

D-半乳糖和三氯化铝诱导小鼠产生类阿尔茨海默病变

罗焕敏*, 肖 飞

(暨南大学药学院神经药理学研究室, 广东 广州 510632)

摘要: 目的 探讨 D-半乳糖和三氯化铝(AlCl_3)联合使用制备阿尔茨海默病动物模型的可能性。方法 昆明种小鼠,腹腔注射 D-半乳糖($60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)和灌胃 AlCl_3 ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)每天 1 次,连续 90 d。给药结束后,通过 Morris 水迷宫、生化指标测定、RT-PCR 及常规 HE 染色和 $\text{A}\beta_{1-40}$ 免疫组化染色,观察 D-半乳糖和 AlCl_3 对小鼠学习记忆、胆碱能系统及脑内 β 淀粉样前体蛋白(APP)、早老素 1(PS1)、 β 位点 APP 内切酶(BACE)基因表达的影响,并观察海马、皮质的形态学改变。结果 D-半乳糖和 AlCl_3 共同作用导致小鼠学习记忆力减退;脑内 ACh 含量下降,AChE 活性升高;APP, PS1 和 BACE 基因表达增强;海马和皮质老年斑形成。结论 D-半乳糖和 AlCl_3 联合使用可使小鼠产生类阿尔茨海默病变,该方法可用于制备阿尔茨海默病动物模型。

关键词: D-半乳糖; 三氯化铝; 阿尔茨海默病; 学习; 记忆; 模型

中图分类号: R965.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2004)01-0022-05

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种以进行性认知功能障碍和记忆损害为特征的脑退行性疾病。老年斑(senile plaque)、神经原纤维缠结(neurofibrillary tangle)和基底前脑胆碱能神经元丢失为 AD 的主要病理特征。研究表明 AD 患者脑组织中铝含量增高,用原子吸收光谱仪测得铝在健康人脑内为(1.8 ± 0.8) $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (脑组织干重),AD 患者脑内铝的含量是(3.6 ± 2.9) $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。而一般 $> 4 \text{ mg} \cdot$

g^{-1} 即可引起神经细胞变性^[1]。D-半乳糖(D-galactose)可造成小鼠亚急性衰老早有报道^[2]。本研究拟将两者结合起来同时施予小鼠,探讨铝和 D-半乳糖对脑的综合毒性作用,以期制备更加贴近人类 AD 的动物模型提供依据。

1 材料与方法

1.1 动物

雌性昆明种小鼠,体重 20~22 g,由广东省医学实验动物中心提供,合格证号:2001A045。标准鼠饲料常规喂养。

1.2 仪器设备和试剂

冷冻高速离心机和 DU 640 型核酸蛋白分析仪为 Beckman 公司生产;DYZ32C 型水平电泳槽为北京六一公司生产;UNO II 型 PCR 仪为 Biometra 公司产品;Multi Genius 型凝胶成像分析系统为 Syngene 公司产品。乙酰胆碱酯酶(AChE)测定试剂盒由南京建成生物工程研究所生产;D-半乳糖(生化试剂)为 AMSCO 公司产品; AlCl_3 (分析纯)为广州化学试剂厂产品;兔抗小鼠 β -淀粉样蛋白 1-40(amyloid β -protein 1-40, $\text{A}\beta_{1-40}$)抗体和 SABC 免疫组化染色试剂盒均由武汉博士德公司提供;焦碳酸二乙酯(DEPC)为上海生物工程有限公司产品;TRIZOL 由 Life 公司生产;一步法逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒和 DNA Marker(DL2000)均为 Takara 公司产品。

1.3 实验方法

小鼠适应性饲养 1 周后,随机分为空白对照组和给药组,每组 20 只。给药组 ip D-半乳糖 $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (生理盐水配制)和 ig AlCl_3 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (双蒸水配制),连续 90 d;空白对照组 ip 等量的生理盐水和 ig 等量的双蒸水。

给药 90 d 后,采用 Morris 水迷宫法测试学习记忆能力^[3]。连续测试 5 d,每天上、下午各测 1 个单元,共 10 个单元。在前 9 个单元,每只小鼠每单元测试 4 次,记录各次潜伏期。在第 10 单元,撤除平

收稿日期: 2003-05-20 接受日期: 2003-08-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30271502)

作者简介: 罗焕敏(1960-),男,江西赣州人,副教授,医学博士,主要从事神经药理学研究。

* 联系作者 E-mail: tlhm@jnu.edu.cn Tel: (020) 85220263 Fax: (020)85220160

台,记录小鼠在原平台所在象限停留时间。行为实验结束后,小鼠取全脑,制成 10% 脑匀浆,分别用于下列检测。

羟胺比色法测定全脑乙酰胆碱(ACh)含量^[4];DTNB 法测定 AChE 活性,操作步骤按试剂盒说明书进行。蛋白测定采用考马斯亮蓝法。

根据 GenBank 的序列,用 Primer 5.0 软件分别设计 β 淀粉样前体蛋白(amyloid β -protein precursor, APP)、早老素 1(presenilin 1, PS1)、 β 位点 APP 内切酶(β -site APP-cleaving enzyme, BACE)基因的引物,内参基因 β -肌动蛋白(β -actin)引物购自鼎国生物公司,其他引物均由上海生物工程公司合成。常规方法提取全脑 RNA;应用半定量 RT-PCR 技术检测 APP, PS1 和 BACE mRNA 的含量。

另做全脑切片,HE 染色和 A β_{1-40} 免疫组化染色,光学显微镜下观察。

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS 10.0 统计软件处理,用 t 检验进行两组间比较。

2 结果

2.1 学习记忆能力测试

由表 1 可看出,两组小鼠逃避潜伏期随测试日期推移而逐渐缩短,至 d 5 已趋稳定,说明已接近潜伏期极限,再增加测试天数已不能明显提高成绩。给药组小鼠在 d 4 和 d 5 逃避潜伏期均明显长于空白对照组。

当 d 5 下午撤除平台后,给药组在平台所在象限停留时间为 (18 ± 5) s, 占总测试时间的 $(30 \pm 9)\%$,明显短于空白对照组的 (30 ± 4) s 和 $(50 \pm 7)\%$

($P < 0.01$)。

2.2 全脑组织乙酰胆碱含量及乙酰胆碱酯酶活性测定

由表 2 可看出,两组间蛋白质含量没有显著性差异。与空白对照组比较,给药组 ACh 含量明显下降,AChE 活性明显升高。

Tab 2. Effects of *D*-galactose and AlCl_3 on acetylcholine(ACh)content and acetylcholinesterase(AChE)activities in whole brain

Group	Protein content /g·L ⁻¹	ACh/ mg·g ⁻¹	AChE/mmol· min ⁻¹ ·g ⁻¹
Control	2.99 ± 0.30	384 ± 27	1.17 ± 0.25
<i>D</i> -Galactose + AlCl_3	2.81 ± 0.25	140 ± 31 ^{**}	3.15 ± 0.34 ^{**}

See legend of Tab 1 for mice treatments. $\bar{x} \pm s$, $n = 10$. ^{**} $P < 0.01$, compared with control.

2.3 脑内 APP, PS1 和 BACE 基因表达的变化

从表 3 和图 1 可看出,给药组 APP, PS1 和 BACE mRNA 含量与内参照基因 β -肌动蛋白 mRNA 含量的百分比值均较空白对照组明显升高。

Tab 3. Effects of *D*-galactose and AlCl_3 on expression of amyloid β -protein precursor (APP), presenilin-1 (PS1) and β -site APP-cleaving enzyme(BACE) genes in whole brain

Group	APP: β -actin/%	PS1: β -actin/%	BACE: β -actin / %
Control	41 ± 6	28 ± 3	103 ± 14
<i>D</i> -Galactose + AlCl_3	94 ± 8 ^{**}	63 ± 6 ^{**}	169 ± 13 ^{**}

See legend of Tab 1 for mice treatments. $\bar{x} \pm s$, $n = 6$. ^{**} $P < 0.01$, compared with control.

Tab 1. Effects of *D*-galactose and aluminum trichloride(AlCl_3) on escape latency of mice tested by Morris water maze

Group	Escape latency/s				
	d 1	d 2	d 3	d 4	d 5
Control	31 ± 10	22 ± 9	20 ± 9	10 ± 5	9 ± 3
<i>D</i> -Galactose + AlCl_3	38 ± 12	29 ± 13	26 ± 12	21 ± 12 ^{**}	21 ± 10 ^{**}

Mice were given *D*-galactose 60 mg·kg⁻¹·d⁻¹, ip, and AlCl_3 5 mg·kg⁻¹·d⁻¹, ig, once daily for 90 d. Control group was given equivalent amount of normal saline, ip, and double distilled water, ig, at the same time. Then Morris water maze was used to test learning and memory of mice for 5 d. Two blocks (four tests in a block) were tested from d 1 to d 4, one in the morning and the other in the afternoon. The escape latencies were recorded as the mean of all 8 tests in one day. At d 5, just one block in the morning was observed. $\bar{x} \pm s$, $n = 160$ (8 tests each mouse, 20 mice) at d 1 to d 4, $n = 80$ at d 5. ^{**} $P < 0.01$, compared with control.

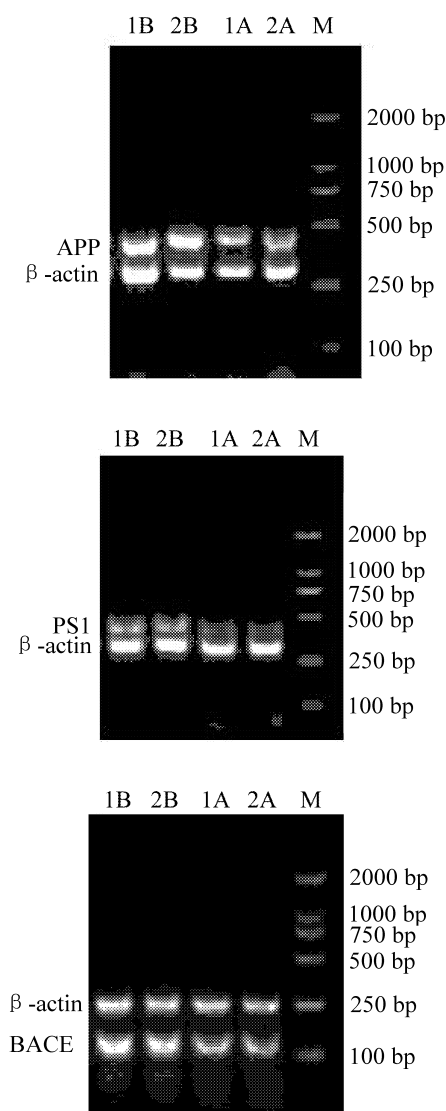


Fig 1. Semi-quantitative results of amyloid β -protein precursor, presenilin-1 and β -site APP-cleaving enzyme mRNA determined by RT-PCR. See legend of Tab 1 for mice treatments. 1 A and 2 A; control; 1 B and 2 B: *D*-gal + AlCl_3 group; M: marker. APP: 467 bp; PS1: 436 bp; BACE: 154 bp; β -actin: 300 bp.

2.4 形态学变化

给药约 60 d 时,已有部分小鼠出现弓背、毛发稀疏、行动迟缓等衰老征象。给药 90 d,取小鼠全脑,切片,常规 HE 染色显示,各组没有明显病理改变和差异。 $\text{A}\beta_{1-40}$ 免疫组化染色显示,空白对照组反应阴性,说明 $\text{A}\beta_{1-40}$ 在正常状态下几乎不表达或表达量极微。而给药组在海马及皮质均可见较多 β 淀粉样蛋白($\text{A}\beta$)沉积形成的老年斑(图2),其周围

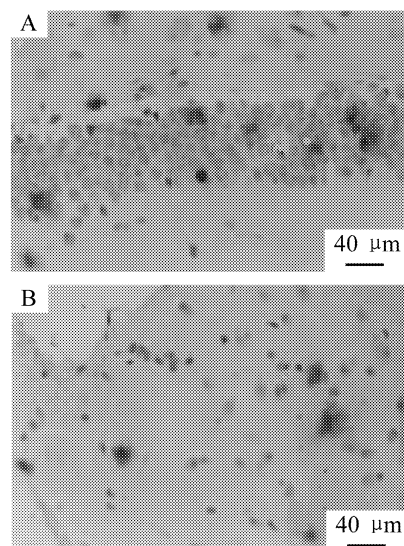


Fig 2. Senile plaques in hippocampus (A) and cortex (B). See legend of Tab 1 for mice treatments. $\text{A}\beta_{1-40}$ immunohistochemical staining.

可见肿胀变形的神经元。另见少量 $\text{A}\beta$ 样免疫反应阳性神经元,阳性产物主要位于神经元核周及突起。

3 讨论

铝元素诱导动物脑内发生病理变化已有报道,但剂量和时间不一致,剂量为 $10.8 \sim 500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,时间从 6 周到 3 个月不等^[5,6]。本研究通过预试发现小鼠给予 AlCl_3 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,3 个月便有动物死亡。因此在正式实验时采用“降低剂量,延长时间”的方案,所用剂量为 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,给药 90 d。动物长期注射 *D*-半乳糖后,由于后者代谢产物半乳糖醇不能被进一步代谢而堆积在细胞内,影响渗透压,导致细胞肿胀,代谢紊乱,体内活性氧增多,细胞膜脂质受损,以致机体多器官、多系统功能衰退,这些现象均与老龄变化非常相似。*D*-半乳糖还引起脑神经元的一系列退行性改变,包括神经元数目减少、脑组织中超氧化物歧化酶活性下降、丙二醛和脂褐素水平升高^[7]。*D*-半乳糖造成动物衰老的剂量为 $60 \sim 180 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,时间从 6 周到 3 个月不等。

用 Morris 水迷宫进行学习记忆力测试,表明 *D*-半乳糖和 AlCl_3 确能引起小鼠学习记忆力下降。 ACh 是中枢胆碱能系统重要的神经递质,研究证实,其含量的高低与学习记忆能力呈一定的正相关。多数研究表明 AD 患者脑内胆碱乙酰转移酶(ChAT)活性降低, AChE 活性升高, ACh 含量不足,学习记忆能

力下降。但有关 AD 动物模型脑内 AChE 活性变化的报道却不尽一致,有的降低,有的升高,可能是由于不同作者采用的 AD 动物模型有很大差异及采样时间不一致所造成。本研究结果显示,给药组小鼠脑内 ACh 含量明显下降,AChE 含量增高。ACh 含量的下降一方面是由于 AChE 活性的异常增高所引起,另一方面也可能是神经元受损,物质代谢功能降低,ChAT 活性降低,生成 ACh 减少所致。*D*-半乳糖和 AlCl_3 引起动物脑内胆碱能系统功能减退,模拟了 AD 的这一特征,这或许也是给药组小鼠学习记忆力下降的重要原因之一。

$\text{A}\beta$ 参与 AD 发病,相关基因表达与 $\text{A}\beta$ 生成及老年斑形成有着密切的关系。这些基因的突变或过度表达都会导致 AD 的发生。本研究表明,给药组脑内 APP, PS1 和 BACE mRNA 含量升高,说明 *D*-半乳糖和 AlCl_3 诱导其基因过度表达。APP 是 $\text{A}\beta$ 产生的前体蛋白,其基因表达增强,将使 $\text{A}\beta$ 产生增加。生成的 APP 经过两条途径代谢,根据第一步是被 α 或 β 分泌酶酶切,可分为 α 分泌酶途径和 β 分泌酶途径。 α 分泌酶途径不产生 $\text{A}\beta$ 。BACE 表达增加使 β 分泌酶含量增加,促使 APP 更多地通过 β 分泌酶途径代谢,形成 $\text{A}\beta$ 。 $\text{A}\beta$ 是否最终产生还取决于第二步 γ 分泌酶的作用。目前有学者认为 PS1 本身就是 γ 分泌酶,即便不是 γ 分泌酶,至少也参与了 γ 分泌酶的水解过程。因此,PS1 基因的过度表达也会使 $\text{A}\beta$ 产生增多。本研究揭示 *D*-半乳糖和 AlCl_3 可在基因水平调控 APP, PS1 和 BACE 基因,使它们的表达量增加。这也许正是海马和皮质出现较多老年斑的原因。此外,在老年斑周围可见到一些肿胀变形的神经元及少量 $\text{A}\beta$ 样免疫反应阳性神经元,阳性产物主要位于神经元核周及突起,这也表明神经元内有大量 $\text{A}\beta$ 表达。

目前,AD 实验动物模型的滞后在很大程度上制约了 AD 发病机制和治疗药物的研究。已有的 AD 动物模型包括非转基因模型和转基因模型均只是模拟了 AD 病理的某一方面,相比 AD 错综复杂的病理过程来说均有较大差距。更重要的是缺乏包括老年斑在内的 AD 特征性变化。转基因小鼠在一定程度上模拟了老年斑,但却缺乏整体衰老的过程,也没有复制出 AD 的其他改变。再者,大多数 AD 患者是散发性的,并没有出现这些基因的突变,只有不到

10% 的 AD 患者呈家族性,而其中的多数也未能发现基因突变,因此转基因动物模型不能完全代表人类 AD。此外,转基因动物制备需要复杂的技术(有时成功率不高)和高昂的费用,难以满足大量需求,推广应用受到很大限制。

本研究为制备一种更为贴近人类 AD 的动物模型提供了有益的资料,它既可复制整体衰老过程、学习记忆力减退、脑内 ACh 含量降低、AChE 活性升高,也可复制脑组织 APP, PS1, BACE 基因表达增强和脑组织 $\text{A}\beta$ 沉积、老年斑形成等特征。本方法制备 AD 模型的缺点是造模所需时间较长。

致谢 病理切片由暨南大学附属第一医院病理科蒋光愉副教授制作。

4 参考文献:

- [1] Henderson AS. Epidemiology of dementia disorders[J]. *Adv Neurol*, 1990, **51**:15-25.
- [2] Gong GQ, Xu FB. Study of aging model on mouse[J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 1991, **22**(2): 101-103.
- [3] Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat[J]. *J Neurosci Methods*, 1984, **11**(1):47-60.
- [4] Yang HX, Wang WX, Ke JS, Liang X, Dong Y, Zhou SY. Determination of blood acetylcholine by base hydroxy amine colorimetric method[J]. *J Clin Lab Sci*(临床检验杂志), 1995, **13**(3):125-126.
- [5] Guo GW, Wu YL, Yang XH, Ge LN, Liang YX. Effects of aluminum chloride on amyloid β -protein precursor and glial fibrillary acidic protein expression in rat cortex[J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*(中国药理学与毒理学杂志), 1999, **13**(3):227-230.
- [6] Qian YH, Yang J, Ren HM, Hu HT, Zhang ZJ. Amyloid protein accumulation in dorsal hippocampal formation of a rat model of dementia: immunocytochemical study[J]. *J Xi'an Med Univ*(西安医科大学学报), 1997, **18**(3): 304-307.
- [7] Shang YZ, Gong MY, Zhou XX, Li ST, Wang BY. Improving effects of SSF on memory deficits and pathological changes of neural and immunological systems in senescent mice[J]. *Acta Pharmacol Sin*(中国药理学报), 2001, **22**(12):1078-1083.

Alzheimer-like pathological changes of mice induced by *D*-galactose and aluminum trichloride

LUO Huan-Min^{*}, XIAO Fei

(Neuropharmacological Research Laboratory, College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: **AIM** To explore the possibility that the combined use of *D*-galactose and AlCl₃ may make an animal model for study on Alzheimer's disease. **METHODS** Kunming strain mice were given *D*-galactose 60 mg·kg⁻¹·d⁻¹, ip, and AlCl₃ 5 mg·kg⁻¹·d⁻¹, ig, once daily for 90 d. Morris water maze was used to test learning and memory, biochemical methods to assay acetylcholine (ACh) and acetylcholinesterase (AChE) contents in whole brain, RT-PCR to determine the expression of amyloid β -protein precursor (APP), presenilin-1 (PS1) and β -site APP-cleaving enzyme (BACE) genes, and conventional HE and A β ₁₋₄₀ immunohistochemical staining to observe morphological changes in hippocampus and cortex. **RESULTS** The combined use of *D*-galactose and AlCl₃ induced some alterations in mice,

such as learning and memory impairment, ACh content decline, AChE activity reinforcement, and the expression increase in APP, PS1 and BACE genes and formation of senile plaque in hippocampus and cortex, which emerged Alzheimer-like pathological changes. **CONCLUSION** The combined use of *D*-galactose and AlCl₃ may well make an animal model whose pathological changes are very similar to those of Alzheimer's disease.

Key words: *D*-galactose; aluminum trichloride; Alzheimer's disease; learning; memory; models

Foundation item: The project supported by National Natural Science of China (30271502)

^{*} Corresponding author.

(本文编辑 董立春)