**广东药学院**

**硕士研究生学位论文**

|  |  |
| --- | --- |
| 题目： | **Aβ42 诱导 tau 蛋白过度磷酸化的实**  **证及初步机理** |

姓 名： 孙灵芝

学 号： 2111043002

院 系： 基础学院 专 业： 人体解剖与组织胚胎学导师姓名：李国营（教授）

**分类号：**

**UDC:**

**密级:**

**Aβ诱导 tau 蛋白过度磷酸化的实证及初步机制**

**The evidence and preliminary mechanism of Aβ-induced hyperphosphorylation of**

**protein tau**

姓 名： 孙灵芝

学 号： 2111043002

院 系： 基础学院 专 业：人体解剖与组织胚胎学 研究方向：神经生物学 导师姓名：李国营（教授） 论文提交日期：2013 年 5 月

论文答辩日期：2013 年 5 月学位授予单位： 广东药学院

**广东药学院学位论文原创性声明**

本人郑重声明： 本人所呈交的学位论文，系我个人在导师的指导下进行研究工作所取得的成果。除文中已特别加以标注和致谢的地方外，不包含其它个人或机构已经发表或撰写过的研究成果。对本研究做出贡献的其它个人和集体，均已在文中明确说明和致谢。本人充分意识到本声明的法律结果完全由本人承担。

学位论文作者签名：＿孙灵芝＿

日 期： 2013 年 4 月 1 日

**学位论文使用授权的声明**

本人完全了解广东药学院有关保留和使用学位论文的规定，学校有权保留和向有关部门或机构送交本论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。学校可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库，可以采用影印、缩印或其它复印手段保存和汇编本学位论文。

保密论文在解密后适用本声明。

论文作者签名：＿孙灵芝＿ 论文导师签名：＿李国营＿

日 期： 2013 年 4 月 1 日

目 录

[研究生 孙灵芝导师李国营教授摘要](#_Toc686341752) 3

**[Abstract](#_Toc686341753)** 4

[序](#_Toc686341754)[言](#_Toc686341754) 5

[材料与方法](#_Toc686341755) 6

**[1.](#_Toc686341756)** [实验材料](#_Toc686341756) 6

**[1.1 .](#_Toc686341757)** [主要仪器及试剂](#_Toc686341757) 6

**[1.2](#_Toc686341758)** [．实验动物](#_Toc686341758) 11

**[2.](#_Toc686341759)** [试验方法](#_Toc686341759) 11

**[2.1.](#_Toc686341760)** [动物模型的建立](#_Toc686341760) 11

**[2.2.](#_Toc686341761)** [动物的取材](#_Toc686341761) 12

**[2.3.](#_Toc686341762)** [组织形态学检测](#_Toc686341762) 12

**[2.4.](#_Toc686341763)** [蛋白印迹检测](#_Toc686341763) 13

**[2.5.](#_Toc686341764)****[RT-PCR](#_Toc686341764)**[检测](#_Toc686341764) 14

**[10](#_Toc686341765)****[×TE Buffer(pH8.0)](#_Toc686341765)**[：100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA，1M Tris-HCl(pH8.0) 100 ml](#_Toc686341765) 14

**[2.5.2.](#_Toc686341766)** [实验过程](#_Toc686341766) 14

[结果](#_Toc686341767) 15

**[1.](#_Toc686341768)** [组织形态学检测结果与分析](#_Toc686341768) 15

**[1.1.](#_Toc686341769)** [Aβ](#_Toc686341769)**[1-42-injection](#_Toc686341769)**[、](#_Toc686341769)**[NS-injection](#_Toc686341769)**[和正常组组织形态学变化的比较](#_Toc686341769) 15

**[1.2.](#_Toc686341770)****[ADDLs](#_Toc686341770)**[在模型鼠脑内的沉积](#_Toc686341770) 15

**[1.3.](#_Toc686341771)** [各组小鼠](#_Toc686341771)**[tau](#_Toc686341771)**[蛋白磷酸化程度比较](#_Toc686341771) 16

**[1.4.](#_Toc686341772)** [各组小鼠](#_Toc686341772)**[cdk5](#_Toc686341772)**[的表达情况分析](#_Toc686341772) 16

**[2.](#_Toc686341773)****[wetern blot](#_Toc686341773)**[检测结果与分析](#_Toc686341773) 16

**[3.](#_Toc686341774)****[rt-pcr](#_Toc686341774)**[检测](#_Toc686341774)**[tau](#_Toc686341774)**[蛋白总量结果分析](#_Toc686341774) 17

[讨论](#_Toc686341775) 18

[结 论](#_Toc686341776) 19

[参考文献](#_Toc686341777) 20

[中英文缩写语对照表](#_Toc686341778) 22

[攻读学位期间发表的文章](#_Toc686341779) 23

[参考文献](#_Toc686341780) 24

**Aβ和tau蛋白相互作用致AD发病的初步研究**

# 研究生 孙灵芝导师 李国营教授摘要

**研究背景：**

阿尔茨海默病即老年痴呆症。是一种进行性发展的神经退行性疾病，临床表现为认知和记忆功能的不断恶化，日常生活能力进行性减退，并有各种神经精神症状和行为障碍。目前，针对AD的发病机制提出了各种学说，其中“Aβ学说”、“tau学说”是最为被接受的主流学说。Aβ学说指出，由于代谢异常，Aβ蛋白不能及时清除，在脑内特定区域沉积，形成老年斑，最终导致神经元死亡，抑制神经元再生，AD的发生。

Tau学说认为tau蛋白的过度磷酸化导致其维持和促进神经元细胞微管结构稳定的作用丧失，导致细胞骨架发生改变，形成神经元纤维缠结，神经元细胞死亡，从而出现一系列AD病理特征的出现。

最近研究发现，可溶性寡聚态形式的Aβ（ADDLs）具有更强的神经毒性。且有研究指出Aβ诱导了tau蛋白的过度磷酸化，其途径是通过激活促进tau蛋白磷酸化的某些激酶。因此，又来越多的证据显示“Aβ学说”和“tau学说”的联合致病学说更为合理。

为了进一步证实Aβ诱导了tau蛋白的过度磷酸化，共同导致的AD的发生，本课题拟从以下几个方面入手，得出结论：（1）Aβ 是AD 发病的源头，其产生和清除不平衡导致了后续AD病理特征的出现；（2）可溶性寡聚态形式的Aβ因具有更强的神经毒性，是AD的最主要病因。（3）Aβ诱导了tau蛋白的过度磷酸化，使其从神经微管上解离出来，游离tau蛋白增多，最终神经元死亡，Aβ和tau蛋白共同导致了

AD病情的发生发展。（4）Aβ激活了促使tau蛋白磷酸化的激酶cdk5。**研究方法：**

1. 利用Aβ-intrahippocampal injection的方法，向实验小鼠脑内海马CA1区注射可溶寡聚态形式的Aβ42，以模拟AD 的主要致病因素，制备动物模型。实验小鼠分

（BALB/c）两组，实验组和对照组，实验组注射可溶寡聚态形式的Aβ42（每只小鼠每侧海马注射4），对照组注射等体积无菌生理盐水。术后7天取材。

2. 常规HE染色，观察Aβ42组和NS组之间的差异

3. 利用免疫组织化学的方法检测实验组Aβ42的沉积，观察Aβ42沉积的位置。

4. 利用免疫组化和western blot 方法检测cdk5在各组小鼠脑内的表达情况。

5. 利用免疫组化和western blot 方法检测p-tau蛋白在各组小鼠脑内的表达情况。

**6.** 利用RT-PCR检测tau蛋白在各组小鼠脑内表达量的变化。**研究结果：**

1. 注射NS和Aβ42的小鼠脑内有明显的炎症损伤，Aβ组的小鼠炎症损伤更为明显，引发神经元变性。

2. Aβ免疫组化显示，Aβ主要在海马区沉积，随着时间的推移，术后7-21天逐渐减少。

3. Cdk5免疫组化和western blot结果显示，在小鼠脑内海马区注射部位和齿状回的亚颗粒细胞层（SGZ）均有cdk5阳性细胞，Aβ组cdk5阳性结果明显多于NS组，差异极显著（P<0.01）。

4. P-tau的免疫组化和western blot结果显示，在小鼠脑内海马区注射部位和齿状回的亚颗粒细胞层（SGZ）均有阳性表达，Aβ组阳性结果明显多于NS组，差异极显著（P<0.01）。

**5.** RT-PCR结果显示tau蛋白在Aβ组的表达量明显高于NS组。**结论：**

1. 可溶性寡聚态形式的Aβ诱导了tau蛋白的过度磷酸化。

2. Aβ激活了促进tau蛋白磷酸化的激酶cdk5。

3. 本研究结果显示Aβ可能是致AD病理进程的始发因素。**关键词：**Aβtau AD

**Preliminary study of the cross-talking effects of Amyloid-βand tau on making Alzheimer disease**

Lingzhi sun(human anatomy and histo-embryology)

**Abstract**

Supervisor: Prof. Guoying Li

**Background:** Alzheimer's disease(AD), also called senile dementia, is a progressive neurodegenerative disease with clinical cognitive and memory loss. Its clinical manifestations are deteriorating cognitive and memory function, progressive neurodegenerative activities of daily living, along with a variety of neuropsychiatric symptoms as well as behavioral disorders. Currently, a hundred of theories of AD pathogenesis, including" amyloidβ-peptide (Aβ) hypothesis" and" tau hypothesis" which are the most accepted mainstream doctrines. Among these, the Aβhypothesis is indicated that owing to developmental and metabolic disorder, Aβ cannot be promptly removed and turns into deposition of brain in senile plaques, which eventually leads to the death of neurons, inhibition of neuronal regeneration, thus the occurrence of AD. The tau hypothesis is considered hyperphosphorylation of protein tau losses ability of maintaining and accelerating structural of a steady neuronal microtubules, changes its cytoskeleton, which resulting in the appearance of neurofibrillary tangles, neuron death, and then a series of AD pathological features.

Recent studies have been identified that Aβof the soluble oligomeric state has stronger neurotoxicity. Research also have pointed out that the Aβinduces hyperphosphorylation of protein tau, whose path is activating certain kinases to stimulate phosphorylation of protein tau. Meanwhile, there is growing number of evidence demonstrate that the joint pathogenic hypothesis of" Aβ hypothesis" and" tau hypothesis" is more reasonable.

In order to investigate Aβinduced hyperphosphorylation of protein tau, then together causing in occurrence of AD, this essay will draw the following conclusions: (1) Aβ is the source of AD pathogenesis. It produces and eliminates imbalance, which bring about the

Emergence of the following characteristics of AD pathology; (2) The soluble oligomeric form of Aβ which is the main pathogeny of AD due to its stronger neural toxicity. (3) Aβinduces hyperphosphorylation of protein tau, and causing it to dissociate from nerve microtubule, finally the growing number of protein tau and finally neural loss. Both Aβ and protein tau will lead to the development of AD. (4) Aβ activates kinase cdk5 that promotes phosphorylation of protein tau.

**Methods:**

1. Using Aβ-intrahippocampal injection method to prepare animal mice models which divided into BALB/c-experimental group and the control group. Experimental groups were injected with Aβ1-42 oligomers (4μg/2μl) into the CA1 area of hippocampus bilaterally; control groups were injected with equal volume of normal saline (NS). Animals were sacrificed at 7d after model injection.

2. Comparing the results between Aβ1-42 group and NS group by Hematoxylin-eosin staining.

3. Detecting the deposition of Aβ1-42 in experimental group by immunohistochemistry staining, and compare the difference between amount of deposition and location in each time.

4. Using immunohistochemistry and Western blot to detect the expression of cdk5 in each group.

5. Using immunohistochemistry and Western blot to detect the expression of protein tau.

6. Applying RT-PCR to detect the expression of protein tau.

**Results:**

1. Both NS group and Aβ1-42 group have apparent inflammatory injured region. Compare to NS group, the area in Aβ1-42 group mice was much more particularly obvious, even induced the degeneration of neurons.

2. Immunohistochemistry showed that Aβwere mainly deposited in area of hippocampus in the experimental groups. Within 7 to 21 days after operation, the area of Aβwere decreased gradually.

3. Immunohistochemistry and western blotting showed that there was positive expression within the subgranular zone (SGZ) of dentate gyrus and injection of hippocampus. Compare to NS group, the expression of cdk5 increased dramatically in Aβ group with significant difference(P<0.01).

4. Immunohistochemistry and western blotting showed that there was positive expression within the subgranular zone (SGZ) of injection of hippocampus and dentate gyrus. Compare to NS group, the expression of protein tau increased dramatically in Aβ group with highly significant difference(P<0.01).

5. RT-PCR showed that the expression of protein tau in Aβgroup was much dramatically higher than in NS group.

**Conclusions:**

1. The soluble oligomeric form of Aβinduces hyperphosphorylation of protein tau.

2. Aβactivates kinase cdk5 that promotes phosphorylation of protein tau.

3. This study shows that Aβ42 may be the starting factors in the pathological process to AD

**Key words:** Amyloid-β; Protein tau; Alzheimer's disease(AD)

序 **言**

阿尔茨海默症，又称老年痴呆，是一种发生在老年期或者老年前期的慢性渐进性中枢神经系统退行性疾病[1-3]。其主要的病理特征是细胞外出现淀粉样蛋白斑，神经元胞体内出现神经元纤维缠绕，突触减少，神经元丢失等，主要出现的位置是海马、大脑皮质和皮质下组织。因其病理改变主要出现在大脑中与记忆和学习相关的区域，所以患者前期主要表现为进行性记忆缺失和认知障碍等临床症状。

随着世界人口老龄化的进展，AD的发病率也随之增高。它严重影响了老年人的生存质量，不仅仅是个体疾病，因其带来的社会负担，已经成为一个严重的社会问题。研究显示，在65岁以上老年人群中，AD的患病率已高达13﹪，并且随着年龄的增长显著增高，成为继心血管病、脑血管病和癌症之后威胁人类健康的第四大杀手。据统计，我国AD的患病人口已超过500万，占全世界总患病人数的1/4，并且患病率在不断升高[4-7]。

目前AD的发病机制还不完全明确，针对其病理特征，研究者提出了众多可能的发病机制。1.胆碱能损伤机制[8, 9]。乙酰胆碱是一种神经递质，是由胆碱和乙酰辅酶

A在胆碱乙酰转移酶的催化下合成的，其与受体结合，传递神经冲动，之后被水解成胆碱和乙酸。中枢神经乙酰胆碱是保证学习和记忆工作正常进行的必要条件。研究显示，患老年痴呆病的人中Ach的含量明显下降，可达70%-80%。另有研究发现，Aβ的沉积可以增加乙酰胆碱酯酶的活性，造成Ach神经递质异常。当大脑皮质和海马区的Ach减少时，皮质和海马的神经生长因子释放减少，导致其营养作用丧失，并进一步导致了Aβ沉积，神经元纤维缠结（NFT）形成。如此循环，增加了Aβ的毒性作用。2. Aβ的神经毒性机制[10-17]。老年斑的出现是AD患者主要的病理特征之一。Aβ为老年斑的主要成分，其由39-42个氨基酸残基组成，是其前体蛋白（APP）降解产生。正常情况下，Aβ在大脑中仅有少量表达，其对不成熟、未分化的神经元细胞有神经营养作用。在AD患者大脑中，Aβ异常表达，表达量大大增加，其对已分化、成熟的神经元细胞有毒性作用。有研究指出，Aβ在脑内沉积是由于其产生和清除失去平衡导致代谢异常所致。正常情况下APP由α分泌酶裂解生成可溶性的αAPPS蛋白，在AD患者中APP先后经β分泌酶和γ分泌酶裂解生成Aβ，Aβ进一步聚集沉积，诱发AD.3. tau蛋白过度磷酸化机制[18-24]。神经原纤维缠结是AD的主要病理特征之一，其形成与tau蛋白的过度磷酸化有关。Tau蛋白是一种微管相关蛋白，其主要作

用是组成微管的重要成分，稳定细胞骨架，维持细胞的生长发育。在病理情况下，tau蛋白被过度磷酸化，导致其从微管结构上解离出来，其促进微管聚集、维持细胞骨架稳定的功能丧失，细胞结构改变，形成神经元纤维缠结及诱导了其他病理特征的出现。

4.氧化应激作用机制[25, 26]。发生在脑神经元和组织损伤之前的氧化应激在AD患者的发病过程中起到了重要作用。研究发现，在AD患者脑中，生物分子的过氧化损害涉及的范围较广，包括DNA和蛋白质氧化作用增强，脂质过氧化作用增强等。5.金属作用机制[27, 28]。研究表明，某些金属铁、铝、铜、锌等与AD患者的金属代谢、氧化还原作用、Aβ的聚集作用有密切关系。6.钙离子调节作用机制[29]。钙离子的调节主要影响了Aβ的代谢和tau蛋白的过度磷酸化。

在提出的众多发病机制中，Aβ学说和tau学说研究最为充分，两大学说对AD的发病机制都有其合理的解释，之间有相通之处。对于谁是发病的源头的问题存在争论。

Aβ学说是1992年Haredy和Higgins最先提出的，该学说认为由于APP代谢异常导致Aβ产量增多，降解减少，过量的Aβ堆积形成淀粉样斑块，淀粉样斑块进一步触发级联病理反应，例如tau蛋白的过度磷酸化、神经元纤维缠结、突触损伤、信号传递中断、神经元死亡等，AD发病，Aβ是发病的源头[30-32]。前期，Aβ致AD发生的研究主要涉及三个方面即氧化应激、炎症反应和神经元凋亡。1. Aβ与氧化应激。氧化应激主要是氧化系统的作用超过了抗氧化防御机制的制约，产生活性氧（ROS）增多，

ROS与脂质、蛋白质、核酸发生反应，损伤细胞功能。Aβ可产生ROS，也可通过多种途径诱导ROS的产生。ROS的氧化损伤机制是通过损伤细胞线粒体的功能，导致

ATP供应不足，致使神经元的功能受到伤害。2. Aβ与炎症反应、免疫反应。Aβ致AD的病因为Aβ代谢失衡，清除障碍。有研究显示，内源性的免疫缺陷可以导致Aβ清除降低。正常情况下，Aβ被脑内的先天性免疫细胞小胶质细胞（巨噬细胞）转运到溶酶体，单核细胞有效清除Aβ，AD病人中小胶质细胞不能够有效将Aβ转运至溶酶体，导致Aβ大量聚集。且另有发现小胶质细胞与Aβ原纤维丝发生作用，激活了细胞内信号转导级联反应，使炎症因子基因表达，促炎症因子IFN-γ、IL-1β、PGE2、TNF-α分泌增多，导致神经元死亡。3. Aβ与神经元凋亡。外源性死亡信号-受体途径、内源性线粒体途径是细胞凋亡的两大类途径，Aβ只要是通过线粒体途径引起神经元凋亡的。

Tau学说在AD发病机制的研究中也占有非常重要的地位[33-39]。神经原纤维缠结

（neurofibrillary tangles, NFT）是AD脑中最经典的组织病理变化之一，作为NFT中的主要的蛋白成分tau蛋白受到了研究者的广泛关注。Tau蛋白基因位于17号染色体上，由单基因编码，全长100Kb，有16个外显子，其中11个编码tau蛋白。Tau蛋白是一种正常的生理蛋白，也是含量最高的微管相关蛋白，与微管结合，维持细胞骨架的稳定性。在AD患者脑中存在三种tau蛋白的形式，胞浆正常tau蛋白（C-tau）、可溶性异常磷酸化tau蛋白（p-tau）、异常聚集形成PHF的tau蛋白（PHF-tau），三种状态的tau蛋白可能代表着神经元纤维退化的不同阶段。高度磷酸化的tau蛋白是致使其功能损伤的最主要原因，目前AD患者脑tau蛋白的高度磷酸化被广泛研究。Tau蛋白的过度磷酸化受多种蛋白激酶和蛋白酯酶相对活性的影响，在AD的发病过程中，

多种蛋白激酶活性增加，例如糖原合酶激酶3β（GSK-3）、细胞周期蛋白激酶（5 CDK5）、

cAMP 依赖性蛋白激酶（PKA）、钙调蛋白依赖性的蛋白激酶Ⅱ（CaMK-Ⅱ）等。在

AD患者脑内发现的tau蛋白的磷酸化位点是特有的，例如Thr212 /Ser214、Thr231/Ser235、

Ser422等。过度磷酸化的tau蛋白主要是通过三个方面来影响tau蛋白的正常功能，最终导致神经元死亡。1、形成早期PHF/NFT,经过一系列变化形成晚期PHF/NFT，导致神经元死亡。2、异常过度磷酸化的tau夺取正常tau和其他微管相关蛋白，使微管结构不能正常形成，导致神经退行性病变发生。3、夺取微管结构上的tau，正常tau从微管上面解聚出来，微管结构破坏，细胞骨架变异，出现神经退行性病变，神经元死亡。

随着科学研究的不断深入，对AD病因认识的不断深入，由原来的Aβ、tau独立致病学说到近年来Aβ和tau蛋白联合致病学说越来越受到人们的关注。

早期的Aβ学说认为AD的发生是由于APP突变导致Aβ产量增加，代谢出现异常，形成老年斑和NFTs，研究者对于APP的代谢和其对神经元造成的影响做了很多的研究，但是Aβ的毒性机制仍不明确[40-47]。造成研究者困扰的问题主要有两个：Aβ在人体内存在多种形式，单体、低聚物和不溶性原纤维沉积，且Aβ是一种可塑性很强的蛋白，不同状态之间存在连续的互变，因此很难确定神经元的毒性作用是哪种形态的Aβ造成的；神经元是由细胞体、轴突、树突三部分构成，Aβ的毒性作用在AD发病的初期可能只局限于某个部位，因此很难针对某种病理特征（突触的丢失，细胞体和树突出现tau的量）做出一个总体的生物化学参数。Aβ的几种形态都有一定的毒性作用，前期的研究主要关注的是沉积形成的老年斑的Aβ的毒性，认为此种状态的

Aβ是AD的主要毒素，目前越来越多的研究表明低聚物状态的Aβ有更强的神经毒性，可能是主导Aβ神经毒性作用的主要类型，因此低聚物类型的Aβ成为关注的焦点。在体内，Aβ存在多种形态，从可溶性的游离态、寡聚态（oligomers）到中间状态的初原纤维（protofibrils）再到不溶性原纤维（fibrils）沉积。越来越多的研究发现可溶性寡聚态形式的Aβ（ADDLs）具有更强的神经毒性，可能是诱导神经元死亡及AD其它一系列病理特征的主要因素。淀粉样斑块的出现是因为Aβ由可溶到不可溶之间的平衡前移导致，或者可以认为淀粉样蛋白斑是Aβ的一种储存形式。ADDLs与tau蛋白的联系也更为密切，更为受到关注。有研究者提出Aβ诱导了tau蛋白过度磷酸化，tau蛋白的过度磷酸化反过来加强了Aβ的神经毒性。

在研究中发现，当给予表达人tau蛋白的转基因小鼠脑部注射ADDLs时，检测到tau蛋白的磷酸化程度明显增高。且共表达APP和人tau蛋白的转基因小鼠表现出了强烈的tau蛋白的磷酸化，明显表现出AD的临床表现，记忆缺失和智力下降。当给予anti-Aβ注射后，病理症状有所改善，且磷酸化水平降低。Selkoe等从AD病人的脑脊液中成功分离出可溶性Aβ的寡聚物，并应用于海马区神经元，发现神经元tau蛋白过度磷酸化，继而神经元细胞骨架改变，神经元死亡。由此可以得出Aβ诱导tau蛋白的过度磷酸化，且ADDLs可能是造成细胞骨架改变，神经元变性的主要原因。且Aβ诱导tau蛋白磷酸化的磷酸化位点与AD中枢系统中发现的tau蛋白的磷酸化位点AT8 、12E8相一致。

Tau蛋白是位于神经元轴突的一种功能蛋白，在神经元发育的初期位于细胞体，神经元发育成熟后移向轴突。当给与ADDLs处理时，发现tau蛋白移向树突。Tau蛋白移向树突后，导致神经元的某些生理特征发生改变。树突tau蛋白可以抑制细胞器的运输，ATP供应不足，突出联合衰退。研究发现接触ADDLs的神经元细胞比正常神经元细胞的突棘下降了大概75%。同时，ADDLs与神经元作用用后，在tau蛋白重新分布的区域，神经微管的数目也大大下降。所以说，ADDLs在一定程度上通过诱导tau蛋白的重新分布影响了神经元的功能，导致神经元细胞凋亡。

在Aβ影响tau蛋白功能的同时，tau蛋白又可以激发Aβ的神经毒性。正常情况下，tau蛋白被极化到轴突，也有少量tau蛋白被分布到树突，但并不影响神经元细胞的正常生理功能。有研究发现在AD病理情况下，tau蛋白在神经元细胞重新分布后参与了Aβ毒性机制。NMDA受体是离子型氨酸受体的一个亚型，具有调节神经元树

突轴突发育及突触可塑性的功能。NMDA受体磷酸化后可以与神经元树突上的骨架蛋白PSD95的相互作用加强，神经递质谷氨酸兴奋性升高，激发了Aβ的神经毒性。

NMDA受体的磷酸化是受Fyn调节的，Fyn是一种非受体络氨酸激酶，在完整tau蛋白的转运下到达树突。在AD病理情况下，tau蛋白被重新分布到树突，导致大量Fyn被转运到树突，NMDA受体磷酸化加强，Aβ毒性激发。

Fyn将细胞外的Aβ与细胞内的轴突蛋白tau及其少量的tau-Fyn结合物联系起来，为tau蛋白激发Aβ的神经毒性作用提供了证据，因此，有人提出Aβ-Fyn-tau体系，试图证明Fyn是Aβ与tau蛋白联系在一起的一个效应因子。Tau蛋白异常进入树突可能是由于Aβ影响了树突中激酶和磷酸酯酶的活性改变，导致tau重新分布及细胞骨架改变。

Tau蛋白进入树突后可能与Fyn继续作用，加强了Fyn的活性，NMDA受体的亚型NR2磷酸化加强，因此增强了突触对Aβ的敏感性，Aβ毒性加强。Tau蛋白和Fyn在树突共区域化及其在生理条件下作用方式的发现是否与AD再起的病因有关还有待进一步的研究，因此要达到运用Tau-Fyn相互作用治疗疾病的目的，还需要研究更多关于tau蛋白间接运输Fyn到达树突的机制及其这种机制对正常神经元的影响[48-55]。

Aβ学说和tau学说都存在其合理与不足的方面，两大学说由独立走向联合是对AD病理机制研究更为透彻的体现。但是，到底在AD的发病过程中谁才是其源头，是Aβ诱导了tau的变化，还是tau引起了Aβ的毒性的问题还存在很大争议。目前，研究者通过神经元细胞培养的方法，给予Aβ后，发现了tau蛋白过度磷酸化，进而神经元细胞骨架破坏，细胞死亡。且在表达人tau蛋白转基因小鼠脑部注射Aβ时，观察到tau蛋白过度磷酸化出现[27, 28]。共表达APP和tau的转基因小鼠表现了强烈的

tau蛋白过度磷酸化特征，当给与anti-Aβ治疗时，tau蛋白的磷酸化水平降低，敲除

tau基因后，小鼠的记忆缺失有所改善[29]。由此，我们提出假设，Aβ是AD发病的最原始因素，由于其代谢异常，导致其在脑内的存在量增多，期间有部分被以不溶性原纤维的形式存储起来，即AD的主要病理特征之一淀粉样蛋白斑，也就是通常所说的老年斑。另一部分是以寡聚物形式存在的Aβ，此部分Aβ的毒性作用最强，可能是

AD病情进展的主要因素，其中起主要作用的是可溶性寡聚肽形式的Aβ，即ADDLs，

ADDLs的存在进一步导致了tau蛋白过度磷酸化，过度磷酸化后的tau蛋白从神经微管上脱落下来，游离tau蛋白增多，同时tau蛋白的主要生理功能组成神经元细胞微管结构，维持细胞骨架稳定丧失，由此产生了大量神经元纤维缠结，即AD的另一大

病理特征。且在Aβ诱导tau蛋白过度磷酸化的过程中某些磷酸化激酶被激活，即Aβ

激活了磷酸化激酶，磷酸化激酶催化tau蛋白过度磷酸化。

据此，本研究以Aβ—intrahippocampal injection为依托，建立模拟AD病理的动物模型。检测Aβ的毒性机制，及其激活磷酸化激酶及其tau蛋白磷酸化的情况。实验结果如果表明了以上观点，则对AD病理机制的研究是一重大补充，也将对AD的治疗提供锲机。

# 材料与方法

## **1.** 实验材料

### **1.1****.** 主要仪器及试剂

1.1.1.仪器

|  |  |
| --- | --- |
| ST-3ND 型脑立体定位仪 | 成都仪器厂 |
| 78001 型颅钻 | STRONG/Korea |
| STW-3 万向微推进器 | 成都仪器厂 |
| 25μl 平头微孔进样器 | 上海高鸽工贸有限公司 |
| KDS Model 310 Plus 微量进样泵 | 美国 KD Scientific |
| 752 紫外可见分光光度计 | 上海菁华科技仪器有限公司 |
| JJ660Y 型精密电子天平 | 常熟双杰测试仪器厂 |
| JA2003A 电子天平 | 上海精天电子仪器厂 |
| WD-9405B 型水平摇床 | 北京市六一仪器厂 |
| TGL-16G 台式离心机 | 上海安亭科学仪器厂 |
| 3H16RI 台式智能高速冷冻离心机 | 湖南赫西仪器装备有限公司 |
| TECAN TYPE 酶标仪 | 瑞士 TECAN 公司 |
| 420 恒温水箱 | 江苏省金坛市宏华仪器厂 |
| GZX-9240MBE 电热恒温鼓风干燥箱 | 上海博讯实业有限公司 |
| SZ-97 自动三重纯水蒸馏器 | 上海亚荣生化仪器厂 |
| 恒温生化培养箱 | 宁波江南仪器厂 |
| 01J2003-04 型立式压力蒸汽灭菌器筒 | 上海东亚压力容器制造有限公司 |
| 生物组织自动脱水机 | 金华市益迪医疗设备 |

|  |  |
| --- | --- |
| 生物组织自动包埋机 | 金华市益迪医疗设备 |
| 切片机 | 金华市益迪医疗设备 |
| 摊片机 | 金华市益迪医疗设备 |
| CX21 光学显微镜 | 日本 OLYMPUS |
| BX-51 OLYMPUS 荧光显微镜 | 日本 OLYMPUS |
| 数码相机 | 佳能 |
| EPS300 电泳仪 | 上海天能科技有限公司 |
| VE-186 转移电泳槽 | 上海天能科技有限公司 |
| VE-180 垂直电泳槽 | 上海天能科技有限公司 |
| FastPrep-24 匀浆机 | MP 公司 |
| LX-100 手掌型离心机 | 江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司 |
| R1011122 Rotor-Gene QPCR 仪 | QIAGEN 公司 |
| Ultra Pure UF 纯水系统 | 上海和泰仪器有限公司 |
| YXQ-LS-30SⅡ型立式压力蒸汽灭菌器 | 上海博迅实业有限公司医疗设备厂 |
| GL-3250A 磁力搅拌器 | 江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司 |
| SKG-01 电热恒温干燥箱 | 湖北省黄石市医疗器械厂 |
| HH.W21Cr420 型 电子恒温水温箱 | 广东省汕头市医用设备厂 |
| AIR TECH 超净台 | 苏州净化集团有限公司 |
| TGL-16G-A 冷冻离心机 | 上海安亭科学仪器厂 |
| HARRIS ELT-13V-85V34 005L-515999-OL | 超低温冰箱 Revco Technologlies Asheville Nc  USA |

**1.1.2. 试 剂**

|  |  |
| --- | --- |
| Beta-Amyloid 1-42 | ANASPEC |
| Pentobarbital natrium | SERVA |
| Haematoxylin | Fisher Scientific |
| Glycine | MDBio |
| TWEEN 20 | AMRESCO |
| Tris Base | MBCHEM |
| APS | Sigma |

|  |  |
| --- | --- |
| SDS | SERVA |
| Milk，Non-Fat Powder | MBCHEM |
| 30%Acrylamide/Bis | BIO-RAD |
| 5-Brdu | Sigma |
| TEMED | Sigma |
| BSA | MBCHEM |
| PageRuler Plus Prestained Protein Ladder | Fermentas |
| SuperSignal West Pico | Thermo Scientific |
| Rabbit polyclonal to beta Amyloid 1-42 | Abcam |
| Goat polyclonal to Doublecortin(C-18) | Santa Cruz |
| Rabbit polyclonal to NF-κB | Santa Cruz |
| HRP-Donkey anti-rabbit IgG | Protein Tech |
| HRP-Donkey anti-goat IgG | Protein Tech |
| HRP-Donkey anti-mouse IgG | Protein Tech |
| Mouse anti Brdu | 中杉金桥生物技术有限公司 |
| Mouse anti β-Actin | 博士德生物工程有限公司 |
| Rabbit anti IFN-γ | 博士德生物工程有限公司 |
| SABC-POD/AP kit-小鼠/兔/ft羊 | 博士德生物工程有限公司 |
| DAB | 博士德生物工程有限公司 |
| AEC | 博士德生物工程有限公司 |
| BCIP/NBT | 博士德生物工程有限公司 |
| RIPA 裂解液（中） | 碧云天生物技术研究所 |
| PMSF | 碧云天生物技术研究所 |
| Western 一抗二抗去除液 | 碧云天生物技术研究所 |
| SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 5× | 碧云天生物技术研究所 |
| BCA-100 蛋白质定量测定试剂盒 | 上海博彩生物科技有限公司 |
| 0.9%生理盐水 | 佛ft双鹤药业有限责任公司 |
| 25%氨水 | 天津市富宇精细化工有限公司 |
| 95%乙醇 | 天津市富宇精细化工有限公司 |

|  |  |
| --- | --- |
| 30%过氧化氢 | 天津市百世化工有限公司 |
| Na2HPO4·12H 2O | 天津市百世化工有限公司 |
| NaH2CP4·2H 2O | 天津市福晨化学试剂厂 |
| NaCl | 天津市广成化学试剂有限公司 |
| 柠檬素三钠 | 天津市福晨化学试剂厂 |
| 柠檬酸 | 天津市化学试剂三厂 |
| 二甲苯 | 天津市富宇精细化工有限公司 |
| 无水乙醇 | 天津市百世化工有限公司 |
| 甲醇 | 天津市百世化工有限公司 |
| 多聚甲醛 | 天津市百世化工有限公司 |
| 醇溶性署红 Y | 天津市百世化工有限公司 |
| 通用显影粉 | 天津市世纪奥博商贸有限公司 |
| 酸性定影粉 | 天津市世纪奥博商贸有限公司 |
| 中性树胶 | 中国上海标本模型厂 |
| 注射用青霉素钠 | 华北制药股份有限公司 |

### **1.2** ．实验动物

SPF级BALB/c-wild type野生型小鼠（BALB/c-WT）54只，雄性，10周龄，体重25-35g，购买于广州中医药大学实验动物中心，许可证号。饲养两周后，进行Aβ-intrahippocampal injection动物模型制备。

实验分为三组：实验组BALB/c-WT+Aβ1-42，对照组BALB/c-WT+NS，空白组不做任何处理。实验组动物在海马CA1区注射Aβ1-42，对照组在海马CA1区注射

NS。每组18只。

## **2.** 试验方法

### **2.1.** 动物模型的建立

**2.1.1.** **Aβ1-42的孵育**

将Aβ1-42冷冻干粉（购于AnaSpec,0.5mg）溶于100μl 1%NH4OH溶液中，制得浓度为5μg/μl的储备液stock solution，分装后置于-20℃保存。用时加入无菌生理盐水

（NS），稀释至工作浓度2μg/μl，置恒温培养箱中，37℃孵育24小时以上，使其成为Aβ

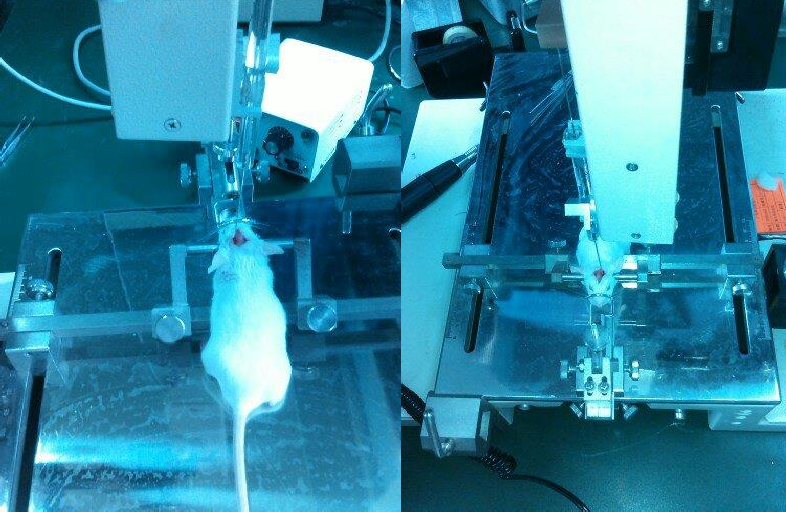
寡聚态(Aβoligomers, referred to as ADDLs, for Aβ-derived diffusible ligands)[**错误！未定义书签。**,

**错误！未定义书签。**]。

2.1.2．动物模型的制备（Aβ-intrahippocampal injection）

术前，0.4%戊巴比妥钠，每10g体重0.2ml，腹腔注射麻醉小鼠。几分钟后，待小鼠完全麻醉，头顶部去毛后，用脑立体定位仪固定小鼠头颅，确保颅骨水平位，

75%酒精消毒皮肤，颅骨正中切口剥开皮下腱膜，暴露前颅。参照小鼠脑立体定位图谱，于中线左右旁开1.8mm，前颅后2.3mm，颅钻打孔。微量进样器子颅骨表面垂直进针2.0mm，每侧海马注射2μl，进样速度为0.8μl/min。实验组注射可溶寡聚肽形式的Aβ1-42，注射浓度为2μg/μl，对照组注射等量无菌生理盐水。注射完毕之后，留针



4min，后缓慢退针。缝合伤口后，每天给予青霉素钠肌注4万单位每只，大约3-4天后停止。整个过程无菌操作。

### **2.2.** 动物的取材

分别选取术后7d、14d、21d三个时间点，分批取材，每批每组六只小鼠。操作按统一步骤：先行04%戊巴比妥钠麻醉，断头处死后，小心剥离出小鼠的大脑其中六只存于4%多聚甲醛中，固定后用于组织学检测，另六只在大脑中再剥离出海马组织，迅速存于-80℃冰箱，用于蛋白印迹检测及其RT-PCR的蛋白检测。

### **2.3.** 组织形态学检测

**2.3.1组织形态学检测所用试剂配制**

**苏木素染液**：苏木素，0.5g 硫酸铝铵，5g 碘酸钠，0.1g水合氯醛，25g 柠檬酸，0.5g 蒸馏水，500ml

配置时，将苏木素加入到煮沸的蒸馏水中，搅拌，使之充分溶解后，再依次加入硫酸铝铵和碘酸钠，待全部溶解后，再加入水合氯醛和柠檬酸，加热煮沸5min，冷却后过滤，放置12h后即可使用。用该染液染色后，不需要分化，充分水洗蓝花后即可伊红复染。 **1%伊红染液**：醇溶性伊红，1g 95%酒精，100ml

将伊红将入到已定量的95%酒精中，用时摇匀。

**0.01M柠檬酸盐缓冲液**：柠檬酸三钠，3g 柠檬酸，0.4g 蒸馏水，1000ml用1N盐酸溶液调节PH至6.0，可加入0.5mlTWEEN20，混合制成

CBS-0.05%TWEEN20，增强效果，且柠檬酸盐缓冲液应现配现用。**0.01M PBS：**氯化钠，8g 氯化钾，0.2g 磷酸氢二钠，3.58g磷酸二氢钠，0.24g 蒸馏水，900ml

将已称量好的氯化钠、氯化钾、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠依次加入到量筒中，加入少量蒸馏水，使之全部溶解，最后定容至900ml, 0.1N氢氧化钠调节PH至7.4。

**3%双氧水**：30%双氧水，20ml 蒸馏水

将30%双氧水倒入量筒中，加入蒸馏水定容至200ml。

**4%多聚甲醛**：多聚甲醛，40g 0.1M PBS

称取40g多聚甲醛，置1000ml烧杯中，加入500ml0.01M PBS,加热至60℃左右，保持搅拌，使粉末完全溶解，滴加少许1N氢氧化钠使溶液清亮，并调节PH至7.2，补足PBS至1000ml，充分混匀，过滤，室温保存。

**1N氢氧化钠溶液**：氢氧化钠，4g 双蒸水称取4g氢氧化钠溶于100ml双蒸水中。

**2.3.2．组织的包埋和切片**

将4%多聚甲醛中固定好的组织取出（在4%多聚甲醛中固定48h），冠状面俢切至海马区附近修出一个平面，做好标签，至脱水框中，冲水，将表面甲醛冲净（冲水

3h）。然后置于生物组织自动脱水机中，进行脱水，透明，进蜡处理。

**组织自动脱水时间：**75%酒精，5h→80%酒精，6h→95%酒精Ⅰ，4h→95%酒精Ⅱ，

4h→95%酒精Ⅲ，4h→100%酒精Ⅰ，3h→100%酒精Ⅱ，2h→二甲苯Ⅰ，1h→二甲苯

Ⅱ，1h→低熔点蜡（48-50℃），0.5h→中熔点蜡（54-56℃），1h→高熔点蜡（60-62℃），

2h。

**组织包埋：**提前1h打开自动包埋机，将包埋机进入运行状态，等组织自动脱水完成后，将已溶的高熔点蜡倒入铜制包埋框中，将组织放入其中，切面朝下，放正，贴好标签。待石蜡全部凝固后，推出石蜡。

石蜡组织切片：切片厚度为6μm，每60μm取一张切片，为一套切片。在40-45℃温水中展片，捞片后晾干，洁净存放。

**2.3.3.** **苏木素-伊红染色（HE染色）**

**脱水至蜡：**二甲苯Ⅰ，10min→ 二甲苯Ⅱ，10min→100%酒精Ⅰ，5min→100%酒精

Ⅱ，5min→95%酒精，5min→90%酒精，5min→80%酒精，5min→70%酒精，5min→50%酒精，5min→ddH2O洗三次

**苏木素染色：**Mayer's Hematoxylin 10 min

**冲水返蓝：**流水冲洗4min，显微镜下观察至染色效果最佳，ddH2O洗三次脱水：50%酒精，2min→70%酒精，2min→80%酒精，2min→90%酒精，2min**伊红复染：**1%伊红8s

**洗涤：**95%酒精Ⅰ，95%酒精Ⅱ

**脱水透明：**100%酒精Ⅰ，5min→100%酒精Ⅱ，5min→二甲苯Ⅰ，10min→ 二甲苯Ⅱ，

10min

中性树胶封片

显微镜下观察结果并拍照。

**2.3.4.** **免疫组织化学检测-SAB 法**

**脱水至蜡：**二甲苯Ⅰ，10min→ 二甲苯Ⅱ，10min→100%酒精Ⅰ，5min→100%酒精

Ⅱ，5min→95%酒精，5min→90%酒精，5min→80%酒精，5min→70%酒精，5min→50%酒精，5min→ddH2O洗三次

**抗原修复：**置0.01M柠檬酸盐缓冲溶液中微波修复20min，自然冷却至室温，ddH2O

洗三次

**阻断灭火内源性过氧化物酶：**3%双氧水，室温 20min, PBS 洗 3\*5min **5%BSA封闭液封闭：**将5%BSA封闭液盖过组织，放入湿盒内，37℃，40min，倾去勿洗

**滴加一抗：**一抗为Rabbit anti-Aβ，1: 200；Rabbit anti-cdk5,1:100;

Rabbit anti-p-tau，1:300，对照为PBS,将抗体或PBS盖过组织，4℃孵育过夜或隔天，

PBS洗3\*5min

**滴加生物素标记二抗：**37℃孵育2h, PBS漂洗3\*5min

**滴加SABC:** 辣根过氧化物酶（horse radish peroxide, HRP）标记的链霉亲和素工作液，

37℃孵育1h, PBS漂洗3\*5min

**显色：**DAB显色，约2-5min，镜检，ddH2O冲洗，终止染色

**复染：**苏木素复染，1-2min，冲水返蓝1-2min，镜检观察至最佳染色效果，ddH2O冲洗

**脱水：**50%酒精，2min→70%酒精，2min→80%酒精，2min→90%酒精，2min→100% 酒精Ⅰ，5min→100%酒精Ⅱ，5min→二甲苯Ⅰ，10min→二甲苯Ⅱ，10min

封片

**图像分析：**免疫组化的组织切片在OLYMPUS BX51显微镜（带成像系统）光镜下观察结果并拍照，用Image pro-plus6.0图像分析系统软件测量阳性细胞个数，阳性细胞免疫反应产物的积分光密度和有效目标分布区域，用于统计学分析。

**2.3.4. 免疫组织化学检测-免疫荧光**

**脱水至蜡：**二甲苯Ⅰ，10min→ 二甲苯Ⅱ，10min→100%酒精Ⅰ，5min→100%酒精

Ⅱ，5min→95%酒精，5min→90%酒精，5min→80%酒精，5min→70%酒精，5min→50%酒精，5min→ddH2O洗三次

**抗原修复：**置0.01M柠檬酸盐缓冲溶液中微波修复20min，自然冷却至室温，ddH2O

洗三次

**阻断灭火内源性过氧化物酶：**3%双氧水，室温20min, PBS洗3\*5min

5%BSA封闭液封闭：将5%BSA封闭液盖过组织，放入湿盒内，37℃，40min，倾去勿洗

**滴加一抗：**一抗为Rabbit anti-Aβ，1: 200；Rabbit anti-cdk5,1:100;

Rabbit anti-p-tau，1:300，对照为PBS,将抗体或PBS盖过组织，4℃孵育过夜或隔天，

PBS洗3\*5min

**滴加二抗：**滴加荧光标记的二抗rabbit anti-Ig，避光孵育2h, PBS漂洗3\*5min

**封片：**滴加带有防猝灭剂的免疫荧光封片剂，封片

**图像分析：**免疫组化的组织切片在OLYMPUS BX51显微镜（带成像系统）光镜下观察结果并拍照，用Image pro-plus6.0图像分析系统软件测量阳性细胞个数，阳性细胞免疫反应产物的积分光密度和有效目标分布区域，用于统计学分析。

### **2.4.** 蛋白印迹检测

**2.4.1.** **相关溶液配制**

**10%SDS:**10gSDS溶于100mlddH2O中，室温放置。

**10%APS（过硫酸铵）：**0.1gAPS溶于1ml ddH2O中，溶解后4℃保存，一周可用。**分离胶缓冲母液：**1.5mol/L Tris-buffer，PH8.8, 18.16gTris base溶解在80ml水中用浓盐酸调节PH至8.8，待溶液恢复至室温再用6M的盐酸调节PH至8.8，最后加水至100ml，室温保存。

**浓缩胶缓冲母液：**1.0mol/L Tris-HCl，PH6.8, 12.12gTris base溶解在80ml水中用浓盐酸调节PH至6.8，待溶液恢复至室温再用6M的盐酸调节PH至6.8，最后加水至100ml，室温保存。

**Tris-甘氨酸电泳缓冲液：**running buffer，PH8.3, Tris base 15.15g和93.85g甘氨酸溶于900ml水中，然后加入5gSDS再加水至1000ml，制成5×Stock. 使用时，加水按1:

4稀释，室温保存，反复利用不超过三次。

**转移缓冲液：**transfer buffer，PH8.5, 74.5g甘氨酸和15gTris base加水定容至1000ml。制成5×stock。使用时5×stock：甲醇：水按1; 1; 3的比例稀释，室温保存，反复利用不超过三次。

**10×TBS:** Tris Buffered Saline，24.2gTris base和80g氯化钠加入到水中，定容至

1L, HCl调节PH至7.6。用时按1: 9稀释。

**2.4.2.** **蛋白质的提取**

将冻存的海马组织取出转移至冰上，每只冻存管中加入1mM 蛋白酶抑制剂

PMSF的RIPA裂解液500μl，冰上匀浆，至充分裂解，冰冻离心机12000rpm离心5min，取上层清液，即为蛋白溶液，表几分装后，-80℃保存。

**2.4.3.** **蛋白质定量**

使用BCA-100 蛋白质定量测定试剂盒（博彩），测定所提蛋白样品浓度。待测样品按1: 20稀释，BSA标准品梯度和样品均用RIPA裂解液配制，每个反应准备3个平行测定。反应在96孔板中进行，37℃保温30min，冷却至室温后，利用TECAN TYPE

酶标仪(Sunrise Remote/ TonchScreen)测定562nm的OD值。操作按说明书进行，根据标准品浓度-OD值绘制标准曲线，计算待测样品浓度。

**2.4.4.** **Western Blot实验过程**

**SDS-PAGE：**按每孔上样蛋白含量为30μg，计算不同浓度样品所需体积，后用裂解液补足20μl，然后与5×loading buffer 5μl混匀，95-100℃热变性处理5min，瞬时离心后上样样本加于SDS-PAGE凝胶中，每孔上样总体积20ul，预染marker上样5μl，剩余孔由1×loading buffer等体积填充。然后进行SDS-PAGE凝胶电泳，浓缩胶80V恒压，分离胶

120V恒压。

**转膜：**待目标条带跑开后，终止电泳，即刻进行转膜处理，冰盒中电转，100V恒压，

90min，将蛋白条带转至PVDF膜上。

封闭：转膜后，TBST漂洗3×10min，转至5%的脱脂奶粉-TBST封闭液中，室温封闭1小时。

**一抗孵育：**将膜加入对应的一抗（由1%的脱脂奶粉-TBST稀释，Rabbit polyclonal to NF-κB, 1/500; Rabbit anti IFN-γ，1/500; Mouse antiβ-Actin, 1/1000;）中于4℃孵育过夜。TBST漂洗3×10min 。

**二抗孵育：**将膜加入相应的二抗（由TBST稀释，HRP-Donkey anti-rabbit IgG, 1/1000; HRP-Donkey anti-mouse IgG, 1/1000）室温孵育1小时。TBST漂洗3×10mi n。

化学发光、显影、定影：加ECL化学发光底物于PVDF膜上，反应2min，可在塑料保鲜膜上进行，反应完成后，将PVDF膜移至新的保鲜膜上，去尽残液，包好，置于胶片暗盒中，蛋白面朝上。在暗室中，用胶片曝光，显影，水洗，定影。自来水冲洗后，室温晾干。

所有样本的Western Blot实验均重复至少3次以上。

### **2.5.** **RT-PCR**检测

**2.5.1.** **相关溶液配置**

**0.5mol/L, PH8.0的EDTA溶液：**将37.2g EDTA-Na加入160mL蒸馏水中，在搅拌器上剧烈搅拌。在用NaOH 调节溶液PH值至8.0（约需4gNaOH）。用蒸馏水定容至200mL。后送至高压灭菌，室温保存。

**0.1%DEPC水：**1 ml DEPC加1000ml双蒸水，混匀，过夜。然后高压灭菌。

# **10** **×TE Buffer(pH8.0)**：100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA，1M Tris-HCl(pH8.0) 100 ml

加入20 ml 0.5M EDTA(pH 8.0)，向烧杯中加入约800 ml的去离子水，均匀混合。将溶液定容至1 L后，高温高压灭菌，室温保存。1×TE Buffer用双蒸水10倍稀释。

## **2.5.2.** 实验过程

**总RNA的提取（Trizol法提取）**

收集到生物材料之后，最好能即刻进行RNA制备工作。若需暂时储存，则应以液氮将生物材料急速冷冻后，储存于-80℃冷冻柜。在制备RNA时，将储存于冷冻柜的材料取出，不可以先行解冻，以避免RNase的作用。

1. 提取组织RNA时，每50～100mg组织用1mL Trizol试剂于玻璃匀浆器中对组织进行裂解；将上述组织的Trizol裂解液转入EP管中，在冰上放置10分钟；

2. 在上述EP管中，加入0.2mL氯仿（4℃），盖上EP管盖子，充分颠倒混匀，在冰上放置1～5分钟后，12000g（4℃）离心10分钟；

3. 取上层水相置于新EP管中，加入等体积的异丙醇，充分混匀，在冰上放置10分钟，沉淀RNA，12000g（4℃）离心10分钟；

4. 弃上清，加1mL 75%乙醇进行洗涤，12000g（4℃）离心5分钟，弃上清，尽量吸取管壁上的液体；

5. 敞开管口，让沉淀的RNA在室温下自然干燥5-10分钟；加20μLDEPC处理的高压消毒纯水溶解RNA沉淀，RNA溶液可保存于-70℃或液氮中。

**逆转录（RT）**

1. 准备1.5 mL的EP管；

2. 冰上操作：在EP管中加入0.1-5µg模板RNA，1µL Oligo(dT) 18引物，DEPC水定容至12µL，短暂离心；

3. 70℃水浴5分钟后，冰上冷冻；

4. 短暂离心后，冰上操作：加入4µL 5×First -Strand Buffer，1µL Ribolock TM

Ribonuclease Inhibitor, 2µL(10mmol) dNTP mix ；

5. 短暂离心，37℃水浴5分钟，加入1µL (200U/µL) ReverAid M -MuLV反转录酶（总反应体积20µL）；

6. 42℃水浴60分钟进行反转录；

7. 70℃水浴10分钟灭活逆转录酶，终止反应，再冰上冷冻；

8. -20℃保存，或立即进行qPCR。

**荧光实时定量RT-PCR反应（Real-time RT-PCR）**

1. 准备200μL PCR反应管

2. 依次在管中加入：（30μL反应体系），Rotor-Gene QPCR仪上反应。

|  |  |
| --- | --- |
| Real time PCR 反应体系 | Real time PCR 反应条件 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| DNA 模板 | 1μL | 预变性 95℃ 10min  变性 95℃ 15s  退火 60℃15s 40 循环延伸 72℃15s  Melt |
| SYBR Premix Ex TaqTMⅡ  （2×） | 15μL |
| 引物-1(10μM) | 0.5μL |
| 引物-2(10μM) | 0.5μL |
| ddH2O | 13μL |
| 总体积 | 30μL |

# 结果

## **1.** 组织形态学检测结果与分析

### **1.1.** Aβ**1-42-injection**、**NS-injection**和正常组组织形态学变化的比较

本研究通过向小鼠脑内海马区注射Aβ1-42（可溶寡聚态形式的Aβ），来模拟AD的主要病理特征。通过向小鼠相同部位注射NS作为对照，观察实验组和对照组形态结构上的变化。在各组HE染色脑组织切片中，如Figure 1所示，与正常组相比，生理盐水组的损伤部位主要位于注射后的创伤部位（Figure 1. B），其注射处除损伤组织外，无其他变化。实验组小鼠脑内有明显的Aβ斑块沉积（Figure 1. C），改组引起的炎症区域明显扩大，Aβ1-42在CA1区的沉积还引起了CA2、CA3区颗粒层神经元细胞的变异。该结果验证了Aβ1-42能诱导神经元变性的神经毒性作用。

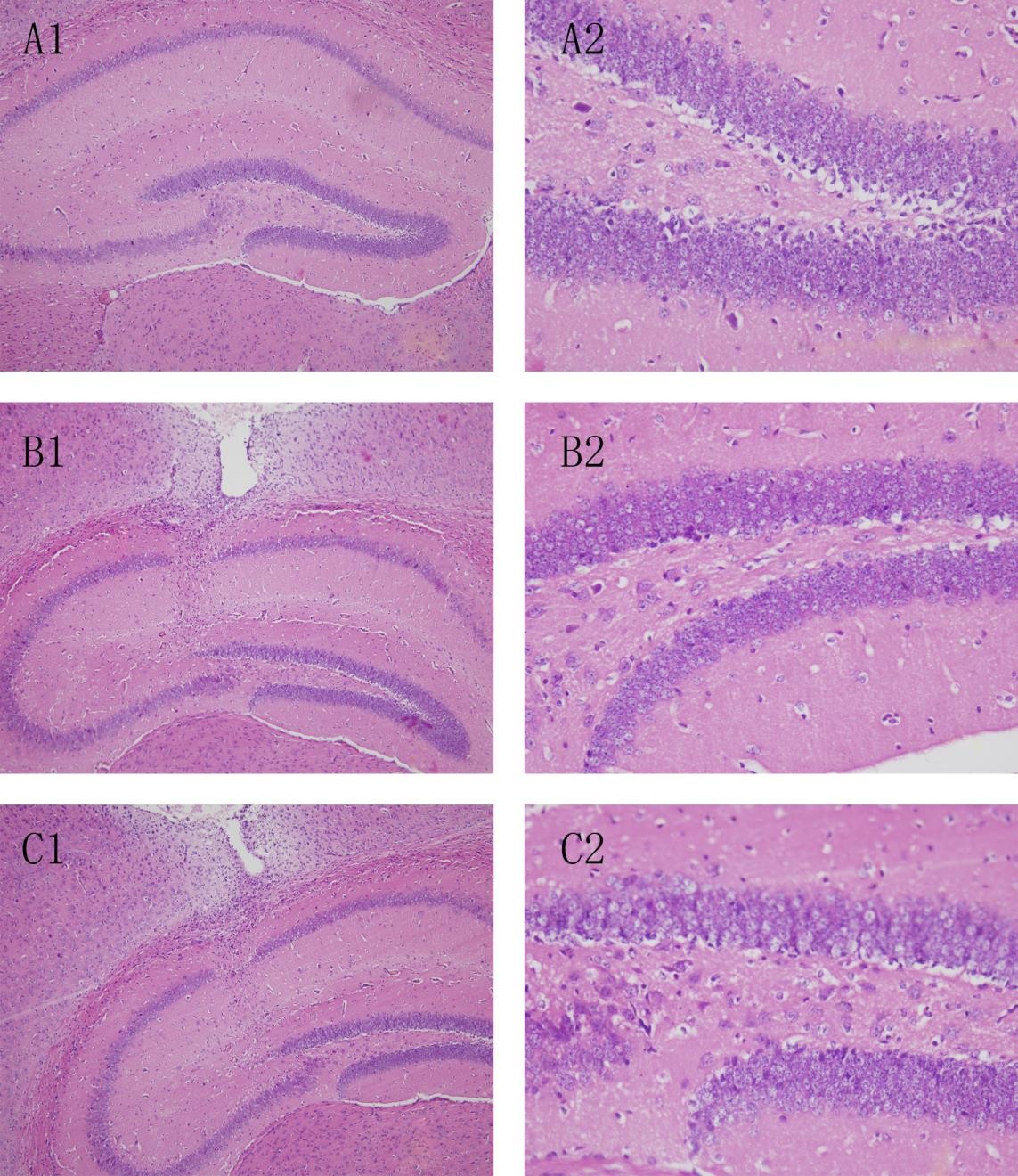


Figure 1. Aβ1-42-injection引发神经元变性

A. BALB/c小鼠正常组；B. NS-injection对照组；C. Aβ-injection实验组A2、B2、C2

分别为A1、B1、C1三组海马齿状回区的高倍放大图；均为HE染色。Scale Bar: A1、

B1、C1, 200um；A2、B2、C2, 50um。

### **1.2.** **ADDLs**在模型鼠脑内的沉积

研究指出，可溶寡聚态形式的Aβ（ADDLs）具有更强的神经毒性。本实验将

ADDLs注射到小鼠脑内海马区之后，7d取材观察实验组和对照组小鼠海马区Aβ和

NS的注射位置和沉积位置。如Figure 2所示，Aβ沉积主要存在于海马结构和皮质区。



Figure 2. Aβ1-42在小鼠脑内的沉积

A.实验组（BALB/c+Aβ1-42）；B.对照组（BALB/c+NS）; A2、B2分别为A1、B1的高倍放大图。IHC检测Aβ，DAB显色，苏木素复染。Scale Bar: A1、B1, 200um；

A2、B2, 50um。

### **1.3.** 各组小鼠**tau**蛋白磷酸化程度比较

Tau蛋白是一种微管相关蛋白，主要分布在轴突，具有稳定神经元稳定的作用。其AD的一大病理特征-神经元纤维缠结（NFT）与tau蛋白的过度磷酸化密切相关，

AD病人的临床检测显示，tau蛋白总量和磷酸化tau蛋白（p-tau）的含量在AD病人的血液和脑脊液中都明显高于同龄正常及非神经疾病患者。本实验通过免疫荧光检测Aβ1-42-injection、NS-injection组tau蛋白磷酸化的程度，与NS-injection组相比较，在海马齿状回和CA1区，Aβ1-42-injection组tau蛋白过度磷酸化的水平明显升高。与此可见，Aβ1-42促进了tau蛋白的过度磷酸化。



Figure 3. tau蛋白在各组小鼠脑内海马区CA1区的表达

A.对照组（BALB/c+NS）; B.实验组（BALB/c+Aβ1-42）；A、B 为小鼠海马区CA1区的图片；A1、A2、B1、B2分别为A、B的高倍放大图。红色荧光检测tau蛋白的表达。Scale Bar: A、B，200um；A1、B1, 100um；A2、B2, 50um。



Figure4. tau蛋白在各组小鼠脑内海马区齿状回的表达A.对照组（BALB/c+NS）; B.实验组（BALB/c+Aβ1-42）；A、B为小鼠海马区齿状回区域的图片；A1、B1分别为A、B的高倍放大图。红色荧光检测tau蛋白的表达。Scale Bar: A1、B1, 100um；A2、B2, 50um。

### **1.4.** 各组小鼠**cdk5**的表达情况分析

Cdk5 为细胞周期素依赖性蛋白激酶5，细胞周期素(cyclin)依赖性蛋白激酶

（CDK）家族成员，其异常可导致神经系统功能障碍并可能触发神经退行性疾病。Cdk5表达增多，可以促进tau蛋白的磷酸化。本实验通过免疫荧光检测Aβ1-42-injection、NS-injection组cdk5在海马区的表达情况，通过下图可以观察到在海马区SGZ和CA1区，cdk5在Aβ1-42-injection组中的表大量明显高于NS-injection组。由此可以推测，Aβ1-42可能通过激活促进tau蛋白磷酸化的激酶cdk5，而促使了tau蛋白的过度磷酸化，共同导致了AD的发生。



Figure5. cdk5在各组小鼠脑内海马区CA1去的表达A.对照组（BALB/c+NS）; B.实验组（BALB/c+Aβ1-42）；A2、A3、B2、B3 分别为A1、B1的高倍放大图。红色荧光检测cdk5的表达。Scale Bar: A、B，200um；A1、B1, 100um；A2、B2, 50um。



Figure6. cdk5在各组小鼠脑内海马区齿状回的表达A.对照组（BALB/c+NS）; B.实验组（BALB/c+Aβ1-42）；A1、A2分别为A、B的高倍放大图。红色荧光检测cdk5的表达。Scale Bar: A、B，100um；A1、B1, 50um。

## **2.** **wetern blot**检测结果与分析

为了进一步分析Aβ与tau蛋白共同致AD发生的机制，即Aβ可能通过激活了tau蛋白磷酸化的酶cdk5，而最终导致tau蛋白过度磷酸化，共同诱发了AD的发生，本实验利用western blot检测了cdk5及p-tau在各组海马的表达情况。由western blot灰度值分析的柱状图显示，p-tau蛋白在海马区的表达中，Aβ-injection组明显高于NS-injection组；cdk5的分析中同样显示Aβ-injection组明显高于NS-injection组。



A

120000

100000

80000

60000

40000

20000

0

tau

NS Aβ

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | | | | |
|  | | |  |  |
|  |  |  |

A1



B

cdk5

700000

600000

500000

400000

300000

200000

100000

0

NS Aβ

B1

Figure 6. tau和cdk5在各组海马内的表达

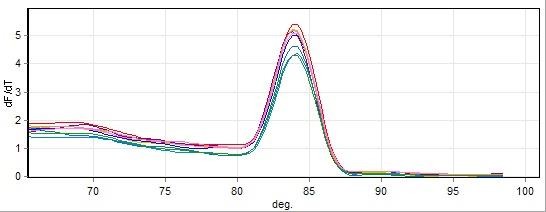
A．B分别为western blot检测tau和cdk5在各组海马内表达的结果，A1. B1分别为其对应的相对应灰度值分析（p﹤0.01）

## **3.** **rt-pcr**检测**tau**蛋白总量结果分析

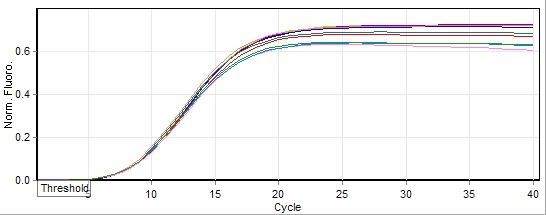
tau蛋白在神经元细胞的过度磷酸化会导致结合在神经微管上的tau蛋白解离出来，成为游离tau蛋白，tau蛋白总量增加。本实验通过RT-pcr技术检测各组Aβ1-42-injection、NS-injection组海马区tau蛋白含量的变化。

由分析结果显示，NS-injection组小鼠海马区tau蛋白总量与未经处理的对照小鼠表达量基本一致，而Aβ-injiction组tau蛋白的总量有明显增多。

**GAPDH MELT:**



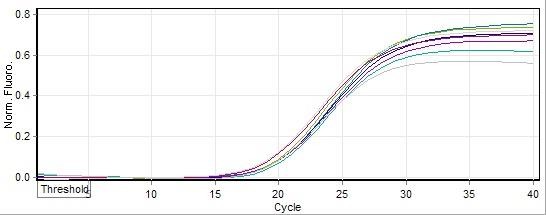
**GAPDH扩增曲线：**



**TAU MELT:**



**TAU扩增曲线：**



**（注：以1号样品为对照组）**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Sample | TAU 的 CT 值 | GAPDH 的 CT 值 | ⊿Ct | ⊿⊿Ct | Relative Quantity(2-  ⊿⊿Ct） |
| S-1 | 16.91 | 6.14 | 10.77 | 0 | 1 |
| S-2 | 16.99 | 6.15 | 10.84 | 0.07 | 0.952637998 |
| S-3 | 16.37 | 6.05 | 10.32 | -0.45 | 1.366040257 |

# 讨论

**1.** **Aβ与tau蛋白过度磷酸化**

Tau蛋白是存在于神经元微管中的一种微管相关蛋白，正常的tau蛋白含有两个磷酸分子，可分布于tau蛋白不同的位点。Tau蛋白由众多磷酸化位点，目前已被鉴定的

tau蛋白磷酸化位点有20多个，全部为丝氨酸残基（ser）或苏氨酸残基（Thr），主要分布在tau蛋白重复区附近的两个侧区内。

Tau蛋白的生物学功能是诱导与促进微管蛋白聚合成微管，且进一步与微管集合在一起，防止微管解聚，维持其结构稳定性，并通过与多种蛋白相互作用来行使其各种功能。

在AD中，其最主要的病理特征是老年斑（SPs）和神经原纤维缠结（NFTs）的形成，SPs的主要成分为Aβ，NFTs有双股螺旋纤维（PHF）和直丝（SF）构成，而PHF为主要成分。Tau蛋白是一种存在于神经系统的特异蛋白，是构成PHF的必需成分，过度磷酸化tau蛋白堆积是NFTs形成过程中最早期的细胞骨架改变之一。正常情况下，tau蛋白修饰只有2-3个磷酸集团，tau蛋白在磷酸化和去磷酸化之间保持平衡，调节细胞骨架的稳定。在病理情况下（AD），tau蛋白分子可连接9-10 个磷酸集团，形成高度磷酸化的tau蛋白，继而形成NFTs。高度磷酸化的tau蛋白失去了原有的生物学功能，其促进微管聚集、维持细胞骨架稳定的功能丧失，且从细胞微管上解离出来，与微管竞争结合正常的tau蛋白，使得游离高度磷酸化tau蛋白增多，具有正常生理功能的tau蛋白减少。Tau蛋白的过度磷酸化形成了AD的主要成分之一NFTs，神经元细胞骨架破裂，细胞凋亡，tau蛋白的过度磷酸化是AD等神经退行性疾病致病过程中的关键因素。

Aβ促进tau蛋白过度磷酸化很早就被研究者提出。Aβ存在多种状态，从游离态到到寡聚肽、淀粉样蛋白斑等。有研究指出寡聚肽形式的Aβ具有更高的毒性，且为AD病变过程中的重要因素。在表达人tau蛋白转基因小鼠脑部注射Aβ时，观察到tau蛋白过度磷酸化出现[27, 28]。共表达APP和tau的转基因小鼠表现了强烈的tau蛋白过度磷酸化特征，当给与anti-Aβ治疗时，tau蛋白的磷酸化水平降低，敲除tau基因后，小鼠的记忆缺失有所改善[29]。Selkoe等从AD病人脑脊液中分离出可溶性

Aβ寡聚物，其成分主要是Aβ二聚体，并将此种生理浓度下寡聚物形式的Aβ应用于海马区神经元。发现此种Aβ首先诱导了海马区神经元tau蛋白过度磷酸化，继而细胞骨架微管破裂，神经元变性[51-58]。

本实验以Aβ作为AD发病的初始因素，利用Aβ-injection的方法将ADDLs注入小鼠脑内，建立AD模型，在小鼠脑内海马区CA1区和齿状回发现tau蛋白被过度磷酸化，且整个海马区游离tau蛋白的量明显升高，Aβ和tau蛋白的紧密关系在在体试验中进一步被证明。这说明在AD的发病过程中，Aβ诱导了tau蛋白过度磷酸化，且可溶性寡聚肽形式的Aβ可能是造成细胞骨架变化，神经元毒性的主要因素。

**2.** **Aβ与cdk5表达的关系**

细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶5-cdk5是细胞周期素依赖的蛋白酶家族中一个特殊的成员，其不参与细胞周期调控。Cdk5几乎存在于整个中枢和外周神经系统的神经元，在一些大神经元如海马的锥体细胞、皮层神经元中表达更高。一般情况下，cdk5的转录和活性受到体内相关机制的调控。在神经元发育及成熟阶段，cdk5通过磷酸化神经元细胞骨架蛋白、信号分子等在神经元的迁移、分化、存活及突触的发生、信息传递、可塑性等方面发挥了重要作用。在某些病理条件下，cdk5的表达量增多，活性失调促进了神经元的凋亡，参与了AD、帕金森氏病（Parkinson's disease PD）、亨廷顿氏病（Huntington's disease HD）以及脊髓侧索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis

ALS）等神经退行性疾病的发生发展的过程。在CNS发育期间，cdk5参与了神经元的迁移、分化、轴突的生长及突触的发生等过程，在成熟的CNS中，cdk5通过磷酸化涉及突触传递、突触后结合效应等，参与了调节学习、记忆、痛觉感及药物成瘾等过程。有研究证实，cdk5参与了神经退行性疾病的病变过程。Cdk5的长期过表达可导致细胞死亡。Lopes等通过实验证实，Aβ可通过p25诱导cdk5活性增高，从而进一步是的

tau蛋白过度磷酸化，导致神经元变性，细胞死亡。有研究指出，在AD的发病过程中，除了Aβ代谢异常，tau蛋白过度磷酸化加重之外，cdk5的表达量也明显增高。最近的研究也发现其三者之间的关系联系紧密。Aβ被认为是AD发生的源头，其代谢异常导致脑内堆积过多的毒性较强的可溶性寡聚态形式的Aβ，然后又导致了其他一些列AD的病理特征出现，CDK5表达增多，tau蛋白过度磷酸化。

Aβ表达使cdk5活性增强。非周期素蛋白p35、p39特异性的存在于CNS中，被称为cdk5激活剂。P35主要分布于大脑皮层，p39主要分布于小脑，因cdk5激活剂p35、

p39分布的局限性限制了cdk5的激活主要存在于神经系统。在兴奋性刺激、Aβ、氧化应激等刺激下，经过钙蛋白酶作用，p35裂解成p25和另一片段，p25具备完备的激活

CDK5的功能，且半衰期比p35长5-10倍。P25-cdk5复合物裂解后缺乏膜锚定信号基

序，导致其在细胞内的定位发生改变，从而无节制的磷酸化其适宜底物，引发病变。

Cdk5导致tau蛋白磷酸化加重，一方面，cdk5可以直接磷酸化tau蛋白，另一方面，可通过调控作用于tau蛋白的激酶或磷酸酶发挥作用。有实验指出，将过表达p25的转基因小鼠与过表达人tau蛋白的转基因小鼠杂交，基因共表达的小鼠一些部位的tau蛋白被过度磷酸化。在皮层tau蛋白明显聚集，同时伴随NFTs增加，所以，cdk5对tau蛋白磷酸化异常相关疾病的发生和发展起着重要作用。在AD病人中，tau蛋白的一些磷酸化位点Ser199、Ser202、Thr205、Ser235、Ser404易被cdk5磷酸化[58-67]。

本实验通过Aβ-injection的方法将ADDLs注入小鼠脑内与学习记忆相关的区域海马区，发现cdk5在海马区齿状回和CA1区的表大量明显升高。这说明在在体试验中，

ADDLs激活了促进tau蛋白磷酸化的激酶cdk5，ADDLs促进tau蛋白过度磷酸化可能是通过激活tau蛋白磷酸化所需激酶cdk5进行的。

**3.** **AD的发病机制**

目前，AD是一种严重困扰人类健康的疾病，全球大约有2500万患者，且随着人口老龄化的影响，AD发病率急剧升高。AD的发病机制还不完全明确，针对其病理特征，研究者提出了各种假说。包括胆碱能损伤机制、Aβ神经毒性机制、tau蛋白磷酸化机制、氧化应激机制等。前期，Aβ毒性机制最为人们关注，即老年斑的主要成分

β淀粉样蛋白在特定脑区内聚集，引发神经毒性作用，造成突触损伤，神经元死亡，

AD发生。但进一步研究证实，在Aβ存在的各种状态中：可溶性的游离态、寡聚肽、初原纤维、不溶性原纤维沉淀，寡聚肽形式的Aβ具有更高的毒性。且有研究指出，在

AD患者发病过程中清除Aβ斑块，AD的病情并不能得到缓解。所以，导致AD发生的主要原因可能并非是由于代谢异常导致的Aβ沉积（老年斑），而是具有更高毒性的可溶寡聚肽形式的Aβ。且越来越多的研究发现此种形态的Aβ与其他病理特征有密切的联系。

Tau学说也是AD发病机制的重要组成部分。Tau蛋白是一种微管相关蛋白，其主要作用是组成微管的主要成分，稳定细胞骨架，维持细胞的生长发育等。在病理情况下，tau蛋白被过度磷酸化，过度磷酸化的tau蛋白竞争结合神经微管上的tau，且磷酸化后的tau蛋白失去结合能力，神经微管上的tau结合蛋白被解离下来，成为游离tau蛋白，其促进微管聚集、维持细胞骨架稳定的功能丧失，做为AD的一个重要的病理特征神经元纤维缠结的出现。Tau蛋白的过度磷酸化可能与某些酶有关，糖原合酶激酶3β

（GSK-3）、细胞周期蛋白激酶5(CDK5)、cAMP依赖性蛋白激酶（PKA）、应激激活蛋白激酶和钙、钙调蛋白依赖性的蛋白激酶Ⅱ（CaMK-Ⅱ）等都可影响tau蛋白的磷酸化。

目前，研究者最为关注的是AD的联合发病机制，即多种发病原因共同导致的AD的发生。其中Aβ和tau蛋白之间的关系最为被人们关注。在研究中发现，当给予表达人tau蛋白的转基因小鼠脑部注射ADDLs时，检测到tau蛋白的磷酸化程度明显增高。且共表达APP和人tau蛋白的转基因小鼠表现出了强烈的tau蛋白的磷酸化，明显表现出

AD的临床表现，记忆缺失和智力下降。当给予anti-Aβ注射后，病理症状有所改善，且磷酸化水平降低。Selkoe等从AD病人的脑脊液中成功分离出可溶性Aβ的寡聚物，并应用于海马区神经元，发现神经元tau蛋白过度磷酸化，继而神经元细胞骨架改变，神经元死亡。由此可以得出Aβ诱导tau蛋白的过度磷酸化，且ADDLs可能是造成细胞骨架改变，神经元变性的主要原因。且Aβ诱导tau蛋白磷酸化的磷酸化位点与AD中枢系统中发现的tau蛋白的磷酸化位点AT8 、12E8相一致[67-75]。

我们在试验小鼠的检测的发现进一步阐明了AD的发病可能是众多因素共同导致的结果，我们将可溶性寡聚肽形式的Aβ1-42作为AD发病过程中始发因素中的主要部分，注入小鼠的脑内，建立AD模型。在进一步的检测中发现了cdk5表大量明显上升，tau蛋白被过度磷酸化明显。ADDLs和tau蛋白的关系在体内实验中被进一步证实。

ADDLs在AD发生的过程中促进了tau蛋白过度磷酸化，可能是通过激活tau蛋白磷酸化所需激酶cdk5实现的。我们的实验为进一步阐明AD的发病机制提供了证据，也为AD的治疗提供了锲机，具有一定的意义。

结 论

1. 可溶性寡聚态形式的Aβ诱导了tau蛋白的过度磷酸化。

2. Aβ激活了促进tau蛋白磷酸化的激酶cdk5。

3. 本研究结果显示Aβ可能是致AD病理进程的始发因素。

参考文献

[1]. Dunn, L. B., et al.," Thinking about it for somebody else": Alzheimer's disease research and proxy decision makers' translation of ethical principles into practice. Am J Geriatr Psychiatry, 2013. 21(4): p. 337-45.

[2]. Epelbaum, J., [Abeta/tau soluble complexes to solve the insolvable question of Alzheimer's disease primary cause]. Med Sci (Paris), 2006. 22(5): p. 462-3.

[3]. Rialle, V., [Technology and Alzheimer disease]. Soins Gerontol, 2008(74): p. 26-8.

[4]. Octave, J. N., [The precursor of amyloid peptide in Alzheimer disease: a protein with multiple functions]. Bull Mem Acad R Med Belg, 2009. 164(7-9): p. 181-6; discussion 187-8.

[5] Kudo, Y., etal., 2-(2-[2-Dimethylaminothiazol-5-yl] ethenyl) -6- (2-[fluoro] ethoxy) benzoxazole: a novel PET agent for in vivo detection of dense amyloid plaques in Alzheimer's disease patients. J Nucl Med, 2007. 48(4): p. 553-61.

[6]. Patil, P. O., et al., A comprehensive review on synthesis and designing aspects of coumarin derivatives as monoamine oxidase inhibitors for depression and Alzheimer's disease. Bioorg Med Chem, 2013.

[7]. Salloway, S. and S. Correia, Alzheimer disease: time to improve its diagnosis and treatment. Cleve Clin J Med, 2009. 76(1): p. 49-58.

[8]. Alzheimer disease: Whole-brain imaging of the glymphatic system-a new strategy to investigate amyloid clearance in AD. Nat Rev Neurol, 2013.

[9]. Gambi, F., et al., Alzheimer patients treated with an AchE inhibitor show higher IL-4 and lower IL-1 beta levels and expression in peripheral blood mononuclear cells. J Clin Psychopharmacol, 2004. 24(3): p. 314-21.

[10] Selkoe, D. J., Alzheimer's disease. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. 3(7). [11]. Maarouf, C. L., et al., Alzheimer's disease and non-demented high pathology control nonagenarians: comparing and contrasting the biochemistry of cognitively successful aging. PLoS One, 2011. 6(11): p. e27291.

[12]. Pitt, J., et al., Alzheimer's-associated Abeta oligomers show altered structure, immunoreactivity and synaptotoxicity with low doses of oleocanthal. Toxicol Appl Pharmacol, 2009. 240(2): p. 189-97.

[13]. Maccioni, R. B., et al., Anomalously phosphorylated tau and Abeta fragments in the CSF correlates with cognitive impairment in MCI subjects. Neurobiol Aging, 2006. 27(2): p. 237-44.

[14]. Pul, R., R. Dodel and M. Stangel, Antibody-based therapy in Alzheimer's disease. Expert Opin Biol Ther, 2011. 11(3): p. 343-57.

[15]. Du J, et al., ApoE 4 reduces the expression of Abeta degrading enzyme IDE by activating the NMDA receptor in hippocampal neurons. Neurosci Lett, 2009. 464(2): p. 140-5.

[16]. Schott, J. M., et al., Apolipoprotein e genotype modifies the phenotype of Alzheimer disease. Arch Neurol, 2006. 63(1): p. 155-6.

[17] Ma, Q. L., et al., Beta-amyloid oligomers induce phosphorylation of tau and inactivation of insulinreceptor substrate via c-Jun N-terminal kinase signaling: suppression by omega-3fatty acids and curcumin. J Neurosci, 2009. 29(28): p. 9078-89. [18]. Hossain, S., et al., Binding of the Alzheimer amyloid beta-peptide to neuronal cell membranes by fluorescence correlation spectroscopy. Exp Mol Pathol, 2007. 82(2): p. 169-74.

[19]. Yoon, W. J., et al., Blockade of ionotropic glutamate receptors produces neuronal apoptosis through the Bax-cytochrome C-caspase pathway: the causative role of Ca2+ deficiency. J Neurochem, 2003. 85(2): p. 525-33.

[20]. Liang, J. H., et al., Catalpol protects primary cultured cortical neurons induced by Abeta(1-42) through a mitochondrial-dependent caspase pathway. Neurochem Int, 2009. 55(8): p. 741-6.

[21]. Lee, S. J., et al., Cell-to-cell transmission of non-prion protein aggregates. Nat Rev Neurol, 2010. 6(12): p. 702-6.

[22]. Kang, J. H., et al., Clinical Utility and Analytical Challenges in Measurement of Cerebrospinal Fluid Amyloid-beta1-42 and tau Proteins as Alzheimer Disease Biomarkers. Clin Chem, 2013.

[23]. Morgan, D., Cognitive Impairment in Transgenic Mouse Models of Amyloid Deposition. 2006.

[24]. Fu, Z., et al., Conformational analysis and parallel QM/MM X-ray refinement of protein bound anti-Alzheimer drug donepezil. J Chem Theory Comput, 2013. 9(3): p. 1686-1693.

[25]. Khurana, V. and M. B. Feany, Connecting cell-cycle activation to neurodegeneration in Drosophila. Biochim Biophys Acta, 2007. 1772(4): p. 446-56.

[26]. Hane, F., et al., Cu(2+) Affects Amyloid-beta (1-42) Aggregation by Increasing Peptide-Peptide Binding Forces. PLoS One, 2013. 8(3): p. e59005.

[27]. Karr, J. W. and V. A. Szalai, Cu(II) binding to monomeric, oligomeric, and fibrillar forms of the Alzheimer's disease amyloid-beta peptide. Biochemistry, 2008. 47(17): p. 5006-16.

[28]. Antequera, D., et al., Cytoplasmic gelsolin increases mitochondrial activity and reduces Abeta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. Neurobiol Dis, 2009. 36(1): p. 42-50.

[29]. Prohovnik, I., et al., Dissociation of neuropathology from severity of dementia in late-onset Alzheimer disease. Neurology, 2006. 66(1): p. 49-55.

[30]. Lin, M. S., et al., Dynamic fluorescence imaging analysis to investigate the cholesterol recruitment in lipid monolayer during the interaction between beta-amyloid (1-40) and lipid monolayers. Colloids Surf B Biointerfaces, 2009. 74(1): p. 59-66.

[31]. Unger, C., et al., Early changes in Abeta levels in the brain of APPswe transgenic

Mice--implication on synaptic density, alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine- and N-methyl-D-aspartate receptor levels. Mol Cell Neurosci, 2005. 30(2): p. 218-27.

[32]. Oikawa, N., et al., Gender effect on the accumulation of hyperphosphorylated tau in the brain of locus-ceruleus-injured APP-transgenic mouse. Neurosci Lett, 2010. 468(3): p. 243-7.

[33] Beecham, G. W., et al., Genome-wide association study implicates a chromosome 12 risk locus for late-onset Alzheimer disease. Am J Hum Genet, 2009. 84(1): p. 35-43. [34]. Yan, J., et al., Glucocorticoid receptor-ERK pathway contributes to ginsenoside Rg1 protection against beta-amyloid peptide-induced human endothelial cells apoptosis. J Ethnopharmacol, 2013.

[35]. Roe, C. M., et al., Improving CSF biomarker accuracy in predicting prevalent and incident Alzheimer disease. Neurology, 2011. 76(6): p. 501-10.

[36]. Anderson, D. F., Incorporating postleap checks in tau-leaping. J Chem Phys, 2008. 128(5): p. 054103.

[37] McCampbell, A., et al., Induction of Alzheimer's-like changes in brain of mice expressing mutant APP fedexcess methionine. J Neurochem, 2011. 116(1): p. 82-92. [38]. Amijee, H., et al., Inhibitors of protein aggregation and toxicity. Biochem Soc Trans, 2009. 37(Pt 4): p. 692-6.

[39]. Takahashi, M., et al., Involvement of tau protein kinase I in paired helical filament-like phosphorylation of the juvenile tau in rat brain. J Neurochem, 1995. 64(4): p. 1759-68.

[40]. Liu, R. M., et al., Knockout of plasminogen activator inhibitor 1 gene reduces amyloid beta peptide burden in a mouse model of Alzheimer's disease. Neurobiol Aging, 2011. 32(6): p. 1079-89.

[41]. Hanger, D. P., A. Seereeram and W. Noble, Mediators of tau phosphorylation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. Expert Rev Neurother, 2009. 9(11): p. 1647-66.

[42] Nicholson, A. M., D. N. Methner and A. Ferreira, Membrane cholesterol modulates{beta}-amyloid-dependent tau cleavage by inducing changes in the membrane content and localization of N-methyl-D-aspartic acid receptors. J Biol Chem, 2011. 286(2): p.

976-86.

[43]. Okello, A., et al., Microglial activation and amyloid deposition in mild cognitive impairment: a PET study. Neurology, 2009. 72(1): p. 56-62.

[44]. Tan, J., et al., Microglial activation resulting from CD40-CD40L interaction after beta-amyloid stimulation. Science, 1999. 286(5448): p. 2352-5.

[45]. Mohammadi, M. and R. Yazdanparast, Modulation of H2O2-induced mitogen-activated protein kinases activation and cell death in SK-N-MC cells by EUK134, a salen derivative. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2011. 108(6): p. 378-84.

[46]. Zhang, T., et al., Molecular Mechanism of the inhibition of EGCG on the Alzheimer's Abeta Dimer. J Phys Chem B, 2013.

[47]. Groussard, M., C. Mauger and H. Platel, Musical long-term memory throughout the progression of Alzheimer disease. Geriatr Psychol Neuropsychiatr Vieil, 2013. 11(1): p. 99-109.

[48]. Palmer, B. W., et al., Neuropsychological correlates of capacity determinations in Alzheimer disease: implications for assessment. Am J Geriatr Psychiatry, 2013. 21(4): p. 373-81.

[49]. Manczak, M., et al., Neutralization of granulocyte macrophage colony-stimulating factor decreases amyloid beta 1-42 and suppresses microglial activity in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. Hum Mol Genet, 2009. 18(20): p. 3876-93.

[50]. Mitka, M., PET imaging for Alzheimer disease: are its benefits worth the cost JAMA, 2013. 309(11): p. 1099-100.

[51] Fan, L. Y. and M. J. Chiu, Pharmacological treatment for Alzheimer's disease: current approaches and futurestrategies. Acta Neurol Taiwan, 2010. 19(4): p. 228-45. [52]. Gohdo, M., T. Takamasu and M. Wakasa, Photochemical primary process of photo-Fries rearrangement reaction of 1-naphthyl acetate as studied by MFE probe. Phys Chem Chem Phys, 2011. 13(2): p. 755-61.

[53]. Berr, C., et al., Polymorphism of the codon 129 of the prion protein (PrP) gene and neuropathology of cerebral ageing. Acta Neuropathol, 2003. 106(1): p. 71-4.

[54]. Qin, X. Y., et al., Potential protection of curcumin against amyloid beta-induced

Toxicity on cultured rat prefrontal cortical neurons. Neurosci Lett, 2009. 463(2): p. 158-61. [55]. Otten, R., et al., Probing microsecond time scale dynamics in proteins by methyl (1) H Carr-Purcell-Meiboom-Gill relaxation dispersion NMR measurements. Application to activation of the signaling protein NtrC(r). J Am Chem Soc, 2010. 132(47): p. 17004-14. [56]. Bulic, B., M. Pickhardt and E. Mandelkow, Progress and Developments in Tau Aggregation Inhibitors for Alzheimer Disease. J Med Chem, 2013.

[57]. Tiveron, C., et al., ProNGF\NGF imbalance triggers learning and memory deficits, neurodegeneration and spontaneous epileptic-like discharges in transgenic mice. Cell Death Differ, 2013.

[58]. Shibuya, K., et al., Reversible conformational change of tau2 epitope on exposure to detergent in glial cytoplasmic inclusions of multiple system atrophy. Acta Neuropathol, 2003. 105(5): p. 508-14.

[59]. Ono, M., et al., Rhodanine and thiohydantoin derivatives for detecting tau pathology in Alzheimer's brains. ACS Chem Neurosci, 2011. 2(5): p. 269-75.

[60]. Zhukareva, V., et al., Selective reduction of soluble tau proteins in sporadic and familial frontotemporal dementias: an international follow-up study. Acta Neuropathol, 2003. 105(5): p. 469-76.

[61]. Sethuraman, R., et al., Simultaneous analysis of D- and L-serine in cerebrospinal fluid by use of HPLC. Clin Chem, 2007. 53(8): p. 1489-94.

[62]. Mirzaei, S. I., et al., Spectroscopic evidence for Fermi liquid-like energy and temperature dependence of the relaxation rate in the pseudogap phase of the cuprates. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013.

[63]. Wang, J., S. W. Tse and A. Andreadis, Tau exon 6 is regulated by an intricate interplay of trans factors and cis elements, including multiple branch points. J Neurochem, 2007. 100(2): p. 437-45.

[64]. Del, C. A. A., Tau, neurodegeneration and Alzheimer's disease. Curr Alzheimer Res, 2010. 7(8): p. 653-5.

[65]. Ramirez-Rodriguez, G., et al., The alpha Crystallin Domain of Small Heat Shock Protein b8 (Hspb8) Acts as Survival and Differentiation Factor in Adult Hippocampal

Neurogenesis. J Neurosci, 2013. 33(13): p. 5785-5796.

[66]. Sayas, C. L., et al., The neurite retraction induced by lysophosphatidic acid increases Alzheimer's disease-like Tau phosphorylation. J Biol Chem, 1999. 274(52): p. 37046-52.

[67]. Dall'Armi, C., et al., The phospholipase D1 pathway modulates macroautophagy. Nat Commun, 2010. 1: p. 142.

[68]. Akay, C., et al., The protective effects of taurine on experimental acute pancreatitis in a rat model. Hum Exp Toxicol, 2013.

[69]. Scott, I. S. and J. S. Lowe, The ubiquitin-binding protein p62 identifies argyrophilic grain pathology with greater sensitivity than conventional silver stains. Acta Neuropathol, 2007. 113(4): p. 417-20.

[70]. Oddo, S., The ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease. J Cell Mol Med, 2008. 12(2): p. 363-73.

[71]. Kern, A. and C. Behl, The unsolved relationship of brain aging and late-onset Alzheimer disease. Biochim Biophys Acta, 2009. 1790(10): p. 1124-32.

[72]. Bryan, K. J., et al., Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease: Behavioral Testing and Considerations. 2009.

[73]. Alonso, E., et al., Translocation of PKC by Yessotoxin in an in vitro model of Alzheimer disease with improvement of Tau and beta-Amyloid pathology. ACS Chem Neurosci, 2013.

[74]. Head, M. W., et al., Variably protease-sensitive prionopathy in a PRNP codon 129 heterozygous UK patient with co-existing tau, alpha synuclein and Abeta pathology. Acta Neuropathol, 2010. 120(6): p. 821-3.

[75]. Saluja, I., et al., X11alpha haploinsufficiency enhances Abeta amyloid deposition in Alzheimer's disease transgenic mice. Neurobiol Dis, 2009. 36(1): p. 162-8.

## 中英文缩写语对照表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| AD | Alzheimer's Disease | 阿尔兹海默症 |
| Aβ | amyloid-β | β-淀粉样蛋白 |
| CNS | Central nervous system | 中枢神经系统 |
| WT | Wild type | 野生型 |
| NS | Normal saline | 生理盐水 |
| SGZ | The subgranular zone | 亚颗粒细胞层 |
| HE | Hematoxylin and Eosin staining | HE 染色 |
| IHC | Immunohistochemistry | 免疫组织化学 |
| BrdU | 5-bromodeoxyuridine | 5-溴-2-脱氧尿嘧啶核苷 |
| WB | Western blot | 免疫印迹 |
| IFN-γ | Interferon-gamma | γ-干扰素 |
| NF-κB | Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of  Activated B cells | 核因子 kappa 轻链 |

## 攻读学位期间发表的文章

Aβ和tau蛋白从独立学说到联合学说-老年痴呆的研究进展，神经解剖学杂志，2012年7月31日出版。

石菖蒲不同药效部位改善阿尔茨海默病模型小鼠的认知功能，中国病理生理杂志 ，

2011年8月30日出版

石菖蒲对β淀粉样蛋白致学习记忆障碍模型小鼠的影响，神经解剖学杂志，2012年 3

月31日出版

石菖蒲不同部位对阿尔茨海默病小鼠模型的治疗作用，神经解剖学杂志，2012年 9

月15日出版

致谢

感谢我尊敬的导师李国营教授在这三年里对我的培养，您在学习和生活各方面的不倦教诲和悉心指导，使无知的我能在科学研究道路上满怀热忱，得以启迪并坚定信念，让我受益匪浅。

感谢刘靖老师、田素民老师在学习和生活中对我无微不至的关心和帮助，使我在学习的道路上迅速成长。

感谢我的同门师兄师姐师弟师妹，感谢你们在实验过程中给我的帮助。感谢广东药学院能为我提供这样的机会和平台。

衷心感谢身边的每一个人。

**Aβ、tau蛋白从独立学说到联合学说-老年性痴呆的研究进展**孙灵芝，阮志刚，刘靖，李国营**＊**

（广东药学院基础学院人体解剖学教研室，广州510006）

**【摘要】**在阿尔茨海默病的发病过程中，存在多种病因学说，其中以“Aβ”和“tau学说”研究最为充分。究竟这是两个独立的致AD病因，还是两者之间存在相互作用或者主从关系存在很大的争议。近年来的研究表明Aβ和tau蛋白之间存在着主从关系和相互作用。现就Aβ和tau蛋白在AD病理中作用的研究进展做一简要综述。

【关键词】 阿尔茨海默病； Aβ； tau

阿尔兹海默症（Alzheimer's Disease, AD），又称为老年性痴呆，是一种最为常见的中枢神经系统退行性疾病，其主要病理特征是淀粉样斑块（即老年斑，Senile plaques，

SP）沉积，神经原纤维缠结（Neurofibrillary tangles, NFT）和神经元丢失；并主要发生于大脑内与学习和记忆功能相关的区域——海马区和大脑皮质区，所以患者多表现出进行性记忆衰退和认知障碍等主要临床症状[1]。

AD的具体发病机制仍不明确，目前的研究结果认为β-淀粉样蛋白在脑内蓄积、

tau蛋白过度磷酸化是AD的主要发病机理。“Aβ学说”和“tau学说”是对AD病理机制提出的众多学说中的两大主流学说，且研究最为充分。β-淀粉样蛋白在特定脑区内聚集，形成老年斑，tau蛋白过度磷酸化，使得神经元细胞骨架发生改变，引发神经原纤维缠结。针对AD两大病理机制的机理，治疗AD的药物被开发并应用于临床。目前，基于Aβ学说的药物开发，取得了一定疗效。基于tau学说的研究如抑制tau蛋白磷酸化激酶活性的药物已用于临床，为AD的诊断和治疗提供了根据。进一步的研究发现，Aβ和tau蛋白之间存在一定联系。目前，Aβ和tau蛋白的主从关系和相互作用受到关注，其新的研究进展可能为AD的治疗提供更为有效的方案。

**1.关于Aβ学说**

“Aβ学说”被广泛接受为AD最主要发病机理，即老年斑的主要成分—β淀粉样蛋白在特定脑区内聚集，诱导神经元毒性，最终导致突触损伤，神经元凋亡。Aβ学说认为AD发病始于Aβ的产生和清除失去平衡，可溶性和非可溶性Aβ肽在脑内蓄积，导致神经元毒性[2, 3]。Aβ是由其前体蛋白APP在加工修饰过程中，经β和γ分泌酶的水解作用，形成的39-43个氨基酸多肽。此途径生成的Aβ主要有两种，分别为Aβ40

基金项目：国家自然科学基金（30840073），广东省科技计划项目（2010B06900085）

＊通讯作者：李国营电话020-39352232, Email: [gzlgying820@sina. com](mailto:gzlgying820@sina.com)

和Aβ42，后者具有更强的神经毒性。在APP生成Aβ的过程中，许多酶参与了调节作用，如Caspase-3是细胞凋亡的效应器，也是细胞凋亡蛋白级联反应的必经之路。

Caspas酶可以有效剪切APP，其蛋白水解产物又聚集形成Aβ。Manchin-Njock C揭示，Caspase-3对APP的剪切，破坏了细胞内APP的正常代谢进程，向着生成Aβ方向进行，Aβ的毒性作用刺激和活化凋亡通路中的上游caspase，经酶级联放大反应激活caspase-3，加速APP的水解、Aβ的生成和聚集，促进神经细胞凋亡[4]。

早期的Aβ学说认为AD的发生是由于APP突变导致Aβ产量增加，但是Aβ的毒性机制却不明确[5, 6]。因为Aβ在人体内存在多种形式，包括单体、低聚物和不溶性原纤维沉积[7, 8, 9]。且Aβ是一种可塑性很强的蛋白，不同状态之间存在连续互变，因此很难确定神经元的毒性作用是何种形态Aβ所造成的[10]。神经元是由细胞体、轴突、树突三部分构成，Aβ的毒性作用在AD发病初期可能只局限于某个部位，因此很难针对某种病理特征做出一个总体的生物化学参数[11]。Aβ的几种形态都有一定的毒性作用，前期研究主要关注沉积形成老年斑的Aβ的毒性，认为此种状态的Aβ是诱发

AD的主要物质。目前越来越多的研究表明低聚物状态的Aβ有更强的神经毒性，可能是主导Aβ神经毒性作用的主要类型。

Aβ学说认为AD的主要致病因素是Aβ1-42的代谢异常所致，因此基于Aβ学说的主要治疗途径是减少Aβ1-42在大脑中的量。目前主要通过几个方面来达到治疗的效果：（1）免疫疗法；（2）γ-分泌酶的抑制；（3）β-分泌酶的抑制；（4）Aβ寡聚化的抑制；（5）Aβ从血液进入大脑的抑制；（6）促进Aβ降解。其中免疫疗法研究较为充分，AN-1792是第一代用于治疗AD的靶向Aβ的疫苗，该方法能有效清除脑内Aβ沉积，但在临床实验过程有6%的病人出现脑炎并发症而停止[12]。第二代免疫治疗药物是ACC-001，目前正在进行Ⅱ期的临床试验[13]。被动免疫疗法也在也在临床实验过程中，

bapineuzumab是一种靶向Aβ的人缘化单克隆抗体，正在进行Ⅲ期临床试验[14]。靶向

Aβ的免疫抑制剂和被动免疫的药物已有研究报道[15]。

**2 tau学说**

神经元纤维缠结是AD的重要病理特征之一，其产生与tau蛋白过度磷酸化密切相关，因此tau蛋白在AD发病过程中也起到了非常重要的作用。tau蛋白是一种可溶、亲水性强、非折叠的微管相关蛋白（microtubule-associated proteins, MAPs）。是微管结合蛋白家族的成员之一，主要分布在轴突，具有稳定神经元微管的作用。在神经元

极性的保持、维持神经元生长及胞内物质转运等方面起着重要作用。对tau蛋白的测定显示，AD患者血浆和脑脊液（CSF）中tau蛋白的总含量以及磷酸化tau蛋白的含量都明显高于同龄正常及非神经疾病患者[16]。tau蛋白有20-30个磷酸化位点，tau蛋白的磷酸化状态主要取决于蛋白激酶和蛋白磷酸酯酶的相对活性。许多因素（如Aβ, thrombin, LPA, TNF-A, IL-1等）可以通过多种信号转导通路改变激酶或磷酸酯酶的活性，进而引发tau蛋白过度磷酸化。研究表明GSK-3β和CDK-5是tau蛋白过度磷酸化的两种主要的激酶，目前研究显示，AD脑内磷酸酯酶缺陷可能是引起tau蛋白过度磷酸化的主要原因[17]。

正常情况下，tau蛋白与微管蛋白结合，促进微管形成并维持微管稳定。异常磷酸化tau蛋白（p-tau）与微管蛋白竞争结合正常tau, 抑制微管的聚集，导致正常情况下其具有的稳定微管和促进微管蛋白聚合成微管的作用丧失，p-tau则自身聚集成NFT结构。P-tau与微管竞争结合tau蛋白，导致tau蛋白从微管上面解离出来，微管的功能发生紊乱，最终导致神经细胞凋亡[18, 19]。

基于Tau学说的AD治疗药物的研发，主要涉及抑制tau蛋白磷酸化激酶的活性。糖原合酶激酶3β(GSK3β)，细胞周期蛋白激酶5(CDK5)，细胞外调节蛋白激酶（ERK），促分裂原活化蛋白激酶激酶（P38）是研究较为充分促进tau蛋白磷酸化的几种激酶[20]。丙戊酸和锂是两种抑制GSK3活性的抑制剂，丙戊酸已经进入Ⅲ期的临床试验，但是没有表现出对AD病人的治疗作用[21]，锂也没有表现出AD病人认知障碍的改善作用

[22]. NP-031112（NP-12）也是GSK3的抑制剂，在AD模型鼠试验中表现出降低了脑部

tau蛋白的磷酸化，抑制淀粉样沉积物的聚集作用，目前正在用于Ⅱ期的临床治疗，结果还有待进一步验证[23]。

**3 Aβ和tau的联合作用机制的研究进展**

在大量研究“Aβ”和“tau”各自独立致AD病因学说的同时[24, 25, 26]，Aβ蛋白和tau蛋白之间的主从关系和相互作用也越来越受到研究者关注。“Aβ学说”近期的研究显示，Aβ对神经元既有直接的毒性作用，又能触发AD其它病理出现，包括tau蛋白过度磷酸化，Aβ是AD发病的源头。“tau学说”的近期研究表明tau蛋白通过某些信号通路激活Aβ毒性作用，并最终导致突触丢失，神经元凋亡，AD发生。近期的这些研究结果说明，倾向于独立致AD的“Aβ”学说和“tau”学说走向了Aβ与tau的联合。

**3.1 Aβ诱导tau蛋白的过度磷酸化**

AD病理特征中tau蛋白的过度磷酸化可能是由Aβ介导的。在表达人tau蛋白转基因小鼠脑部注射Aβ时，观察到tau蛋白过度磷酸化出现[27, 28]。共表达APP和tau的转基因小鼠表现了强烈的tau蛋白过度磷酸化特征，当给与anti-Aβ治疗时，tau蛋白的磷酸化水平降低，敲除tau基因后，小鼠的记忆缺失有所改善[29]。Selkoe等从AD病人脑脊液中分离出可溶性Aβ寡聚物，其成分主要是Aβ二聚体，并将此种生理浓度下寡聚物形式的Aβ应用于海马区神经元。发现此种Aβ首先诱导了海马区神经元

tau蛋白过度磷酸化，继而细胞骨架微管破裂，神经元变性。这说明是Aβ诱导了tau蛋白过度磷酸化，且可溶性寡聚肽形式的Aβ可能是造成细胞骨架变化，神经元毒性的主要因素。

虽然造成AD病人神经元毒性的主要物质可能是可溶性Aβ低聚物，但它却不能够直接诱发CNS毒性，其过程是通过一条完整信号转导系统实现的[30]。Src家族蛋白激酶和磷脂酰肌醇-3激酶（PI3 K）是与原纤维Aβ活性相关的两种酶。PP1

（Src4-amino-5-(4-chlorophenyl) -7 (t-butyl) pyraz ol(3,4-D) pyramide）为Src蛋白激酶抑制剂，LY 294002为PI3K抑制剂，研究发现，当Src蛋白激酶活性被PP1抑制，PI3K活性被LY294002抑制时，tau蛋白过度磷酸化被完全阻滞。PP1和LY 294002对可溶性Aβ寡聚物没有直接作用，但是可以抑制Aβ诱导tau蛋白高度磷酸化，表明Src蛋白激酶和

PI3K与Aβ诱导tau蛋白过度磷酸化信号通路有关。

另有研究发现，Aβ诱导tau蛋白过度磷酸化过程中，tau蛋白某些磷酸化位点被激活[31, 32]。通过比较EGFP和hTau-EYFP转导的转基因小鼠的磷酸化水平发现，可溶性的Aβ二聚体在tau蛋白的Ser202/Thr205（AT8）和SER262（12E8）磷酸化位点诱导了其磷酸化，在Thr181（AT270）位点的磷酸化水平较低，而在Ser231/Thr235（AT180）和Ser396(PHF-1)位点则没有明显的磷酸化。这与在AD病人中枢神经系统中发现tau蛋白AT8,12E8位点过度磷酸化结果相一致。

**3.2 Aβ诱导了tau蛋白在神经元的重新分布，并致神经元结构和机能障碍**

Tau蛋白在神经细胞发育的初期主要位于细胞体，在神经细胞发育成熟的过程中移向轴突，MAP2是树突的一种微管相关蛋白，是构成神经元树突的重要成分。Hans等对海马区神经元细胞给予接触可溶性Aβ 低聚物（ADDLs），通过免疫荧光技术对

tau蛋白位置进行检测，发现MAP2出现的区域出现了tau蛋白，这说明在神经元细胞接触ADDLs后，tau蛋白重新分布，移向树突，即ADDLs诱导了tau蛋白的重新

分布[33, 34, 35]。

Tau蛋白移向树突后，神经元细胞某些生理特征发生改变。研究表明，树突tau蛋白可以抑制囊泡核细胞器的运输，ATP供应不足，突触联合衰退[36]。比较正常神经元与接触ADDLs神经元的树突棘数目，发现接触ADDLs组神经元树突棘数目下降了大概75%. ADDLs易与突触结合，通过对突触后受体细胞棘区域Aβ分布的研究发现，

ADDLs优先与树突及树突棘相结合[37]。ADDLs与tau蛋白共定位的结果显示，tau蛋白分布的区域，ADDLs不能与神经元结合，但是树突的其它位置ADDLs的分布正常，且可以观察到即使在距离tau蛋白分布很近的区域，只要没有直接接触，ADDLs分布依然正常，即树突棘分布未发生改变。这说明tau蛋白移向树突后，导致其存在区域突触丢失。

ADDLs与神经元细胞作用后，神经微管降解，在tau蛋白重新分布后的区域，微管数目下降了大概75%. Yan等指出局部微管缺失可能是由于线粒体不足，树突局部能量供应不足导致[38]。研究发现，在树突有tau蛋白分布的区域线粒体数目明显下降。另有研究发现，tau蛋白可以导致Ca2+聚集，造成局部浓度升高。细胞微管对Ca2+敏感，因此细胞内或者细胞外Ca2+聚集可能导致微管的破坏。同时，由于Ca2+浓度升高，导致线粒体的动力系统被切断，从而抑制了线粒体转运，神经微管受到破坏[39]，出现

AD病理。

**3.3 Tau蛋白激发了Aβ毒性，形成Tau-Fyn-Aβ通路。**

Aβ毒性作用主要是低聚物形式的Aβ(ADDLs)与树突发生相互作用产生的，tau蛋白作为一种轴突蛋白，可能通过tau-Fyn-Aβ信号通路触发了ADDLs毒性作用[26]。与其它细胞的分类途径一样，tau蛋白不能完全极化到轴突。因此在正常的生理状态下，有少量tau蛋白分布到树突，但并不引起病理特征出现。但在AD病理条件下，tau蛋白重新分布到细胞体和树突，参与Aβ毒性机制。Tau蛋白可能对树突某些信号通路有调节作用，Tau蛋白的N-末端与非受体络氨酸激酶Fyn结合[40]，将其转运到细胞体和树突。

Lttner[41]发现缺少C-羧基端或N-末端的tau蛋白不能将Fyn转运到树突，这表明正常状态下的tau蛋白是Fyn转运的必要条件，Fyn靶向树突需要完整的tau蛋白。Fyn磷酸化NMDA受体，NMDA受体是离子型谷氨酸受体的一个亚型，调节神经元树突轴突结构发育及突触可塑性等。磷酸化的NMDA受体与神经元树突骨架蛋白PSD95相互作用加强，导致神经递质谷氨酸兴奋性升高，激发Aβ毒性。Tau蛋白不足可以降低转基因AD

模型鼠中Aβ诱导的NMDA受体的兴奋性毒性[42]。相似的，在AD模型鼠中，缺少C羧基端的tau蛋白过表达时，可以观察到记忆力改善。这表明当Fyn在树突中的水平下降时，Aβ的毒性作用下降，且这种变化不依赖于Aβ或淀粉样蛋白斑生成量的多少，Fyn可能是将tau与Aβ联系在一起的一个效应因子。

Fyn将细胞外的Aβ与细胞内轴突蛋白tau，以及少量的tau-Fyn结合物联系起来，为tau蛋白激发Aβ神经毒性作用提供了证据。Tau蛋白异常进入树突可能是由于Aβ影响了树突内激酶和磷酸酯酶的活性改变，导致tau重新分布及细胞骨架改变。Tau蛋白进入树突后可能与Fyn继续作用，加强Fyn的活性，NMDA受体的亚型NR2磷酸化加强，因此增强了突触对Aβ的敏感性，Aβ毒性加强。因此，Tau-Fyn-Aβ通路的出现是AD病因学说从“Aβ”、“tau”独立学说走向联合的又一根据。 **4 小结**

虽然人们根据AD的临床、病理特征提出了多个致病机制学说，又根据各种学说分别研制出了针对性的治疗药物，且取得了一定的治疗效果，但无论是AD的病因还是治疗都未取得根本性突破。由于AD病因甚为复杂，各种学说虽有其合理的一面，但都有其局限性，不能全面解释AD复杂、广泛的神经系统病理变化，本文就近几年

AD病因学说的研究进展做一综述。让人们了解这一研究领域出现的新的成果和趋势，为人们进一步研究AD病因提供参考和借鉴。

参考文献

[1] Mattson M P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease[J]. Nature, 2004, 430(7000): 631-639.

[2] Masters C L, Simms G, Weinman N A, *et al*. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985, 82(12): 4245-4249.

[3] Hardy J, Selkoe D J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics[J]. Science, 2002, 297(5580): 353-356.

[4] Dumanchin-Njock C, Alves D C C, Mercken L, *et al*. The caspase-derived C-terminal fragment of betaAPP induces caspase-independent toxicity and triggers selective increase of Abeta42 in mammalian cells[J]. J Neurochem, 2001, 78(5): 1153-1161.

[5] Haass C, Selkoe D J. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the

Alzheimer's amyloid beta-peptide[J]. Nat Rev Mol Cell Biol,2007,8(2):101-112.

[6] Small S A, Duff K. Linking Abeta and tau in late-onset Alzheimer's disease: a dual pathway hypothesis[J]. Neuron, 2008, 60(4): 534-542.

[7] Klein W L. Synaptic targeting by A beta oligomers (ADDLS) as a basis for memory loss in early Alzheimer's disease[J]. Alzheimers Dement, 2006, 2(1): 43-55.

[8] Glabe C G. Structural classification of toxic amyloid oligomers[J]. J Biol Chem, 2008, 283(44): 29639-29643.

[9] Roychaudhuri R, Yang M, Hoshi M M, *et al*. Amyloid beta-protein assembly and Alzheimer disease[J]. J Biol Chem, 2009, 284(8): 4749-4753.

[10] Wogulis M, Wright S, Cunningham D, *et al*. Nucleation-dependent polymerization is an essential component of amyloid-mediated neuronal cell death[J]. J Neurosci, 2005, 25(5): 1071-1080.

[11] Gotz J, Ittner L M. Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia[J]. Nat Rev Neurosci, 2008, 9(7): 532-544.

[12] Gilman S, Koller M, Black R S, *et al*. Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial[J]. Neurology, 2005, 64(9): 1553-1562.

[13] Fagan T, Kagan B, Corbin D, *et al*. Alzheimer Research Forum Live Discussion: Now you see them, now you don't: The amyloid channel hypothesis[J]. J Alzheimers Dis, 2006, 9(2): 219-224.

[14] Strobel G. Alzheimer research forum report: Tubingen: the man behind the eponym[J]. J Alzheimers Dis, 2007, 11(1): 131-133.

[15] Lemere C A, Masliah E. Can Alzheimer disease be prevented by amyloid-beta immunotherapy[J]. NatRevNeurol, 2010, 6(2): 108-119.

[16] Oddo S, Caccamo A, Shepherd J D, *et al*. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction[J]. Neuron, 2003, 39(3): 409-421.

[17] Tackenberg C, Brandt R. Divergent pathways mediate spine alterations and cell death induced by amyloid-beta, wild-type tau, and R406W tau[J]. J Neurosci, 2009, 29(46): 14439-14450.

[18] Polydoro M, Acker C M, Duff K, *et al*. Age-dependent impairment of cognitive and synaptic function in the htau mouse model of tau pathology[J]. J Neurosci, 2009, 29(34): 10741-10749.

[19] Hardy J, Selkoe D J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics[J]. Science, 2002, 297(5580): 353-356.

[20] Iwatsubo T. Tauopathy: an overview[J]. Neuropathology, 2006, 26(5): 455-456.

[21] Landhuis E, Dance A. Alzforum News Highlights: Caffeine, Anesthesia, and Twin Epigenetics[J]. J Alzheimers Dis, 2009.

[22] Hampel H, Ewers M, Burger K, *et al*. Lithium trial in Alzheimer's disease: a randomized, single-blind, placebo-controlled, multicenter 10-week study[J]. J Clin Psychiatry, 2009, 70(6): 922-931.

[23] Sereno L, Coma M, Rodriguez M, *et al*. A novel GSK-3beta inhibitor reduces Alzheimer's pathology and rescues neuronal loss in vivo[J]. Neurobiol Dis, 2009, 35(3): 359-367.

[24] Selkoe D J. Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies[J]. Ann Intern Med, 2004, 140(8): 627-638.

[25] Guillozet A L, Weintraub S, Mash D C, *et al*. Neurofibrillary tangles, amyloid, and memory in aging and mild cognitive impairment[J]. Arch Neurol, 2003, 60(5): 729-736.

[26] Ballatore C, Lee V M, Trojanowski J Q. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders[J]. Nat Rev Neurosci, 2007, 8(9): 663-672.

[27] Rapoport M, Dawson H N, Binder L I, *et al*. Tau is essential to beta -amyloid-induced neurotoxicity[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(9): 6364-6369.

[28] Roberson E D, Scearce-Levie K, Palop J J, *et al*. Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model[J]. Science, 2007, 316(5825): 750-754.

[29] Ittner L M, Ke Y D, Delerue F, *et al*. Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models[J]. Cell, 2010, 142(3): 387-397.

[30] Williamson R, Scales T, Clark B R, *et al*. Rapid tyrosine phosphorylation of neuronal proteins including tau and focal adhesion kinase in response to amyloid-beta peptide

Exposure: involvement of Src family protein kinases[J]. J Neurosci,2002,22(1):10-20.

[31] Hampel H, Buerger K, Zinkowski R, *et al*. Measurement of phosphorylated tau epitopes in the differential diagnosis of Alzheimer disease: a comparative cerebrospinal fluid study[J]. Arch Gen Psychiatry, 2004, 61(1): 95-102.

[32] Hampel H, Goernitz A, Buerger K. Advances in the development of biomarkers for Alzheimer's disease: from CSF total tau and Abeta(1-42) proteins to phosphorylated tau protein[J]. Brain Res Bull, 2003, 61(3): 243-253.

[33] Yankner B A, Dawes L R, Fisher S, *et al*. Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease[J]. Science, 1989, 245(4916): 417-420.

[34] Busciglio J, Lorenzo A, Yeh J, *et al*. beta-amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding[J]. Neuron, 1995, 14(4): 879-888.

[35] Park S Y, Ferreira A. The generation of a 17 kDa neurotoxic fragment: an alternative mechanism by which tau mediates beta-amyloid-induced neurodegeneration[J]. J Neurosci, 2005, 25(22): 5365-5375.

[36] Thies E, Mandelkow E M. Missorting of tau in neurons causes degeneration of synapses that can be rescuedby the kinase MARK2/Par-1[J]. J Neurosci, 2007, 27(11): 2896-2907.

[37] Klein W L. Synaptic targeting by A beta oligomers (ADDLS) as a basis for memory loss in early Alzheimer's disease[J]. Alzheimers Dement, 2006, 2(1): 43-55.

[38] Yan T, Feng Y, Zhai Q. Axon degeneration: Mechanisms and implications of a distinct program from cell death[J]. Neurochem Int, 2010, 56(4): 529-534.

[39] Wang X, Schwarz T L. The mechanism of Ca2+ -dependent regulation of kinesin-mediated mitochondrial motility[J]. Cell, 2009, 136(1): 163-174.

[40] Lee G, Newman S T, Gard D L, *et al*. Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases[J]. J Cell Sci, 1998, 111 ( Pt 21): 3167-3177.

[41] Ittner L M, Ke Y D, Delerue F, *et al*. Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models[J]. Cell, 2010, 142(3): 387-397.

[42] Roberson E D, Scearce-Levie K, Palop J J, *et al*. Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model[J].

Science,2007,316(5825):750-754.