

·基础研究·

小强度跑台运动对 APP/PS1 转基因小鼠海马齿状回神经元凋亡的影响*

刘慧莉¹ 赵刚¹ 张合¹

摘要

目的:观察小强度跑台运动对 APP/PS1 转基因小鼠海马齿状回神经元凋亡的影响。

方法:3月龄 C57 野生型小鼠及 APP/PS1 转基因小鼠随机分为四组:野生型小鼠对照组(WtC 组,6 只)、野生型小鼠运动组(WtE 组,6 只)、转基因小鼠对照组(TgC 组,6 只)、转基因小鼠运动组(TgE 组,6 只),运动组小鼠进行 5 个月小强度跑台运动。训练结束后,各组小鼠在麻醉状态下在体灌注固定,取脑,石蜡包埋,取石蜡切片进行 Nissl 染色与 TUNEL 染色,观察神经元形态和数量及神经细胞凋亡。

结果:与野生型小鼠比较,TgC 组小鼠海马齿状回神经元数量明显减少,排列稀疏,胞体塌陷或皱缩,神经元细胞核固缩多见,尼氏小体数量明显减少。相较于 TgC 组,TgE 组小鼠齿状回神经元数量较多,排列较规整,偶见神经元细胞核固缩,仍可见到较多的尼氏小体,形态大致正常。转基因小鼠齿状回可见较多的凋亡细胞,凋亡指数高于野生型小鼠,差异具有显著性($P<0.05$);TgE 组齿状回神经细胞凋亡指数低于 TgC 组,差异具有显著性($P<0.05$)。

结论:小强度跑台运动对阿尔茨海默病所致的小鼠海马齿状回神经元数目的减少具有保护作用;抑制神经元凋亡是小强度跑台运动减少海马结构齿状回神经元丢失的可能原因。

关键词 跑台运动;海马齿状回;神经元凋亡;阿尔茨海默病

中图分类号:R339.4, R493 文献标识码:B 文章编号:1001-1242(2014)-04-0348-03

凋亡(apoptosis)是一种细胞程序性死亡,在维持组织的平衡和发展中起重要作用^[1-2]。神经细胞凋亡是阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)发展过程的一个重要机制^[3-4]。正常人脑内几乎没有或很少有细胞凋亡,而 AD 患者脑内,尤其海马区神经细胞凋亡明显增加,神经细胞凋亡与 AD 的发病进展密切相关^[5]。神经细胞凋亡过盛可能是 AD 神经退行性变、神经元丢失的一个重要原因。

规律运动不仅能提高脑的认知能力,而且对脑的可塑性也有积极作用^[6-7]。我们以往的研究证实^[8-9],长期小强度的跑台运动可增强 β -淀粉样前体蛋白/早老素 1(β -amyloid precursor protein/presenilin-1, APP/PS1)转基因小鼠的空间学习与记忆能力,增加长时程增强的发生,并减缓转基因小鼠海马齿状回 AD 样神经病理改变。而海马的神经元数目与学习和记忆能力下降密切相关,学习和记忆功能障碍的老年痴呆患者大脑皮质神经元数目明显减少,海马神经元数目减少可达 44.3%—57.0%^[10]。规律运动增强 APP/PS1 转基因小鼠的学习与记忆能力是否与抑制神经细胞凋亡过盛有关,本研

究观察长期小强度跑台运动对 APP/PS1 转基因小鼠海马齿状回神经元凋亡的影响,为 AD 患者运动处方的制定提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物:3 月龄雌性 APP/PS1 双转基因小鼠(transgenic mice, Tg)及野生型(wild type mice, Wt)小鼠各 12 只,由中国医科大学实验动物中心提供。常规分笼饲养,每笼 4 只,自由进食和饮水。每日光照 12h。饲养室温度 22℃—24℃,相对湿度 40%—60%。实验动物饲养及取材遵守实验动物管理和保护的有关规定。

1.1.2 主要药品及试剂:戊巴比妥钠(中国医药集团上海化学试剂公司);多聚甲醛(天津光复精细化工研究所);细胞凋亡检测试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.1.3 主要仪器设备:小动物跑台(中国,淮北正华);Leica 石蜡切片机(德国 Roche Diagnostics);光学显微镜(美国

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2014.04.011

*基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(31100857)

1 中国医科大学运动医学系,沈阳,110001

作者简介:刘慧莉,女,博士,副教授;收稿日期:2013-09-06

Olympus)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物分组及运动方案:野生型小鼠及APP/PS1转基因小鼠随机分为四组:野生型小鼠对照组(WtC,6只)、野生型小鼠运动组(WtE,6只)、转基因小鼠对照组(TgC,6只)、转基因小鼠运动组(TgE,6只)。

运动组小鼠进行2d跑台适应性训练,第1天以5m/min的速度运动10min,第2天以8m/min的速度运动10min。正式运动开始后,运动组小鼠每日下午14:00后进行跑台运动30min,每天以5m/min的速度开始运动5min,后以8m/min的速度运动5min,最后以11m/min的速度运动20min。参照文献^[1],小鼠运动强度约为45%—55%最大摄氧量(VO_{2max})。每周运动5d,休息2d,持续5个月(从3月龄至8月龄)。

1.2.2 样本采集:5个月跑台训练结束后,各组小鼠经0.67%的戊巴比妥钠(0.01ml/g)腹腔注射麻醉后,将小鼠开胸,从左心室插管至升主动脉,先以30ml的生理盐水灌流冲洗,再以4%的多聚甲醛固定液灌注固定。灌毕后立即取脑,投入4%多聚甲醛固定液,置于4℃冰箱中固定过夜。次日将脑组织于70%、80%、90%、95%及100%酒精中梯度脱水,透明,浸蜡,石蜡包埋,切片,片厚5 μ m。

1.2.3 尼氏(Nissl)染色:将石蜡切片进行常规Nissl染色,步骤如下:常规石蜡切片脱蜡、水化;蒸馏水洗1—2min;用1%的甲苯胺蓝染液于37℃温箱内浸染10min;蒸馏水洗1—2min;用95%酒精分化至镜下尼氏体清晰为止;无水酒精脱水8—10min;二甲苯透明8—10min;中性树脂封片。光镜观察。

1.2.4 TUNEL染色:操作过程按照说明书指导,具体步骤如下:石蜡切片脱蜡,梯度酒精水化;新鲜配制3%的 H_2O_2 ,室温处理10min;蒸馏水洗2min \times 3;加2%的蛋白酶K,37℃消化15min;TBS洗2min \times 3;加混有TdT和DIG-d-UTP的标记缓冲液,阴性对照片仅加TBS,37℃孵育120min;封闭液室温处理30min;生物素化的抗地高辛抗体37℃孵育30min;TBS洗2min \times 3;SABC 37℃孵育30min;TBS洗5min \times 4;新鲜配制的DAB显色3—5min;苏木素复染。TUNEL阳性细胞核染成棕黄色,镜下计数细胞,计算凋亡百分率,即凋亡指数(apoptotic index, AI), $AI=(\text{阳性细胞数}/\text{总细胞数})\times 100\%$ 。每张切片选3个视野观察,每只取5张切片观察。

1.3 统计学分析

所有数据均采用SAS 8.1进行统计。实验数据以均数 \pm 标准差表示,组间比较采用双因素方差分析。

2 结果

2.1 Nissl染色结果

光镜下可见脑片染色背景干净、对比清晰。野生型小鼠

齿状回神经元排列整齐、均匀,神经元数量多,细胞结构完整,尼氏小体形态正常,呈深蓝色颗粒或斑块,分界清晰,细胞核呈浅蓝色,细胞膜、核膜清晰,核圆,核仁明显;WtE组小鼠齿状回神经细胞未见明显增多,但细胞排列更为紧密。TgC组小鼠齿状回神经元数量明显减少,排列稀疏,胞体塌陷或皱缩,细胞外空隙增大,胞膜、核膜界限不清,神经元细胞核固缩多见,胞核呈椭圆或三角形,尼氏小体数量明显减少,尼氏小体分界不清;TgE组小鼠齿状回神经元数量较多,排列较规整,偶见神经元细胞核固缩,仍可见到较多的尼氏小体,形态大致正常。见图1。

2.2 TUNEL染色结果

应用TUNEL染色检测小鼠齿状回神经元凋亡情况,细胞核深着色的深棕色细胞为TUNEL阳性细胞,为凋亡细胞(见图2)。结果显示,野生型小鼠齿状回几乎未见凋亡细胞,转基因小鼠齿状回可见较多的凋亡细胞,凋亡指数明显高于野生型小鼠(WtC:1.32 \pm 0.18, TgC:27.30 \pm 3.86; $P<0.05$),并且出现细胞核固缩深染、形状不规则。与TgC组小鼠比较, TgE组小鼠齿状回神经细胞凋亡少见,且凋亡指数明显减

图1 小鼠齿状回神经元Nissl染色($\times 400$)

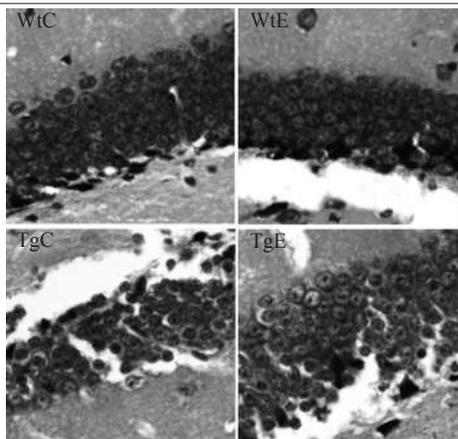
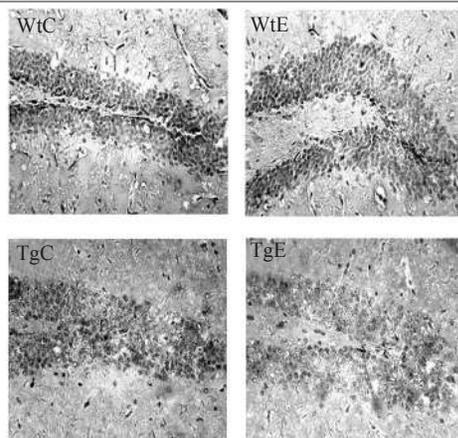


图2 小鼠齿状回神经元TUNEL染色



少,差异具有显著性(TgC:27.30±3.86, TgE:15.23±2.15; $P < 0.05$)。

3 讨论

尼氏体是神经元的特征性结构之一,虽然神经生物学的研究已进入到分子水平,但作为神经元的标记性物质,尼氏体形态结构的研究仍然是神经生物学的经典指标之一。当神经细胞遭受损害时,其胞浆中的尼氏小体消失,称为尼氏小体溶解。如病变消失,尼氏体可恢复正常,所以通过观察尼氏小体可检验神经元的形态和功能。

实验结果显示 TgC 组小鼠齿状回神经元数量明显减少,排列稀疏,胞体塌陷或皱缩,细胞外空隙增大,胞膜、核膜界限不清,神经元细胞核固缩多见,胞核呈椭圆或三角形,尼氏小体数量明显减少,尼氏体分界不清; TgE 组小鼠齿状回神经元数量较多,排列较规整,偶见神经元细胞核固缩,仍可见到较多的尼氏小体,形态大致正常。表明小强度跑台运动对 AD 所致的海马齿状回神经元数目的减少具有保护作用。

海马的结构异常与学习和记忆能力下降密切相关,学习和记忆功能障碍的老年痴呆患者大脑皮质神经元数目明显减少,海马神经元数目减少可达 44.3%—57.0%^[10]。但是,Takeuchi A 的研究显示^[12],同时表达 APP^{sw} 和 PS1 突变基因的转基因小鼠,有显著的年龄相关的 A β 沉积,但并不能导致 AD 特征性的海马和相关皮质神经元的明显缺失,观察海马结构的不同区域,可能是取得不同研究结果的主要原因,Takeuchi A 研究的是海马 CA1 区,而我们观察的是海马结构齿状回。

细胞凋亡是一种不同于细胞坏死的死亡方式,是在基因控制下的自我消亡的过程。神经元凋亡是 AD 发病进程过程中的重要事件,是神经元减少、认知功能减退等主要原因之一,抑制神经元凋亡也是治疗 AD 的重要策略^[13]。

AD 患者及动物模型均提示,海马比其他脑区的 AD 病理变化出现较早且重^[14]。在观察细胞凋亡的诸多方法中,脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling, TUNEL)被广泛采用,能够准确地反映细胞凋亡最典型的生物化学和形态学特征。已有研究表明^[15],7 月龄 APP/PS1 转基因小鼠脑内神经元凋亡明显增加。本研究中 TUNEL 染色结果显示,转基因运动组小鼠齿状回神经细胞凋亡少于转基因对照组。提示抑制神经元凋亡是小强度跑台运动减少海马结构齿状回神经元丢失的可能原因。

如上所述,长期规律的小强度跑台运动可减轻 APP/PS1 转基因小鼠海马齿状回的神经细胞凋亡,明显改善 APP/PS1 转基因小鼠海马齿状回的神经元丢失。因此,小强度跑台运动对 AD 所致的海马齿状回神经元数目的减少具有保护作

用;抑制神经元凋亡是小强度跑台运动减少海马结构齿状回神经元丢失的可能原因。这可能是小强度跑台运动改善 APP/PS1 转基因小鼠学习与记忆能力的途径之一。另外,神经元的数目与神经元的凋亡及新生神经元的数目相关,在研究运动对 APP/PS1 转基因小鼠海马齿状回的神经元丢失的改善时,应观察 APP/PS1 转基因小鼠海马齿状回新生神经元数目的变化。

参考文献

- [1] Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system[J]. Nature, 2000, 407(6805): 802—809.
- [2] 朱长庚.神经解剖学[M].北京:人民卫生出版社,2002.202—204.
- [3] Yang DS, Kumar A, Stavrides P, et al. Neuronal apoptosis and autophagy cross talk in aging PS/APP mice, a model of Alzheimer's disease[J]. Am J Pathol, 2008, 173(3):665—681.
- [4] Engidawork E, Gulesserian T, Yoo BC, et al. Alteration of caspases and apoptosis-related proteins in brains of patients with Alzheimer's disease[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 281(1):84—93.
- [5] Raynaud F, Marcilhac A. Implication of calpain in neuronal apoptosis: A possible regulation of Alzheimer's disease[J]. FEBS J, 2006, 273(15):3437—3443.
- [6] García-Mesa Y, López-Ramos JC, Giménez-Llort L, et al. Physical exercise protects against Alzheimer's disease in 3 \times Tg-AD mice[J]. J Alzheimers Dis, 2011, 24(3):421—454.
- [7] Cotman CW, Berchtold NC. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity[J]. Trends Neurosci, 2002, 25(6):295-301.
- [8] Liu HL, Zhao G, Cai K, et al. Treadmill exercise prevents decline in spatial learning and memory in APP/PS1 transgenic mice through improvement of hippocampal long-term potentiation[J]. Behav Brain Res, 2011, 218(2):308-314.
- [9] Liu HL, Zhao G, Zhang H, et al. Long-term treadmill exercise inhibits the progression of Alzheimer's disease-like neuropathology in the hippocampus of APP/PS1 transgenic mice [J]. Behav Brain Res, 2013, 256(11):261—272.
- [10] Petukhov VV, Popov VI. Quantitative analysis of ultrastructural changes in synapses of the rat hippocampal fields CA3 in vitro in different functional states[J]. Neuroscience, 1986, 18(4):823—835.
- [11] Baker EJ, Gleason TT. The effects of intensity on the energetics of brief locomotor activity[J]. J Exp Biol, 1999, 202 (Pt 22):3081—3087.
- [12] Takeuchi A, Irizarry MC, Duff K, et al. Age-related amyloid beta deposition in transgenic mice overexpressing both Alzheimer mutant presenilin 1 and amyloid beta precursor protein Swedish mutant is not associated with global neuronal loss[J]. Am J Pathol, 2000, 157(1):331—339.
- [13] Cui W, Tao J, Wang Z, et al. Neuregulin1beta1 antagonizes apoptosis via ErbB4-dependent activation of PI3-kinase/Akt in APP/PS1 transgenic mice[J]. Neurochem Res, 2013, 38 (11):2237—2246.
- [14] Hampel H, Teipel SJ, Bayer W, et al. Age transformation of combined hippocampus and amygdala volume improves diagnostic accuracy in Alzheimer's disease[J]. J Neurol Sci, 2002, 194(1):15—19.
- [15] 陈静,秦红芳,朱斌,等. APP/PS1 双转基因 AD 小鼠早期内质网应激诱导的凋亡[J]. 解剖学研究, 2012, 34(1):12—15.