文章编号:1000-5404(2006)14-1453-04

论著

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

宋 敏[1],唐 军[2],李达兵[2],徐海伟[2],白 云[1](第三军医大学基础医学部:[1]医学遗传学教研室,[2]生理学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 对所获的PS1/APP双转基因阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)模型小鼠进行基因鉴定,进一步对其进行组织学分析,检测老年斑(senile plaque, SP)的形成情况。**方法** 设计特定的引物,PCR扩增转入基因组DNA中的APP基因,对转入PS1/APP的小鼠应用刚果红染色结合免疫组化观察Aβ沉积、小胶质细胞和星型胶质细胞的活化。**结果** 与未转入的阴性对照相比,在PS1/APP双转基因的AD小鼠皮质和海马内可见Aβ斑块形成,围绕在Aβ斑块周围的小胶质细胞和星形胶质细胞处于活化状态,形成典型的SP结构。**结论** 我们获得的PS1/APP双转基因小鼠能够模拟AD患者脑内的主要病理过程,提供有效的实验动物模型。

关键词:阿尔茨海默病;转基因小鼠;老年斑
中图法分类号:R394-33;R394.2;R749.16 **文献标识码**:A

Genetype identification and histologic analysis of PS1/APP double transgenic Alzheimer disease mouse model

SONG Min[1], TANG Jun[2], LI Da-bing[2], XU Hai-wei[2], BAI Yun[1]([1]Department of Molecular Genetics, [2]Department of Physiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To identify the genetype of the PS1/APP double transgenic mouse model, analyse the tissue histology and detect the formation of the senile plaque. Methods The specific primer was designed and the APP gene was amplified by PCR from the mouse genome DNA. The Aβ deposits, activation of microglia and astrocyte were observed by the congo red staining and immunohistologic methods. Results As compared to the negative control, the PS1/APP mouse displayed Aβ deposits restricted to cortical and hippocampal structures, the activated microglia and astrocyte surrounded the plaque, thus the classic senile plaque stucture was formed. Conclusion The double transgenic PS1/APP mouse produced by the two mice we bought from American Jackson Laboratory could simulate the specific pathogenesis of Alzheimer disease and be the efficient experimental animal model.

Key words: Alzheimer disease; transgenic mouse; senile plaque

阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)作为一种病因尚未完全明了的神经退行性疾病,其发病机制的研究一直是神经科学研究的热点。目前,Aβ炎性假说[1]因其能够较好的符合病理学、实验以及临床流行病学研究结果而受到越来越多研究者的承认。

该学说认为:Aβ(β-amyloid)42肽在脑内的异常沉积是AD致病的关键和始动因素。$A\beta_{42}$肽由淀粉样蛋白跨膜前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)经过内源性分泌酶裂解后的跨膜区和胞外区片段组成。在正常情况下,APP裂解后大部分是纤维原性较低、不易聚集的$A\beta_{40}$肽,只有5%~10%是较长的、纤维原性较高的$A\beta_{42}$肽,并通过正常的生理机制降解。而在AD患者中,由于基因突变或者清除机制障碍导致$A\beta_{42}$增多,其在体外彼此通过高度的疏水作用而聚合成寡聚体,进而形成纤丝沉积直至形成较致密的斑块,从而导致氧化应激、破坏离子平衡、激活补体系统、活化小胶质细胞和星型胶质细胞等途径导致引发一系列的病理学变化和相应的临床表现[2]。

针对Aβ炎性假说,目前构建了多种实验动物模

基金项目:国家自然科学基金海外青年学者合作研究基金资助项目(30228018)
Supported by the National Natural Science Foundation of China-Joint Research Fund for Overseas Chinese Young Scholars(30228018)
作者简介:宋 敏(1979-),男,江西省九江市人,博士研究生,助教,主要从事神经免疫方面的研究。电话:(023)68753925
通讯作者:白 云,电话:(023)68752258,E-mail:geneby@yahoo.com.cn
收稿日期:2005-06-29;修回日期:2005-09-18

型。如侧脑室直接注射 Aβ 多肽以及 APOE、早老素-1（presenilin 1，PS-1）、β-淀粉样前体蛋白（β-amyloid precursor protein，β-APP）转基因动物模型[3]等，但是由于 $A\beta_{42}$ 肽分泌增多是由于多基因突变导致，因此研究者们开始构建两基因甚至三基因突变的小鼠模型，研究证明转基因动物相对能够比较好的模拟 AD 病的病理学变化[4]。为此，我们从 Jackson 实验室购入了 APPswe/PS1 双转基因小鼠杂合体种鼠 2 只进行繁殖，由于种鼠为杂合体，根据遗传规律所获后代有 1/4 的几率为阴性纯合子，所以在使用前必须进行基因型检测。而后，我们以阴性纯合子（野生型）为对照，对所获的阳性的 PS1/APP 双转基因阿尔茨海默病模型小鼠进一步进行用刚果红组织学染色结合免疫组织化学染色，检测老年斑（senile plaque，SP）的形成情况，特别是小胶质细胞和星型胶质细胞的活化，探讨我们所获模型的应用价值。

1 材料与方法

1.1 实验动物

美国国立 Jackson 动物中心提供 B6C3-Tg（APPswe，PSEN1de9）85Dbo/J 品系双转基因小鼠杂合体种鼠 2 只，繁殖所产生后代 6 只，9～12 月龄，分笼喂养于光照/黑暗为12 h/12 h 的恒温环境，每笼 2 只，自由摄食和饮水。

1.2 主要试剂

小鼠血液基因组 DNA 提取试剂盒购自上海生工，*Taq* 酶购自大连宝生物工程公司；小鼠抗人 Aβ 抗体（Sigma）、大鼠抗小鼠 MHC Ⅱ I-A/I-E（BD）、山羊抗小鼠 GFAP 多抗，HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG、HRP 标记山羊抗大鼠、生物素标记兔抗山羊多克隆抗体（相应三抗为 HRP 标记链霉素）等及 DAB 显色试剂盒购自北京中山生物公司。

1.3 PS1/APP 转基因小鼠基因型鉴定

抽取小鼠尾血 30 μl，加入 70 μl EDTA-二钠抗凝剂。参照小鼠血液基因组 DNA 试剂盒所提供方法提取基因组 DNA，紫外分光光度计和电泳鉴定后，根据 Jackson 动物中心设计合成引物序列，扩增 APP，上游 5′-GACTGACCACTCGACCAGGTTCTG-3′，下游 5′-CTTGTAAGTTGGATTCTCATATCCG-3′，其产物大小为 350 bp。阳性对照为 β-actin，上游 5′-GCTACAGCTTCACCACCACAG-3′，下游 5′-GGTCTTTACGGATGTCAACGTC-3′，扩增产物 232 bp。反应总体系为 25 μl：10 × buffer 2.5 μl，ddH_2O 9.5 μl，dNTP 5 μl，$MgCl_2$ 1.5 μl，引物各 0.5 μl，基因组 DNA 5 μl，94 ℃预变性 5 min 后加入 *Taq* DNA 聚合酶 1 μl，94 ℃ 60 s，56 ℃ 60 s，72 ℃ 60 s，循环 35 次。完毕后电泳分析。

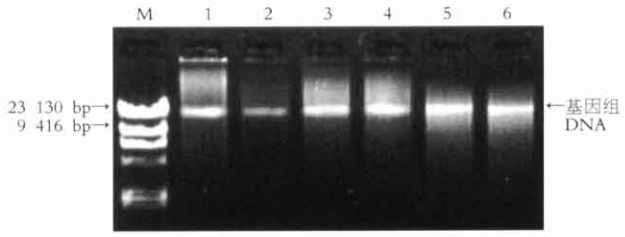
1.4 PS1/APP 转基因小鼠脑组织的病理学及免疫组织化学分析

用戊巴比妥钠 100 mg/kg 将动物深度麻醉，开胸从左心室插管至升主动脉，先灌注生理盐水 100 ml，随后灌注由 0.1 mol/L PBS 配制的 40 g/L 多聚甲醛 100 ml。取脑后固定，脱水。待脑沉底后用冰冻切片机切片，厚为 40 μm。将包含齿状回和海马的所有切片按顺序收集于盛有抗冻缓冲液的 12 孔培养板中，每隔 5 张切片取 1 张切片，每只小鼠可得 5 套部位相同或相近、每套包含海马和齿状回的 12 张切片。分别用于刚果红组织学染色、Aβ、MHC-Ⅱ、GFAP 免疫组织化学染色。刚果红染色程序：切片贴于涂有多聚赖氨酸的载玻片上自然干燥，苏木精染色 5～10 min，冲洗，1 % 盐酸乙醇分化数秒钟，温水显蓝，冲洗；甲醇刚果红染色 15 min，冲洗；0.12 % 碱性乙醇分化数秒钟，冲洗后常规脱水、透明、封片。免疫组化染色程序：采用漂片法：小鼠抗人 Aβ 抗体（1/1 000）显示 Aβ 斑块，大鼠抗小鼠 MHC-Ⅱ（1/400）染色显示活化小胶质细胞，山羊抗小鼠 GFAP 多克隆抗体（1/400）显示星型胶质细胞，37 ℃孵育 2 h 后 4 ℃过夜，二抗分别为 HRP 标记大鼠抗小鼠，HRP 标记山羊抗大鼠，生物素标记兔抗山羊多克隆抗体（三抗为 HRP 标记链霉素），37 ℃孵育 2 h 后，漂洗，DAB 显色。常规贴片，脱水、透明封片。Olympus 显微镜观察，摄片。

2 结果

2.1 小鼠血液基因组 DNA 抽提鉴定

采用 λDNA/*Hind*Ⅲ为标准，电泳鉴定所获小鼠基因组。显示所提取 6 只小鼠的基因组 DNA 大小为 20 kb 左右。由于所提取的小鼠尾血不完全一致，因此所得基因组 DNA 浓度不完全均一，但从条带中可见明显清晰基因组 DNA 条带，符合所需，能够进行 PCR 鉴定，见图 1。



M：λDNA/*Hind*Ⅲ标准；1－6：6 只传代小鼠基因组 DNA

图 1 小鼠基因组抽提结果

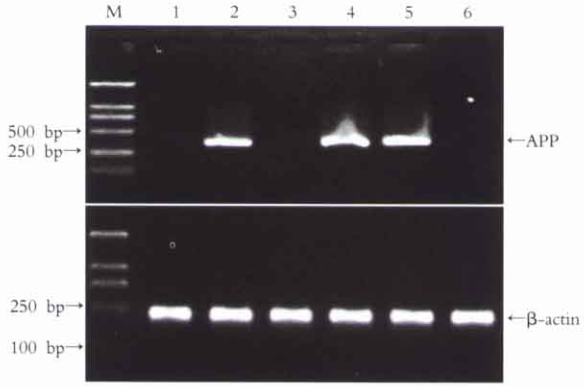
2.2 PCR 扩增 APP 基因

以基因组 DNA 为模板，可见有在所获 6 只小鼠中均扩增出 230 bp 大小条带阳性对照 β-actin，其中 3 只小鼠基因组 DNA 扩增出 350 bp 大小条带，与预计所扩增 APP 基因大小一致（图 2）。由于该小鼠在构建时载体为大脑特异性的 PrP 启动子同时控制 PS1 和 APP 基因的表达，所以扩增出 APP 可认为所获后代中有 3 只成功转入 PS1 和 APP 基因。

2.3 刚果红染色结果

染色背景清晰干净，视野下可见较多桔红色细胞外沉淀物，呈斑块样聚集，周围绕以蓝色细胞带。主要分布于 PS1/APP 双转基因小鼠的海马、齿状回和大脑皮质等部位。每侧海

马和齿状回有 10～20 个 Aβ 斑块，其大小不等，主要分布在多型细胞层和分子层，在大脑皮质各层均可见有 Aβ 斑块的分布。在我们所得到的不同年龄组的转基因小鼠中随着年龄增加，斑块的数量也呈现逐步增加的趋势。见图 3。



M：λDNA/*Hind*Ⅲ标准；1－6：6 只传代小鼠基因组 DNA

图 2　PCR 扩增 APP 基因结果

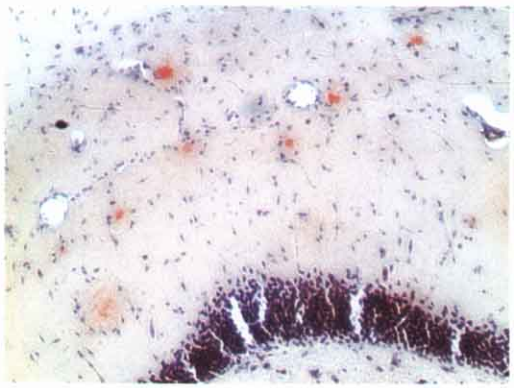


图 3　转基因小鼠海马 CA3 区刚果红染色结果　（×200）

2.4　免疫组化结果

2.4.1　Aβ 染色　　转基因小鼠 Aβ 免疫组化结果如图 4 所示，可见背景清晰干净，低倍视野下有较多棕褐色细胞外沉淀物，呈斑块样聚集。主要沉积在皮层、海马，与刚果红染色的结果一致。

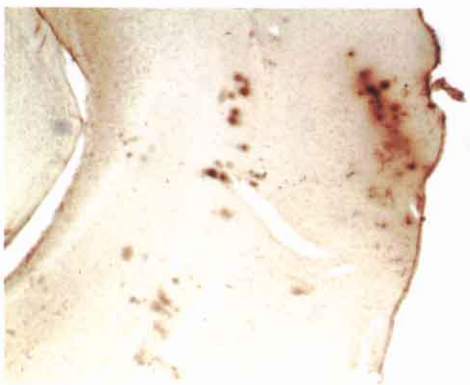
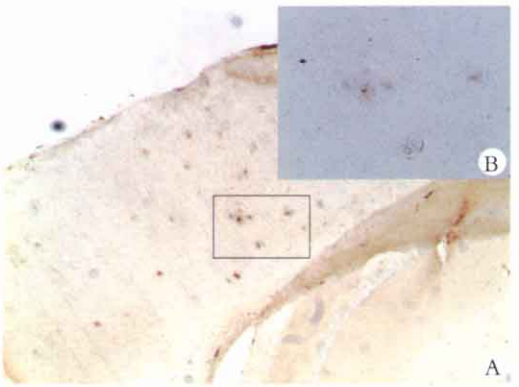


图 4　转基因小鼠皮层 Aβ 间接免疫组化染色结果　（×40）

2.4.2　小胶质细胞染色　　利用活化的小胶质细胞的标记物 MHC-Ⅱ类分子免疫组化检测可见在 12 个月的转基因动物中皮层和海马区小胶质细胞有广泛活化，高倍视野下观察 MHC-Ⅱ阳性细胞胞体小，突起少，数个细胞成簇状分布（图 5）。



A：皮层 MHC-Ⅱ（×40）；B：MHC-Ⅱ阳性细胞（×200）

图 5　皮层 MHC-Ⅱ间接免疫组化染色结果

2.4.3　星型胶质细胞染色　　利用星形胶质细胞的标记物 GFAP 免疫组化检测可见在野生型和转基因动物中阳性细胞均广泛分布，无明显分布差别。此外，在转基因动物中高倍视野下见多个 GFAP 阳性细胞，其突起较多，呈树枝状，在皮层数个阳性细胞聚集成团（图 6）。



图 6　皮层 GFAP 间接免疫组化染色结果　（×400）

3　讨论

针对阿尔茨海默病不同的病因假说，研究者创建了多种动物模型，如神经元直接损伤模型、胆碱能系统功能损伤模型、慢性缺血痴呆模型、铝中毒模型、侧脑室注射 Aβ 多肽模型、转基因动物模型等。而其中的转基因动物模型因其能够较好的模拟出类似于 AD 患者的病理变化以及行为学变化而受到研究者的重视，已经成为研究 AD 病重要的实验材料。但是由于 Aβ

蛋白产生增多并非单基因突变导致，而是涉及到多个基因的参与。其中有位于 14 号染色体的早老素-1（PS-1）、1 号染色体的早老素-2（PS-2）、21 号染色体的淀粉样蛋白前体蛋白（APP）、19 号染色体的载脂蛋白 E（APOE）基因、12 号染色体的 α2 巨球蛋白基因（A_2M）等[5]。因此部分研究者开始关注多基因的转基因小鼠，通过单转基因小鼠的杂交，如转 PS1 基因的小鼠和 APP 基因的小鼠进行杂交或者直接构建双转基因小鼠等方法[6]，试图找到一个相对完善的研究模型，能够再现 AD 病的病理表现和病程。

其中，SP 作为 AD 的特征性的病理变化之一是验证 AD 模型成功与否的一个关键指标，其典型结构为：核心由 $A\beta_{40}$、$A\beta_{42}$ 凝集构成斑块，周围包绕变性的神经轴突终末和活化的小胶质细胞和星形胶质细胞。

我们对从 Jackson 实验室所获得的转基因小鼠杂合体进行繁殖，而后对其后代通过抽提小鼠的尾静脉血液提取基因组 DNA，对其进行基因型分析，成功得到了转入 PS1/APP 基因的小鼠。随后，我们以未转入的小鼠作为阴性对照，通过刚果红结合免疫组织化学染色对 PS1/APP 双转基因小鼠 SP 结构进行分析。

通过脑片组织学染色显示：在 9 个月的转基因小鼠中即可见刚果红染色阳性的 Aβ 斑块沉积，进一步在 12 个月的转基因小鼠中可见斑块沉积增多，而且在 Aβ 斑块的周围明显可见细胞成簇状分布，通过免疫组织化学证明主要是小胶质细胞和星型胶质细胞，形态学可见小胶质细胞由分支状逐渐向阿米巴样转变，提示小胶质细胞处于活化状态，尤其是在 Aβ 斑块的周围，这些形态改变有利于小胶质细胞进行阿米巴运动及其吞噬功能的发挥。目前认为小胶质细胞在 PS1/APP 转基因 AD 模型小鼠及 AD 患者脑内激活后的起到了双刃剑的作用。一方面，作为单核吞噬细胞系统中的一员，小胶质细胞可以通过清道夫受体，RAGE 受体等介导吞噬 Aβ 片段并将其降解，但是同时由于活化的小胶质细胞把 Aβ 的异常沉积作为“危险物质”，启动了外源性抗原呈递过程，上调表达 MHC Ⅱ 类分子，以及 B7-1，B7-2 等重要的共刺激分子，并释放炎症因子 TNF-α、NO、IL-1β、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12 等，引发局部无菌性炎症，致使邻近神经元死亡和胶质瘢痕形成进而导致病症发生[7]，与此同时，星型胶质细胞也发生活化增殖，并包绕在 Aβ 斑块的周围。目前认为星型胶质细胞除了支持和营养作用以外，越来越多的证据表明胶质细胞还有更为广泛的重要功能，它与神经细胞共同构成对中枢神经系统调控的立体网络，维持 CNS 内稳态，调节神经递质代谢和突触信息传导。而且当星形胶质细胞被激活时，可释放大量的化学因子、细胞因子或炎性介质，激活补体，引起神经炎症免疫反应，最近 Wyss 等[8]研究证明：星型胶质细胞还直接参与了 Aβ 蛋白的降解过程，提示我们星型胶质细胞在 AD 的发病过程中可能扮演了重要的作用。

相比阴性对照小鼠，未见明显的 Aβ 块斑沉积和胶质细胞活化。通过以上分析表明：我们所获的转基因小鼠在 9 个月左右脑内即可见 SP 的沉积，随着年龄的增长其沉积亦更加明显，而且可见在 12 个月左右小胶质细胞和星型胶质细胞在 Aβ 沉积周围的聚集、活化，符合 SP 的典型结构，为研究 AD 的发病机制以及验证药物疗效等提供了较理想的动物模型。

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] SELKOE D J. Alzheimer's disease is a synaptic failure[J]. Science, 2002, 298(5594): 789-791.

[3] 王德生，张守信. 老年性痴呆[M]. 北京：人民卫生出版社，2001：133-145.

[4] ODDO S, CACCAMO A, SHEPHERD J D, *et al*. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction[J]. Neuron, 2003, 39(3): 409-421.

[5] PRICE D L, TANZI R E, BORCHELT D R, *et al*. Alzheimer's disease: genetic studies and transgenic models[J]. Annu Rev Genet, 1998, 32: 461-493.

[6] JANKOWSKY J L, SLUNT H H, RATOVITSKI T, *et al*. Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: a comparison of strategies[J]. Biomol Eng, 2001, 17(6): 157-165.

[7] ROGERS J, STROHMEYER R, KOVELOWSKI C J, *et al*. Microglia and inflammatory mechanisms in the clearance of amyloid beta peptide[J]. Glia, 2002, 40(2): 260-269.

[8] WYSS CORAY T, LOIKE J D, BRIONNE T C, *et al*. Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta *in vitro* and *in situ*[J]. Nat Med, 2003, 9(4): 453-457.

（编辑 汪勤俭）