文章编号:1000-5404(2007)19-1873-04

论著

糖原合酶激酶3β在大鼠脑老化及神经退行性变中的表达与分布改变

杨继飞[1],张 建[2],景秀京[1],胡远兵[1],杨 忠[2] ([1]武警四川总队成都医院内一科,成都 610041;[2]第三军医大学基础医学部神经生物学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 比较糖原合酶激酶3β(glycogen synthase kinase-3β, GSK3β)在正常成年、老年及β淀粉样蛋白(amyloid beta, Aβ)诱导的神经退行性变模型大鼠脑内的表达与分布差异,探讨其在神经退行性变中的功能意义。**方法** 立体定位仪下海马内注射 $A\beta_{1-42}$ 建立神经退行性变模型,免疫组织化学观察 GSK3β 在不同大鼠脑内的分布与定位,Western印迹法定量检测 GSK3β 在皮层、海马等区域的表达。**结果** GSK3β 在脑内分布广泛,主要定位于神经元样细胞,在皮层锥体细胞层、海马锥体细胞层、齿回颗粒层、纹状体及丘脑等区域分布较为密集。老年及 Aβ 注射组(一侧)GSK3β 免疫阳性细胞密度明显增多,以 Aβ 注射组为甚,阳性信号除细胞体外还延伸至长突起远端。蛋白定量检测显示 GSK3β 在老年和 Aβ 注射大鼠较正常成年大鼠呈现明显增高。**结论** 在脑老化及 Aβ 诱导的神经退行性变中存在 GSK3β 的表达上调,它可能在相关神经病理事件中扮演了重要角色。

关键词:糖原合酶激酶3β;神经退行性变;大鼠
中图法分类号:R345.55;R741.02;R749.16 **文献标识码**:A

Distribution and expression changes of glycogen synthase kinase-3β in aged and Aβ-induced neurodegenerative rat brain

YANG Ji-fei[1], ZHANG Jian[2], JING Xiu-jing[1], HU Yuan-bing[1], YANG Zhong[2] ([1]Department of Neurology, Chengdu General Hospital of Armed Police Forces, Chengdu 610041; [2]Department of Neurobiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To compare the distribution and expression differences of glycogen synthase kinase-3β(GSK3β) among normal adult, aged and amyloid beta(Aβ)-induced neurodegenerative rat brains, so as to explore its functional role in neurodegeneration. **Methods** Aggregated Aβ was microinjected into normal adult rat hippocampus under a stereotaxic system. The rats over 12 months were defined as aged rats. The distribution and localization of GSK3β were examined using immunohistochemistry. Western blotting was performed to assess expression change in cortex and hippocampus quantitatively. **Results** The GSK3β positive cells were distributed extensively around the whole brain and almost with neuron-like morphology. In normal adult rats, the strong anti-GSK3β immunoreactivity located in the neocortex pyramidal layer, hippocampus pyramidal layer, dentate gyrus, thalamus, substantia nigra, *etc*. The amount of GSK3β positive cells was much more in the aged and Aβ-injected group than in normal ones. The immunoreactive signals usually extend to the distal area of neurite in the Aβ-injected ones. Western blot showed that the expression intensity of GSK3β was stronger in the aged and neurodegenerative rat brain than in the normal adult rat brain. **Conclusion** The expression of GSK3β increases apparently in the neurons of aged and Aβ-injected brain. It may play a role in the neurodegenerative process.

Key works: glycogen synthase kinase 3β; neurodegeneration; rats

糖原合酶激酶3β(glycogen synthase kinase 3β, GSK3β)是一类在机体内分布广泛、且结构高度保守的丝苏氨酸蛋白激酶,最初发现时因其对糖原代谢的调节作用而得名。以往研究显示,GSK3β 功能复杂,涉及了组织细胞内多条信号途径,在丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)、磷脂酰肌醇3激酶(PI3-K)及 Wnt 信号通路中处于关键的枢纽位置[1]。近年实验表明 GSK3β 在中枢神经系统(central nervous system, CNS)内含量极高,它不仅参与了对微管、神经丝、髓鞘碱性蛋白和神经生长因子等的调节,同时还是 CNS 内催化 tau 蛋白磷酸化的主要激酶;GSK3β 功能的异常被认为与老年性痴呆、卒中乃至一些神经精神性疾病的发生密切相关[2,3]。

β淀粉样蛋白(amyloid beta, Aβ)沉积是老年性痴

基金项目:成都武警医院科研基金(2007001)
Supported by the Scientific Research Foundation of Chengdu Armed Police Hospital(2007001)
作者简介:杨继飞(1955-),女,内蒙古自治区呼和浩特市人,副主任医师,主要从事脑血管疾病的临床方面的研究。电话:(028)86308529
通讯作者:杨 忠,电话:(023)68752233,E-mail: yangzhong1999@yahoo.com.cn
收稿日期:2006-09-14;修回日期:2007-01-21

呆等神经退行性变中的关键始发环节，Aβ 脑内微量注射所致的神经退行性变模型多年来已得到广泛应用，在此模型中 GSK3β 的表达与分布有何改变，其变化与脑老化情况下有何异同，目前尚少见实验报道。本研究比较 GSK3β 在正常成年、老年及 Aβ 诱导的神经退行性变模型大鼠脑内的表达与分布差异，探讨其在神经退行性变中的功能意义。

1 材料与方法

1.1 动物和分组

正常成年 Wistar 大鼠 20 只(2～11 月龄)，10 只作为正常对照组，10 只用于 Aβ 脑内注射制作神经退行性变模型；老年组(12～18 月龄)用 Wistar 大鼠 8 只；分别由第三军医大学与大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。各组动物半数用于 GSK3β 免疫组化染色，半数用于 Western blot 蛋白定量检测。

1.2 主要试剂

Aβ1-42 购自美国 Sigma 公司，GSK3β 多克隆抗体(兔血清)为美国 Santa Cruz 公司产品，免疫组织化学试剂盒购自武汉博士德公司。Western blot 使用的二抗是武汉博士德公司生产的 HRP 标记羊抗兔 IgG，蛋白裂解液(RIPA，PMSF)购自于上海申能博彩生物科技公司。

1.3 Aβ1-42 海马内注射建立神经退行性变模型及学习记忆能力检测

用无菌生理盐水将 $A\beta_{1-42}$ 稀释为 2 μg/μl，37 ℃孵育 1 周，使其变为凝聚态。神经退行性变组大鼠经麻醉后固定于江湾Ⅰ型大鼠脑立体定位仪，常规备皮消毒，切开皮肤，暴露前囟，用微量注射器向一侧(左)海马齿状回颗粒细胞带缓慢注入凝聚态 $A\beta_{1-42}$ 5 μl，留针 5 min，然后缓慢撤针缝合。坐标位置：AP-3.0 mm，ML-2.0 mm，DV-3.0 mm。正常对照组注射等量生理盐水，其余步骤相同。

$A\beta_{1-42}$ 注射 21 d 后用 Morris 水迷宫检测大鼠的空间学习记忆能力。记录各组大鼠找到平台的时间(逃避潜伏期)，平台所在象限停留时间并计算其占总时间百分比(总时间以 60 s 记)。

1.4 取材制片

动物存活 4 周后用戊巴比妥钠麻醉，开胸行升主动脉插管，先后以生理盐水和 4% 多聚甲醛灌注固定，取脑再行后固定 8 h，30% 蔗糖脱水后进行冠状冰冻切片，片厚 25 μm。

1.5 免疫组织化学染色

切片采用常规 SABC 法，各步骤间用 PBS 漂洗 3 次，主要步骤为：①3% H_2O_2，室温孵育 20 min；②1% BSA-0.3% Triton X-100 37 ℃ 20 min；③10% 正常山羊血清室温孵育 30 min；④一抗(1∶500)37 ℃孵育 1 h 后，4 ℃过夜；⑤生物素化二抗(Biotin 标记羊抗兔，1∶100)37 ℃ 2 h；⑥ABC 复合物(Avidin-HRP，1∶100)37 ℃ 2 h；⑦显色，显色液为 0.05% DAB 0.01% H_2O_2 0.05 mol/L TBS(pH 7.5)，阳性信号呈现棕黄色；⑧PBS 终止反应，脱水透明，封片，光镜下观察摄片。对照实验用 PBS 代替 GSK3β 抗体，结果为阴性。

1.6 Western blot 蛋白定量检测

按蛋白裂解液(RIPA，PMSF)使用说明提取组织总蛋白，动物断头活杀后快速取皮层、海马组织，液氮冷冻、研钵粉碎；加入 PMSF(每克组织 30 μl)，冰上孵育 30 min，4 ℃离心(15 000 r/min)15 min，取上清。获得的总蛋白用紫外分光光度仪检测定量。实验每组蛋白使用量 50 μg(10～20 μl)，SDS-PAGE 凝胶电泳，半干法转移至硝酸纤维素膜，丽春红染色证实转移成功，用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液封闭，一抗 4 ℃孵育过夜，GSK-3β 抗体稀释度为1∶2 000，漂洗后入生物素化二抗(1∶2 000)室温下孵育 1 h，化学发光法显色，洗片，凝胶成像系统扫描记录。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验。

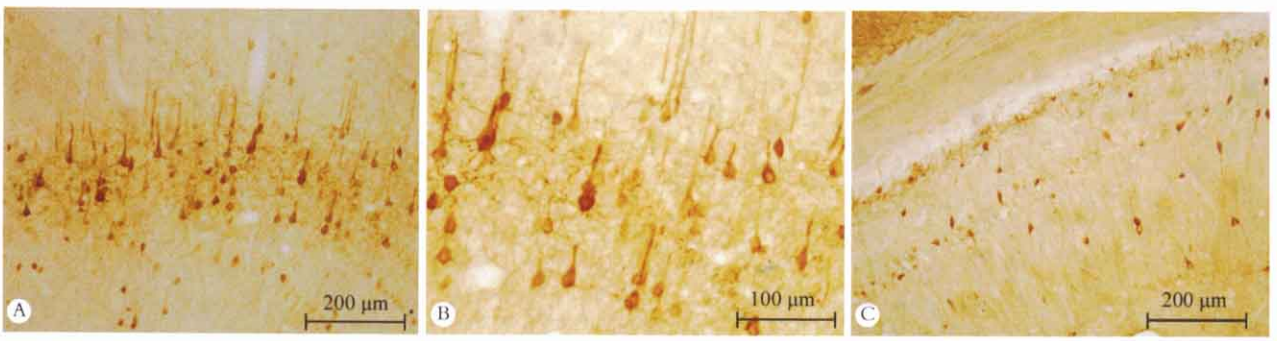
2 结果

2.1 水迷宫实验结果

水迷宫实验检测结果显示，与正常成年大鼠比较，老年及 Aβ 海马注射大鼠在第 4 天及第 5 天的逃避潜伏期明显延长($P<0.05$)，平台所在象限停留时间占总时间百分比减少(老年大鼠及 Aβ 海马注射大鼠相差不明显)；同时它们在水迷宫实验中的错误次数也明显增加($P<0.05$)。提示其学习认知能力存在明显下降。

2.2 GSK3β 在正常脑组织内的表达分布与定位

GSK3β 免疫阳性细胞在正常大鼠脑内分布广泛，皮层锥体细胞层、海马锥体细胞层、齿回颗粒层、纹状体及丘脑等区域分布较为密集。形态上 GSK3β 免疫阳性细胞多为典型多极神经元样，在锥体细胞层等部位阳性信号主要定位于细胞体和近端突起(树突)，见图 1。

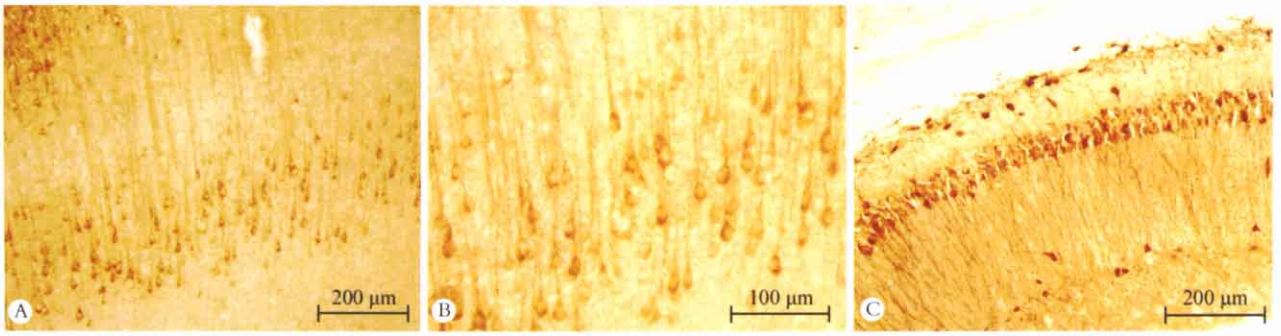


A：皮层低倍；B：皮层高倍；C：海马 CA2 区

图 1 GSK3β 在正常成年大鼠脑组织内的分布 (SABC)

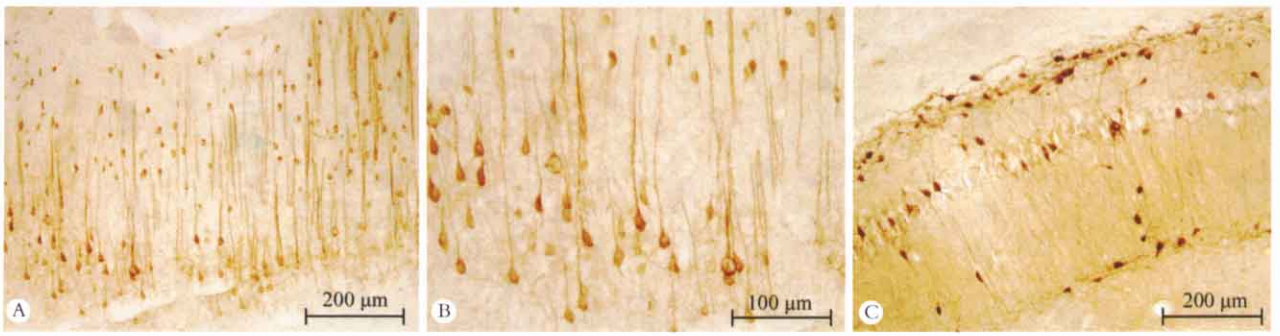
2.3　GSK3β 在脑老化与神经退行性变中的改变

与正常成年大鼠比较，老年及 Aβ 海马注射大鼠脑内 GSK3β 阳性细胞密度明显增多，仍定位于多极神经元样细胞；在老年组，阳性信号略显弥散，以海马区为甚，Aβ 注射组阳性信号除细胞体外，在锥体细胞层等区域还常常延伸至阳性细胞远端突起（树突）内。见图 2、3。



A：皮层低倍；B：皮层高倍；C：海马 CA2 区

图 2　GSK3β 在老化大鼠脑组织内的分布　（SABC）

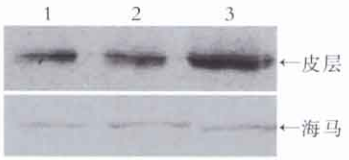


A：皮层低倍；B：皮层高倍；C：海马 CA2 区

图 3　GSK3β 在 Aβ 注射大鼠脑组织内的分布　（SABC）

2.4　Western blot 检测 GSK3β 在正常、老化与神经退行性变皮层及海马中的变化

两区域基本呈现相似的变化趋势，GSK3β 在正常成年脑组织内表达最低，老年组明显增高，Aβ 注射组（一侧）最高。老年组和 Aβ 注射组与正常成年比较相差显著（$P<0.05$）。图 4 为 3 组大鼠在皮层和海马区 Western blot 的代表性结果。



1：正常成年大鼠；2：老年大鼠；3：Aβ 注射大鼠

图 4　Western blot 显示不同组别中 GSK3β 在皮层、海马的表达变化

3　讨论

老年性痴呆是一组常见的与年龄相关的神经退行性疾病，其特征性病理改变是神经细胞外 β-淀粉样蛋白（Aβ）沉积形成的老年斑（senile plaque，SP）和神经元内 tau 蛋白异常聚集形成神经纤维缠结（NFTs），以及由此引起的脑内多部位选择性的胆碱能神经元死亡。迄今对上述两类病变形成的细胞分子过程特别是其相互间的内在联系，尚未完全阐明[4,5]。

多年来的研究已经显示 GSK3β 是催化 tau 蛋白磷酸化的主要激酶，对阿尔茨海默病患者及老年脑组织的检测也发现常存在 GSK3β 的表达上调。GSK3β 的表达及活性增高与 tau 蛋白过磷酸化的病理联系已得到一系列实验证实，如有报道早老素蛋白 1（PS1）作为一种协助 tau 蛋白与 GSK3β 在空间上相互接近的停靠蛋白，其突变能导致过多 GSK3β 的堆积，进而催化 tau 蛋白的过磷酸化[6]。在发生 NFTs 及神经元空泡变性的转基因小鼠，GSK3β 表达明显升高且多集中于神经元受损区[7]。Lucas 等[8]通过对过表达 GSK3β 转基因鼠的研究，显示海马神经元细胞核内 β-catenin 水平明显下降，同时存在广泛的 tau 蛋白过磷酸化，而后者能进一步引起细胞体及树突内纤维缠结样的病变，导致神经元变性。

Aβ 脑内微量注射所致的神经退行性变模型多年来在老年性痴呆等研究中被广泛采用，本实验通过应用免疫组织化学的定性定位观察和 Western 印迹法的半定量检测，显示在脑老化特别是 Aβ 诱导的神经退行性变中存在 GSK3β 的表达上调，GSK3β 主要存在于神经元内，且主要集中于胞体和长突起，提示 Aβ 可能具有刺激 GSK3β 表达的作用。

事实上早在 2001 年已有研究报道通过向转基因动物脑内注射 Aβ 能增加 tau 蛋白磷酸化的程度，从而

促进 NFTs 的形成[9]。但对于两者间的具体分子病理过程,一直存在争议。近年来伴随对 GSK3β、尤其是 Wnt 信号通路的深入了解,逐步证实 Wnt 信号途径的抑制(常伴有 GSK3β 的表达或活性增高)可能是老年性痴呆 SP 和神经元内 NFTs 形成的共同上游环节,GSK3β 在两者的内在联系中扮演了关键角色[5,10]。GSK3β 的抑制解除,一方面能引起 tau 蛋白的过磷酸化,同时通过加速 APP 的水解,也增加了 SP 的形成。由此有关老年性痴呆发生机制的两个学说在此找到了一个联结交汇点,老年性痴呆发生的淀粉样蛋白病变和 tau 蛋白及神经纤维缠结学说得到了合理的整合与解释[5,11,12]。

参考文献:

[1] Bhat R V, Budd-Haeberlein S L, Avila J. Glycogen synthase kinase 3: a drug target for CNS therapies[J]. J Neurochem, 2004, 89(6): 1313-1317.

[2] Kozlovsky N, Nadri C, Agam G. Low GSK-3beta in schizophrenia as a consequence of neurodevelopmental insult[J]. Eur Neuropsychopharmacol, 2005, 15(1): 1-11.

[3] Bhat R V, Budd S L. GSK3beta signalling: casting a wide net in Alzheimer's disease[J]. Neurosignals, 2002, 11(5): 251-261.

[4] 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.

[5] Fuentealba R A, Farias G, Scheu J, *et al*. Signal transduction during amyloid-beta-peptide neurotoxicity: role in Alzheimer disease[J]. Brain Res Brain Res Rev, 2004, 47(1-3): 275-289.

[6] Takashima A, Murayama M, Murayama O, *et al*. Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3beta and its substrate tau[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(16): 9637-9641.

[7] Ishizawa T, Sahara N, Ishiguro K, *et al*. Co-localization of glycogen synthase kinase-3 with neurofibrillary tangles and granulovacuolar degeneration in transgenic mice[J]. Am J Pathol, 2003, 163(3): 1057-1067.

[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] Gotz J, Chen F, van-Dorpe J, *et al*. Formation of neurofibrillary tangles in P3011 tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils[J]. Science, 2001, 293(5534): 1491-1495.

[10] Caricasole A, Copani A, Caraci F, *et al*. Induction of Dickkopf-1, a negative modulator of the Wnt pathway, is associated with neuronal degeneration in Alzheimer's brain[J]. J Neurosci, 2004, 24(26): 6021-6027.

[11] De-Ferrari G V, Inestrosa N C. Wnt signaling function in Alzheimer's disease[J]. Brain Res Brain Res Rev, 2000, 33(1): 1-12.

[12] De-Ferrari G V, Chacon M A, Barria M I, *et al*. Activation of Wnt signaling rescues neurodegeneration and behavioral impairments induced by beta-amyloid fibrils[J]. Mol Psychiatry, 2003, 8(2): 195-208.

(编辑 张大春)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2007)19-1876-01

食管多发癌胃镜诊断分析

白 梅,彭贵勇,李尚红 (第三军医大学西南医院全军消化内科中心,重庆 400038)

食管多发癌临床上较少见,我们分析了食管多发癌的胃镜检查资料,旨在提高本病的内镜诊断率。现报告如下。

1 资料与方法

11例食管多发癌患者来自本院2000年7月至2006年7月经手术及病理证实病例。其中男性7例,女性4例,年龄39-73岁,平均58岁。合并用药11例,胸背后疼痛3例,体质渐减者2例,癌家族史2例。出现症状至手术时间平均2.8个月。均收入胸外科百直食癌切除术。食管多发癌诊断标准:食管同时或先后出现两个或两个以上恶性肿瘤,且各肿瘤间境界分明[1]。以上述诊断标准为依据,将患者术后病理与术前胃镜结果进行比较。

作者简介:白 梅(1962-),女,重庆市人,主治医师,主要从事消化内镜方面的研究。现在重庆市第三军医大学西南医院消化内科工作。电话:(023)68758885,E-mail:bmwcmu@126.com。

通讯作者:彭贵勇,电话:023-68754078,E-mail:pgy@medmail.com.cn

收稿日期:2006-12-11;修回日期:2007-05-08

2 结果

11例食管癌患者,其中多发癌9例,单一癌2例,癌灶22处,多发于食管中下段,肿瘤间距3-9 cm,病检均为食管鳞状细胞癌。术后病理检测资料:食管多发癌11例,切除食管标本发现癌灶25处,10例食管鳞状细胞癌,1例食管鳞状细胞癌合并小细胞神经内分泌癌。2例胃镜诊断食管单一癌胃镜检查时各漏1处癌灶,1例胃镜发现癌灶2处,术后病理检测为癌灶3处,漏诊1处,且漏诊癌灶3处。本组病例胃镜诊断准确率为81.8%(9/11)。胃镜癌灶发现率为88%(22/25)。11例中8例胃镜所见及病理检测与术后食管标本及病理检测结果完全一致,3例漏诊。

3 讨论

食管多发癌的术前诊断无为重要,直接关系到治疗方案的

(下转1885页)