论著

文章编号:1000-5404(2006)16-1648-04

PS1/APP双转基因AD模型小鼠与$A\beta_{1-40}$海马注射AD模型大鼠的组织病理学比较

李达兵[1],唐 军[1],范晓棠[2],宋 敏[3],徐海伟[1],周光纪[1],白 云[3] (第三军医大学基础医学部:[1]生理学教研室,[2]神经生物学教研室,重庆市神经科学研究所,[3]分子遗传学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 对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和组织学分析,探讨其与老化态$A\beta_{1-40}$单侧海马注射AD模型大鼠之间的组织病理学差异。**方法** 对Tg小鼠和AD大鼠模型应用改进刚果红染色法、Nissl's染色结合免疫组织化学方法观察脑内Aβ沉积和星形胶质细胞的活化情况。**结果** ①PS1/APP双转基因AD小鼠刚果红染色显示皮质和海马内广泛圆形Aβ沉积,周围绕以胶质细胞带,免疫组化显示GFAP阳性细胞活化呈团块聚集。②AD大鼠刚果红染色显示单侧海马齿回区有Aβ斑块状沉积,Nissl's染色显示注射针道附近海马锥体层细胞丢失,注射侧海马GFAP阳性细胞增多。**结论** $A\beta_{1-40}$单侧海马注射AD模型大鼠尽管可以模拟人类AD疾病的部分特征病理改变,但是不能模拟疾病渐进性的病理学改变。PS1/APP双转基因小鼠能够模拟AD病人脑内的主要病理改变与渐进性过程,是较为理想的实验动物模型,但该模型未发现细胞丢失。

关键词: 阿尔茨海默病;转基因小鼠;大鼠;β淀粉样多肽

中图法分类号: R-332;R361.2;R749.16 **文献标识码:** A

Histopathologic comparison between PS1/APP double transgenic mouse model and $A\beta_{1-40}$-injected rat model of Alzheimer disease

LI Da-bing[1], TANG Jun[1], FAN Xiao-tang[2], SONG Min[3], XU Hai-wei[1], ZHOU Guang-ji[1], BAI Yun[3] ([1]Department of Physiology, [2]Department of Neurobiology, [3]Department of Medical Genetics, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To identify the genetype of the PS1/APP double transgenic mouse model, then to analyse the histopathological changes in the brain and compare the differences between the transgenic mice models and $A\beta_{1-40}$-injected rat model of Alzheimer disease. **Methods** The improved congo red staining, Nissl's staining and immunohistochemical staining was used to observe the Aβ deposits, activation of astrocyte respectively. **Results** The PS1/APP transgenic mouse extensively displayed Aβ deposits in the cortex and hippocampal structures, and GFAP positive cells were aggregated in mass and surrounded the congo red-positive plaque. The $A\beta_{1-40}$-intrahippocampal-injected rat model showed the Aβ plaque deposits in the dentate gyrus of the hippocampus, with the astrocyte surrounded. The neuron loss was significant in the injection point and pin hole of injection with Nissl's staining methods. GFAP-positive cells increased significantly as compared with the uninjured lateral of the hippocampus. **Conclusion** Although $A\beta_{1-40}$-injected rat models simulate some characteristic pathological features of human Alzheimer diseases, it would not simulate the progressive degenenration in the brain of AD. The double transgenic PS1/APP mice could simulate the specific pathogenesis and progressive changes of AD, while no neuron loss was found in this model.

Key words: Alzheimer disease; transgenic mouse; rat; β-amyloid

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);国家自然科学基金资助项目(30100087,30500148,30571770)
Supported by the National Natural Science Foundation of China-Joint Research Fund for Overseas Chinese Young Scholars (30228018) and the National Natural Science Foundation of China (30100087, 30500148, 30571770)

作者简介: 李达兵(1974-),男,四川省宣汉县人,硕士研究生,讲师,主要从事老年性退行性疾病方面的研究。现在泸州医学院生理学教研室。E-mail: lidabing008@yahoo.com.cn

通讯作者: 徐海伟,电话:(023)68752254-269,E-mail: haiweixu2001@yahoo.com.cn

收稿日期: 2005-09-09;**修回日期:** 2005-11-05

作为一种病因尚未完全明了的中枢神经系统退行性疾病，其发病机制的研究一直是神经科学领域研究的热点。Aβ 炎性假说[1,2]因其符合病理学、实验以及临床流行病学的研究结果而受到越来越多研究者的承认。目前体外实验已证实 Aβ 的神经毒性[3]，但在体研究不多且报道结果并不一致，这与 Aβ 的来源、种类、凝聚程度及不同注射脑区的选择有关。由于海马与学习记忆功能密切相关，可作为阿尔茨海默病（Alzheimer disease，AD）研究的较理想靶区。以凝聚态 Aβ 直接海马内注射，建立 AD 大鼠模型的方法近来已受到关注。转基因动物模型具备在活体上研究某一特定致病基因的优势，是研究 AD 的独特而重要的模型。鉴于 AD 是多基因遗传疾病，研究者们开始构建两基因甚至三基因突变的小鼠模型[4]。

在本实验中，我们采用刚果红染色、Nissl's 染色、胶质纤维酸性蛋白（glial fibrillary acidic protein，GFAP）免疫组化染色的方法，对经基因鉴定筛选后的 PS1/APP 双转基因 AD 模型小鼠（tg +/+）与老化态的 Aβ 单侧海马注射的 AD 模型大鼠进行组织病理改变的比较分析，比较两种 AD 模型在老年斑形成、神经元丢失、星形胶质细胞活化等组织学改变的异同，以比较两种 AD 模型的差异及应用价值。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　实验动物　美国国立 Jackson 动物中心（Bar Harbor，ME，USA）提供 PS1/APP dtg 转基因小鼠嵌合体种鼠 2 只。此双转基因小鼠品系名为 B6C3-Tg（APPswe，PSEN1dE9）85Dbo/J，原种编号为 004462，表达人突变的 PS1（DeltaE9）和嵌合体的小鼠/人 APP（APPSwe）基因。该 dtg 转基因小鼠繁殖所产生后代，分笼喂养于光照/黑暗为 12/12 h 的恒温环境，每笼 2 只，自由摄食和饮水。分别于 6、9 月龄用于实验。Wistar 大鼠 8 只，体质量（150 ± 10）g，雌雄不拘，由本校实验动物中心提供。

1.1.2　主要试剂　Aβ1-40 购自 Sigma 公司；兔抗 GFAP IgG 购自武汉博士德公司；S-P 系列试剂盒，DAB 购自北京中杉金桥公司。其它试剂均为分析纯。

1.1.3　主要仪器设备　江湾Ⅰ型立体定向仪（第二军医大学），微量注射器（上海精密仪器厂），CM1900 恒冷式冰冻切片机（Leica 公司）。OLYMPUS 光学及荧光倒置显微镜（日本）。

1.2　方法

1.2.1　PS1/APP 双转基因 AD 小鼠模型的建立与鉴定　美国国立 Jackson 动物中心提供野生型转基因雌性小鼠（+/+ females）和半合子的转基因雄性小鼠（Tg/0 males）作为种鼠。所有的雄性鼠都是 APPswe 和 PSEN1dE9 转基因杂合子。取小鼠尾血，提取基因组 DNA 完成鉴定，同窝出生的转基因阴性小鼠作为对照。

1.2.2　AD 大鼠模型制备　Wistar 大鼠，雌雄不拘，分为实验组和对照组。实验组大鼠单侧海马齿回（dentate gyrus，DG）注射老化态 Aβ1-40 共计 10 μg（2 μg/μl，溶于人工脑脊液，使用前置于 37 ℃孵箱 1 周以便 Aβ 老化），海马齿回坐标参照包新民等图谱，AP：-3.0 mm，ML：-2.2 mm，O/V：2.9 mm，缓慢注射，每分钟 1 μl，注射完毕后留针 15 ~ 20 min，保证液体充分弥散以免溢出，缓慢退针，1 mm/min。术后 3 d 每日给予 5×10^4 U 青霉素腹腔注射，同等剂量人工脑脊液作为对照组。

1.2.3　组织化学与免疫组织化学染色　双转基因 AD 小鼠与 AD 大鼠行冠状冰冻切片，每片厚 15 μm 或 40 μm。所有需组织化学处理的切片均裱在多聚赖氨酸处理的载玻片上，自然风干，梯度乙醇脱脂后入蒸馏水；显色后用二甲苯透明、中性树胶封片。①β 淀粉样蛋白的刚果红染色（漂浮染色）：15 μm 冰冻切片入苏木精染液 3 min，自来水漂洗玻片干净后，入 1% 盐酸乙醇溶液分化数秒，背景干净细胞条带清晰则用自来水终止分化。再入 1% 刚果红水溶液复染 2 min 后，入 0.2% 碱性乙醇溶液分化数秒，至显现橘红色沉积物即可终止分化。②GFAP 免疫组化（漂浮染色）：40 μm 冰冻切片经 0.01 mol/LPBS 漂洗，10 min × 3 次；3% 双氧水孵育 15 min，0.3% TritonX - 100 处理 30 min 后正常山羊血清封闭液 10 min，入兔抗 GFAP（1∶100），37 ℃孵育 3 h，转入 4 ℃过夜后加入生物素化山羊抗兔 IgG（1∶100），用辣根过氧化物酶（HRP）标记三抗（1∶100）37 ℃孵育 3 h，DAB 显色，常规裱片、脱水、透明、DPX 封片。③Nissl's 染色：10 μm 冰冻切片入预热至 56 ℃的 1% 甲苯氨蓝染液浸染 30 min，自来水冲洗干净后，切片入 70% 约 1 min、95% 乙醇分化。

刚果红阳性斑块和 Nissl's 染色阳性锥体细胞计数，每隔 3 张脑切片取一张，显微镜下计数阳性细胞或淀粉样斑块。

1.3　统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件作组间方差检验。

2　结果

2.1　PS1/APP 转基因小鼠与 $A\beta_{1-40}$ 海马注射大鼠淀粉样斑块分布比较

光镜下，在 PS1/APP 双转基因 AD 模型 9 月龄小鼠皮层和海马可见散在分布橘红色沉积物，形似圆形，背景清晰，周围绕以蓝色细胞带，细胞体积较小，有突起（图 1）。而 6 月龄转基因小鼠橘红色沉积物密度分布主要局限于皮层，密度低，海马偶有阳性染色。对 6、9 月龄小鼠的海马与皮层的刚果红阳性斑块的数量进行统计计数，显示 9 月龄小鼠的阳性斑块数量高于 6 月龄小鼠（$P < 0.05$）。



图 1　PS1/APP 双转基因 AD 小鼠海马（9 月龄）（刚果红 ×100）

AD模型大鼠可见注射侧海马CA4、齿状回等注射区域及针道附近有斑块样橘红色细胞外沉积物，形状不规则，周围绕以蓝色细胞带，细胞体积较小，为活化胶质细胞（图2），皮层及非注射区域未见细胞外阳性沉积物。针道区域可见锥体细胞条带中断，结构紊乱，细胞体积变小，密度降低，针道两侧细胞密度增高，细胞体积小，为活化胶质细胞条带。



图2 $A\beta_{1-40}$单侧海马注射AD大鼠 （刚果红×40）

2.2 PS1/APP转基因小鼠与$A\beta_{1-40}$海马注射大鼠GFAP星形胶质细胞分布比较

光镜下，在PS1/APP双转基因AD小鼠模型的皮层和海马可见多个GFAP阳性细胞团块，高倍视野下细胞突起明显，相互交织成团（图3）。

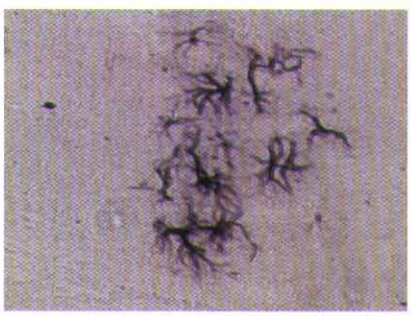


图3 PS1/APP双转基因AD小鼠 （S-P×400）

AD模型大鼠可见注射区域附近有大量GFAP阳性细胞分布，胞体增大，突起延长（图4），皮层及对侧海马背景干净，少有GFAP阳性细胞分布。

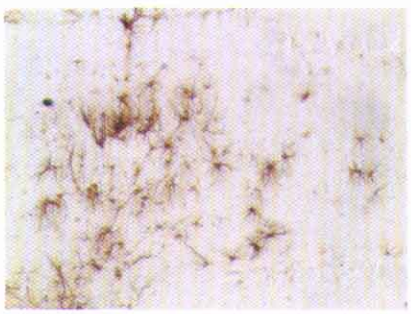


图4 Aβ1-40单侧海马注射AD大鼠 （GFAP×100）

2.3 PS1/APP转基因小鼠与$A\beta_{1-40}$海马注射大鼠Nissl's染色阳性细胞比较

光镜下，AD模型大鼠Aβ注射侧海马可见在针道附近区域，胞浆尼氏体呈蓝色，色较浅，锥体细胞Nissl's染色阳性细胞数目减少，密度降低，体积减小，尼氏体模糊，锥体细胞带出现细胞带断裂，其间有较多新生胶质细胞，胞体较小，Nissl's染色浅，模糊（图5）。Aβ注射组和溶酶注射组注射侧海马相同区域Nissl's染色阳性细胞计数分别为（46±5），（84±8）个，两组统计比较，注射侧海马Aβ注射区域神经细胞数目显著减少（$P<0.01$）。与tg-/-小鼠相比，tg-/-转基因小鼠Nissl's染色阳性细胞数目无显著统计学差异（$P>0.05$）（图6）。

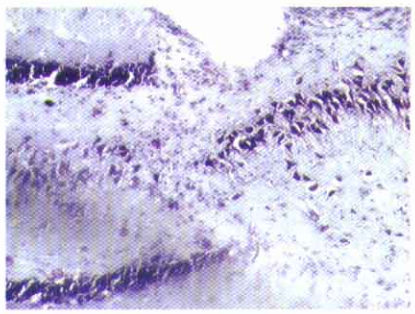


图5 $A\beta_{1-40}$单侧海马注射AD大鼠 （Nissl's ×200）

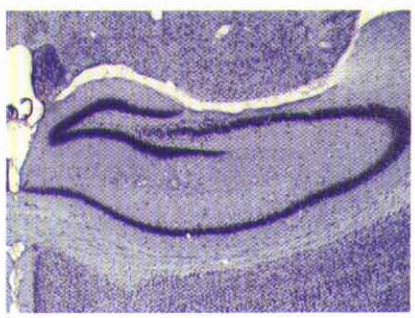


图6 PS1/APP双转基因AD小鼠 （Nissl's ×40）

3 讨论

针对AD的不同病理机制，目前已创建了多种动物模型，如机械损伤模型、叠氮钠模型、复合损伤模型、侧脑室注射Aβ多肽模型、转基因动物模型等。AD动物模型帮助人类解决了AD发病的某些分子机制和其他一些基础生物学问题，但在对AD基本病因、发病机制缺乏根本了解的情况下，很难制作出准确反映该病的动物模型。然而，近10余年来迅速发展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，已经成为研究AD病重要的实验材料。AD病因涉及到多个基因的参与，诸如早老素（PS-1，PS-2）、淀粉样蛋白前体蛋白（APP）、载脂蛋白E基因（APOE）、α2巨球蛋白基因（A2M）等[5]。

我们对转基因小鼠嵌合体进行组织病理学检测，

结果显示,相对于转染阴性小鼠,转染阳性转基因小鼠在 6 月龄时脑内即出现老年斑的沉积,Aβ 刚果红染色显示细胞外淀粉样物质沉积多见于皮层分布,海马沉积较少。这与国外文献报道基本一致[6]。随着月龄的增加,9 月龄小鼠细胞外 Aβ 沉积现象更加明显,在皮层与海马都显著增多。这一结果与人类 AD 属渐进性疾病的病理特性相吻合,Aβ 沉积物周围可见 GFAP 阳性活化星形胶质细胞包绕,符合老年斑的典型结构。相对来说,PS1/APP 转基因小鼠不仅脑内出现 Aβ 沉积形成神经斑块的时间早,而且 Aβ 沉积的量多,分布广,伴有神经变性与丢失以及行为功能改变[7],是研究 AD 较好的模型。

尽管 AD 转基因小鼠技术日趋成熟,但基于遗传背景、繁殖能力、操作难度和经济角度的考虑,目前多数实验室仍采用传统建模方法,Aβ 在体注射建立 AD 模型为其中之一。

由于海马与学习记忆,特别是近记忆功能密切相关,具代表性,可作为 AD 研究的较理想靶区。本实验中,采用大鼠海马一次性注射凝集态老化 Aβ1-40,观察模型 Morris 水迷宫中空间学习记忆功能的影响。结果在这种大鼠模型注射 2 周后,出现空间分辨能力下降,组织病理学也显示注射处 Aβ 刚果红染色呈斑片状,周围绕以蓝色活化胶质细胞带。针道区域海马锥体细胞胞体变小,细胞密度降低,细胞带有断裂,注射侧 GFAP 阳性细胞数量显著高于对侧海马,而 Nissl's 染色显示注射侧海马锥体细胞丢失明显,印证了 Aβ 在体的细胞毒性作用[8]。不少学者认为 Aβ 神经毒性作用是以聚集态的方式,即可溶性 Aβ 聚集成不溶性 Aβ 才具有更强的毒性,其中激活胶质细胞释放大量细胞因子与炎性产物,介导炎症损伤作用[9]。

Aβ1-40 海马注射 AD 模型为在体水平研究 Aβ 介导神经损伤的神经病理机制提供时间和空间上较易控制的条件。此种模型可迅速建立学习记忆障碍,损毁部位明确,与学习记忆相关海马脑区锥体细胞丢失明显且局限,而且可以通过调整 Aβ 注射量来控制模型的行为与组织病变程度。另外也为后期的细胞定位移植治疗模型提供适宜的模型条件[10,11]。

然而人类 AD 为渐进性病理损伤,且病变范围累及全脑,包括海马、皮层以及基底核等脑区。此种 AD 大鼠模型仅能从海马局部的某一阶段模拟 AD,只能模拟 AD 主要病理特征之一,对于模型海马神经元细胞内神经病理损伤及神经纤维缠结是否形成却无法在短期内观察,因此此类模型仅可作为研究 AD 早期病变的研究,此为其局限性所在。

能够真实反映疾病各个病理发展阶段特征的动物模型,对于 AD 研究有着十分重要的意义。转基因技术通过转入 AD 基因调控成分建立整体模型,可以在复杂的内环境中再现或模拟 AD 某些病理表现。它可以验证有关 AD 病因机制等的各种假说,为临床药物研究提供有效实验依据,继而找到确切的治疗靶位,较之于目前其他动物更有效。随着 AD 治疗学由对症治疗转向对因治疗,AD 动物模型研究也应顺应这一新的变化,借助动物模型的研究,推动 AD 治疗学向着更加安全、有效的方向发展。

参考文献:

[1] SELKOE D J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy [J]. Physiol Rev, 2001, 81(2): 741 - 766.

[2] 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.

[3] FORLONI G, TAGLIAVINI F, BUGIANI O, *et al*. Amyloid in Alzheimer's disease and prion-related encephalopathies: studies with synthetic peptides[J]. Prog Neurobiol, 1996, 49(4): 287 - 315.

[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] Van-LEUVEN F. Single and multiple transgenic mice as models for Alzheimer's disease[J]. Prog Neurobiol, 2000, 61(3): 305 - 312.

[7] BORCHELT D R, RATOVISKI T, VAN-LARE J, *et al*. Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins[J]. Neuron, 1997, 19(4): 939 - 945.

[8] RICHARDSON J C, KENDAL C E, ANDERSON R, *et al*. Ultrastructural and behavioural changes precede amyloid deposition in a transgenic model of Alzheimer's disease[J]. Neuroscience, 2003, 122(1): 213 - 228.

[9] BOKVIST M, LINDSTROM F, WATTS A, *et al*. Two types of Alzheimer's beta-amyloid (1-40) peptide membrane interactions: aggregation preventing transmembrane anchoring versus accelerated surface fibril formation[J]. J Mol Biol, 2004, 335(4): 1039 - 1049.

[10] 徐如祥. 阿尔茨海默病的分子机制与神经干细胞移植治疗[J]. 老年医学与保健, 2004, 10(3): 177 - 180.

[11] 吴　旋,徐海伟,黎海蒂,等. AANAT 基因工程化 ES 细胞减少 APP 高表达 PC12 细胞 Aβ 的分泌[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(3): 209 - 211

(编辑　汪勤俭)