

· 基础研究 ·

β 淀粉样肽及冈田酸对大鼠脑内突触素和发动蛋白 I 表达的影响 *

曹 颖¹ 肖 雁² 吴昌学² 官志忠^{1,2,3}

摘要

目的:探讨 β 淀粉样肽(A β)及冈田酸(OA)对大鼠学习记忆能力及脑内突触素和发动蛋白 I 的表达影响。

方法:采用立体定向方法将 A β 1-42 及 OA 分别注入 SD 大鼠双侧海马 CA1 区,2 个月后水迷宫实验检测大鼠学习记忆能力,Western 印迹及实时聚合酶链反应(real-time PCR)检测大鼠脑组织中突触素和发动蛋白及 mRNA 表达水平。

结果:与对照组相比,A β 注射组、OA 注射组及 A β +OA 共同注射组均能引起大鼠学习记忆能力降低,各组脑组织中突触素、发动蛋白 I 及 mRNA 表达均降低($P<0.01$),其中以 A β +OA 共同注射组改变尤为明显。

结论:A β 和 OA 均可降低大鼠学习记忆能力,降低突触素和发动蛋白 I 的表达,该改变可能与 AD 发病机制中学习记忆能力减退有关。

关键词 β -淀粉样肽;冈田酸;突触素;发动蛋白 I;阿尔茨海默病

中图分类号:R749.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2010)-09-0828-05

Influence of beta-amyloid peptide and Okadaic acid on expressions of synaptophysin and dynamin I in rat brain/CAO Ying, XIAO Yan, WU Changxue, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2010, 25(9): 828-832

Abstract

Objective: To investigate the influence of beta-amyloid peptide (A β) and Okadaic acid (OA) on the learning and memory abilities of rats and the expressions of synaptophysin and dynamin I in rat brains.

Method: A β 1-42 or OA was injected into the bilateral hippocampus CA1 of SD rats, and learning and memory abilities were evaluated at two months after injection; the protein and mRNA levels of synaptophysin and dynamin I were surveyed by Western blotting and real-time PCR, respectively.

Result: Significant reduction of synaptophysin and dynamin I at protein or mRNA level, and impaired learning and spatial memory were observed in rats after injections of A β , OA and A β +OA as compared with controls ($P<0.01$), in which the group of A β +OA showed more obvious changes.

Conclusion: A β 1-42 and OA could decrease the learning and memory abilities of rats and inhibit the expressions of synaptophysin and dynamin I in the rat brains, which might be a mechanism in connection with cognitive deficit of AD.

Author's address Department of Pathology, Guiyang Medical College, Guiyang, 550004

Key words β -amyloid peptide; Okadaic acid; synaptophysin; dynamin I; Alzheimer's disease

DOI10.3969/j.issn.1001-1242.2010.09.003

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30870986)、科技部国际合作项目(2006DFA33530)、贵州省科技厅基金项目黔科合 J 字[2007]2087 号

1 贵阳医学院病理学教研室,贵阳,550004; 2 贵阳医学院分子生物学重点实验室; 3 通讯作者

作者简介:曹颖,女,副主任医师,博士研究生; 收稿日期:2009-09-09

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种常见于老年人的中枢神经系统退行性变疾病,其主要临床表现为进行性认知功能障碍、记忆力衰退、性格和行为改变等。随着社会老龄化的发展,AD成为发病率仅次于心脏病、肿瘤、卒中之后严重影响老年人的健康及生命的疾病^[1]。目前为止,AD还没有根治办法,早期发现、早期干预是重要的措施,对改善其认知功能,提高其生存质量,有重要的临床意义^[2]。

研究显示,AD患者的认知功能下降程度与脑边缘系统、新皮质的突触联系丧失关系最为密切^[3]。但引起AD脑中突触丧失及功能低下的具体分子机制目前并不十分清楚。为此,我们采用大鼠双侧海马CA1区微量注射 β 淀粉样肽(β -amyloid peptide, A β 1-42)及冈田酸(Okadaic acid, OA),检测大鼠学习记忆能力及脑组织中突触素(Synaptophysin)、发动蛋白I(Dynamin I)表达水平,初步探讨AD发病机制中学习记忆能力减退的可能分子机制,以期对AD患者康复治疗提供更多实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

A β 1-42、OA购自Sigma公司;兔抗突触素、鼠抗发动蛋白I及兔抗 β -actin抗体分别购自Epitomics、Santa Cruz及Sigma公司;real-time PCR引物由宝生物公司合成,SYBP GreenMix购自ABI公司;DMS2-Morris水迷宫(中国医学科学院药物研究所),脑立体定位仪(深圳市瑞沃德生命科技有限公司),Mini Port垂直电泳系统(美国BIO-RAD公司);7300型荧光定量PCR仪(美国ABI公司)。

1.2 实验动物及分组

选择8月龄的成年健康SD大鼠(购自贵阳医学院动物研究中心[合格证号:SCXK(黔)200220001]),雌雄对半,体重300—400g,自然条件下笼养。适应性喂养1周后,进行Morris水迷宫定向航行及空间探索实验,选取学习记忆能力相同水平的大鼠随机分为对照组、A β 组、OA组及A β +OA组。

1.3 实验方法

1.3.1 模型制作:1mg A β 1-42溶于10%二甲亚砜

(DMSO)配制1mg/ml浓度,-80℃保存,用前取适量置于37℃培养箱中孵育4d;OA用10% DMSO配制0.4mmol/L浓度,-20℃保存,临用时取出。大鼠10%水合氯醛腹腔注射麻醉(300mg/kg)后,参照包新民等^[4]的《大鼠脑立体定向图谱》,于脑立体定位仪上定位双侧海马CA1区为注射靶点,A β 组双侧海马一次性注射A β 1-42(1mg/ml,5 μ l/侧);OA组双侧海马注射OA(0.4mmol/L,2 μ l/侧/次),间隔1d再注射,共注射7次;A β +OA组先注射A β 1-42,1周后再注射OA,方法分别同A β 组和OA组,对照组注入等体积的10% DMSO。

1.3.2 行为学检测:造模后2月再行Morris水迷宫定向航行和空间探索实验。

1.3.3 实验大鼠海马及颞叶皮质突触素、发动蛋白I表达:水迷宫实验结束后,取各组大鼠海马及颞叶皮质加入组织裂解液制备10%组织匀浆,蛋白定量后进行Western印迹检测突触素、发动蛋白I及 β -肌动蛋白表达。结果用GDS-8000型UVP凝胶成像系统照相,用Labworks软件分析结果时以 β -肌动蛋白条带作为内参照,计算突触素、发动蛋白I条带与 β -肌动蛋白条带像素灰度的百分比值作为突触素、发动蛋白I表达的相对水平。

1.3.4 实验大鼠海马组织突触素、发动蛋白ImRNA表达:Trizol一步法提取各组大鼠颞叶皮质总RNA,取3 μ gRNA样品逆转录cDNA,以cDNA产物为模板进行实时聚合酶链反应(real-time PCR)(SYBR Green I嵌合荧光法)。ABI7300型荧光定量PCR仪采集待测基因及内参照 β -肌动蛋白扩增各循环荧光信号,以Applied Biosystems SDS14.0软件进行荧光采集和数据分析。SDS14.0软件分析其 Δ Ct值及相对量(relative quantity, RQ)值,RQ=2^{- Δ Ct}。分析实验结果时以 β -肌动蛋白为内对照,计算突触素、发动蛋白ImRNA和对照组的相对水平。real-time PCR引物序列、PCR产物片断见表1。

1.4 统计学分析

数据用均数 $\pm$ 标准差来表示,采用单因素方差分析,数据统计由SPSS12.0软件包完成。

2 结果

2.1 行为学实验结果

表 1 real-time PCR 引物序列及 PCR 产物片断

	引物序列	扩增产物
突触素	上游 5'TTCCTGCAGAACAACTACCGAGAG3' 下游 3'GCCATCTTCACATCGGACA5'	132bp
发动蛋白 I	上游 5'ATTTCCGCTGTGCCCATCA3' 下游 3'CCAACTGGGACCTTGCTCATTTC5'	95bp
β-肌动蛋白	上游 5'ACTGGAACGCTGAAGGTGACA3' 下游 3'ATGGCAAGGGACTTCCTGTAAC5'	60bp

与对照组比较, Aβ 组、OA 组和 Aβ+OA 组平均逃避潜伏期明显延长($P<0.01$);撤去平台后,以在原平台象限(第 1 象限)的活动时间为指标,与对照组比较, Aβ 组、OA 组及 OA+Aβ 第 1 次穿越平台所用时间延长($P<0.01$ 或 $P<0.05$),穿越站台次数减少($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。各组大鼠 Morris 水迷宫定向航行及空间探索试验结果见表 2 和表 3。

2.2 大鼠海马、颞叶皮质突触素、发动蛋白 I 表达

与对照组相比, Aβ 组、OA 组及 Aβ+OA 组海马突触素表达分别降低 51%、56%、63%;颞叶皮质分别降低 29%、48%、54%;与对照组相比, Aβ 组、OA 组及 Aβ+OA 组海马发动蛋白 I 表达分别降低 58%、59%、62%;颞叶皮质分别降低 49%、54%、61%,均以 OA+Aβ 组改变最为明显。各组突触素、发动蛋白 I 表达水平见表 4, 图 1。

2.3 大鼠颞叶皮质突触素、发动蛋白 I mRNA 表达

与对照组相比, Aβ 组、OA 组及 Aβ+OA 组颞叶皮质 Synaptophysin mRNA 表达降低 28%、30%、49%;与对照组相比, Aβ 组、OA 组及 Aβ+OA 组海马 Dynamin I mRNA 表达分别降低 38%、32%、50%。各组突触素、发动蛋白 I mRNA 表达水平见表 5。

表 2 各组定向航行试验中每日平均逃避潜伏期 ($\bar{x}\pm s, s$)

组别	例数	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天
对照组	12	21.58±18.06	15.68±11.05	11.147±6.13	12.20±8.2
Aβ 组	12	37.26±12.24	30.68±9.78	26.32±11.83	22.85±7.10 ^①
OA 组	8	38.82±21.32	28.79±20.51	25.52±19.90	23.83±20.29 ^①
Aβ+OA 组	12	45.89±18.80	37.95±21.12	35.43±21.47	28.25±19.49 ^①

①与对照组相比 $P<0.01$

表 3 各组空间探索试验中第 1 次穿越平台时间和穿平台次数 ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	第 1 次穿越平台时间(s)	平台穿越次数(次)
对照组	12	12.74±12.85	3.92±2.59
Aβ 组	12	25.14±12.34 ^②	2.66±1.41 ^②
OA 组	8	29.36±11.19 ^①	1.96±1.71 ^①
Aβ+OA 组	12	30.26±9.46 ^①	1.33±1.35 ^①

与对照组相比:① $P<0.01$, ② $P<0.05$

表 4 各组大鼠海马、颞叶皮质突触素和发动蛋白 I 蛋白表达水平 ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	突触素		发动蛋白 I	
		海马	颞叶皮质	海马	颞叶皮质
对照组	12	1.29±0.38	1.01±0.27	1.49±0.46	1.16±0.38
Aβ 组	12	0.63±0.19 ^①	0.72±0.34 ^②	0.62±0.18 ^①	0.59±0.19 ^①
OA 组	8	0.57±0.05 ^①	0.53±0.16 ^②	0.61±0.04 ^①	0.53±0.23 ^①
Aβ+OA 组	12	0.48±0.13 ^①	0.46±0.21 ^①	0.56±0.19 ^①	0.45±0.19 ^①

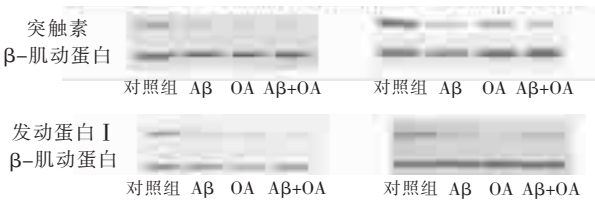
与对照组相比:① $P<0.01$;② $P<0.05$

表 5 各组大鼠颞叶皮质突触素 mRNA 和发动蛋白 I mRNA 表达水平 ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	突触素	发动蛋白 I
对照组	12	1.31±0.39	0.97±0.27
Aβ 组	12	0.94±0.24 ^②	0.6±0.19 ^②
OA 组	8	0.92±0.17 ^②	0.66±0.14 ^②
Aβ+OA 组	12	0.67±0.21 ^①	0.48±0.21 ^①

与对照组相比:① $P<0.01$;② $P<0.05$

图 1 各组突触素、发动蛋白 I 表达水平



3 讨论

学习记忆的形成与变化和突触的形成与变化密切相关^[5-6]。突触素是一种 38kD 的钙结合蛋白,存在于几乎所有神经终末的突触囊泡膜上,常作为突触前终末特异性标志物用来检测突触的密度和分布。除存在一定程度的突触丧失外,AD 还表现出突触功能的低下,许多突触相关蛋白表达都发生了改变^[7]。发动蛋白 I 是突触囊泡循环中网格蛋白(clathrin)介导的突触囊泡(synaptic vesicle,SV)内吞回收机制中的一个重要调节蛋白,是一个 100kD 的 GTP 酶,其主要作用是对已包被网格蛋白的突触囊泡进行机械挤压并剪切,动物实验结果显示抑制发动蛋白 I 可直接耗竭 SV^[8]。研究显示^[9],AD 患者及 APP 转基因动物脑组织中突触素及发动蛋白 I 的表达显著下降,提示 AD 脑中存在一定程度的突触联系丧失及网格蛋白介导的 SV 内吞功能的异常。

引起 AD 脑突触丧失及功能低下的具体分子机制目前还不清楚。近年来, Aβ 病因学说在 AD 发病机制中逐渐占据主流地位,并与突触病理改变密切

相关^[10-11]。我们对大鼠双侧海马CA1区微量注射A β 1-42,2月后与对照组相比,大鼠脑组织中突触素、发动蛋白I表达水平显著下降,并出现学习记忆能力降低,提示A β 可引起大鼠脑突触联系丧失及网格蛋白介导的SV内吞功能下降,突触联系丧失使神经元间信号交流破裂而形成临床上的痴呆表现,而网格蛋白介导的内吞调节发动蛋白I的表达异常,势必导致SV回收功能的降低,神经元的突触终端最终不能提供足够的SV而导致突触强度的改变,可能是引起该模型鼠认知能力下降的原因之一。

网格蛋白介导的内吞在真核生物细胞中常见于内吞营养物质、抗体和生长因子等过程,也参与脂质和蛋白质的运输。最近研究显示,网格蛋白介导的内吞过程还参与 β 淀粉样肽前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)的A β 加工过程^[12-13]。细胞培养实验显示全长的APP在细胞表面通过网格蛋白介导的内吞机制回收,然后在内涵体(endosomes)内进行 β -分泌酶裂解产生A β ^[14],抑制发动蛋白可减少APP的细胞内吞作用,从而减少A β 的产生和释放^[15];此外增强突触活性也可促进APP的内吞作用,导致A β 的产生和释放增多^[16-17],过度分泌的A β 又可反馈抑制突触传递^[17]。网格蛋白介导的APP内吞、A β 及突触功能之间似乎存在某些关联,我们推测APP的A β 加工过程可能存在反馈调节机制:AD病理过程中不正常的APP处理加工过程产生过度的A β ,过度产生的A β 可引起网格蛋白内吞调节蛋白发动蛋白I表达降低,试图反馈抑制网格蛋白介导的APP内吞过程以减少A β 的产生和释放,但发动蛋白I表达降低的同时也造成SV回收能力的下降,影响正常突触功能,最终导致学习记忆能力减退。与我们的结果一致的是,Kelly等报道在体外实验中A β 也可引起发动蛋白I及转录水平下降^[18]。

AD患者脑内另一标志性病理变化是神经细胞内神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFTs),NFTs的主要成分是过度磷酸化的Tau蛋白。Tau蛋白是一种微管相关蛋白,其主要功能是促进微管蛋白聚集成微管,并增强其稳定性、维持细胞的生长发育。本实验结果显示,大鼠海马微量注射蛋白磷酸酯酶PP-2A抑制剂冈田酸可促使Tau蛋白过度磷酸化(数据未显示),2月后大鼠出现学习记忆能力

的减退及突触素、发动蛋白I表达显著下降。Callahan等^[19]的研究显示与未出现NFTs的神经元相比,出现NFTs的神经元突触素蛋白丢失更为明显,推测神经元细胞支架破裂对突触运输可能会有影响。微管结构的完整性是神经细胞胞体与轴突间营养物质运输的基础,过度磷酸化的Tau蛋白促使微管解聚,细胞骨架破坏,正常轴突转运系统受损,可能最终导致突触丢失及逆行性退行性改变,认知功能下降。此外蛋白磷酸化和去磷酸化对于神经系统完成神经信号传递具有重要的意义,神经递质的释放主要是通过突触囊泡的循环过程实现的,包括囊泡的运输、胞吐和胞吞过程,都伴随着若干调控因子的磷酸化或去磷酸化过程^[20]。有研究显示OA造成PP2A活性降低不仅导致其催化Tau去磷酸化的能力下降,而且还可通过激活蛋白激酶A(protein kinase,PKA)、钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶II(calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, CaMK II)、丝裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)和应激激活蛋白激酶等激酶的活性,也影响了突触蛋白的磷酸化或去磷酸化平衡进而影响突触功能,我们推测这些异常磷酸化可能也损伤网格蛋白的调节蛋白导致SV内吞功能下降而影响突触功能,最终导致学习记忆能力的下降。

此外,本结果还显示,与对照组相比,A β 组、OA组及A β +OA注射组大鼠突触素、发动蛋白I表达海马较颞叶皮质下降更为显著,可能是海马是AD脑中最易受到影响的部位,并与学习记忆能力密切相关,也可能与本模型的注射点是海马有关。与A β 组、OA组相比,A β +OA组突触素、发动蛋白I表达下降水平更为显著,是由于受到两种病理因素的影响,还是A β 1-42与OA具有协同作用,尚需进一步研究。我们对突触素、发动蛋白I的mRNA研究显示,各模型组均较对照组表达水平下降,显示上述蛋白水平表达降低,可能在转录水平就已发生改变。

综上所述,本研究结果显示大鼠海马微量注射 β -淀粉样蛋白及冈田酸,均可降低大鼠学习记忆能力和突触素、发动蛋白I的表达,A β 和OA影响大鼠学习记忆功能可能是通过降低突触素、发动蛋白I的表达产生的,但具体分子机制还有待进一步探讨。通过对AD认知功能降低的分子机制研究,将对

AD 的治疗与康复提供新的方法。

参考文献

- [1] 王传升,张萍,张中兴.阿尔茨海默病患者行为和精神症状及其相关因素分析[J].中国康复医学杂志,2007,22(5):440—441.
- [2] 薛继芳,袁家璐,刘爱信.老年性痴呆患者的记忆功能评价及意义[J].中国康复医学杂志,2006,21(3):269—270.
- [3] Coleman P, Federoff H, Kurlan R. A focus on the synapse for neuroprotection in Alzheimer disease and other dementias[J]. Neurology, 2004, 63(7): 1155—1162.
- [4] 包新民,舒斯云.大鼠脑立体定位图谱[M]. 第1版. 北京:人民卫生出版社,1991.44.
- [5] Frick KM, Stearns NA, Pan JY, et al. Effects of environmental enrichment on spatial memory and neurochemistry in middle-aged mice[J]. Learn Mem, 2003, 10(3): 187—198.
- [6] 张辉,张昊昕,张朝东.运动训练对血管性痴呆大鼠认知障碍及长时程增强的影响[J].中国康复医学杂志,2007,22(1):21—23.
- [7] Reddy PH, Mani G, Park BS, et al. Differential loss of synaptic proteins in Alzheimer's disease: implications for synaptic dysfunction[J]. J Alzheimers Dis, 2005, 7(2):103—117.
- [8] Newton AJ, Kirchhausen T, Murthy VN. Inhibition of dynamin completely blocks compensatory synaptic vesicle endocytosis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103 (47): 17955—17960.
- [9] Yao PJ, Zhu M, Pyun EI, et al. Defects in expression of genes related to synaptic vesicle trafficking in frontal cortex of Alzheimer's disease[J]. Neurobiol Dis, 2003, 12(2): 97—109.
- [10] Selkoe DJ. Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior [J]. Behav Brain Res, 2008, 192(1): 106—113.
- [11] Lesne S, Koh MT, Kotilinek L, et al. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory [J]. Nature, 2006, 440(7082): 352—357.
- [12] Thinakaran G, Koo EH. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function [J]. J Biol Chem, 2008, 283 (44): 29615—29619.
- [13] Wu F, Yao PJ. Clathrin-mediated endocytosis and Alzheimer's disease: An update[J]. Ageing Res Rev, 2009, 8(3): 147—149.
- [14] Nordstedt C, Caporaso GL, Thyberg J, et al. Identification of the Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein in clathrin-coated vesicles purified from PC12 cells [J]. J Biol Chem, 1993, 268(1): 608—612.
- [15] Cirrito JR, Kang JE, Lee J, et al. Endocytosis is required for synaptic activity-dependent release of amyloid-beta in vivo[J]. Neuron, 2008, 58(1): 42—51.
- [16] Nitsch RM, Farber SA, Growdon JH, et al. Release of amyloid β -protein precursor derivatives by electrical depolarization of rat hippocampal slices [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90 (11) :5191—5193.
- [17] Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, et al. APP processing and synaptic function[J]. Neuron, 2003, 37(6): 925—937.
- [18] Kelly BL, Vassar R, Ferreira A. Beta -amyloid -induced dynamin 1 depletion in hippocampal neurons. A potential mechanism for early cognitive decline in Alzheimer disease[J]. J Biol Chem, 2005, 280(36): 31746—31753.
- [19] Callahan LM, Vaules WA, Coleman PD. Quantitative decrease in synaptophysin message expression and increase in cathepsin D message expression in Alzheimer disease neurons containing neurofibrillary tangles [J]. J Neuropathol Exp Neurol, 1999, 58 (3): 275—287.
- [20] 刘治军,陈乃宏.蛋白磷酸化去磷酸化与突触囊泡循环[J].生理科学进展,2007, 38(4):343—346.

更正

关于《中国康复医学杂志》2010年第25卷第6期第565—570页发表的《脑卒中运动功能训练的循证医学研究》一文,现做如下更正:①删除第一作者的单位“暨南大学附属第一医院”,只保留“北京大学第一医院”;②增加王宁华为通讯作者。

姚滔涛