

· 综 述 ·

中医药干预 APP/PS1 双转基因痴呆模型小鼠研究进展

梁琳 李浩 刘剑刚 刘美霞 李晓 田芳

老年痴呆,又称阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD),是一种老年人常见的进行性神经系统退行性改变,它以慢性进行性记忆和认知功能障碍并伴有情志改变为主要临床表现,以老年斑、神经纤维缠结及大脑海马区神经细胞凋亡、突触消失为主要病理改变^[1]。其发病率逐年上升,发病年龄有下降趋势,严重影响老年人的生活质量和寿命。故老年痴呆的研究已经成为老年病科研领域的热点。

1 APP/PS1 双转基因痴呆模型的特点

国外很早便采用转基因动物应用于老年痴呆的研究,国内近年也见到关于 SAMP8、APP 转基因动物、APP/PS1 双转基因动物应用于老年痴呆实验研究的报道,由于双转基因动物难以培育、容易死亡、价格较为昂贵,目前国内使用较少。从近两年来关于 APP/PS1 双转基因痴呆模型报道来看,该模型已经成为研究老年痴呆的一个比较前沿和热门的模式。

APP/PS1 双转基因痴呆模型小鼠是表达人类突变的 β 淀粉样蛋白前体蛋白(amyloid precursor protein, APP) *swe* 基因(APP *swe*)和突变的早老素 1(Presenilin 1)基因(PS1 -246E)的双转基因模型小鼠,可在短期内形成 $A\beta_{1-42}$ 和蛋白沉积,并随增龄出现进行性加重^[2]。老年斑(senile plaque, SP)的主要成分为 β 淀粉样蛋白(beta amyloid protein, $A\beta$),以 $A\beta_{1-40}$ 和 $A\beta_{1-42}$ 为主,均由 β 裂解酶(BACE)和 γ 分泌酶对 APP 的裂解生成。APP 基因的突变使得 β 淀粉样蛋白前体蛋白与 β 分泌酶的结合位点发生结构改变,导致 β 分泌酶的活性升高,从而使 $A\beta$ 的总量增加而加剧了老年斑的形成;PS1 的突变可引起 γ 分泌酶的活性改变,从而导致 APP 的代谢过程发生变化,选择性地引起老年斑的主要成分不溶性的 β 淀粉样蛋白 $A\beta_{1-42}$ ^[3] 的产生和增加,它的沉积加速了老年斑的形成,是影响行为学改变的重要病

理因素^[4]。与普通小鼠相比,这种小鼠脑内 5 月龄就出现老年斑,12 月龄有大量老年斑形成,其出现老年斑的时间更早^[5] 病变表现更严重,因此这种模型能够很好地模拟早发并且逐渐进展的人大脑内的老年斑的沉积及老年痴呆的形成^[6]。

2 APP/PS1 双转基因痴呆模型在中医药领域的应用

基于以上优势,APP/PS1 双转基因痴呆模型现已成功应用到中医药抗痴呆研究的领域

2.1 中药单体对 APP/PS1 双转基因痴呆模型小鼠的作用

细胞凋亡学说是研究老年痴呆的一个重要学说。陈月等^[7] 研究 β -蜕皮甾酮对 APP/PS1 转基因小鼠学习记忆能力及海马 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响。 β -蜕皮甾酮是从露水草等中提取出的一种植物甾酮,具有改善微循环、抗氧化及细胞保护、降低毛细血管通透性、影响免疫系统及中枢神经系统等多种功效,也有报道称其对老年痴呆有治疗作用。Bcl-2、Bax 蛋白的异常表达与细胞凋亡有密切关系^[8],而细胞凋亡又是老年痴呆的一个发病机制^[9]。实验用 C57 小鼠作为对照,双转小鼠作为实验组和模型组,连续灌胃 8 周后, Morris 水迷宫实验结果显示:与模型组比较,实验组学习记忆能力明显改善。小鼠海马组织免疫组化结果显示:与模型组比较,实验组 Bcl-2 蛋白的表达增加, Bax 蛋白的表达减少。从而证明 β -蜕皮甾酮能够改善转基因小鼠的学习记忆能力,可能与促进海马 Bcl-2 蛋白表达和抑制 Bax 蛋白表达有关。

双转基因痴呆动物模型虽然是一个较为先进的模型,但国内较有规模的研究还停留在行为学的较低层面,缺乏对痴呆相关蛋白、分子通道及基因层面的研究。袁树民等^[10] 筛选了 12 味中药单体,包括白藜芦醇、丹参酮、茶多酚、吴茱萸碱、虎杖苷、葛根素等,观察其对 APP^{swe}/PS1 Δ E9 转基因痴呆小鼠的学习记忆功能的影响。5 月龄时开始给药,干预 4 周后,水迷宫实验观察其记忆力和定向力。实验结果显示:与安慰剂组相比实验组,吴茱萸碱能够显著缩短寻找平台的潜伏期,显著增加穿过原平台的次数,故认为其能够显著改善双转小鼠的学习记忆能力。

基金项目:国家“重大新药创制”科技重大专项课题(No. 2009ZX09103-391);国家自然科学基金资助项目(No. 81173383)

作者单位:中国中医科学院西苑医院(北京 100091)

通讯作者:刘剑刚, Tel: 010 - 62835630, E-mail: liujiangang2002@sina.com

DOI: 10. 7661/CJIM. 2013. 09. 1292

在 AD 发病的众多理论中, A β 级联假说是目前较为公认的学说^[11]。北京中医药大学的王蓬文教授研究了姜黄素对 APP/PS1 双转基因痴呆小鼠的行为学、A β_{42} 及其降解酶、A β 及其寡聚体表达的影响^[12,13]。

姜黄素是从姜黄属中药姜黄、郁金、莪术等的根茎中提取出来的酚类色素, 属活血药, 具有行气祛风、活血止痛之效, 可能通过改善痰浊瘀血治疗 AD。这项研究用免疫组织化学法和 Western blot 观察双转基因小鼠在使用姜黄素治疗前后 A β_{1-42} 及其降解酶、A β 及其寡聚体的变化, 判断姜黄素对 A β 级联反应的影响。3 月龄双转小鼠灌胃 3 个月后, Morris 水迷宫显示: 治疗组与模型组相比定位航行实验和空间探索实验存在不同程度的差异 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 此外, 免疫组化法测得模型组小鼠海马 A β_{1-40} 、A β_{1-42} 及其降解酶 NEP、可溶性 A β 寡聚体 ADDLs 的阳性细胞均较正常组增加, 且以 A β_{42} 增加更加明显; 各干预组小鼠海马 A β_{1-40} 、A β_{1-42} 及其降解酶、ADDLs 阳性细胞明显降低。Western blot 检测模型组小鼠海马 A β_{1-40} 、A β_{1-42} 和 ADDLs 蛋白表达比正常对照组明显增加 ($P < 0.01$); 与模型组小鼠比较, 各干预组小鼠海马 A β_{1-40} 、A β_{1-42} 和 ADDLs 蛋白表达均减少。结论为, 姜黄素给药 3 个月, 能明显减少 APP/PS1 双转基因小鼠脑内海马 CA1 区 A β_{40} 、A β_{1-42} 及其降解酶 NEP、可溶性 A β 寡聚体的表达, 对 A β_{42} 的降低更为明显, 有可能是通过抑制 A β_{42} 降解酶的活性和 A β_{1-42} 的生成, 来影响 A β 级联反应的。这一研究从蛋白层面对导致老年斑生成的 β 淀粉样蛋白及其降解酶的表达做了定性和定量研究, 能够很直观体现药物对痴呆相关蛋白表达的影响, 尚缺乏较深的基因层面的研究。

从炎症学说研究中中药单体对双转基因动物作用效果的实验^[14], 使用姜黄素干预 6 月龄双转基因雌性小鼠, 分别于 9、12、18 月龄时处死, 用 ELISA 法检测其大脑、血清中的细胞因子 TNF- α 和 IL-6, 与野生小鼠比较, 双转小鼠 TNF- α 和 IL-6 在 9 月龄时开始升高, 12 月龄时差异显著, 18 月龄时差异更加显著。药物干预后, 姜黄素中、高剂量组 (160、600 mg/kg) 大脑血清中的 TNF- α 和 IL-6 下降有显著差异, 说明姜黄素可能通过抗炎、改善痴呆动物的免疫系统而发挥作用。

此外, 尚见从氧化应激学说研究中中药单体对 APP/PS1 双转基因痴呆动物作用效果的报道。梅峥嵘等^[15]用隐丹参酮对 3 月龄 APP/PS1 双转基因痴呆

小鼠用药干预 4 个月, 行为学实验之后, 采用分光光度法测定血清和脑组织中谷胱甘肽过氧化物 (GSH-Px)、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性和丙二醛 (MDA) 的含量。结果显示: APP/PS1 双转基因模型小鼠血清和脑组织 GSH-Px、SOD 活力下降, MDA 含量明显增多; 隐丹参酮治疗组学习和记忆能力升高, 血清和脑组织 GSH-Px、SOD 活力升高, MDA 含量减少, 与 AD 模型组比较差异有统计学意义, 结论为隐丹参酮能够显著改善双转基因痴呆小鼠的学习记忆能力, 并可剂量依赖性地改善其抗氧化能力。

2.2 中药复方对 APP/PS1 双转基因痴呆模型小鼠的作用

目前国内中药复方对 APP/PS1 双转基因痴呆模型小鼠的研究报道还较少。黄连解毒汤的抗炎作用研究^[16]: 3 月龄 APP/PS1 双转基因痴呆雄性小鼠经灌胃盐酸多奈哌齐和黄连解毒汤大、中、小剂量 7 个月后, 应用 ELISA 检测其脑组织中炎性细胞因子 IL-6、IL-1 β 水平, 免疫荧光染色法检测小鼠海马区 SP 及神经纤维缠结 (NFTs) 数量并观察神经细胞核病理学变化进行分析。结果显示: 与模型溶剂对照组比较, 盐酸多奈哌齐组及中药各剂量组 IL-6 水平均显著降低、神经细胞核病变发生率 (PNND) 均显著减低, SP 数量均减少, NFTs 形成均减少, 差异均有统计学意义。说明黄连解毒汤具有神经保护作用, 并且其作用可能优于盐酸多奈哌齐。

黄连解毒汤的抗氧化应激作用研究^[17]: APP/PS1 双转基因 AD 小鼠分组及处理同上, 用药结束后, 检测小鼠脑内氧化应激指标 (SOD、MDA), 结果显示: 黄连解毒汤各剂量组均能明显提高 SOD 活性, 并降低 MDA 活性, 提示其治疗 AD 的机制可能与抗氧化应激有关。

黄连解毒汤对海马区病理形态的保护作用^[18]: 双转小鼠分组给药同上, 处理后观察各组干预措施对小鼠海马 CA1 区神经细胞形态学及老年斑的影响, 结果显示, 各用药组均能减少海马神经细胞的破坏、老年斑的形成, 有效阻止海马神经细胞的退变, 黄连解毒汤中剂量组优于安理申组。这是用病理形态学比较直观的方法观察中药复方的作用效果。

此外, 该课题组还从基因水平对黄连解毒汤的干预进行了研究^[19]: 分组及干预同上, 于末次灌胃治疗后, 通过实时荧光定量 PCR 检测各组脑内 β -APP mRNA 水平。结果显示: 黄连解毒汤各剂量组的 APP mRNA 水平低于对照组, 其中以中剂量组水平降低最为明显。如果能对其 β -APP 或者 A β 水平进

行蛋白定量或定性,就能与基因水平的变化互相验证,实验将更加充实。

此外,尚有北京协和医学院比较医学中心,中国医学科学院医学实验动物研究所,卫生部人类疾病比较医学重点实验室的专家对他们自己培育的 APP/PS1 双转基因痴呆小鼠用中药复方干预后进行了行为学和精神症状的研究^[20]。通过社会互动行为检测、旷场实验、Rota-rod 实验和蔗糖饮水实验来观察中药 1 号方对 APP/PS1 小鼠行为和神经症状的作用,结果证明中药 1 号方能够改善 APP/PS1 双转基因小鼠的社会互动行为、减少过度增强的运动能力和探究行为,提高其耐力和平衡学习能力,并减轻其焦虑、烦躁、易激惹等神经症状。这一研究比较新颖,侧重性格和情志方面,比较符合老年痴呆患者多伴有性情改变、性格孤僻的特点,值得借鉴。

由于老年痴呆发病机制比较复杂,目前临床治疗的方法主要是针对 AD 的发病机制,以改善症状为主,治疗药物包括:胆碱酯酶抑制剂、抗氧化剂治疗、他汀类药物、非甾体抗炎药、激素、疫苗、免疫治疗等。这些治疗措施,只能短暂提高记忆力和认知功能,但由于自身的局限性而很难长期临床应用^[21]。因此使用中医药多角度、多靶点干预老年痴呆的发病和进展,具有很大的潜力,纵观目前针对 APP/PS1 双转基因痴呆模型这一较为先进的痴呆模型,中医界的研究还停留在较宏观和较不系统的层面,中医中药对老年痴呆作用的细胞、分子及基因机制还值得深入研究。

参 考 文 献

- [1] Mattson MP. Pathways towards and away from Alzheimer's disease[J]. Nature, 2004, 430: 631 - 639.
- [2] Dickson DW. Neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease: a perspective from longitudinal clinicopathological studies [J]. Neurobiol Aging, 1997, 18: S21 - 26.
- [3] 王虹,王蓬文. 阿尔茨海默病转基因小鼠的特点和应用[J]. 中国实验动物学报, 2009, 17(6): 465 - 469.
- [4] 宗园媛,王晓映,王海林,等. APP/PS 双转基因阿尔茨海默病小鼠模型的老年斑及行为学动态分析[J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(9): 8 - 14.
- [5] 刘玉,秦秀德,赵彩艳,等. APP/PS1 双转基因小鼠大脑皮质 A131 1.42 斑块对神经元形态和学习记忆影响[C]. 全国中医药创新发展论坛论文集. 北京: 2011:97 - 104.
- [6] 朱斌,陈静,秦红芳,等. APP/PS1 双转基因老年性痴呆小鼠早期病理和认知行为变化[J]. 广州中医药大学学报, 2012, 29(2): 193 - 196.
- [7] 陈月,孟令慧,冯婉玉. β -蜕皮甾酮对 APP/PS1 转基因小鼠学习记忆能力及海马 Bcl-2, Bax 蛋白表达的影响[J]. 解剖科学进展, 2011, 17(5): 440 - 444.
- [8] Tichy A. Apoptotic machinery: the Bcl-2 family protein in the role of inspectors and superintendents[J]. Acta Medica, 2006, 4(1): 13 - 18.
- [9] Fang M, Li J, Tiu SC, et al. N-methyl-D-aspartate receptor and apoptosis in Alzheimer's disease and multiinfarct dementia [J]. Neurosci Res, 2005, 81(2): 269 - 274.
- [10] 袁树民,王冬梅,高凯,等. 12 种中药单体对 APPswe / PS Δ E9 转基因痴呆模型小鼠学习记忆作用的比较[J]. 中国比较医学杂志, 2011, 4(21): 31 - 36.
- [11] THOMAS P, FENECH M. A review of genome mutation and Alzheimer's disease [J]. Mutagenesis, 2007, 22(1): 15 - 33.
- [12] 魏鹏,李瑞晟,王蓬文,等. 姜黄素对 APP/PS1 双转基因小鼠 $A\beta$ 及 $A\beta$ 寡聚体表达的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2012, 35(6): 386 - 390.
- [13] 王蓬文,王虹,李瑞晟,等. 姜黄素对 APPswe/PS1dE9 双转基因小鼠 $A\beta_{42}$ 及其降解酶 NEP 表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(8): 1079 - 1082.
- [14] 王铜浩,杨茂伟,颜培培,等. 姜黄素对 APP/PS1 转基因鼠 TNF- α 、IL-6 的影响[J]. 中国医科大学学报, 2010, 39(10): 809 - 811.
- [15] 梅峥嵘,张芳艳,颜鹏科,等. 隐丹参酮对 APP/PS1 双转基因模型小鼠学习记忆和抗氧化能力的影响[J]. 中国现代应用药学, 2010, 27(12): 1072 - 1076.
- [16] 陈国华,梅瑰,邱昕,等. 黄连解毒汤对 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠脑组织 IL-6、IL-1 β 水平及 SP、NFTs 数量的干预作用[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2011, 18(5): 352 - 355.
- [17] 邱昕,陈国华,梅瑰,等. 黄连解毒汤对 APP/PS1 双转基因阿尔茨海默病小鼠脑组织自由基代谢及 IL-6、IL-1 β 含量的影响[J]. 卒中与神经疾病, 2011, 18(2): 72 - 74.
- [18] 邱昕,陈国华,汪毅,等. 黄连解毒汤对 APP/PS1 双转基因阿尔茨海默病小鼠自由基代谢及海马区病理形态学影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(10): 1379 - 1382.
- [19] 邱昕,陈国华,冯佩,等. 黄连解毒汤对 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠海马区病理形态学及脑内 β APP 基因 mRNA 的影响影响[J]. 神经损伤与功能重建, 2010, 5(6): 404 - 408.
- [20] 姚志刚,梁良,秦川,等. 中药 1 号方对 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠模型行为和神经症状的影响[J]. 中国实验动物学报, 2012, 20(2): 16 - 20.
- [21] Shah RS, Lee HG, Xiongwei Z, et al. Current approaches in the treatment of Alzheimer's disease [J]. Biomed Pharmacother, 2008, 62: 199 - 207.