

文章编号:1000-5404(2012)12-1167-04

论著

丙戊酸钠对 APP/PS1 双重转基因小鼠脑组织 Tau 蛋白的影响

赵蕾¹, 龙志敏¹, 贺桂琼^{1,2}, 宋冲¹, 楚亚楠¹ (400016 重庆, 重庆医科大学: 神经科学研究中心¹, 基础医学院人体解剖学教研室²)

[摘要] 目的 探讨丙戊酸钠(valproic acid, VPA)对 APP/PS1 双转基因阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)模型小鼠丝氨酸 262 位点 Tau 蛋白过度磷酸化(p-Tau-ser262)及神经细胞内神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFTs)的影响。方法 3月龄 APP/PS1 双重转基因 AD 模型小鼠 20 只,均分为 VPA 治疗组和生理盐水对照组(每组 10 只)。腹腔注射 VPA 和等量生理盐水 4 周后取材,应用免疫组化方法检测各组 AD 模型鼠脑内 p-Tau-ser262 阳性细胞表达,HE 染色显示 NFTs 的数量及分布变化;Western blot 分析各组 AD 模型鼠脑内糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase3 β , GSK-3 β)ser9 位点磷酸化水平。结果 免疫组化结果显示,VPA 治疗组 AD 模型小鼠 p-Tau-ser262 阳性细胞数皮质(5.01 \pm 0.71)、海马(5.29 \pm 1.32)、嗅球(10.06 \pm 3.36)、小脑(13.54 \pm 1.51),与生理盐水对照组[分别为(8.60 \pm 1.82)、(9.00 \pm 1.87)、(56.00 \pm 6.67)、(22.02 \pm 1.98)]相比明显减少($P < 0.05$, $P < 0.01$);HE 染色结果显示:VPA 治疗组小鼠海马(1.33 \pm 0.71)和大脑皮质区内(1.90 \pm 0.88)NFTs 数量与生理盐水对照组[分别为(5.89 \pm 0.92)、(6.08 \pm 1.61)]相比明显减少($P < 0.01$);Western blot 检测结果显示:VPA 治疗组 AD 模型鼠脑内 GSK-3 β 蛋白 ser9 磷酸化水平(126.88 \pm 5.61)明显高于生理盐水对照组(73.34 \pm 3.61)($P < 0.01$)。结论 VPA 可明显减少 AD 模型小鼠脑内 Tau 蛋白的过度磷酸化及 NFTs 的形成;VPA 发挥保护作用的机制可能与下调 GSK-3 β 活性有关。

[关键词] 丙戊酸钠;阿尔茨海默病;神经原纤维缠结;Tau 蛋白

[中图分类号] R394.3;R745.705;R966

[文献标志码] A

Effect of sodium valproate on Tau in brain tissues of APP/PS1 double transgenic mouse models of Alzheimer's disease

Zhao Lei¹, Long Zhimin¹, He Guiqiong^{1,2}, Song Chong¹, Chu Yanan¹ (¹Center of Neuroscience, ²Department of Anatomy, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of sodium valproate (VPA) on the hyperphosphorylation of Tau (p-Tau-Ser262) and neurofibrillary tangles (NFTs) in the brain tissues of APP/PS1 double transgenic mouse models of Alzheimer's disease (AD). **Methods** Twenty APP/PS1 transgenic mice (3 months old) were randomly divided into a control group and a VPA group (10 mice in each group). The mice of the VPA group and the control group were intraperitoneally injected with VPA and the same amount of normal saline once a day for 4 weeks, respectively. Immunohistochemical staining was applied to detect the number of p-Tau-Ser262-positive cells, and HE staining was applied to observe the number and distribution of NFTs in the brain tissues of the AD mice. The level of phospho-glycogen synthase kinase 3 β -Ser9 (p-GSK-3 β -Ser9) in the brain tissues of AD mice was analyzed by Western blotting. **Results** The result of immunohistochemical staining showed that the number of p-Tau-Ser262-positive cells was significantly lower in the cerebral cortex (5.01 \pm 0.71), hippocampus (5.29 \pm 1.32), olfactory bulb (10.06 \pm 3.36) and cerebellum (13.54 \pm 1.51) of the VPA group as compared with those of the control group (8.60 \pm 1.82, 9.00 \pm 1.87, 56.00 \pm 6.67 and 22.02 \pm 1.98, $P < 0.05$, $P < 0.01$). The HE staining result revealed that the number of NFTs significantly decreased in the hippocampus (1.33 \pm 0.71) and cerebral cortex (1.90 \pm 0.88) of the VPA group as compared with those of the control group (5.89 \pm 0.92 and 6.08 \pm 1.61, $P < 0.01$). Western blotting results showed that the level of p-GSK-3 β -Ser9 in the brain tissues of the VPA group was significantly higher than those of the control group (126.88 \pm 5.61 vs 73.34 \pm 3.61, $P < 0.01$). **Conclusion** VPA can significantly inhibit the hyperphosphorylation of Tau and the formation of NFTs in the brain tissues of APP/PS1 double transgenic

[基金项目] 国家自然科学基金(30970986)

[通信作者] 贺桂琼, E-mail:guiqionghe@hotmail.com

mice through downregulating the activity of GSK-3 β .

[Key words] sodium valproate; Alzheimer's disease; neurofibrillary tangles; microtubule-associated proteins

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30970986). Corresponding author: He Guiqiong, E-mail: guiqionghe@hotmail.com

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是常见的中枢神经系统退行性疾病,以进行性记忆力减退、认知功能障碍以及人格改变为主要临床症状,目前病因不明,但AD患者脑内Tau过度磷酸化,聚集形成的神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFTs),被认为是导致神经元死亡的重要原因。而近期研究发现,糖原合成酶激酶-3(glycogen synthase kinase 3, GSK-3)同时参与AD病理特征老年斑沉积和NFT的形成及神经元凋亡^[1]。GSK-3 β 在AD的发病机制中起核心作用,近年的研究认为GSK-3 β 可能成为AD治疗的一个突破点。丙戊酸钠(valproic acid sodium salt, VPA)作为GSK-3 β 的选择性抑制剂,课题前期研究已表明VPA可改善APP/PS1双转基因AD模型小鼠的空间学习记忆能力,减少老年斑的形成,抑制神经元的凋亡等神经保护作用^[2-3]。VPA对AD模型鼠异常磷酸化的Tau蛋白和NFTs的作用又如何呢?鉴于此,本课题拟用VPA处理APP/PS1双重转基因AD模型小鼠,采用组织学、免疫组织化学及Western blot等,检测VPA对AD模型小鼠不同脑区Tau蛋白丝氨酸262位点的过度磷酸化(p-Tau-ser262)、NFTs及GSK-3 β 活性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

兔抗p-Tau-ser262多克隆抗体购自Santa Cruz公司,DNA提取试剂盒购自Tiangen公司,鼠抗p-GSK-3 β -ser9单克隆抗体购自Millipore公司,淀粉样蛋白前体(APP)、PS1、 β -actin引物购自Invitrogen公司,ABC免疫组化试剂盒购自北京中杉,DAB试剂盒购自美国Pierce公司,组织蛋白裂解液购自美国Pierce公司,BCA试剂盒购自碧云天,柯达胶卷,碧云天显影定影液,其他均为国产分析纯。

1.2 实验动物及分组

APP/PS1双重转基因传代小鼠的建立:将购于美国国立Jackson动物中心的APP/PS1种鼠B6C3-Tg(APP^{swe},PSEN1^{de9})85Dbo/J,表达人突变的PS1(DeltaE9)和嵌合体的小鼠/人APP(APP^{swe})基因,饲养于重庆医科大学动物中心SPF级,待产下的子代达3周龄,取小鼠尾,提取基因组DNA完成鉴定,同窝出生的转基因阴性小鼠作为野生对照^[4]。然后分笼饲养于光照/黑暗为12/12h的恒温恒湿环境,每笼2~5只,自由摄食和饮水。所有操作遵循重庆医科大学实验动物使用相关伦理要求。取3月龄双重转基因小鼠20只,体质量25~30g,均分为VPA治疗组和生理盐水对照组(每组10只)。VPA治疗组小鼠给予VPA(Sigma公司)30mg/(kg·d)腹腔注射,生理盐水

对照组腹腔注射等量生理盐水^[2]。每天固定给药时间和操作人员,并记录小鼠体质量、行为活动以及饮食饮水情况,持续用药4周。

1.3 动物标本的制备

小鼠行4周药物处理后,用2%水合氯醛麻醉,经左心室快速灌注生理盐水20ml,冰上取脑,右侧脑组织-80℃冻存;左侧脑组织放入4%多聚甲醛0.1mol/L磷酸盐缓冲液(PB,pH7.4)固定72h,常规70%酒精脱水、石蜡包埋,然后进行矢状切片,厚度4 μ m。

1.4 染色

小鼠脑组织行矢状石蜡切片,每片厚4 μ m。①HE染色:切片经二甲苯脱蜡,再由高浓度到低浓度酒精,最后入蒸馏水进行水化。将水化后的脑片放入苏木精水溶液中染色数分钟,在氨水中分化数秒,流水冲洗1~2min,入70%、80%、90%酒精中各脱水5min,放入酒精伊红染色液染色1min,最后将切片放入无水乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。②免疫组化染色:免疫组化步骤依照S-P试剂盒说明书进行,具体如下:切片经二甲苯脱蜡,PBS冲洗,枸橼酸钠微波煮沸抗原修复,经3% H_2O_2 处理15min以封闭内源性过氧化物酶活性,5%BSA封闭1h后,加入一抗:兔抗p-Tau-ser262(1:200),4℃过夜;PBS冲洗3次,加入二抗和S-P复合物(北京中杉),于37℃孵育30min。用硫酸镍氨加强法DAB(Pierce,USA)显色。常规脱水、透明、封片,光镜下观察。

阴性对照:免疫组化染色时,用正常血清代替一抗孵育APP/PS1转基因小鼠脑组织切片,经上述免疫组织化学染色,未见明显的特异性免疫阳性反应产物。

1.5 Western blot检测

取右侧半海马和大脑皮质提取蛋白,并按照BCA试剂盒测定蛋白的浓度。取蛋白样品100 μ g,经过10%SDS-PAGE凝胶电泳,将蛋白电转至0.45 μ m PVDF膜上,以5%脱脂奶粉液封闭后,加入一抗p-GSK-3 β -ser9抗体(1:1000),4℃孵育过夜,洗涤后加入HRP标记的二抗(1:10000)室温孵育2h后,ECL底物化学发光显色后曝光显影压制成胶片,采用Image Pro Plus分析测定各蛋白条带的强弱。

1.6 统计学处理

用Image Pro Plus软件对免疫组化显示的p-Tau-ser262免疫阳性细胞以及HE染色显示的NFTs样细胞数量进行分析,每只小鼠随机测量5张切片,每张切片随机选取5个视野进行分析;Western blot反应条带灰度值。采用SPSS 17.0统计软件,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,行独立样本t检验。

2 结果

2.1 免疫组化检测2组小鼠海马、皮质、嗅球、小脑中p-Tau-ser262的表达

生理盐水对照组:阳性细胞在海马CA1区着色深,神经元

胞体和轴突皆着色;皮质区部分细胞出现过深染,突起浓染;嗅球内可见阳性细胞胞体和突起均浓染;小脑 Purkinje 细胞层阳性细胞胞体和突起密集阳性反应。较生理盐水对照组而言,VPA 治疗组小鼠脑内 CA1 区的少量锥体神经元轴突淡染;皮质区极少数淡染的神经元突起,胞体仅有稀疏弱阳性反应;嗅球内未见明显的阳性反应;小脑 Purkinje 细胞层阳性反应稀疏表达于胞体,未见突起着色。VPA 治疗组 AD 模型鼠皮质阳性细胞数量为(5.01 ± 0.71)、海马(5.29 ± 1.32)、嗅球(10.06 ± 3.36)、小脑(13.54 ± 1.51),明显少于生理盐水对照组[分别为(8.60 ± 1.82)、(9.00 ± 1.87)、(56.00 ± 6.67)、(22.02 ± 1.98), $P < 0.05, P < 0.01$]。见图1。

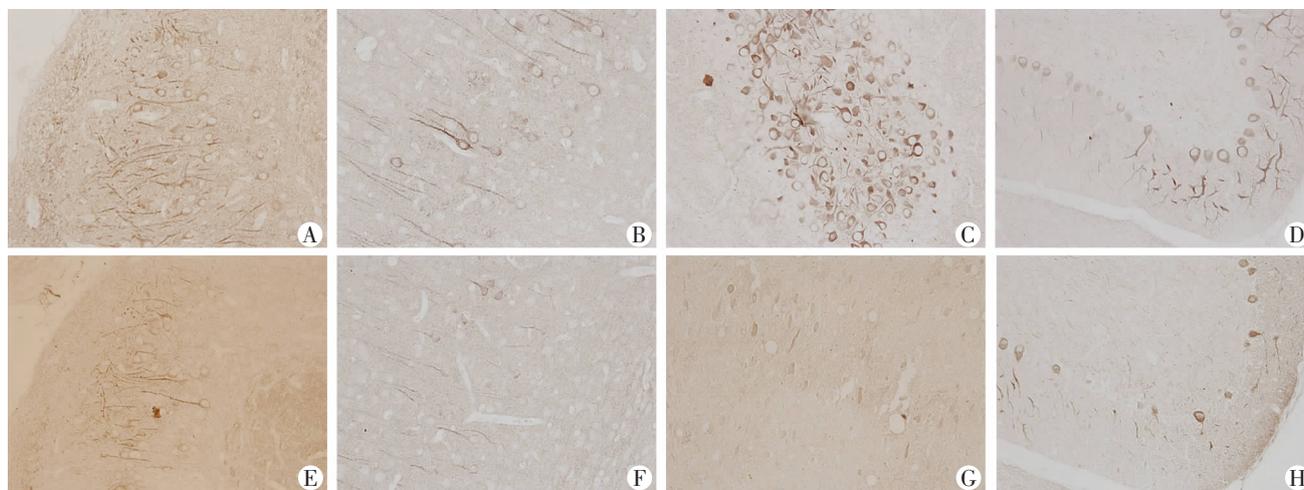
2.2 HE 染色观察 2 组小鼠海马、皮质区神经细胞形态和结构

HE 染色可见海马 CA2、CA3 区以及海马齿状回和内嗅皮质区 VPA 治疗组和生理盐水对照组存在差异。生理盐水对照组小鼠海马齿状回颗粒细胞层出现胞体过深染,细胞核不明

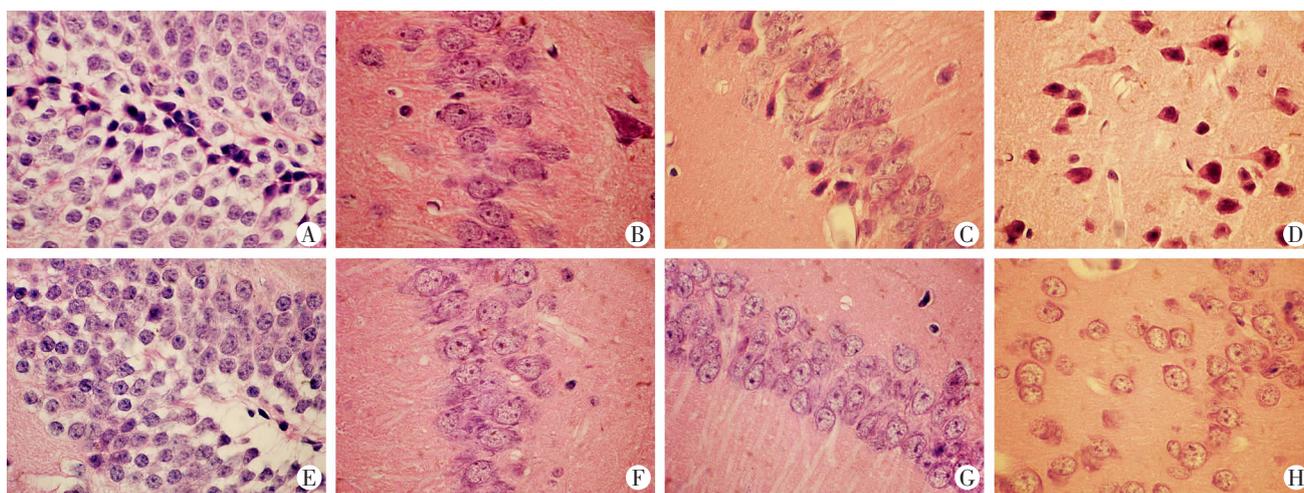
显,轴突可见明显拖尾现象;CA3 区细胞内神经原纤维增粗,排列紊乱,增粗的纤维占据整个细胞胞体,细胞核模糊不清;CA2 区神经元,排列紊乱疏松,在该区和内嗅皮质区还可见较多神经细胞轴突染色过深出现拖尾状态,形成 NFTs。VPA 治疗组小鼠海马脑内上述区域神经元形态有较大变化,海马齿状回颗粒细胞层神经元排列规则、紧密,形态完整,罕见拖尾现象细胞;CA3 区神经元胞体圆润,胞核清楚,神经元内神经原纤维排列整齐有序;CA2 区神经元细胞排列规则、密集,胞体呈圆球形,CA2 区和内嗅皮质区未见拖尾或者染色过深的轴突。VPA 治疗组小鼠大脑皮质区的 NFTs 细胞数量为(1.90 ± 0.88)、海马区为(1.33 ± 0.71),与生理盐水对照组[分别为(5.89 ± 0.92)、(6.08 ± 1.61)]相比明显减少($P < 0.01$)。见图2。

2.3 Western blot 检测 2 组小鼠脑内 ser9 位点磷酸化的 GSK-3 β 蛋白表达水平

VPA 治疗组 p-GSK-3 β -ser9 的蛋白水平灰度值(126.88 ± 5.61)明显高于生理盐水对照组(73.34 ± 3.61) ($t = 7.64, P < 0.01$,图3)。



A、E: 海马 CA1 区; B、F: 大脑皮质区; C、G: 嗅球; D、H: 小脑; A、B、C、D: 生理盐水对照组; E、F、G、H: VPA 治疗组
图1 两组 APP/PS1 转基因小鼠海马、皮质、嗅球、小脑中 p-Tau-ser262 的表达 (S-P × 400)



A、E: 海马齿状回; B、F: 海马 CA3 区; C、G: 海马 CA2 区; D、H: 内嗅皮质区; A、B、C、D: 生理盐水对照组; E、F、G、H: VPA 治疗组
图2 两组 APP/PS1 转基因小鼠海马、皮质区神经细胞形态和结构 (HE × 1 000)

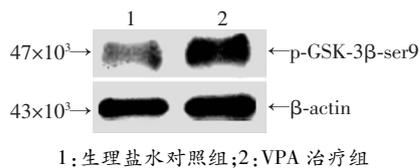


图3 Western blot 检测两组小鼠大脑中 p-GSK-3 β -ser9 蛋白水平的表达

3 讨论

神经元内出现大量的 NFTs 是 AD 患者脑内的三大特征性病理改变之一^[5], NFTs 的形成导致微管的稳定性以及骨架蛋白的完整性下降,轴突丧失正常的运输功能^[6],引起突触的丢失和神经元的变性^[7],而 NFTs 是由异常过度磷酸化的 Tau 蛋白形成。AD 患者脑内异常磷酸化的 Tau 蛋白受多种蛋白激酶调节,而 GSK-3 β 是其主要的一种蛋白激酶^[8]。AD 患者脑内 GSK-3 β 的异常活化在 Tau 蛋白磷酸化、NFTs 聚积和 A β 沉积中均起重要作用^[9-10]。可见,GSK-3 β 在 AD 的发病机制中占据核心地位,开展以 GSK-3 β 为靶点的药物研究将为 AD 的有效防治开辟新途径。

VPA 是一种临床上广泛应用于广谱抗癫痫的药物,近年研究表明,VPA 还具有神经保护和抗凋亡作用。本课题前期研究已证实 VPA 有神经保护作用^[2-3]。而 GSK-3 β 是引起 Tau 蛋白磷酸化的主要激酶,那么,作为 GSK-3 β 的抑制剂 VPA,对于 Tau 蛋白又有什么影响呢?对此我们选择 3 月龄 AD 模型鼠进行 VPA 药物干预,虽然 GSK-3 β 可磷酸 Tau 蛋白多个位点^[11],最新研究表明,VPA 可经由 GSK-3 β 和 CDK5 信号通路减少 Tau 蛋白在 Thr205、Ser396 和 Thr231 位点的过度磷酸化^[12],但对靠近微管结合部位的 Tau 蛋白 ser262 位点的检测目前尚少见报道,然而 ser262 位点的异常磷酸化则更易导致 Tau 与微管的分离,最终缠结成 NFTs,丧失正常的结构和运输功能^[13],故选取 p-Tau-ser262 点进行了免疫组织化学染色,结果显示,VPA 能明显抑制 AD 模型小鼠皮质、海马、嗅球、小脑中 Tau 蛋白 ser262 位点的异常磷酸化。同时 HE 染色显示海马 CA2、CA3 以及齿状回和内嗅皮质区域类 NFTs 较生理盐水对照组也显著减少。

GSK-3 β 的活性受蛋白磷酸化水平调节,当 GSK-3 β 在 Tyr216 位点磷酸化其活性增强^[14],而 ser9 位点磷酸化则活性将受到抑制^[15]。为验证 VPA 是否抑制了 GSK-3 β 的活性来影响 Tau 的磷酸化水平,我们采用 Western blot 分析显示 VPA 干预组 p-GSK-3 β -ser9 蛋白水平较生理盐水对照组明显升高,结合前期研究,我们推测 VPA 通过抑制 GSK-3 β 的活性,从而影响 GSK-3 β 的磷酸化底物 Tau 的磷酸化反应,使神经原纤维的缠

结减少,维持了微管结构的稳定性,达到保护神经元的作用。AD 的发病机制极其复杂,Tau 蛋白异常磷酸化所导致的 NFTs 只是其特征性的病理改变之一,在 AD 患者脑中存在众多异常磷酸化位点,本研究仅探讨了 VPA 和 Tau 蛋白 ser262 位点的异常磷酸化之间的关系,VPA 是否可抑制其他位点的 Tau 蛋白异常磷酸化?我们将进一步研究。

参考文献:

- [1] Muyliaert D, Kremer A, Jaworski T, *et al.* Glycogen synthase kinase-3beta, or a link between amyloid and Tau pathology[J]. *Genes Brain Behav*, 2008, 7(Suppl 1): 57-66.
- [2] Qing H, He G, Ly P T, *et al.* Valproic acid inhibits Abeta production, neuritic plaque formation, and behavioral deficits in Alzheimer's disease mouse models[J]. *J Exp Med* 2008, 205(12): 2781-2789.
- [3] 陈通,龙志敏,汪克建,等. 丙戊酸钠对 APP/PS1 转基因小鼠自主活动及脑形态结构的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2012, 34(9): 870-873.
- [4] 高宝兵,龙志敏,贺桂琼,等. 常压高氧对淀粉样蛋白前体/早老素 1 双重转基因小鼠脑内老年斑及 β -淀粉样蛋白的影响[J]. *中华神经科杂志*, 2010, 43(3): 222-226.
- [5] Hooper C, Killick R, Lovestone S. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease[J]. *J Neurochem*, 2008, 104(6): 1433-1439.
- [6] Metcalfe M J, Figueiredo-Pereira M E. Relationship between Tau pathology and neuroinflammation in Alzheimer's disease[J]. *Mt Sinai J Med*, 2010, 77(1): 50-58.
- [7] Pritchard S M, Dolan P J, 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.
- [8] Engmann O, Giese K P. Crosstalk between Cdk5 and GSK3beta: implications for Alzheimer's disease [J]. *Front Mol Neurosci*, 2009, 2: 2.
- [9] Voss K, Gamblin T C. GSK-3beta phosphorylation of functionally distinct Tau isoforms has differential, but mild effects [J]. *Mol Neurodegener*, 2009, 4: 18.
- [10] 杨继飞,张建,景秀京,等. 糖原合酶激酶 3 β 在大鼠脑老化及神经退行性变中的表达与分布改变[J]. *第三军医大学学报*, 2007, 29(19): 1873-1876.
- [11] Liu F, Liang Z, Shi J, *et al.* PKA modulates GSK-3beta- and cdk5-catalyzed phosphorylation of Tau in site- and kinase-specific manners [J]. *FEBS Lett*, 2006, 580(26): 6269-6274.
- [12] Hu J P, Xie J W, Wang C Y, *et al.* Valproate reduces Tau phosphorylation via cyclin-dependent kinase 5 and glycogen synthase kinase 3 signaling pathways [J]. *Brain Res Bull*, 2011, 85(3/4): 194-200.
- [13] Buee L, Bussiere T, Buee-Scherrer V, *et al.* Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders [J]. *Brain Res Brain Res Rev*, 2000, 33(1): 95-130.
- [14] Lochhead P A, Kinstrie R, Sibbet G, *et al.* A chaperone-dependent GSK3beta transitional intermediate mediates activation-loop autophosphorylation[J]. *Mol Cell*, 2006, 24(4): 627-633.
- [15] Jang H D, Shin J H, Park D R, *et al.* Inactivation of glycogen synthase kinase-3 β is required for osteoclast differentiation [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(45): 39043-39050.

(收稿:2011-11-14;修回:2011-12-20)

(编辑 王小寒)