DOI:10.16016/j.1000-5404.201506040

胰淀素在痴呆小鼠和正常小鼠脑内的分布和表达变化

张 婷[1],曾庆桦[1],刘 滢[1],贺桂琼[1,2],汪克建[1,2] (重庆 400016,重庆医科大学:神经科学研究中心[1],基础医学院人体解剖学教研室[2])

[摘要] **目的** 观察胰淀素在正常小鼠、阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)模型小鼠和肥胖模型小鼠脑内的分布和表达情况,分析其与小鼠脑内老年斑的关系,探讨胰淀素是否参与老年性痴呆的发病。**方法** 取5月龄雄性APP/PS1双转基因小鼠(AD模型小鼠)、ob/ob肥胖模型小鼠及野生型小鼠(正常小鼠),采用免疫荧光染色方法检测胰淀素和老年斑在各组小鼠脑内的分布和表达。**结果** 免疫荧光双标检测结果显示:胰淀素免疫阳性神经元广泛分布于APP/PS1双转基因小鼠脑内,包括皮质、海马、丘脑等区域,强阳性表达于岛叶和梨形皮质区域($P<0.01$),而老年斑则选择性表达于新皮质、海马等区域,胰淀素的分布范围较老年斑的分布广泛,在部分老年斑的周围可见胰淀素免疫阳性物质分布。5月龄AD模型小鼠、ob/ob肥胖模型小鼠新皮质内胰淀素阳性神经元数目明显高于正常小鼠($P<0.05$,$P<0.01$)。**结论** 胰淀素在AD模型小鼠、ob/ob肥胖模型小鼠及正常小鼠脑内的分布和表达存在差异,这种差异有可能促进老年斑的形成以及参与AD疾病的发生。

[关键词] 胰淀素;老年斑;β淀粉样蛋白;阿尔茨海默病
[中图法分类号] R-332;R741.02;R749.16 [文献标志码] A

Distribution and expression of amylin in brain of Alzheimer's disease and normal mice

Zhang Ting[1], Zeng Qinghua[1], Liu Ying[1], He Guiqiong[1,2], Wang Kejian[1,2] ([1]Institute of Neuroscience, [2]Department of Anatomy, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the distribution and expression of amylin in the brain of Alzheimer's disease (AD) model mice, ob/ob mice (obese mice) and wild-type controls for the relationship between amylin and senile plaques, so as to investigate whether amylin is involved in the pathogenesis of senile dementia. **Methods** Five-month-old APP/PS1 double transgenic male mice (AD model), ob/ob mice and the wild-type mice were employed in this study. Immunofluorescence assay was used to detect the distribution and expression of amylin and senile plaques in the brain of 3 groups of mice. **Results** Amylin was widely distributed and expressed in the neurons throughout almost all the regions of brain in the APP/PS1 double transgenic mice, including the cerebral cortex, hippocampus, dorsal thalamus, and so on, with very high levels in the insular cortex and piriform cortex ($P<0.01$). While senile plaques were selectively distributed in the cerebral cortex and hippocampus. The distribution of amylin was much more extensive than that of senile plaques in the brain of the AD mice. Amylin positive substances were found gathering around the deposition of senile plaques. The number of amylin-positive neurons in the cerebral cortex was significantly higher in the AD and ob/ob mice than that the wild-type mice ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** The distribution and expression of amylin are obviously different in the brain of the AD, ob/ob and wild-type mice, and these differences may promote the formation of senile plaques and be involved in the pathogenesis of AD.

[**Key words**] amylin; senile plaques; amyloid-β protein; Alzheimer's disease

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81371221) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2011jja10030). Corresponding author: Wang Kejian, E-mail: 562082991@qq.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81371221);重庆市自然科学基金(CSTC2011jja10030)
[通信作者] 汪克建,E-mail:562082991@qq.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151204.0907.002.html(2015-12-04)

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)又叫老年性痴呆(senile dementia),是一种发生于老年期前后的中枢神经系统的退行性疾病。AD 发病的中心环节是β-淀粉样蛋白(amyloid β peptide,Aβ)沉积形成的老年斑(senile plaques,SP)。研究显示胰淀素和 Aβ密切相关,能聚合形成淀粉样纤维,对外周和中枢神经系统产生影响[1]。胰淀素(amylin)即胰岛淀粉样多肽(islet amyloid peptide,IAPP),是近年来新被认识的一种降糖激素,由胰岛 β 细胞分泌所产生[2]。它的有毒成分是一种具有膜渗透性的可溶性低聚物,能够损伤神经元[3],其低聚体通过干扰破坏细胞膜从而导致胰岛 β 细胞的凋亡[4-5]。此外,胰淀素在大脑沉积对前驱糖尿病胰岛素抵抗有一个直接的影响,可能是引起与年龄相关性神经退行性疾病的第二种淀粉样蛋白[6-7]。胰淀素沉积形成的胰岛淀粉样蛋白沉积(IA)是Ⅱ型糖尿病的主要病理特征,Ⅱ型糖尿病是 AD 发病的风险因素之一[8],但目前关于胰淀素在 AD 和糖尿病患者脑内的分布和表达却鲜有报道。本课题拟以 APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠、ob/ob 肥胖模型小鼠及正常小鼠为研究对象,采用形态学方法检测胰淀素在小鼠脑内的分布和表达变化,以明确胰淀素与老年性痴呆的关系。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

1.1.1 动物准备 取 5 月龄雄性 APP/PS1 双转基因小鼠(AD 模型小鼠)、ob/ob 肥胖模型小鼠及野生型小鼠(正常小鼠),每组 5 只,采购于中国医学科学院实验动物研究所。动物饲养在重庆医科大学动物中心 IVC 级动物房,恒温 21 ℃,24 h 明暗交替照明。

1.1.2 试剂 兔抗 amylin 抗体(博奥森),鼠抗 4G8 单克隆抗体(Covance Inc 公司,USA),488 标记山羊抗兔 IgG、CY3 标记山羊抗小鼠 IgG、DAPI 染色液均购自碧云天,其他均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 标本制备 腹腔注射 3.5% 的水和氯醛麻醉动物后,开胸,暴露心脏,从心尖插入头皮针后剪开右心耳,灌注生理盐水,待肝无血色时冰上取脑,将右侧半脑组织放入 4% 多聚甲醛中固定 48 h,常规脱水、石蜡包埋、石蜡切片机连续冠状切片,厚度 5 μm,常温放置,备用。

1.2.2 免疫荧光染色 切片经二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,0.01 mol/L 枸橼酸钠 95℃抗原修复 30 min,PBS 冲洗后用 0.3% Triton X-100 处理 5 min,PBS 冲洗,驴血清封闭处理 45 min,加入兔抗 amylin 抗体(1∶25)10 μL,4 ℃冰箱孵育过夜;37 ℃复温 1 h,PBS 冲洗,加 488 标记山羊抗兔 IgG(1∶200)10 μL 于 37 ℃避光孵育 1 h,PBS 冲洗;DAPI 染核 5 min,PBS 冲洗,甘油封片,避光保存,荧光显微镜观察。

1.2.3 免疫荧光双标染色 切片经二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,0.01 mol/L 枸橼酸钠 95 ℃抗原修复 30 min,PBS 冲洗后用 0.3% Triton X-100 处理 5 min,PBS 冲洗,加 88% 甲酸溶解老年斑中不溶解状态的 Aβ 10 min,PBS 冲洗,驴血清封闭处理 45 min,加入兔抗 amylin 抗体(1∶25)及鼠抗 4G8 单克隆抗体(1∶200)10 μL,4 ℃冰箱孵育过夜;37 ℃复温 1 h,PBS 冲洗,加 488 标记山羊抗兔 IgG(1∶200)及 CY3 标记山羊抗小鼠 IgG(1∶200)10 μL 于 37 ℃避光孵育 1 h,PBS 冲洗;DAPI 染核 5 min,PBS 冲洗,甘油封片,避光保存,荧光显微镜观察。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

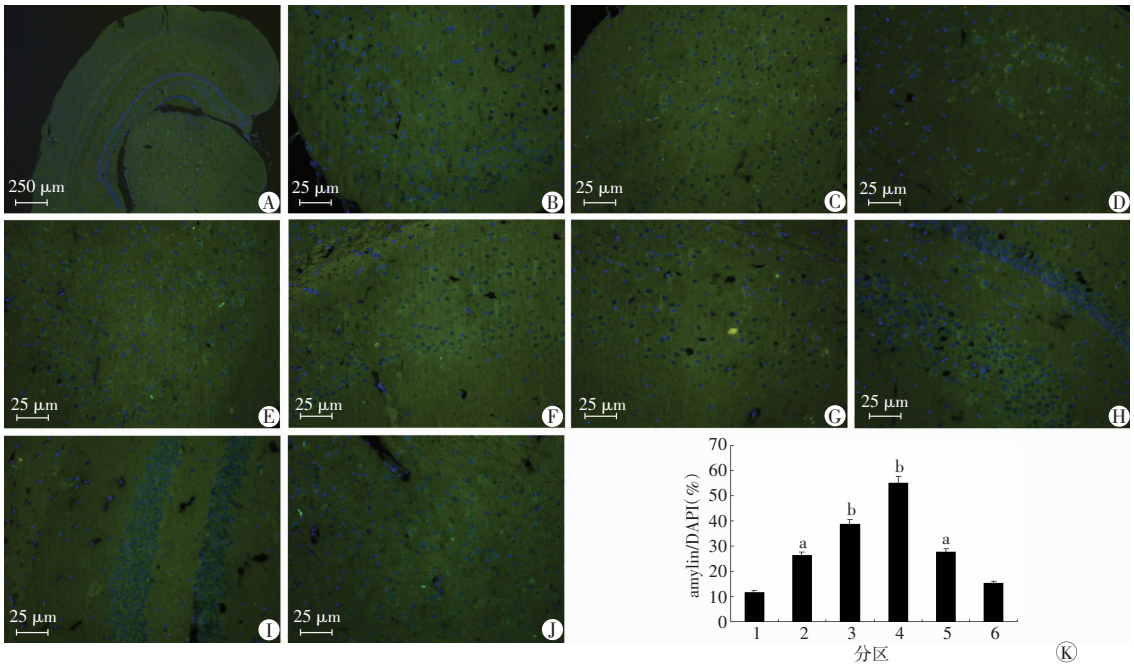
2 结果

2.1 胰淀素在 APP/PS1 双转基因小鼠脑内的分布和表达

免疫荧光染色结果显示:胰淀素免疫阳性物质广泛分布于 5 月龄 APP/PS1 双转基因小鼠脑内各区域,强表达于岛叶和梨形皮质区域($P<0.01$),中等表达于躯体感觉皮质及海马各亚区(齿状回、CA1、CA2、CA3 等,$P<0.05$),少量表达于丘脑及运动皮质区域。在细胞水平,胰淀素主要表达于神经元样细胞,在细胞内呈点状分布(图 1)。

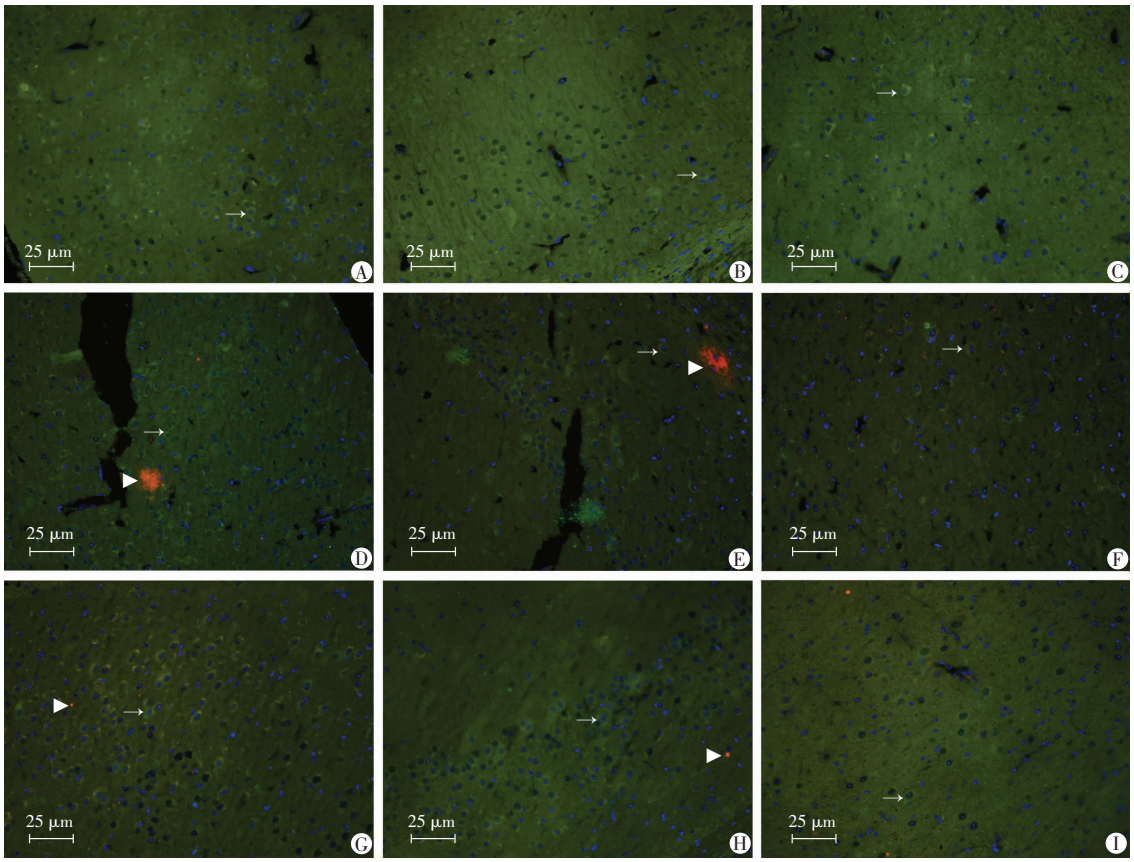
2.2 胰淀素和老年斑在各组 5 月龄小鼠脑内共表达情况

免疫荧光双标染色结果显示:胰淀素免疫阳性物质在 3 组小鼠脑内的分布模式一致;老年斑主要见于 AD 模型鼠的大脑皮质、海马内,而丘脑内 SP 极少,斑块荧光染色较均匀,在 ob/ob 肥胖模型小鼠和正常小鼠脑内极少 SP 分布;胰淀素免疫阳性物质数量(71.33 ± 16.50)明显多于 4G8 阳性斑块(3.67 ± 1.15),差异有统计学意义($P=0.002$),部分老年斑的周围可见胰淀素免疫阳性物质分布(图 2)。



A:大脑皮质、海马、丘脑;B:运动皮质;C:躯体感觉皮质;D:岛叶;E:梨形皮质;F:海马 CA1;G:海马 CA2;H:海马 CA3;I:海马齿状回;J:丘脑;K:胰淀素(amylin)阳性细胞数与 DAPI 的百分比 1:运动皮质区;2:躯体感觉皮质区;3:岛叶;4:梨形皮质区;5:海马;6:丘脑;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与运动皮质区比较

图 1 胰淀素在 5 月龄 APP/PS1 双转基因小鼠脑内的分布 (免疫荧光染色)



A、D、G:皮质;B、E、H:海马;C、F、I:丘脑; A、B、C:正常小鼠;D、E、F:AD 模型小鼠;G、H、I:ob/ob 肥胖模型小鼠;▲:老年斑(红光);↑:胰淀素免疫阳性物质(绿光)

图 2 胰淀素和老年斑在各组 5 月龄小鼠脑内共表达情况 (免疫荧光双标染色)

2.3　胰淀素在5月龄AD模型小鼠、ob/ob肥胖模型小鼠及正常小鼠新皮质内的表达

3组小鼠新皮质内的胰淀素阳性细胞数见表1,经统计学分析,3组间两两比较,差异均有统计学意义($P<0.05$,$P<0.01$)。

表1　胰淀素阳性细胞在5月龄AD模型小鼠、ob/ob肥胖模型小鼠及正常小鼠新皮质内的表达比较($n=5$,$\bar{x}\pm s$)

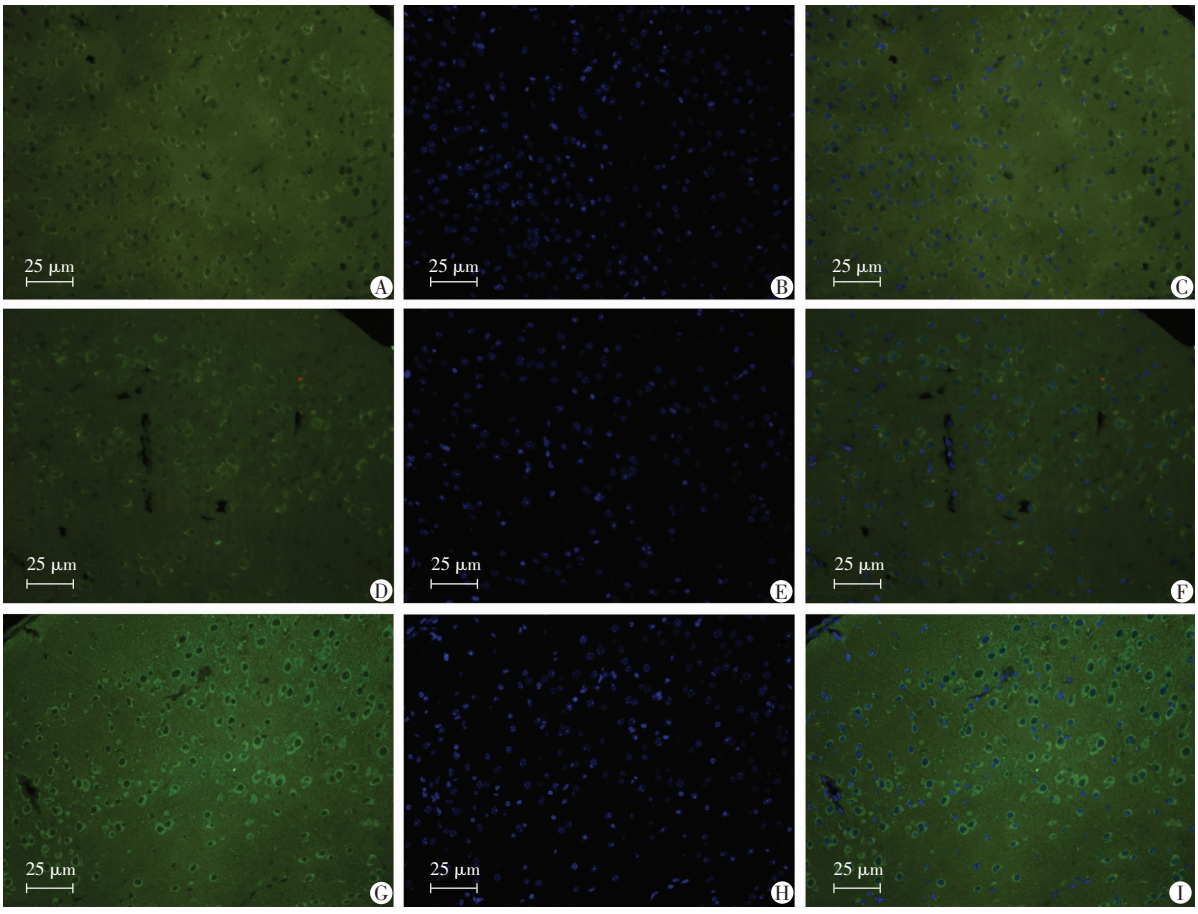
组别	阳性细胞数
正常小鼠	104.00±39.560
AD模型小鼠	155.00±24.532[a]
ob/ob肥胖模型小鼠	240.80±40.923[bc]

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与正常小鼠比较;c:$P<0.01$,与AD模型小鼠比较

胰淀素在3组小鼠新皮质神经元内的分布不同:在正常小鼠胰淀素免疫阳性物质主要分布于细胞膜以及近细胞膜的少量胞质内,仅细胞膜的荧光染色较深,近细胞膜的少量胞质内荧光染色较浅;在AD模型小鼠主要分布于细胞膜和近细胞膜的胞质,且细胞膜和近细胞膜的胞质荧光染色较深;而在ob/ob肥胖模型小鼠则主要分布于细胞膜和胞质内,细胞膜和胞质内荧光染色均较深(图3)。

3　讨论

胰淀素是1987年由Westerwark等首先在Ⅱ型糖尿病患者的胰岛淀粉样蛋白及正常胰岛细胞中发现的一种激素[9]。胰淀素在组织中分布广泛,主要分布于心脏、胰腺、肾脏、血管系统。在AD患者的血浆中检测到高胰淀素血症[10],但目前关于胰淀素在痴呆小鼠脑内的分布及表达情况尚不清楚。本实验对5月龄AD模型小鼠脑组织进行免疫荧光染色,结果显示胰淀素广泛分布于AD小鼠脑内各区域,但具有区域差异性,在新皮质内的表达明显强于在海马内的表达。Jackson等[11]在AD患者脑内发现了胰淀素的沉积,这提示胰淀素是第2种淀粉样蛋白,而且也是与年龄有



A、B、C:正常小鼠;D、E、F:AD模型小鼠;G、H、I:ob/ob肥胖模型小鼠;A、D、G:胰淀素免疫阳性物质(绿光);B、E、H:DAPI标记(蓝光);C、F、I:融合

图3　胰淀素在5月龄AD模型小鼠、ob/ob肥胖模型小鼠及正常小鼠新皮质内的表达　(免疫荧光染色)

关的痴呆和 AD 的一种新的生物标记物。那么胰淀素的这种区域差异性是否与 AD 的发病相关？有待进一步研究。

AD 的典型病理特征之一是 Aβ 沉积形成的 SP。本研究免疫荧光双标结果显示,胰淀素的分布范围较广泛,在 SP 形成及非 SP 形成区内均有表达,部分老年斑的周围可见胰淀素免疫阳性物质分布。研究发现 AD 脑内胰淀素周围可见 Aβ 斑块的聚集,以及胰淀素的沉积可导致脑内 Aβ 的清除障碍[11]。我们推测这部分胰淀素免疫阳性物质可能与 Aβ 和 SP 的形成相关。胰淀素受体是 Aβ 的一个潜在靶点受体,能够介导 Aβ 的毒性作用[12],胰淀素与 Aβ 聚合形成的单体和低聚体能够与胰淀素受体 3 结合,对神经元产生毒性作用[1]。那么胰淀素受体是否是 Aβ 毒性作用的靶点受体？目前尚不清楚,有待进一步的探讨和研究。而另一部分胰淀素可能未参与 Aβ 的形成,可能尚存在其他功能。

本实验的小鼠模型是 APP/PS1 双转基因小鼠(携带“瑞典家族”突变的 APPswe 以及 PS△E9 基因)和 ob/ob 肥胖模型小鼠(瘦素基因敲除)。APP/PS1 双转基因小鼠具有 AD 患者的特征性改变:SP 沉积[13]、认知功能障碍及神经元丢失等,是公认的 AD 动物模型;Ⅱ型糖尿病是 AD 发病的一个风险因素[8],ob/ob 肥胖模型小鼠作为肥胖和糖耐量降低的Ⅱ型糖尿病动物模型[14],以及大量的研究是关于胰淀素在糖尿病患者胰腺中过表达[15],而在脑内的分布与表达鲜有报道,故选择其作为本实验的动物模型。本实验比较了胰淀素在 5 月龄 AD 模型小鼠、ob/ob 肥胖模型小鼠及正常小鼠新皮质内的数量、分布以及表达情况,结果显示胰淀素阳性神经元在 3 组小鼠新皮质内的表达水平存在明显差异。那么胰淀素在 AD 模型小鼠和 ob/ob 肥胖模型小鼠脑内的表达异常增加是否促进和参与 Aβ 的形成？已有研究表明胰淀素与 Aβ 密切相关,都属于淀粉样蛋白家族成员,能够沉积形成有毒的低聚体[16],其低聚体具有膜渗透性,能改变细胞的结构[15]。Lim 等[17]发现胰淀素和 Aβ 具有相似的神经毒性,能够穿过血脑屏障损伤神经元。在细胞水平,Lim 等[18]发现胰淀素对小鼠皮质神经元具有明显的毒性作用。结合本实验的研究结果及相关报道,推测胰淀素在 AD 模型小鼠和 ob/ob 肥胖模型小鼠脑内的表达异常增加可能与 Aβ 的生成及 AD 疾病的发生相关。而细胞内胰淀素的表达水平则取决于自身的更新和降解。但是胰淀素在 3 组小鼠脑内出现这种差异的原因是由于胰淀素在合成过程中出现了折叠错误、转运障碍,还是胰淀素的蛋白降解出现障碍呢？关于这些问题目前尚不清楚,有待进一步探讨和研究。

综上所述,本实验结果显示,胰淀素在 5 月龄 AD 模型小鼠脑内分布广泛,但具有区域差异性,强表达于岛叶和梨形皮质区域;胰淀素的分布范围较老年斑的分布广泛,在部分老年斑的周围可见胰淀素免疫阳性物质分布;胰淀素在 AD 模型小鼠、ob/ob 肥胖模型小鼠及正常小鼠脑内的表达具有明显差异,这种差异有可能促进老年斑的形成以及参与 AD 疾病的发生。

参考文献:

[1] Fu W, Patel A, Jhamandas J H. Amylin receptor: a common pathophysiological target in Alzheimer's disease and diabetes mellitus[J]. Front Aging Neurosci, 2013, 5: 42. DOI: 10.3389/fnagi.2013.00042

[2] Lee H J, Choe Y H, Lee J H, *et al*. Delayed response of amylin levels after an oral glucose challenge in children with Prader-Willi syndrome[J]. Yonsei Med J, 2011, 52(2): 257-262. DOI: 10.3349/ymj.2011.52.2.257

[3] 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. DOI: 10.1126/science.1072994

[4] Ritzel R A, Meier J J, Lin C Y, *et al*. Human islet amyloid polypeptide oligomers disrupt cell coupling, induce apoptosis, and impair insulin secretion in isolated human islets[J]. Diabetes, 2007, 56(1): 65-71. DOI: 10.2337/db06-0734

[5] 郑晓雅, 任伟, 张素华, 等. 胰岛素原和胰淀素原水平与胰岛素抵抗和胰岛β细胞功能的相关性研究[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(2): 169-172.

[6] Knight J A. Disease and disorders associated with excess body weight[J]. Ann Clin Lab Sci, 2011, 41(2): 107-121.

[7] Ohara T, Doi Y, Ninomiya T, *et al*. Glucose tolerance status and risk of dementia in the community: the Hisayama study[J]. Neurology, 2011, 77(12): 1126-1134.

[8] Xu W L, von-Strauss E, Qiu C X, *et al*. Uncontrolled diabetes increases the risk of Alzheimer's disease: a population-based cohort study[J]. Diabetologia, 2009, 52(6): 1031-1039. DOI: 10.1007/s00125-009-1323-x

[9] Wagner J D, Cline J M, Shadoan M K, *et al*. Naturally occurring and experimental diabetes in cynomolgus monkeys: a comparison of carbohydrate and lipid metabolism and islet pathology[J]. Toxicol Pathol, 2001, 29(1): 142-148.

[10] Adler B L, Yarchoan M, Hwang H M, *et al*. Neuroprotective effects of the amylin analogue pramlintide on Alzheimer's disease pathogenesis and cognition[J]. Neurobiol Aging, 2014, 35(4): 793 – 801. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.10.076

[11] Jackson K, Barisone G A, Diaz E, *et al*. Amylin deposition in the brain: a second amyloid in Alzheimer's disease?[J]. Ann Neurol, 2013, 74(4): 517 – 526. DOI: 10.1002/ana.23956

[12] Kimura R, MacTavish D, Yang J, *et al*. Beta amyloid induced depression of hippocampal long-term potentiation is mediated through the amylin receptor[J]. J Neurosci, 2012, 32(48): 17401 – 17406. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3028-12.2012

[13] 楚亚楠, 宋冲, 贺桂琼, 等. 早老素增强子-2 在 APP/PS1 双转基因小鼠脑内的分布及表达[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(24): 2479 – 2483.

[14] Leppin K, Behrendt A K, Reichard M, *et al*. Diabetes mellitus leads to accumulation of dendritic cells and nerve fiber damage of the subbasal nerve plexus in the cornea[J]. Invest Ophthamol Vis Sci, 2014, 55(6): 3603 – 3615. DOI: 10.1167/iovs.14-14307

[15] Westermark P, Andersson A, Westermark G T. Islet amyloid polypeptide, islet amyloid, and diabetes mellitus[J]. Physiol Rev, 2011, 91(3): 795 – 826. DOI: 10.1152/physrev.00042.2009

[16] Kawahara M, Kuroda Y, Arispe N, *et al*. Alzheimer's beta-amyloid, human islet amylin, and prion protein fragment evoke intracellular free calcium elevations by a common mechanism in a hypothalamic GnRH neuronal cell line[J]. J Biol Chem, 2000, 275(19): 14077 – 14083.

[17] Lim Y A, Rhein V, Baysang G, *et al*. Abeta and human amylin share a common toxicity pathway *via* mitochondrial dysfunction[J]. Proteomics, 2010, 10(8): 1621 – 1633. DOI: 10.1002/pmic.200900651

[18] Lim Y A, Ittner L M, Lim Y L, *et al*. Human but not rat amylin shares neurotoxic properties with Abeta42 in long term hippocampal and cortical cultures[J]. FEBS Lett, 2008, 582(15): 2188 – 2194. DOI: 10.1016/j.febslet.2008.05.006

(**收稿**:2015-06-08;**修回**:2015-08-03)

(编辑 王小寒)