上取脑,取出前额叶置于液氮内迅速冷冻,后-70℃保存。机械粉碎组织后加入载样缓冲液煮沸,使蛋白变性。选用 8%分离胶电泳分离蛋白,恒压 120V,1.5h。分离后,100V 恒压,90min 转膜将蛋白转入硝酸纤维素膜(nitrocellulose filter membrane, NC)。含 3%牛血清白蛋白(bovine serum albumin,BSA)的 Tris 缓冲盐-吐温溶液(Tris-buffer saline containing Tween-20, TBST)封闭过夜。一抗(NMDA-NR1,NMDA-NR2B) 1:1000 37℃孵育 1h,TBST 洗涤后,二抗(辣根酶标记山羊抗兔 IgG) 1:8000 37℃孵育 45min。TBST 洗涤后,增强型化学发光剂(enhanced Chemiluminescence,ECL)显像,压片。Quantity One 半定量分析蛋白灰度。

1.4 统计学分析

采用 SPSS17.0 分析,t 检验,α=0.05 (双侧检验)。

2 结果

2.1 Aβ₁₋₄₀ 对大鼠水迷宫检测潜伏期的影响

共有 22 只大鼠行水迷宫检测,对照组 12 只,实验组 10 只(另两只因不明原因丧失游泳能力)。表 1 显示,对照组和实验组参考记忆潜伏期比较。对照组

和实验组大鼠随训练时间逐渐延长,其潜伏期逐渐降低。实验组降低较为均匀,且均慢于实验组。第 2 天两组潜伏期差异无显著性意义(P>0.05),第 3 天对照组下降较为明显,两组差异有非常显著性(P<0.01),第 4 天和第 5 天均有显著性差异(P<0.05)。

表 2 显示的是对照组和实验组工作记忆潜伏期比较。对照组和实验组工作记忆潜伏期之间存在显著性差异。第 6 天两组之间差异无显著性(P>0.05),第 7 天实验组潜伏期明显长于对照组(P<0.01),第 8 天实验组潜伏期和对照组潜伏期也有显著性差异(P<0.05)。

2.2 对照组和实验组前额叶 NMDA-NR1 和 NMDA-NR2B 分布比较

各组随机选取 2 只行免疫荧光检测 NMDA-NR1 和 NMDA-NR2B 在前额叶区域的分布情况。可见 NMDA-NR1 和 NMDA-NR2B 均分布在细胞膜上,荧光显像形如环状。这两个受体在两组前额叶分布中具有差异。对照组荧光分布较实验组广,且亮度较高于实验组。

2.3 对照组和实验组前额叶 NMDA-NR1 和 NMDA-NR2B 蛋白表达比较

剩余大鼠(对照组 10 只,实验组 8 只)均进行前额叶 NMDA-NR1 和 NMDA-NR2B 蛋白水平检测。从图 1 中可知,实验组前额叶区域 NMDA-NR1 表达明显低于对照组,且有显著性差异(P<0.05)。NMDA-NR2B 表达低于对照组,但差异没有显著性。

表 1 对照组和实验组参考记忆潜伏期比较 (x̄±s,ms)

组别	鼠数	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
对照组	12	46174±15866	17995±6173	18069±5921	11408±3573
实验组	10	43493±13791	30634±11106 ^②	24871±11274 ^①	16690±6689 ^①

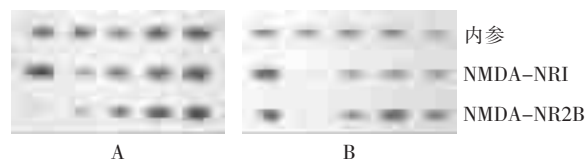
①P<0.05,②P<0.01

表 2 对照组和实验组工作记忆潜伏期比较 (x̄±s,ms)

组别	鼠数	第 6 天	第 7 天	第 8 天
对照组	12	21330±12949	13125±7185	13398±5849
实验组	10	18167±11038	24788±11846 ^②	27945±19099 ^①

注:①P<0.05,②P<0.01

图 1 对照组(A)和实验组(B)前额叶 NMDA-NR1 和 NMDA-NR2B 蛋白表达



Aβ₁₋₄₀ 的 SD 大鼠前额叶 NMDA-NR1 和 NMDA-NR2B 进行测定,发现注射后的大鼠水迷宫学习记忆能力明显减弱,前额叶内 NMDA-NR1 和 NMDA-

3 讨论

本研究主要运用 Morris 水迷宫、免疫荧光组织化学和 Western 印迹等方法,对双侧脑室内注射

NR2B 分布和表达含量均明显降低。

大鼠脑内注射 A β 致 AD 模型是一个相对成熟的 AD 模型制作方法。根据注射部位,单双侧和 A β 类型等有多种制作手段。注射部位包括海马、侧脑室、纹状体等,一般分为单侧注射和双侧注射,多使用 A β_{25-35} ,A β_{1-40} 和 A β_{1-42} 等,有单次足量注射或微量泵多次注射等。本研究采用双侧脑室单次注射 A β_{1-40} 制作手段,脑室注射避免了在海马和纹状体等部位注射造成的机械损伤,A β 进入脑室通过脑脊液能均匀作用于大脑,双侧注射使 A β 分布更均匀。单次注射聚集态 A β 和多次微量注射溶解态 A β 所致效果一样^[4],且容易实现,使用仪器要求不高,被许多研究者广为使用。A β_{1-40} 是脑内淀粉样沉积的主要物质,能更易模仿淀粉样沉积对大脑的影响。双侧脑室各注射 5 μ l 聚集态 A β_{1-40} 后,AD 模型鼠出现学习记忆能力下降。

Morris 水迷宫主要检测大鼠的参考记忆和工作记忆。参考记忆检测过程中,平台位置始终保持不变,随着训练次数的增多,逐渐强化记忆平台位置的能力,主要评测长期记忆的能力。本研究显示 AD 模型鼠寻找平台的时间也会随着训练时间的增强而减弱,但减弱幅度不及对照组,如需得到对照组的程度,必须增加训练次数以增强学习记忆能力。在检测工作记忆过程中,每天的平台位置均发生变化,前一天的训练结果并不影响第二天的成绩,需要每次重新记忆平台位置以便迅速逃离水体。这主要用于测评短期记忆能力。A β 注射致 AD 大鼠模型的短期记忆也有不同程度的损伤,且损伤程度大于长期记忆能力。可知 A β 对短期记忆能力影响比对长期记忆的影响更迅速也更敏感。这与 AD 患者最先容易遗忘近期发生的事情症状相吻合。随着疾病逐渐加重,逐渐遗忘过去发生的很多事情,长期记忆逐渐损害。

近年来,NMDA 受体逐渐成为研究热点。NMDA 受体为离子型谷氨酸受体,主要参与神经系统的多种重要生理功能,其异常可以引起某些神经精神系统疾病。NMDA 受体由不同亚基组成的异四聚体,主要有 NR1,NR2 和 NR3 三种亚基。每个 NMDA 受体均含有至少一个 NR1 亚基和一个 NR2 亚基,NR2 可为不同类型,NMDA-NR2B 主要分布于前脑区域。NMDA 受体在中枢神经系统的突触可塑性中发挥重

要作用,主要参与诱导和维持 LTP,形成空间记忆等。研究表明,A β 能够抑制谷氨酸诱发电流,选择性抑制 NMDA 受体调节的信号传导,使得 NMDA 受体功能性下调,突触可塑性降低^[5],同时还能够干扰 NMDA 受体下游信号通路,包括钙依赖型蛋白磷酸酶等^[6],例如 AD 大脑前额叶中 NMDA-NR1 和磷酸化 Ca²⁺/钙调蛋白依赖性蛋白激酶水平下降^[7],使得信号传导障碍,最终表现为学习功能障碍。AD 的初始阶段因为 A β 蓄积引起谷氨酸受体功能障碍,致使谷氨酸能突触传递障碍,与早期的认知损伤平行^[8]。运用原位杂交技术得知随着 AD 疾病的逐渐加重,AD 患者脑内 NMDA 受体下调^[9],脑内 NMDA-NR1/2B 的 mRNA 表达量明显降低^[10-11],主要表现为海马和嗅皮质区域 NMDA-NR2B 表达降低^[12-14]。近年来越来越多的研究显示,前额叶与多种感觉信息加工、注意、记忆等高级活动有关,特别是对工作记忆关系密切,当前额叶受损时,可以表现为短时记忆受损^[15-16]。本研究通过荧光免疫组化染色可见 AD 大鼠前额叶内 NMDA-NR1 和 NMDA-NR2B 的分布密度和强度都低于对照组。Western 印迹对前额叶 NMDA-NR1 和 NMDA-NR2B 进行蛋白含量测定结果与免疫荧光结果吻合,AD 模型组前额叶这两个受体亚型均低于对照组。可以得出,A β 所致 AD 大鼠脑内神经细胞突触丢失,NMDA 受体含量减少,无法维持长时程增强和空间记忆能力,致使 AD 大鼠学习记忆功能减弱,特别是短时记忆损害。

4 结论

本文运用水迷宫、免疫组化和 Western 印迹等方法探讨 A β_{1-40} 致 AD 大鼠模型大脑前额叶 NMDA 受体分布与学习记忆的关系,发现 A β_{1-40} 可引起大鼠前额叶神经细胞突触丢失,NMDA 受体减少,进一步引起学习记忆能力损伤,特别是短时记忆丧失,从而部分揭示了前额叶中 NMDA 受体在学习记忆功能中可能的参与作用。建议可以运用功能锻炼等方法适当提高前额叶脑区能力,以改善 AD 患者记忆功能。由于本研究只针对部分 NMDA 受体在前额叶的分布情况,建议后期研究增加其他 NMDA 受体亚型在其他脑区的分布情况,以确切其在脑内包括记忆的其他功能。

参考文献

- [1] Laurie DJ, Seeburg PH. Ligand affinities at recombinant N-methyl-D-aspartate receptors depend on subunit composition[J]. Eur J Pharmacol, 1994, 268(3):335—345.
- [2] Lee HK, Takamiya K, Han JS, et al. Phosphorylation of the AMPA receptor GluR1 subunit is required for synaptic plasticity and retention of spatial memory [J]. Cell, 2003,112(5): 631—643.
- [3] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates [M]. 5th Edition. USA: Elsevier Academic Press,2005.83.
- [4] O'Hare E, Weldon DT, Mantyh PW, et al. Delayed behavioral effects following intrahippocampal injection of aggregated A beta(1-42) [J]. Brain Res, 1999,815(1): 1—10.
- [5] Zhang JF, Hou L, Gao XP, et al. Amyloid beta-protein differentially affects NMDA receptor- and GABA (A) receptor-mediated currents in rat hippocampal CA1 neurons [J]. Progress in Natural Science, 2009,19(8): 963—972.
- [6] Yamin G. NMDA receptor-dependent signaling pathways that underlie amyloid beta-protein disruption of LTP in the hippocampus[J]. J Neurosci Res, 2009,87(8):1729—1736.
- [7] Amada N, Aihara K, Ravid R, et al. Reduction of NRI and phosphorylated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II levels in Alzheimer's disease [J]. Neuroreport, 2005,16 (16): 1809—1813.
- [8] Parameshwaran K, Dhanasekaran M, Suppiramaniam V. Amyloid beta peptides and glutamatergic synaptic dysregulation [J]. Exp Neurol, 2008,210(1): 7—13.
- [9] Jacob CP, Koutsilieri E, Bartl J, et al. Alterations in expression of glutamatergic transporters and receptors in sporadic Alzheimer's disease [J]. Journal of Alzheimers Disease, 2007,11(1):97—116.
- [10] Mishizen-Eberz AJ, Rissman RA, Carter TL, et al. Biochemical and molecular studies of NMDA receptor subunits NR1/2A/2B in hippocampal subregions throughout progression of Alzheimer's disease pathology [J]. Neurobiology of Disease, 2004,15(1):80—92.
- [11] Hynd MR, Scott HL, Dodd PR. Differential expression of N-methyl-D-aspartate receptor NR2 isoforms in Alzheimer's disease[J]. Journal of Neurochemistry, 2004,90(4):913—919.
- [12] Tsai SJ, Liu HC, Liu TY, et al. Association analysis for the genetic variants of the NMDA receptor subunit 2b and Alzheimer's disease [J]. Dementia and Geriatric Cognitive Disorders, 2002,13(2):91—94.
- [13] Bi H, Sze CI. N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2A and NR2B messenger RNA levels are altered in the hippocampus and entorhinal cortex in Alzheimer's disease[J]. Journal of the Neurological Sciences, 2002,200(1—2): 11—18.
- [14] Sze CI, Bi H, Kleinschmidt-Demasters BK, et al. N-Methyl-D-aspartate receptor subunit proteins and their phosphorylation status are altered selectively in Alzheimer's disease[J]. Journal of the Neurological Sciences, 2001,182(2):151—159.
- [15] 季俊霞,江钟立,贺丹军,等. 基底核损伤与额叶损伤对注意力和短时记忆的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2008,23(1):30—33.
- [16] 谢敏,徐波,王泽军. 游泳训练对大鼠空间学习记忆能力与海马前额叶皮质环磷酸腺苷、环磷酸鸟苷水平的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2009,24(11):1002—1005.

小儿神经系统疾病诊疗暨 A 型肉毒毒素在儿科临床应用进展学习班

北京天坛医院将于 2010 年 8 月 23—27 日在北京举办国家级继续教育项目“小儿神经系统疾病诊疗及 A 型肉毒毒素在儿科临床应用进展学习班”,授课教师为小儿神经内科、神经外科、康复医学、神经影像、神经电生理等领域著名专家。本年度增加了小儿神经病学内容,力争在短期学习过程中,使学员收获最好效果。

主要授课内容:脑性瘫痪概述(高宝勤);肉毒毒素及其制品安全使用(王荫春);A 型肉毒毒素在儿科临床应用的进展(王雅洁,实际操作演示);减低早产儿脑性瘫痪发生率的研究及 0—1 岁神经运动检查(鲍秀兰,实际操作演示);小儿运动障碍的康复治疗(任世光);小儿脑瘫语言障碍的评价和治疗(李胜利,实际操作演示);高压氧在小儿神经病学领域的实际应用(薛连璧);脑电图、肌电图及脑磁图在儿科临床的应用(乔慧);小儿癫痫的诊治和抗癫痫药物的合理使用(丁成赞);儿童头痛的诊断和治疗进展(梁承玮);小儿神经系统疾病神经影像学诊断(李少武);功能性超选择性脊神经根切断术治疗痉挛性脑瘫(王贵怀,病例演示);小儿脑血管病诊断治疗进展和烟雾病的手术治疗(张东,病例演示)。

参加对象:儿科、妇幼保健科、神经内科、神经外科、康复医学科的医、技人员。学习班名额 50 人。额满为止。学费和学分:学费 1200 元(含讲义费,光盘)。食宿统一安排,费用自理。考试合格者授予国家继续教育 I 类学分 10 分。时间:2010 年 8 月 21—22 日(周六、日)上午报到,23 日开始正式上课。报到地点:北京市崇文区天坛西里六号北京天坛医院儿科门诊(恕不接站)。北京南站乘 20 路公共汽车到先农坛下车,北京站乘 729 路公共汽车,北京西站乘运通 102 路(途经 10 站)永定门东下车步行 10—20 米到永定门东乘 803 路、36 路、120 路到途经 1 站先农坛下车。

联系方式:北京市崇文区天坛西里六号北京天坛医院儿科,邮编 100050;联系人:王桂芬,杨伟力;电话:010-67098227、67096615,15300192946;电子邮件:wgf6322@yahoo.com.cn。若无第二轮通知,请按时报到。