

·基础研究·

电针百会对APP/PS1转基因小鼠学习记忆能力及Tau蛋白磷酸化的影响*

吴羽楠¹ 陈吉祥¹ 陶静¹ 林如辉² 张颖铮¹ 卓沛元¹ 陈立典^{3,4}

摘要

目的:基于Tau蛋白磷酸化探讨电针百会对APP/PS1转基因痴呆模型小鼠学习记忆能力的影响及其可能机制。

方法:30只4月龄雌性APP/PS1转基因小鼠随机分为模型组、百会组和非穴组,10只同窝阴性野生小鼠为野生组;百会组电针百会穴,非穴组电针非穴,干预28d。采用Morris水迷宫实验观察小鼠学习记忆能力;尼氏染色观察小鼠海马神经元形态结构变化;蛋白免疫印记杂交技术(Western blot)检测小鼠海马组织在Ser-396位点上Tau蛋白磷酸化水平。

结果:与模型组相比,百会组可改善小鼠的学习记忆能力($P < 0.05$),减轻海马神经元形态结构的损伤,降低海马组织中Ser-396位点上Tau蛋白磷酸化水平($P < 0.05$),非穴组与模型组相比无显著性差异($P > 0.05$)。

结论:电针百会能够改善APP/PS1转基因痴呆模型小鼠的学习记忆能力,其机制可能与抑制Tau蛋白磷酸化有关。

关键词 电针;阿尔茨海默病;学习记忆;Tau

中图分类号:R749.1+6, R245 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2015)-05-0432-05

Effects of electroacupuncture at Baihui on learning and memory ability and Tau phosphorylation in APP/PS1 transgenic mice/WU Yunan, CHEN Jixiang, TAO Jing, et al//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2015, 30(5): 432—436

Abstract

Objective: To explore the effects of electroacupuncture at Baihui (DU20) on learning and memory ability and its possible mechanism through the phosphorylated Tau in APP/PS1 transgenic mice.

Method: Thirty female APP/PS1 transgenic dementia model mice were randomly divided into model group, DU20 group and non-acupoint group, 10 wild type mice consisted wild group. The DU20 group received electroacupuncture at Baihui (DU20) and the non-acupoint group received electroacupuncture at non-acupoint for 28 days. Learning and memory ability was tested with Morris water maze. The morphology and structure of hippocampus neurons were observe by Nissl's staining. The level of Tau phosphorylation at Ser-396 point was detected by Western blot.

Result: Compared with the model group, electroacupuncture at DU20 could ameliorated learning and memory ability of APP/PS1 mice ($P < 0.05$), decreased the injury of neurons in morphology and structure and the level of Tau phosphorylation at Ser-396 in hippocampus ($P < 0.05$), and there was no significant difference between model group and non-acupoint group ($P > 0.05$).

Conclusion: Electroacupuncture at DU20 could ameliorate learning and memory ability in APP/PS1 transgenic dementia model mice, the mechanism may be related to the Tau phosphorylation in hippocampus.

Author's address College of Rehabilitation Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, 350122

Key word electroacupuncture; Alzheimer's disease; learning and memory; Tau

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2015.05.005

*基金项目:福建省康复技术协同创新中心资助项目(X2012004-协同)

1 福建中医药大学康复医学院,福州,350122; 2 福建中医药大学中西医结合研究院; 3 福建中医药大学; 4 通讯作者
作者简介:吴羽楠,女,硕士研究生; 收稿日期:2014-12-19

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是主要发生在老年人的一种以认知功能进行性减退和进行性痴呆为临床特征的神经退行性疾病,临床主要表现为记忆、认知、语言、行为障碍及人格改变,严重者丧失生活自理能力,是康复医学亟待解决的重点问题。Tau蛋白过度磷酸化,不能把微管蛋白结合在一起,引起轴突不稳定,导致运输能力降低,并且促进Tau蛋白的聚集,在神经元中形成神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFTs),产生神经退行性病变是其主要病理变化之一^[1-2]。有研究结果证实,降低Tau蛋白磷酸化水平,减少NFTs,可明显改善AD模型小鼠空间学习记忆障碍^[3]。无论从临床研究还是基础研究发现,针刺对治疗AD病具有独特的疗效,但其机制尚不明确^[4-6]。

因此,本研究通过观察电针百会穴对APP/PS1转基因痴呆模型小鼠学习记忆能力、海马神经元形态结构及Tau蛋白磷酸化的影响,探讨其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

30只4月龄雌性APP/PS1转基因痴呆模型小鼠30只,同窝阴性野生小鼠10只,购于南京大学模式动物所,于福建中医药大学实验动物中心SPF级实验室喂养。采用随机数字表法将所有APP/PS1转基因小鼠编号,分为3组:模型组(n=10)、百会组(n=10)、非穴组(n=10),野生组为阴性野生小鼠(n=10)。实验过程均严格按照国际动物保护和使用的规定进行。

1.2 主要试剂和仪器

尼氏染色液(上海碧云天生物技术有限公司,上海);Tau、Tau(phospho S396)(Abcam, Cambridge, MA, USA)和 β -actin一抗及辣根过氧化物酶二抗(Cell Signaling, Beverly, MA, USA);Morris水迷宫(中国医学科学院药物研究所);Image-lab图像分析系统(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)。

1.3 干预措施

①野生组和模型组:置于普通笼中饲养,只给予同等条件抓取,不给予任何治疗。②百会组:参考《实验针灸学》取小鼠百会穴,使用华佗牌30号0.5

寸毫针,G6805电针仪,电压峰值2V,以针体轻轻抖动为度,疏密波,频率1Hz,每次30min,每天1次,共治疗28d。③非穴组针刺非穴,取肋下非经非穴点,具体定位为髂后上棘上2cm,脊柱旁开3cm,该点避开督脉及肋部穴位^[7],针刺时间、疗程与百会组相同。

1.4 Morris水迷宫实验

各组小鼠在实验干预第24天进行。水迷宫的水池,圆桶形,直径120cm,深50cm,水深30cm,水温(26±2)℃,池壁上4个等距离点分水池为4个象限,池壁外标4个入水点,任选一象限在中央放置平台。平台直径6cm,高28cm,没于水面下2cm,水池周围参照物保持不变。Morris水迷宫主要包括定位航行实验和空间探索实验两个部分。①定位航行实验(place navigation):检测小鼠对平台位置学习的能力。将小鼠按顺时针方向依次由第一象限,第二象限,第三象限,第四象限入水点顺序面向池壁放入水中。如果小鼠在90s内爬上平台,并停留3s以上,则认为小鼠找到平台,此为逃避潜伏期(escape latency)。如果90s内小鼠未能找到平台,则拖拽其尾部,将其引导到平台,熟悉10s,此时潜伏期按90s计算。②空间探索实验(spatial probe):测试小鼠学会寻找平台后,对平台空间位置记忆的能力。定位航行实验后,即在第28天,撤去平台,取任意一个入水点将小鼠放入水中,观察并记录90s内小鼠穿过原平台区域的次数。

1.5 取材及检测方法

1.5.1 尼氏染色观察神经元形态:麻醉下开胸,生理盐水80ml经左心室快速冲洗,4%多聚甲醛(pH=7.4)40ml灌流固定。取脑后置入4%多聚甲醛内4℃固定24—48h。常规脱水,石蜡包埋,冠状切片,片厚5 μ m。二甲苯脱蜡、梯度酒精脱水,尼氏染色液染色,中性树脂封片。光镜下观察小鼠大脑海马组织细胞形态学变化。

1.5.2 蛋白免疫印迹法(Western blot):取小鼠海马组织置于液氮罐中速冻,再置于-80℃冰箱保存。1ml裂解缓冲液和10 μ l苯甲基磺酰氟(phenyl methane sulfonyl fluoride, PMSF)储存液裂解100mg海马组织,充分研磨后离心,吸取上清。BCA蛋白浓度测定法测定蛋白浓度。样品蛋白变性后,取50 μ g

样品蛋白经 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate - polyacryl amide gel electrophoresis, SDS-PAGE), 转移到聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜后, 用封闭液封闭 2h, 分别用 Tau、Tau(phospho S396) 和 β -actin 一抗 (1:1000) 孵育, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 用辣根过氧化物标记的二抗 (1:5000) 室温孵育 1h。将 PVDF 膜放图像扫描仪上, 避光配置显色液并覆盖 PVDF 膜, Image-lab 图像分析系统并分析处理。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 18.0 进行数据统计分析, 所有数据均满足方差齐性 ($P > 0.05$), 以均数 \pm 标准差表示, 采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 法。

2 结果

2.1 Morris 水迷宫实验检测结果

定位航行试验: 随着训练时间的增加, 各组小鼠逃避潜伏期都呈逐渐缩短趋势, 从实验干预第 24 天起, 与野生组相比, 模型组小鼠的逃避潜伏期时间明显延长 ($P < 0.01$)。从第 25 天起, 与模型组相比, 百会组小鼠的逃避潜伏期时间缩短 ($P < 0.05$), 非穴组相比于模型组无显著性差异 ($P > 0.05$)。空间搜索试验: 实验干预第 28 天, 模型组小鼠跨越平台次数与野生组相比明显减少 ($P < 0.01$), 而相比于模型组, 百会组跨越平台次数增加 ($P < 0.05$), 非穴组穿平台次数差异无显著性 ($P > 0.05$), 见表 1。

以上实验结果表明百会组小鼠学习记忆力明显优于模型组, 非穴组与模型组相比差异无显著性。

表 1 各组小鼠逃避潜伏期及跨越平台次数比较

($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	逃避潜伏期(s)				穿越平台次数
	第 24 天	第 25 天	第 26 天	第 27 天	
野生组	71.33 \pm 8.35	58.72 \pm 11.17	47.89 \pm 6.72	28.92 \pm 7.11	1.98 \pm 0.53
模型组	83.26 \pm 4.94 ^①	79.27 \pm 7.29 ^①	74.88 \pm 14.80 ^①	57.51 \pm 11.28 ^①	0.70 \pm 0.67 ^①
百会组	77.20 \pm 8.28	67.19 \pm 10.05 ^②	60.70 \pm 14.52 ^②	42.62 \pm 9.59 ^②	1.33 \pm 0.71 ^②
非穴组	82.38 \pm 5.78 ^③	77.89 \pm 6.79 ^③	72.37 \pm 18.28 ^③	54.97 \pm 11.34 ^③	0.83 \pm 0.66 ^③

与野生组相比: ① $P < 0.01$; 与模型组相比: ② $P < 0.05$; ③ $P > 0.05$

2.2 尼氏染色结果

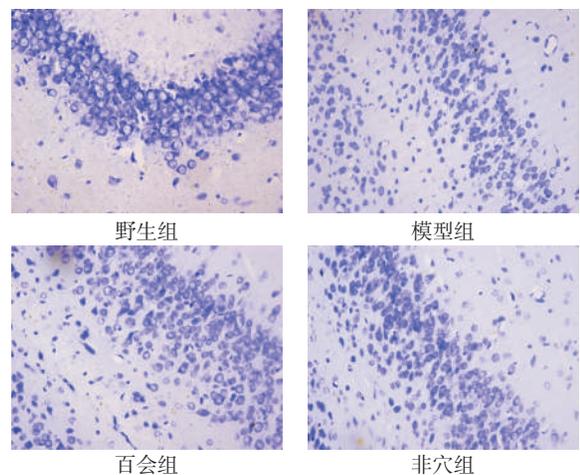
小鼠石蜡脑切片尼氏染色结果显示, 野生组小鼠海马 CA3 区神经元细胞形态结构完整, 排列紧密、整齐、均匀, 细胞膜、核仁清晰, 着色均匀。模型组和非穴组小鼠海马 CA3 区神经元细胞固缩破裂, 排列疏松, 胞体塌陷或皱缩, 胞膜、核膜界限不清, 着色深浅不均, 结构完整性遭到破坏。百会组染色结果显示, 与模型组比较神经元排列较紧密规整, 神经元细胞结构破坏程度减轻。电针百会能减轻 APP/PS1 转基因痴呆模型小鼠 CA3 区神经元细胞的结构完整性的损伤, 见图 1。

2.3 小鼠海马 Tau 蛋白磷酸化检测

通过 Western blot 法检测, 以 p-Tau (Ser-396)/Tau 的相对值表示磷酸化水平, 我们发现, 与野生组相比, 模型组小鼠海马在 Ser-396 位点上 Tau 蛋白磷酸化明显增加 ($P < 0.05$), 而经过电针百会治疗后, 百会组小鼠 Tau 蛋白磷酸化水平相比于模型组明显降低 ($P < 0.05$), 非穴组与模型组相比无显著性差异 ($P > 0.05$), 见图 2—3。

图 1 各组小鼠海马 CA3 区神经元形态变化

(尼氏染色, $\times 400$)



3 讨论

AD 在中医理论体系中见于“呆病”、“健忘”、“癫狂”等证的描述中, 以气郁痰结、肾精亏虚, 瘀阻于脑络为痴呆发病的主要原因。针灸疗法对其已

图2 各组小鼠海马组织Ser-396位点上Tau蛋白磷酸化水平比较

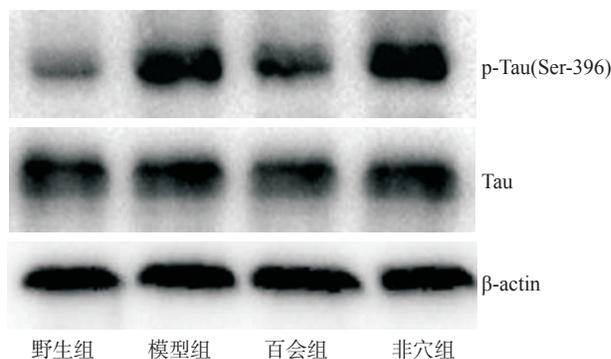
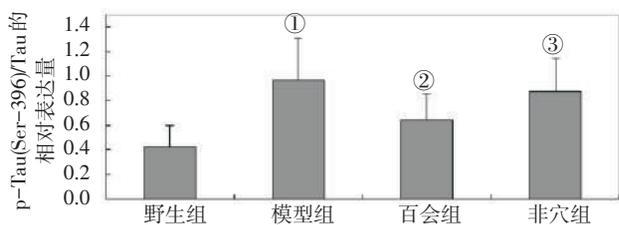


图3 各组小鼠海马组织p-Tau(Ser-396)/Tau的相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$, 相对值, n=6)



与野生组相比:① $P < 0.05$;与模型组相比:② $P < 0.05$;③ $P > 0.05$

有明确的治疗原则,如醒脑开窍、益血调气、益肾化浊等,取穴以督脉、心经、肾经等经穴为主。督脉上至风府,入属于脑,历代医家素有“病变在脑,首取督脉”之说。百会为督脉,足太阳之会,位居巅顶,其深处即为脑。《太平圣惠方·针经》记载:百会疗“多睡心烦,惊悸无心力,忘前失后,吃食无味,头重”。可见,百会穴具有益心安神、生髓养脑的功效,主要用于治疗心神病症。

记忆障碍是AD的主要表现之一, Morris水迷宫是目前用于啮齿类动物学习记忆功能评估的重要工具。本研究通过定位航行实验和空间探索实验证实了电针百会穴可以改善APP/PS1转基因小鼠的学习和记忆能力。海马区是重要的学习与记忆的存储结构,常被用于探究学习记忆障碍的研究^[8-9]。当AD发生时,海马等与学习记忆有关的脑区的神经元细胞发生病理性变化,出现学习记忆障碍^[10]。通过尼氏染色,我们观察到电针可以减少小鼠海马组织中神经元细胞的结构完整性的损伤,进一步在形态学上证明了电针对APP/PS1转基因小鼠的神经保护作用。

AD的主要特征病理改变是脑内淀粉样蛋白沉积形成的老年斑和神经元内出现神经原纤维缠结。Tau蛋白是一种微管相关蛋白(microtubule associated proteins, MAPs),主要位于神经元轴突内,具有促进微管的形成和保持微管的稳定性的作用。Tau蛋白过度磷酸化后,与微管蛋白的结合能力显著下降,丧失了促进微管组装的功能,并且与正常Tau蛋白竞争结合微管蛋白,导致微管解聚,而异常过度磷酸化的Tau蛋白则聚集形成NFTs^[11]。神经元内大量NFTs会对细胞轴突运输功能产生直接干扰,引起毒性效应,导致突触丢失和神经元变性^[12]。Tau蛋白磷酸化程度取决于体内多种特异蛋白激酶的磷酸化和蛋白磷酸酶去磷酸化之间的相互作用。Tau蛋白磷酸化的蛋白激酶主要有糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)、细胞周期依赖性蛋白激酶5(cyclin-dependent kinase 5, CDK-5)和cAMP依赖性蛋白激酶A(cAMP-dependent protein kinase A, APKA)^[13]。Tau蛋白发生过度磷酸化与其自身众多的磷酸化位点有关,已发现的AD脑部的Tau蛋白异常磷酸化位点Ser-199、Ser-202、Ser-396、Ser-404、Thr-181等均为丝/苏氨酸位点。作为丝/苏氨酸蛋白激酶,GSK-3 β 是Tau蛋白过度磷酸化的一个关键蛋白激酶^[14-15]。GSK-3 β 对Ser-396位点具有高亲和性,其磷酸化的能力最强,而且成纤维特性更强,使Tau蛋白稳定微管蛋白的能力降低,影响微管稳定性^[16-17]。故我们选择Ser-396位点进行磷酸化水平检测,结果显示经过28d电针百会治疗,能够有效抑制APP/PS1小鼠海马组织中Ser-396位点上Tau蛋白的磷酸化水平。

综上所述,电针百会穴能够改善APP/PS1转基因痴呆模型小鼠的学习记忆能力,其作用机制可能与电针治疗能够抑制小鼠海马区Tau蛋白的磷酸化水平以及其对小鼠海马的神经保护作用有关,但有待进一步研究。

参考文献

- [1] Wang JZ, Xia YY, Grundke-Iqbal I, et al. Abnormal hyperphosphorylation of tau: sites, regulation, and molecular mechanism of neurofibrillary degeneration[J]. J Alzheimers Dis, 2013, 33(Suppl 1):S123-139.
- [2] Gerschütz A, Heinsen H, Grünblatt E, et al. Neuron-specific

- alterations in signal transduction pathways associated with Alzheimer's disease[J]. *J Alzheimers Dis*, 2014, 40(1):135—142.
- [3] Dobarro M, Orejana L, Aguirre N, et al. Propranolol restores cognitive deficits and improves amyloid and Tau pathologies in a senescence-accelerated mouse model[J]. *Neuropharmacology*, 2013, (64):137—144.
- [4] Lu Y, Huang Y, Tang C, et al. Brain areas involved in the acupuncture treatment of AD model rats: a PET study[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, (14):178.
- [5] Wang Z, Liang P, Zhao Z, et al. Acupuncture modulates resting state hippocampal functional connectivity in Alzheimer disease[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3):e91160.
- [6] Wang Z, Nie B, Li D, et al. Effect of acupuncture in mild cognitive impairment and Alzheimer disease: a functional MRI study[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8):e42730.
- [7] 洪钰竺,张学君,洪霖,等.针刺“长强”穴对自闭症模型大鼠学习记忆能力和前额叶皮层缝隙连接相关蛋白表达的影响[J].针刺研究,2014,39(3):173—179.
- [8] Deng W, Aimone JB, Gage FH. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory?[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2010, 11(5):339—350.
- [9] Manns JR, Eichenbaum H. A cognitive map for object memory in the hippocampus[J]. *Learn Mem*, 2009, 16(10):616—624.
- [10] Asle-Rousta M, Kolahdooz Z, Oryan S, et al. FTY720 (fingolimod) attenuates beta-amyloid peptide (A β 42)-induced impairment of spatial learning and memory in rats[J]. *J Mol Neurosci*, 2013, 50(3):524—532.
- [11] Doran M, du Plessis DG, Ghadiali EJ, et al. Familial early-onset dementia with tau intron 10 + 16 mutation with clinical features similar to those of Alzheimer disease[J]. *Arch Neurol*, 2007, 64(10):1535—1539.
- [12] Pritchard SM, Dolan PJ, Vitkus A, et al. The toxicity of tau in Alzheimer disease: turnover, targets and potential therapeutics[J]. *J Cell Mol Med*, 2011, 15(8):1621—1635.
- [13] Gong CX, Liu F, Grundke-Iqbal I, et al. Post-translational modifications of tau protein in Alzheimer's disease[J]. *J Neural Transm*, 2005, 112(6):813—838.
- [14] Engmann O, Giese KP. Crosstalk between Cdk5 and GSK3 β : Implications for Alzheimer's Disease[J]. *Front Mol Neurosci*, 2009, (2):2.
- [15] Voss K, Gamblin TC. GSK-3 β phosphorylation of functionally distinct tau isoforms has differential, but mild effects[J]. *Mol Neurodegener*, 2009, (4):18.
- [16] Li T, Paudel HK. Glycogen synthase kinase 3 β phosphorylates Alzheimer's disease-specific Ser396 of microtubule-associated protein tau by a sequential mechanism[J]. *Biochemistry*, 2006, 45(10):3125—3133.
- [17] Feng Y, Xia Y, Yu G, et al. Cleavage of GSK-3 β by calpain counteracts the inhibitory effect of Ser9 phosphorylation on GSK-3 β activity induced by H₂O₂[J]. *J Neurochem*, 2013, 126(2):234—242.

(上接第 431 页)

- embryo dorsal root ganglia[J]. *Bioelectromagnetics*, 1996, 17(4):293—302.
- [11] 叶日乔,黄有荣,王大伟,等.脉冲电磁刺激临床应用研究[J].中医正骨,2004,16(11):11—12.
- [12] 张鸿日,李伯勤,彭静华,等.低频脉冲磁场对脑缺血再灌注损伤大鼠神经元保护作用的研究[J].临床神经病学杂志,2007,20(2):125—127.
- [13] 魏轶,范建中,吴红瑛,等.脉冲磁场对脑缺血大鼠的作用及其IGF-1表达的变化[J].中国康复医学杂志,2008,23(10):878—883.
- [14] 夏绪刚,黄兆民,周红霞.旋磁场并高压氧对脑卒中患者自由基代谢的影响[J].中华理疗杂志,1995,18(3):140—142.
- [15] 黄乃艳,张效莲,李小瑛,等.脉冲磁场抑制缺血再灌注大鼠神经细胞凋亡与Ca²⁺分布的关系[J].中国临床康复,2004,8(7):1268—1270.
- [16] 江城,廖维靖,杨万同,等.丰富康复训练对脑缺血大鼠行为功能表现的影响[J].中国康复医学杂志,2006,21(3):210—214.
- [17] 蒙兰青,廖维靖,杨万同,等.运动训练对大鼠脑缺血再灌注后功能恢复及VEGF表达的影响[J].中国康复医学杂志,2006,21(3):197—199.
- [18] Wei OY, Huang YL, Da CD, et al. Alteration of basic fibroblast growth factor expression in rat during cerebral ischemia[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2000, 21(4):296—300.
- [19] Middeldorp J, Hol EM. GFAP in health and disease[J]. *Prog Neurobiol*, 2011, 93(3):421-443.
- [20] Buffo A, Rite I, Tripathi P, et al. Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(9):3581—3586.
- [21] Sidoryk-Wegrzynowicz M, Wegrzynowicz M, Lee E, et al. Role of astrocytes in brain function and disease[J]. *Toxicol Pathol*, 2011, 39(1):115—123.
- [22] Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology[J]. *Acta Neuropathol*, 2010, 119(1):7—35.
- [23] Zhao Y, Rempe DA. Targeting astrocyte for stroke therapy[J]. *Neurotherapeutics*, 2010, 7(4):439—451.
- [24] Carmignoto G, Gómez-Gonzalo M. The contribution of astrocyte signalling to neurovascular coupling[J]. *Brain Res Rev*, 2010, 63(1):138—148.