

[文章编号] 1000-2200(2008)03-0276-03

· 基础医学 ·

维生素 E 对 Alzheimer 病模型大鼠 海马过磷酸化 tau 蛋白含量的影响

苗青¹, 闫福岭², 张干¹, 王菲¹, 吴松¹, 董利¹, 叶斌¹

[摘要]目的:通过氧化应激途径,探讨维生素 E(Vit E)对阿尔茨海默病(AD)模型大鼠脑内磷酸化 tau 蛋白的影响。方法:36 只大鼠随机分为假手术组、AD 模型组、AD 模型治疗组,每组 12 只。以淀粉样 β 蛋白左侧杏仁核注射制备 AD 大鼠模型,假手术组仅注射等量的溶剂。模型治疗组以胃管注入 Vit E 10 mg/d。Y 迷宫检测大鼠学习记忆功能;免疫组化方法测定大鼠海马 P_{ser-262}-tau 的表达。结果:AD 模型治疗组的记忆功能虽不如假手术组($P < 0.01$),但比 AD 模型组则有改善($P < 0.01$)。Vit E 减少 AD 模型大鼠海马磷酸化 tau 蛋白的含量($P < 0.01$)。结论:Vit E 能改善 AD 大鼠的学习记忆功能,且使 AD 大鼠的海马 tau 蛋白表达下降,提示 Vit E 对 AD 大鼠的 tau 蛋白过度磷酸化具有保护作用。

[关键词] 阿尔茨海默病;氧化应激;维生素 E;淀粉样 β 蛋白;tau 蛋白;磷酸化;大鼠

[中国图书资料分类法分类号] R 749.16 **[文献标识码]** A

Influence of vitamin E on the hyperphosphorylation tau protein contents in hippocampus of Alzheimer disease rats

MIAO Qing¹, YAN Fu-ling², ZHANG Gan¹, WANG Fei¹, WU Song¹, DONG Li¹, YE Bin¹

(1. Department of Neurology, Bengbu Third People's Hospital, Bengbu Anhui 233000;

2. Department of Neurology, Affiliated Zhongda Hospital Medical College of Southeast University, Nanjing Jiangsu 210092, China)

[Abstract] **Objective:** To study the influence of Vitamin E on the hyperphosphorylation tau protein in the brains of Alzheimer disease (AD) rats by means of oxidative stress. **Methods:** Thirty-six AD rats were randomly divided into three groups: sham operation group, model group and model treatment group (each consisting of 12 rats). The models were established by injecting amyloid-β protein into the left amygdale of the rats. The sham operation group received injection of solvent only, and the model treatment group were additionally fed Vit E 10 mg once a day by gastrogavage. The ability of learning and memory of the rats were detected by Y-maze and the expression of P_{ser-262}-tau in hippocampus tissues was estimated by immunohistochemistry methods. **Results:** The ability of learning and memory of the rats in the treatment group was lower than that in sham operation group ($P < 0.01$), but higher than that in model group ($P < 0.01$). Vitamin E could depress the expression of P_{ser-262}-tau in the hippocampus tissues of AD rats. **Conclusions:** Vitamin E depresses the expression of P_{ser-262}-tau in the hippocampus tissues of AD rats and improves the learning and memory ability of the rats, suggesting that vitamin E can protect the tau protein from hyperphosphorylation in rats.

[Key words] Alzheimer disease; oxidative stress; vitamin E; amyloid-β protein; tau protein; phosphorylation; rats

阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 是发生在老年的退行性神经变性疾病,是老年人的多发病和常见病。患者脑内的主要病理特征为神经原纤维缠结 (NFTs) 和老年斑 (Ps)。AD 病因不明,可能与 tau 蛋白异常修饰、淀粉样 β 蛋白毒性、自由基损伤、炎症反应等有关^[1]。Tau 蛋白是一种微管相关蛋白,主要存在于神经元,具有促进微管组装并维持其稳定性的功能。在 AD 患者脑中 tau 蛋白被异常修饰,如过度磷酸化。过度磷酸化的 tau 丧失了 tau 蛋白的正常生理功能,缠结形成 NFT。

大量的报道认为,氧化应激参与了 AD 的发病。

有研究表明,氧化应激促进了神经细胞骨架蛋白发生过度磷酸化^[2]。维生素 (Vit E) 是一种强有力的脂性自由基清除剂。在体外脑片实验研究中^[3],已证实 Vit E 对 tau 蛋白的过度磷酸化有保护作用,其在体内是否也能抑制 tau 蛋白的过度磷酸化,尚有待进一步验证。本实验就是为了证实这一点,将淀粉样 β 蛋白注入大鼠左侧杏仁核内造成 AD 大鼠模型,观察 AD 大鼠脑内 tau 蛋白磷酸化的形成及 Vit E 对这一过程的干预作用。

1 材料与方 法

1.1 实验动物和分组 雄性清洁级 SD 大鼠 36 只 (体重 250 ~ 300 g),东南大学医学院动物科提供。大鼠随机分为假手术组、AD 模型组、AD 模型治疗组,每组 12 只。

1.2 动物模型的建立 SD 大鼠麻醉后固定于立体

[收稿日期] 2008-01-11

[作者单位] 1. 安徽省蚌埠市第三人民医院 神经内科,233000;2. 东南大学医学院附属中大医院 神经内科,江苏 南京 210092

[作者简介] 苗青(1973-),女,硕士,主治医师。

定向仪上^[4],头顶部正中切口,暴露前囟,参照大鼠脑立体定向图谱(AP 3.2 mm,ML 4.3 mm,DV 8.5 mm),对左侧杏仁核立体定位后,3 组大鼠分别用微量注射器垂直进针,AD 模型组和 AD 模型治疗组缓慢匀速注入 0.1% 三氟乙酸(TFA) + 淀粉样 β 蛋白₂₅₋₃₅ 5 nmol/5 μ l,注射 5 min,留针 3 min 缓慢拔出,假手术组注射等量的 0.1% TFA 5 μ l。

1.3 给药 术后 14 天,AD 模型治疗组开始胃管注入溶有 Vit E 10 mg 的植物油约 2 ml,每天 1 次^[5],AD 模型组及假手术组分别给予等量不含 Vit E 的植物油,继续饲养 14 天。

1.4 学习记忆测试 用三等分 Y 型迷宫箱进行测试^[6],大鼠学习记忆成绩以其测试达到连续 10 次有 9 次(9/10)正确反应时所需的电击次数表示。预选:将大鼠放入 Y 型迷宫箱中,然后给予电击(电压 36 V,电流 0.5~0.7 mA),至其对三臂均探索进入止,选择对电击反应较敏感者 36 只供实验用。学习测验:将大鼠放入迷宫箱中,适应环境 3~5 min 后,驱至一臂起步区,予以电击使其逃避至安全区。休息 1 min 后再予以第 2 次测试,依次重复,测试达连续 9/10 次正确反应为止,并统计电击次数。规定大鼠逃避至安全区为正确反应,否则为错误反应。记忆再现测试:学习测验 48 h 后,再次以同样方法测试。各组分别于术前、术后 2 周、术后 4 周同一时间点进行测试。

1.5 免疫细胞化学方法 术后第 28 天,用戊巴比妥钠按体重 30 mg/100 g 经腹腔麻醉、处死大鼠,暴露心脏,经左心室升主动脉快速灌注生理盐水 100 ml 后,用 40 g/L 多聚甲醛溶液(pH7.4)约 500 ml 灌注,持续 1.5~2 h 后取脑,并于 30% 蔗糖溶液中浸置 24~48 h(4 $^{\circ}$ C)。从视交叉向后切成约 2 mm 厚切片,放入冷冻切片机中连续切片(厚度 8 μ m),每 5 张取 1 张。免疫组化染色步骤依照 SP 试剂盒说明书进行,DAB 呈色。其中免疫组化阳性细胞的测定,每只大鼠取 10 张切片,光镜下每张切片计数 4 个视野(400 \times)的阳性细胞,总和除以 4 作为该大鼠的阳性细胞的计数。

1.6 统计学方法 采用方差分析和 q 检验。

2 结果

2.1 学习记忆测定 术前 3 组学习记忆能力大致相同($P > 0.05$)。术后 14 天 AD 模型鼠学习记忆能力下降,与假手术组差异有统计学意义($P < 0.01$);术后 28 天,AD 模型鼠学习记忆能力进一步下降,与假手术组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),而 AD 模型治疗组学习记忆功能虽较假手术组差($P <$

0.01),但术后 28 天比 AD 模型鼠则有明显改善($P < 0.05$)(见表 1)。

表 1 各组大鼠电击次数比较($\bar{x} \pm s$)

分组	n	实验前	术后 14 天	术后 28 天
假手术组	12	13.01 \pm 3.56	12.42 \pm 3.85	14.97 \pm 3.22
AD 模型组	12	13.97 \pm 4.01	35.01 \pm 7.52**	48.37 \pm 6.73**
AD 模型治疗组	12	12.01 \pm 3.98	32.33 \pm 4.01**	29.02 \pm 4.55 $\Delta\Delta$
F	—	0.78	62.70	132.58
P	—	>0.05	<0.01	<0.01
MS _{组内}	—	14.865	29.151	25.455

q 检验:与假手术组比较 * $P < 0.01$;与 AD 模型组比较 $\Delta\Delta P < 0.01$

2.2 Vit E 对 AD 模型鼠 P_{ser-262}-tau 的影响 大鼠海马 P_{ser-262}-tau 阳性细胞计数:免疫组化结果显示,假手术组海马 CA1 区只检测到少量 P_{ser-262}-tau 阳性表达(14.9 \pm 5.2)(见图 1)。AD 模型组在海马 CA1 区可观察到大量 P_{ser-262}-tau 阳性细胞(55.8 \pm 6.4),表现为胞质呈棕黄色,着色明显,阳性细胞数较假手术组明显增高($P < 0.01$)(见图 2)。经 Vit E 治疗后 P_{ser-262}-tau 阳性细胞数(32.6 \pm 7.2)明显减少($P < 0.01$)(见图 3)($F = 105.32, P < 0.01, MS_{组内} = 39.947$)。3 组大鼠海马 CA1 区 P_{ser-262}-tau 阳性神经元数目(P_{ser-262}-tau \times 40)(见图 1~3)。

3 讨论

近年来,国外根据 AD 病因学研究,提出 AD 患者的有害网络假说^[7]。假说认为淀粉样蛋白前体(APP)代谢异常、氧化损伤、能量代谢障碍及钙平衡失调是 AD 的四大致病因素,相互交叉影响,形成一个有害网络,导致 AD 的发病。淀粉样 β 蛋白是 AD 脑内老年斑的主要结构物质,其在脑内的沉积诱导自由基的产生,自由基增多又极大的促进了淀粉样 β 蛋白的沉积,造成神经细胞受损和功能紊乱的恶性循环。而且纤维状的淀粉样 β 蛋白本身具有肽自由基性质,可引起细胞膜脂质过氧化物生成增多^[8],膜通透性增加,细胞外钙离子进入细胞内,激活钙依赖性蛋白酶、脂酶、激酶,损伤细胞器和细胞骨架,最后导致细胞死亡。本实验结果显示,将淀粉样 β 蛋白注入大鼠左侧杏仁核内后,大鼠学习记忆能力较假手术组显著下降($P < 0.01$),说明淀粉样 β 蛋白的沉积在造成大鼠神经元不可逆的损伤、导致大鼠行为能力的改变中起了重要作用。

Tau 蛋白是一类亲水性微管相联蛋白^[9],是正常神经元纤维中双股螺旋纤维丝(PHF)的成分,可稳定微管结构,促进轴突对营养物质和神经递质的运输。正常人体中的 tau 蛋白是一种磷酸蛋白,NFT

中 PHF 上的 tau 蛋白则为高度磷酸化的蛋白,tau 蛋白磷酸化的程度取决于蛋白激酶和蛋白磷酸酶的平衡。AD 对 tau 蛋白的过度磷酸化是由于蛋白激酶活性过强,使高度磷酸化的 tau 蛋白生成过多,或蛋白磷酸酶活性偏低,使 tau 蛋白脱磷酸不足所致。大量自由基的生成使磷酸酶的巯基被氧化^[10],磷酸酶活性降低,同时使钙稳态失衡,钙离子大量内流,使钙依赖性钙调蛋白激酶过度活化,蛋白激酶与蛋白磷酸酶比例失衡,促进 tau 蛋白的异常磷酸化及 NFT 的形成。此外,氧化应激还导致了糖基化终产物(AGE)生成^[7],AGE 可对 tau 蛋白进行糖基化修饰,修饰后的 tau 蛋白可使 NFT 结构稳定,不易被降解。本实验中,AD 造模后的大鼠海马 CA1 区磷酸化 tau 蛋白的含量明显增高,说明 tau 蛋白的磷酸化参与了 AD 的病理过程,也是 AD 脑内病理改变的最终结果。

Vit E 对自由基有强大的清除能力,可阻止神经细胞被自由基破坏。本实验观察到,Vit E 治疗组的 AD 大鼠脑中磷酸化 tau 蛋白的水平显著低于 AD 模型组($P < 0.01$),说明口服 Vit E 可显著降低 AD 大鼠脑中磷酸化 tau 蛋白的水平,改善 AD 大鼠的学习记忆能力,并通过清除自由基的途径,抑制氧化应激反应,可降低 tau 蛋白磷酸化程度,而且进一步证实了自由基的损伤参与了神经元 tau 蛋白过度磷酸化的病理过程。

(本文图 1~3 见插页)

[参 考 文 献]

[1] 魏 群,于大禹,吴和珍.阿尔茨海默病与 tau 蛋白的磷酸化

及去磷酸化[J].中国航天医药杂志,2004,6(2):1-5.
 [2] Takashima A, Honda T, Yasutake K, et al. Activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3beta by amyloid beta peptide (25-35) enhances phosphorylation of tau in hippocampal neurons[J]. *Neurosci Res*, 1998, 31(4):317-323.
 [3] Behl C. Vitamin E protects neurons against oxidative cell death in vitro more effectively than 17-β estradiol and induces the activity of the transcription factor NF-κB[J]. *J Neural Transm*, 2000, 107(4):393-407.
 [4] Sigurdsson EM, Lorens SA, Hejna MJ, et al. Local and distant histopathological effects of unilateral amyloid-β₂₅₋₃₅ injections into the amygdala of young F344 rats[J]. *Neurobiol Aging*, 1996, 17(6):893-901.
 [5] 钱亦华,胡海涛,杨 杰,等.川续断对 Alzheimer 病模型大鼠顶叶皮质内淀粉样蛋白沉积的作用[J]. *中国老年学杂志*, 2002, 22(1):44-46.
 [6] Barnes CA. Spatial learning and memory processes: the search for their neurobiological mechanisms in the rat[J]. *Trends Neurosci*, 1988, 11(4):163-169.
 [7] 孙 泉.氧化损伤与阿尔茨海默病致病网络[J]. *国外医学·老年医学分册*, 2002, 23(5):226-230.
 [8] Subramaniam R, Koppal T, Green M, et al. The free radical antioxidant vitamin E protects cortical synaptosomal membranes from amyloid beta-peptide (25-35) toxicity but not from hydroxynonenal toxicity: relevance to the free radical hypothesis of Alzheimer's disease[J]. *Neurochem Res*, 1998, 23(11):1403-1410.
 [9] 吴 琪. Alzheimer 病神经原纤维缠结与 tau 蛋白研究[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2000, 26(1):63-64.
 [10] 杨细飞,田 青,李晓鹏,等.维生素 E 对 CA 诱导的 tau 蛋白过度磷酸化的保护[J]. *华中科技大学学报*, 2004, 32(8):110-113.

本刊可直接使用的常用缩略语

2008 年起,本刊将对以下大家比较熟悉的医学常用词汇,允许直接使用其缩略语,即第一次出现时,可不必标注中英文全称。

一氧化氮(NO)	一氧化氮合酶(NOS)	三磷酸苷酸(ATP)	二磷酸苷酸(ADP)
脱氧核糖核酸(DNA)	核糖核酸(RNA)	葡萄糖注射液(GS)	生理盐水(NS)
白细胞(WBC)	血小板(BPC)	血红蛋白(Hb)	G 免疫球蛋白(IgG)
A 免疫球蛋白(IgA)	M 免疫球蛋白(IgM)	C 反应蛋白(CRP)	苏木素-伊红(HE)
一氧化碳(CO)	二氧化碳(CO ₂)	过氧化氢(H ₂ O ₂)	丙型肝炎病毒(HCV)
变异系数(CV)	磁共振成像(MRI)	乙型肝炎病毒(HBV)	丙氨酸氨基转移酶(ALT)
重症监护病房(ICU)	动脉血氧分压(PaO ₂)	甲型肝炎病毒(HAV)	
动脉血二氧化碳分压(PaCO ₂)		乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)	
乙型肝炎病毒表面抗体(抗 HBs)		乙型肝炎病毒核心抗体(抗 HBc)	
乙型肝炎病毒 e 抗原(HBeAg)		乙型肝炎病毒 e 抗体(抗 HBe)	
逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)		酶联免疫吸附测定(ELISA)	

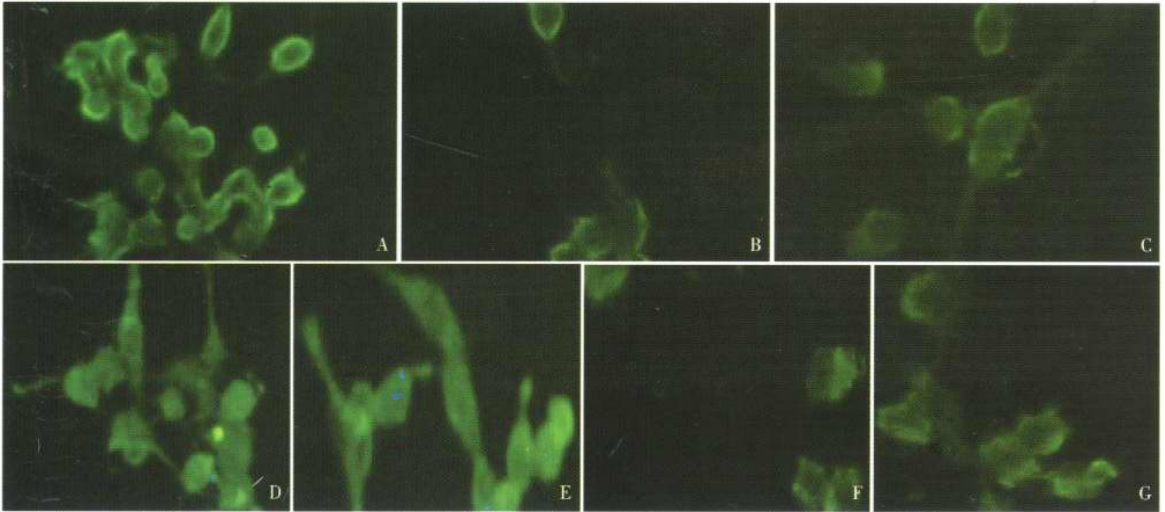


图5 PC12 细胞转染 pcDNA3-flag/Kir2.3 质粒后免疫荧光显示 Kir2.3 基因表达(A,B,C 分别为 PC12 细胞转染 pcDNA3-flag/Kir2.3 后 24 h、48 h、72 h;D,E,F 分别为 PC12 细胞转染空质粒 pcDNA3 后 24 h、48 h、72 h;G 为未做转染处理的 PC12 细胞)

米力农对兔早期急性肺损伤 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-10 的影响(正文见第 270 页)

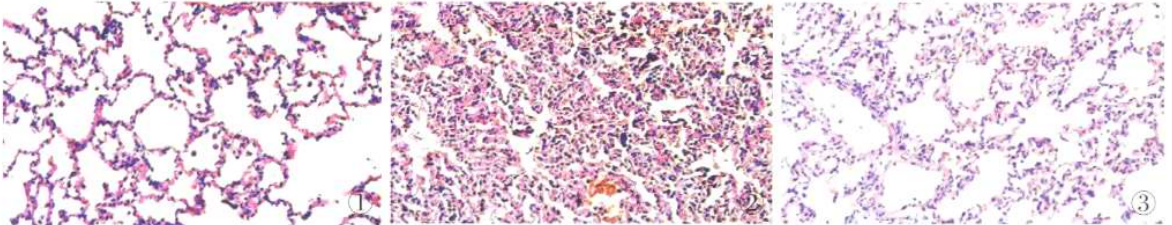


图1 A 组肺组织:肺泡结构清晰,无明显细胞浸润(HE $\times 100$) 图2 B 组肺组织:有大量红、白细胞浸润,肺泡扩张或萎陷,结构难以辨认 (HE $\times 100$) 图3 C 组肺组织:有少数红、白细胞浸润,肺泡无明显萎陷,结构尚清晰(HE $\times 100$)

维生素 E 对 Alzheimer 病模型大鼠海马过度磷酸化 tau 蛋白含量的影响(正文见第 276 页)

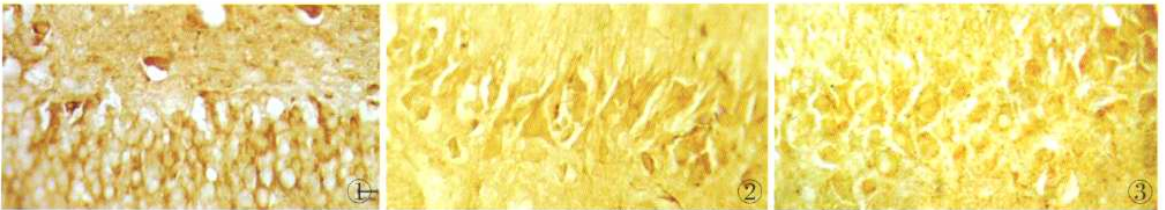


图1 假手术组,棕黄色阳性细胞排列稀疏 图2 AD 模型组,见大量阳性细胞,胞质呈棕黄色,着色明显 图3 AD 模型治疗组,阳性细胞明显减少

球血管外周细胞瘤 1 例(正文见插图)

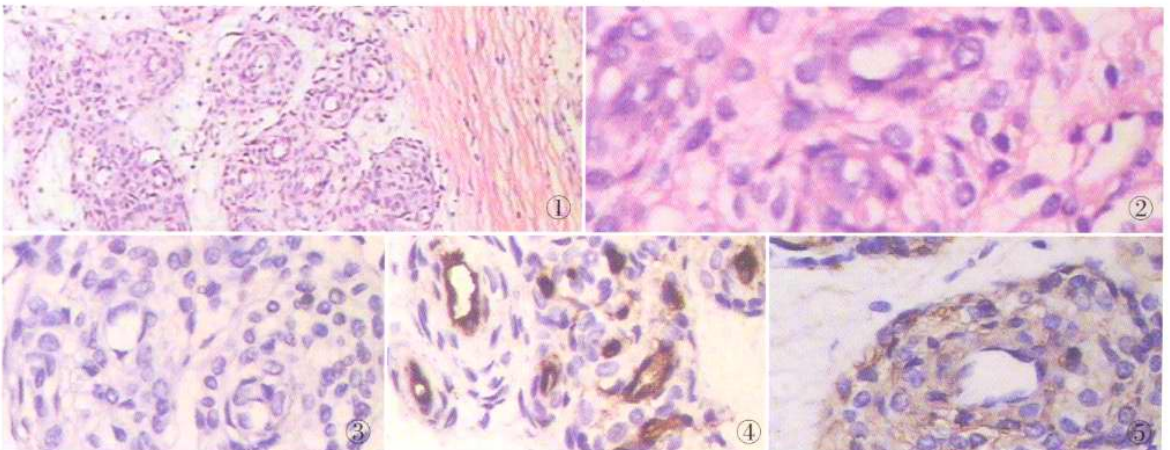


图1 瘤体内血管较多,瘤细胞呈同心圆状排列在血管周围(HE $\times 100$) 图2 瘤细胞立方形,胞质透明或嗜酸,核圆形居中(HE $\times 400$) 图3 瘤细胞 desmin(-)(免疫组化 SP 法) 图4 CD34(+)(免疫组化 SP 法) 图5 SMA(+)(免疫组化 SP 法)