

# 高胆固醇对 AD 大鼠海马神经元缺失和 Tau 蛋白异常磷酸化的影响

方传勤 李敬诚 许志强 李静 高长越 周华东

**【摘要】** 目的 研究高胆固醇饮食对阿尔茨海默病(AD)大鼠海马神经元缺失和 Tau(ser202)异常磷酸化的影响。方法 海马齿状回注射  $\beta$  淀粉样蛋白(A $\beta$ )建立 AD 大鼠模型,根据不同饮食,将动物分为高胆固醇 AD 组、高胆固醇磷酸盐缓冲液(PBS)组、标准饮食 AD 组和标准饮食 PBS 组;采用尼氏染色方法检测海马神经元缺失率,应用免疫组织化学方法检测海马及皮层 Tau(ser202)磷酸化水平。结果 高胆固醇饮食增加海马神经元缺失,高胆固醇饮食 AD 组海马神经元缺失率(30.9%±4.6%)明显大于标准饮食 AD 组(22.7%±1.9%)、高胆固醇饮食 PBS 组(7.0%±1.5%)和标准饮食 PBS 组(5.4%±1.1%),差异均有统计学意义( $P<0.05$ );高胆固醇 AD 组、标准饮食 AD 组、高胆固醇 PBS 组、标准饮食 PBS 组海马齿状回 (Pser202)Tau 阳性细胞数分别为 65.5±6.2、48.8±4.8、22.5±3.1 和 12.7±1.7,比较差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。结论 高胆固醇饮食促进 A $\beta$  诱导神经元缺失和 Tau 蛋白异常磷酸化。

**【关键词】** 高胆固醇; 阿尔茨海默病; Tau 蛋白磷酸化; 神经元缺失

**【中图分类号】** R742.4 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-8925(2009)04-0359-04

**Effect of high-cholesterol diet on neuronal loss and Tau (ser202) phosphorylation in a rat model of Alzheimer's disease**

FANG Chuan-qin, LI Jing-cheng, XU Zhi-qiang, LI Jing, GAO Chang-yue, ZHOU Hua-dong. Department of Neurology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China

Corresponding author: ZHOU Hua-dong, Tel: 023-68757851

**【Abstract】 Objective** To study the effect of high-cholesterol diet on neuronal loss and Tau (ser202) phosphorylation in a rat model of Alzheimer's disease (AD). **Methods** Twenty rats were randomized into high-cholesterol diet+AD group, standard diet+AD group, high-cholesterol diet+PBS group, and standard diet+PBS group. In the former two groups, amyloid- $\beta$  peptide (A $\beta_{1-40}$ ) was injected into the right dentate gyrus of the hippocampus to establish experimental AD, and PBS was injected instead in the latter two groups. Corresponding feed was administered in the 4 groups as indicated. The hippocampal neuronal loss in the rats was assessed using Nissel staining, and the level of Tau (ser202) phosphorylation was estimated with immunohistochemistry. **Result** The rats in cholesterol+AD group exhibited serious neuronal loss at the rate of 30.9%±4.6%, which was significantly higher than those in standard diet+AD group (22.7%±1.9%), cholesterol+PBS group (7.0%±1.5%), and standard diet+PBS group (5.4%±1.1%). The numbers of Tau-positive cells in the dentate gyrus in the 4 groups were 65.5±6.2, 48.8±4.8, 22.5±3.1, and 12.7±1.7, respectively. **Conclusion** High cholesterol diet aggravates neuronal loss and enhances Tau (ser202) phosphorylation in the dentate gyrus in AD rats.

**【Key words】** High-cholesterol; Alzheimer's disease; Tau phosphorylation; Neuronal loss

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是老年痴呆的首要病因。近来研究表明血管因素在 AD 的发生、发展中发挥着重要作用,而胆固醇是重要的血

管危险因素,流行病学资料显示在中年时期体内增高的胆固醇水平可增加 AD 的发病风险<sup>[1]</sup>。前期研究显示高胆固醇加重 AD 大鼠认知功能损害,但是其机制尚有待进一步明确<sup>[2]</sup>。老年性痴呆基本病理改变包括  $\beta$  淀粉样蛋白(A $\beta$ )沉积、Tau 蛋白异常磷酸化和神经元缺失。本研究通过观察高胆固醇对 A $\beta$  诱导的神经元缺失和 Tau 蛋白异常磷酸化来探

DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-8925.2009.04.009

作者单位:400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所神经内科

通信作者:周华东,电话:023-68757851

讨高胆固醇促进 AD 发生发展的机制。

### 材料和方法

#### 一、主要试剂和仪器

Aβ<sub>1-40</sub>(美国 Sigma 公司), (Pser202)Tau 抗体(武汉博士德公司), 江湾 II 型大鼠脑立体定位仪, 微量加样器, 冰冻切片机(Leica)。

#### 二、动物分组

健康、雄性 Wistar 大鼠 20 只, 体质量(300±20)g, 由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。根据饮食和注射试剂的不同, 分为高胆固醇饮食 AD 组(CH+AD 组), 高胆固醇饮食磷酸盐缓冲液(PBS)组(CH+PBS 组), 标准饮食 AD 组(SD+AD 组), 标准饮食 PBS 组(SD+PBS 组), 每组 5 只大鼠。高胆固醇饮食组予高胆固醇饮食(由 5%胆固醇, 1%猪胆酸钠, 10%猪油, 84%普通鼠粮混合而成), 喂养 8 周。标准饮食组喂养普通鼠粮。

#### 三、动物模型制作

予 0.3% 苯巴比妥钠(按 1 mL/100 g)腹腔注射麻醉, 麻醉完全后将大鼠固定在立体定位仪上。Aβ<sub>1-40</sub>溶于 0.01 mol/L PBS 调成浓度为 1 μg/μL 的溶液, 用前 37 °C 下孵育 1 周以上。取右侧海马齿状回为注射区(前囟后 3.0 mm, 右侧旁开 2.0 mm, 硬脑膜下 2.9 mm, 门齿沟平面低于耳间线平面 2.4 mm)。微量加样器注射 Aβ<sub>1-40</sub> 溶液 10 μL (注射速度 1 μL/min), 留针 5 min, 以保证溶液充分弥散, 然后缓慢撤针。PBS 注射组仅注射等量 PBS。

#### 四、尼氏染色检测齿状回注射附近神经元损伤情况

2 周后予过量 0.3% 苯巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠后, 剪开胸腹腔, 暴露心脏, 经心尖部相继灌注生理盐水(4 °C) 250 mL、40 g/L 多聚甲醛(4 °C) 250 mL。取脑置于含有 30% 蔗糖的 40 g/L 多聚甲醛溶液中直至标本沉底。恒冷切片在注射点前后连续冠状切片, 片厚 10 μm。将脑片贴于多聚赖氨酸处理的玻片上, 酒精脱脂后, 置于 55 °C 1% 甲苯氨兰溶液中 20 min, 75% 和 95% 乙醇分化, 直到尼氏小体清晰

可见为止。显微镜下观察染色结果: 细胞核淡蓝色, 尼氏小体深蓝色。海马齿状回神经细胞丢失的检测: 随机取含针道切片 5 张, 进行尼氏染色, 利用图像分析系统检测齿状回尼氏染色阳性细胞, 计算平均值。以相同层面对侧海马齿状回细胞数作为对照。结果以神经细胞缺失率(loss rate, LR)表示, 其计算公式如下: LR=(对侧海马齿状回细胞数-海马齿状回残余细胞数)/对侧海马齿状回细胞数×100%。

#### 五、免疫组织化学染色 (SP 法) 检测脑组织 (Pser202)Tau 水平

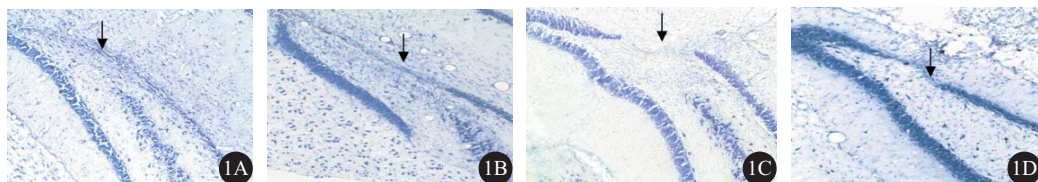
模型制作、标本处理同前; 冰冻切片, 片厚 30 μm; 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 封闭内源性过氧化物酶; 正常山羊血清封闭液封闭; (Pser202)Tau 抗体(1:200)孵育, 4 °C 过夜, 37 °C 1 h; 二抗工作液(生物素标记, 20 μL), 37 °C 2 h; 加入三抗 HRP 工作液(20 μL), 37 °C 1 h; DAB 显色; PBS 终止反应, 脱水, 透明, 封片, 光镜下观察摄片, 阳性染色为细胞浆或突起呈棕黄色。每个动物取 3 张切片, 每张切片在海马齿状回、皮质随机取 4 个互不重叠的视野, 在 100 倍显微镜下采用标准网格按点计数法计算阳性细胞数。

#### 六、统计学分析

各组数据以均数±标准误表示, 采用 SPSS10.0 软件包进行处理, 多组均数间的比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 SNK 检验, 以 P≤0.05 为差异有统计学意义。

### 结 果

一、高胆固醇饮食对 Aβ 诱导神经元缺失的影响  
镜下观察各组均见齿状回神经细胞带存在损伤断裂, 局部神经元丢失(图 1 箭头所示), 其中 CH+AD 组齿状回细胞带出现大片段缺失。定量分析结果显示饮食和注射类型不同, 海马齿状回神经细胞丢失有显著差异。CH+AD 和 SD+AD 组齿状回神经细胞丢失明显大于 PBS 组, 其中 CH+AD 组神经细胞减少最为明显, CH+AD 组明显高于 SD+AD 组, 差异有统计学意义(P<0.05)。在 PBS 组中发现同样的规律, 即进食高胆固醇的大鼠损害大于进



1A: CH+AD 组; 1B: SD+AD 组; 1C: CH+PBS 组; 1D: SD+PBS 组

图 1 尼氏染色检测齿状回神经细胞的缺失(×100)

Fig.1 Nissle staining for observing neuronal loss in the dentate gyrus of the rats in different groups(×100)

食标准饮食的大鼠。(表 1)

表 1 高胆固醇对 AD 大鼠海马神经元缺失率的影响( $\bar{x}\pm s$ )

Tab.1 Effect of high-cholesterol diet on hippocampal neuronal loss rate in the AD rats (Mean±SD)

组别	例数	缺失率(%)
CH+AD组	5	30.9±4.6 <sup>ab</sup>
SD+AD组	5	22.7±1.9 <sup>b</sup>
CH+PBS组	5	7.0±1.5
SD+PBS组	5	5.4±1.1
F值		183.002
P值		0.000

与 SD+AD 组比较, <sup>a</sup> $P<0.05$ ; 与 CH+PBS 组比较, <sup>b</sup> $P<0.05$

## 二、高胆固醇饮食对(Pser202)Tau 表达的影响

免疫组织化学显示(Pser202)Tau 阳性物质位于胞浆内,呈棕黄色颗粒。PBS 组检测到少量阳性细胞,AD 组阳性细胞数多于 PBS 组,CH+AD 明显多于 SD+AD 组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。皮质阳性细胞数只与饮食有关,高胆固醇饮食组高于标准饮食组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。(表 2, 图 2, 3)

## 讨 论

本研究结果显示注射部位神经元缺失受饮食影响,CH+AD 组较 SD+AD 组相比神经元缺失率明显增加,SD+AD 组的神经元缺失率 22.7%上升到 CH+AD 组的 30.9%,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。Gonzalo 等<sup>[3]</sup>研究发现大鼠大脑皮层注射 A $\beta$  所造成的胆碱能神经元丢失,高胆固醇饮食组比标准饮食组增加近一倍。以上结果提示高胆固醇可以增加大

表 2 高胆固醇对 AD 大鼠(Pser202)Tau 表达的影响( $\bar{x}\pm s$ )

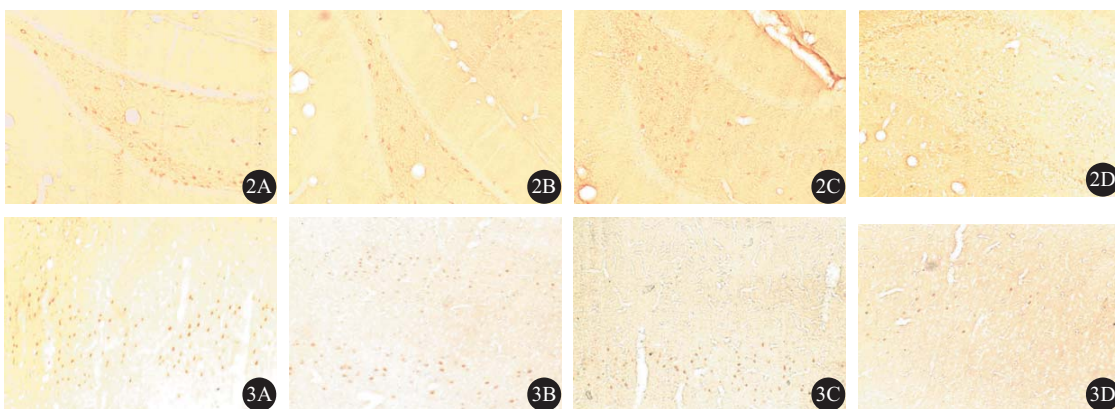
Tab.2 Effects of high-cholesterol diet on (Pser202)Tau in the dentate gyrus of the AD rats (Mean±SD)

组别	例数	齿状回	皮质
CH+AD组	5	65.5±6.2 <sup>ab</sup>	24.6±2.7
SD+AD组	5	48.8±4.8 <sup>b</sup>	9.3±1.1 <sup>b</sup>
CH+PBS组	5	22.5±3.1	23.3±2.2
SD+PBS组	5	12.7±1.7	8.3±1.3 <sup>b</sup>
F值		105.400	149.600
P值		0.000	0.000

与 SD+AD 组比较, <sup>a</sup> $P<0.05$ ; 与 CH+PBS 组比较, <sup>b</sup> $P<0.05$

鼠脑神经细胞对 A $\beta$  毒性损害<sup>[4]</sup>。这一结论在体外研究也得到证实,高胆固醇增加 A $\beta$  对在体外培养海马神经细胞的毒性作用,与 A $\beta$  组相比主要表现为高胆固醇+A $\beta$  组神经元体积小,密度减低,细胞膜通透性增加<sup>[5]</sup>。

A $\beta$  沉积和 Tau 蛋白过度磷酸化是导致 AD 神经元丧失及产生痴呆症状的重要因素,而 Tau 蛋白在 A $\beta$  诱导的神经退行性病变过程中起着关键性的作用,由 Tau 蛋白磷酸化组成的神经原纤维缠结(neurofibrillary tangle, NFT) 的数量则与 AD 临床痴呆程度密切相关。Tau 蛋白共有 21 个 Tau-ser 和 Tau-thr 磷酸化位点,其中只有少数位点参与调节 Tau 蛋白的微管结合活性,而 Tau 蛋白在 Ser202、Thr231、Ser396 位点的异常磷酸化具有一定的代表性。故在本试验中,我们选择 Tau(Ser202)位点异常磷酸化水平作为指标观察高胆固醇对 A $\beta$  诱导神经细胞 Tau 蛋白异常磷酸化的影响,结果显示在齿状回,CH+AD 组 Tau(ser202)磷酸化阳性细胞明显多



2A、3A:CH+AD 组;2B、3B:SD+AD 组;2C、3C:CH+PBS 组;2D、3D:SD+PBS 组

图 2 免疫组织化学检测齿状回(Pser202)Tau 的表达( $\times 40$ ) 图 3 免疫组织化学检测皮质(Pser202)Tau 的表达( $\times 40$ )

Fig.2 Immunohistochemistry for (Pser202)Tau in the dentate gyrus of the rats ( $\times 40$ ) Fig.3 Immunohistochemistry for (Pser202)Tau in the cerebral cortex of the rats( $\times 40$ )

于 SD+AD 组,而在远离 Aβ<sub>1-40</sub> 处(皮层处),高胆固醇饮食组仍高于标准饮食组,在 PBS 组发现同样规律,以上结果显示高胆固醇能够促进 Aβ 注射部位附近 Tau 蛋白磷酸化,另外在没有外来因素干预下,胆固醇本身即能够促进 Tau 蛋白发生异常磷酸化。有关胆固醇代谢异常与 Tau 蛋白异常磷酸化关系最明显的例子是尼曼匹克病(Niemann-Pick disease,NPC)。胆固醇代谢异常是包括 NPC 在内的一些 Tau 蛋白病变的直接原因,NPC 患者脑同时存在胆固醇代谢失衡和 NFTs<sup>[6]</sup>。提示胆固醇代谢异常和 Tau 蛋白异常磷酸化存在某种联系。在 NPC 鼠动物模型的中枢神经系统,Tau 蛋白的特殊位点发生过度磷酸化并伴随着蛋白激酶的活性增强<sup>[7]</sup>。Ghribi 等<sup>[8]</sup>使用 1%胆固醇喂养兔子促使兔脑中 Ser396 和 Ser404 位点丝氨酸磷酸化,并且激活 p-ERK。Fan 等<sup>[9]</sup>研究发现胆固醇在 NFTs 病变的神经元中聚集,支持细胞内胆固醇过载可能与 Tau 蛋白磷酸化有关;Rahman 等<sup>[10]</sup>发现高胆固醇能够诱导 APOE 基因敲除鼠脑内 Tau 蛋白异常磷酸化物质聚集和一些激酶活性增加。以上结果提示胆固醇可能通过激活某些蛋白激酶导致 Tau 蛋白过度磷酸化进而诱发神经退行性病的发生。

在本实验中观察到神经元缺失和 Tau(Ser202)异常磷酸化显著相关,该结果提示高胆固醇通过促进 Tau 蛋白异常磷酸化,可能是促进 Aβ 诱导神经元缺失的机制之一,Tau 蛋白过度磷酸化在促进神经细胞退行性变性中起重要作用。

综上所述,高胆固醇饮食促进 Tau 蛋白异常磷酸化,促进 Aβ 诱导神经元缺失,可能是高胆固醇促进 AD 发生发展的重要机制,故降低饮食中的胆固

醇含量和治疗高胆固醇血症有助于预防 AD 发病。

参 考 文 献

[1] Kivipelto M, Helkala EL, Laakso MP, et al. Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life longitudinal, population based study[J]. BMJ, 2001, 322(7300): 1447-1451.

[2] 方传勤,周华东,李敬诚,等.高胆固醇饮食对 AD 模型大鼠空间学习和记忆的影响[J].重庆医学,2007,36(9): 852-854.

[3] Onzalo-Ruiz A, Perez JI, Sanz JM, et al. Effects of lipids and aging on the neurotoxicity and neuronal loss caused by intracerebral injections of the amyloid-beta peptide in the rat [J]. Exp Neurol, 2006, 197(1): 41-55.

[4] Gonzalo-Ruiz A, Gonzalez I, Sanz-Anquela JM. Effects of β-amyloid protein on serotonergic, noradrenergic, and cholinergic markers in neurons of the pontomesencephalic tegmentum in the rat[J]. J Chem Neuroanat, 2003, 26(3): 153-169.

[5] 方传勤,周华东,李敬成,等.高胆固醇对 Aβ 诱导神经元损伤和胶质细胞活化的影响[J].重庆医学,2007,36(22): 2299-2301.

[6] Distl R, Treiber-Held S, Albert F, et al. Cholesterol storage and tau pathology in Niemann-Pick type C disease in the brain[J]. J Pathol, 2003, 200(1): 104-111.

[7] Distl R, Meske V, Ohm TG. Tangle-bearing neurons contain more free cholesterol than adjacent tangle-free neurons [J]. Acta Neuropathol(Berl), 2001, 101(6): 547-554.

[8] Ghribi O, Larsen B, Schrag M, et al. High cholesterol content in neurons increases BACE, beta-amyloid, and phosphorylated tau levels in rabbit hippocampus [J]. Exp Neurol, 2006, 200 (2): 460-467.

[9] Fan QW, Yu W, Senda T, et al. Cholesterol-dependent modulation of tau phosphorylation in cultured neurons[J]. J Neurochem, 2001, 76(2): 391-400.

[10] Rahmana R, Akterina S, Flores-Morales A, et al. High cholesterol diet induces tau hyperphosphorylation in apolipoprotein E deficient mice[J]. FEBS Letters, 2005, 579(28): 6411-6416.

(收稿日期:2008-11-28)

(本文编辑:卢丽玉)



· 消息 ·

第三届亚洲癫痫外科大会

随着第一届(2007)、第二届(2008)亚洲癫痫外科大会分别在韩国和中国圆满落幕,大会对亚洲癫痫外科所产生的学术指导意义日益明朗,中国乃至亚洲各国癫痫外科的事业正在如火如荼的进行着。为巩固会议成果,第三届亚洲癫痫外科大会将于 2009 年 6 月 18 日至 19 日在日本大阪召开。本届大会主席由日本大阪大学医学部神经外科 Toshiki Yoshimine 教授担任。会议主题除涉及癫痫及相关专业内容外,还将增设 "Standard Techniques in Epilepsy Surgery" 等教学项目。详情可登陆会议网站查询 [Http://www.aesc2009.jp/](http://www.aesc2009.jp/)。欢迎广大同仁积极参加,共同研究交流。