

阿尔茨海默症转基因动物模型脑组织 病理学及免疫组化研究

秦川 朱华 张兵林 常洋 尹红星 刘亚莉

(中国医学科学院 中国协和医科大学 实验动物研究所, 北京 100021)

【摘要】 目的 通过组织病理学和免疫组织化学方法, 验证阿尔茨海默症转基因动物模型。**方法** 取转基因小鼠脑组织, 冠状切面中 1/3 部位, 脱水、包埋, 进行组织病理学观察, 并对相关抗体进行免疫组织化学研究。**结果** 免疫组化显示在大脑皮层、小脑及海马的神经细胞有 A β 沉淀形成。APP 转基因鼠早老素的阳性细胞数及表达量多于对照鼠。刚果红染色可见大脑皮层间有淀粉样物质形成。**结论** 从病理学角度验证此模型的表型与人类病变的相似性, 并证明早老素-1 可加速淀粉样沉淀的形成, 二者的作用是相互的。

【关键词】 阿尔茨海默症; APP 转基因; 病理学; 免疫组织化学

Pathomorphological and Immunohistochemical Findings in Brains of APP Transgenic Model

QIN Chuan, ZHU Hua, ZHANG Binglin, CHANG Yang, YIN Hongxing, LIU Yali

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical
Science, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To study the neuropathological features of transgenic model for Alzheimer's disease by pathomorphological and immunohistochemical methods. **Methods** Tissue mass was taken from the transgenic mice's brain for dehydration and embedding, congo red staining and immunohistochemical staining. **Results** Immunohistochemistry revealed plaques in pallium, cerebellum and hippocampus. The expression of PS-1 in transgenic mice obviously increased comparing with control. Congo red staining showed amyloid deposition in intercellular. **Conclusion** The transgenic model's pathomorphological display conform to the Alzheimer's disease and it could be used for further study.

【Key words】 Alzheimer's disease; APP transgene; Pathology; Immunohistochemistry

阿尔茨海默症 (Alzheimer Disease, AD) 是神经系统退行性疾病, 其基本的病理学变化是老年斑和神经原纤维缠结并伴有神经元细胞的减少。随着研究的深入, 缺少合适的动物模型已成为病因研究和药物筛选的主要障碍^[1-3], 我们课题组成功的将淀粉样蛋白前体 (Amyloid precursor protein, App) 基因通过显微注射方法导入小鼠体内, 建立了一种与 AD 发病机理类似的转基因动物模型^[4-7]。我们对此模型小鼠的脑组织进行病理组织学观察, 并

本文由科技部特别资助项目

作者简介: 秦川, 女, 副教授, 长期以来从事比较医学人类疾病动物模型制作研究

通过免疫组化染色和刚果红鉴定 App 基因在脑部的表达。

1 材料与方法

1.1 材料 取3、6、9、12、15月龄转基因小鼠及同年龄阴性小鼠各一只,断椎处死后取脑组织用甲醛固定,修块时取冠状切面中1/3部位,脱水包埋,切片厚度5 μm ,42℃烤片过夜。

1.2 试剂 小鼠抗人APP抗体,A β 1-16抗体和A β 1-42抗体由宣武医院老年病研究所多肽研究室盛树力教授赠送。ABC免疫组化试剂购于美国Vector公司(PK-4002)。

1.3 方法 各组切片均进行H.E、刚果红和免疫组化染色。免疫组化采用ABC法,具体步骤如下:切片脱蜡水化,0.3%甲醇双氧水室温30 min,15%正常马血清室温封闭20 min,一抗(1:200稀释)37℃40 min,PBS洗,生物素化二抗(1:100稀释)37℃30 min,PBS洗,AB复合物(1:50稀释)37℃60 min,DAB显色,苏木素复染,脱水、透明、封片。以PBS取代一抗作为阴性对照。

2 结果

2.1 免疫组化

2.1.1 全长APP

免疫组化染色显示大脑皮层神经元细胞胞质阳性着色,神经胶质细胞及细胞间质内未见阳性着色。海马区神经元细胞胞质阳性着色,间质内未见阳性着色。对照组大脑皮层,海马内神经元细胞胞质染色阴性(图1)。

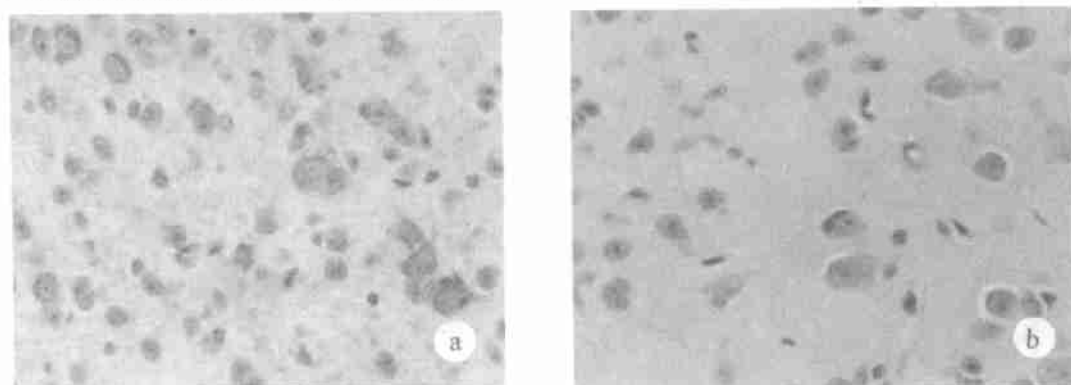


图1 免疫组化显示皮层、海马皮层神经原细胞呈阳性着色(a),阴性对照未见阳性着色(b)(ABC法)

Fig.1 Immunohistochemical positive APP staining (a) in neurons of forebrain and hippocampus in transgenic mice,negative APP staining (b) in neurons of control forebrain.(ABC method)

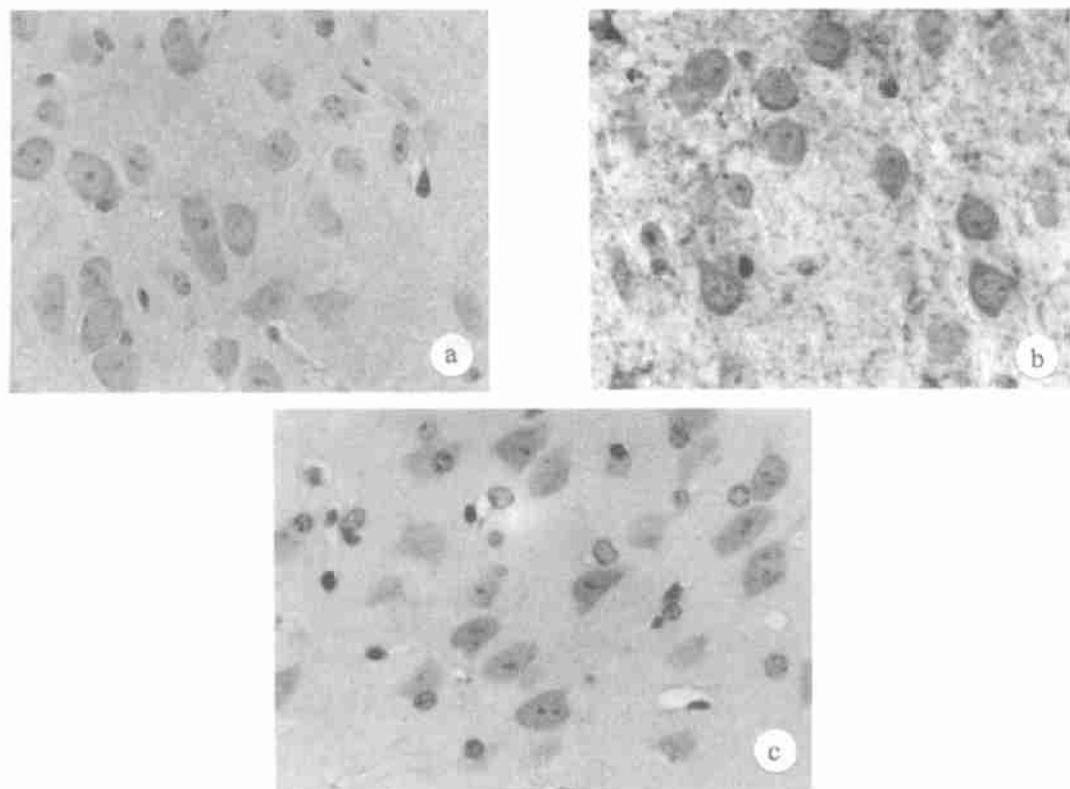
2.1.2 A β 1-16

免疫组化染色显示大脑皮层神经元细胞以锥体细胞为主胞质呈明显阳性着色,神经胶质细胞及间质内未见阳性着色。对照组大脑皮层细胞及间质均染色阴性。

2.1.3 A β 1-42

免疫组化染色显示大脑皮层神经元细胞以锥体细胞为主胞浆呈阳性着色,间质内亦可见

散布分布不均的阳性着色颗粒。对照组染色显示大脑皮层细胞及间质内均呈阴性着色(图2)。



a: A β 1-16 抗体着色区主要在细胞质 400 \times
b: A β 1-42 抗体细胞质和细胞间质均有阳性着色 400 \times
c: 阴性对照 400 \times

图2 A β 1-16 和 A β 1-42 抗体免疫组化结果 (ABC 法)
Fig.2 Immunohistochemical staining of A β 1-16 and A β 1-42 antibodies (ABC method)
a: A β 1-16 antibody stain in cytoplasmic region 400 \times
b: A β 1-42 antibody stain in both cytoplasmic and intercellular regions 400 \times
c: control 400 \times

2.1.4 早老素

免疫组化原位显示 APP695 和 APP751V717I 转基因鼠的大脑皮层比对照组早老素-1 的阳性细胞数明显增多, 细胞着色明显增强, 说明早老素-1 的表达量有升高。(图 3)

2.2 刚果红染色大脑皮层间可见大小不一的淡红色着色的团块状无定形物质, 散在分布, 分布密度不均, 周围可见多少不等的神经元细胞, 胞质染色阴性。对照组大脑皮层间质内未见阳性染色区。

3 讨论

从以上结果可以看出, 在转基因鼠的脑部过量表达突变的 APP695、751 都将引起 A(的大量聚集。通过渐进的过程, 最终形成淀粉样沉淀。而在以前的研究结果中, 未见报道 APP751 同样也能在转基因动物引起淀粉样沉淀的形成。结合病人脑部 APP695 与 APP751 表达比例的异常, 说明 APP 的异常表达与 AD 的发生有关。

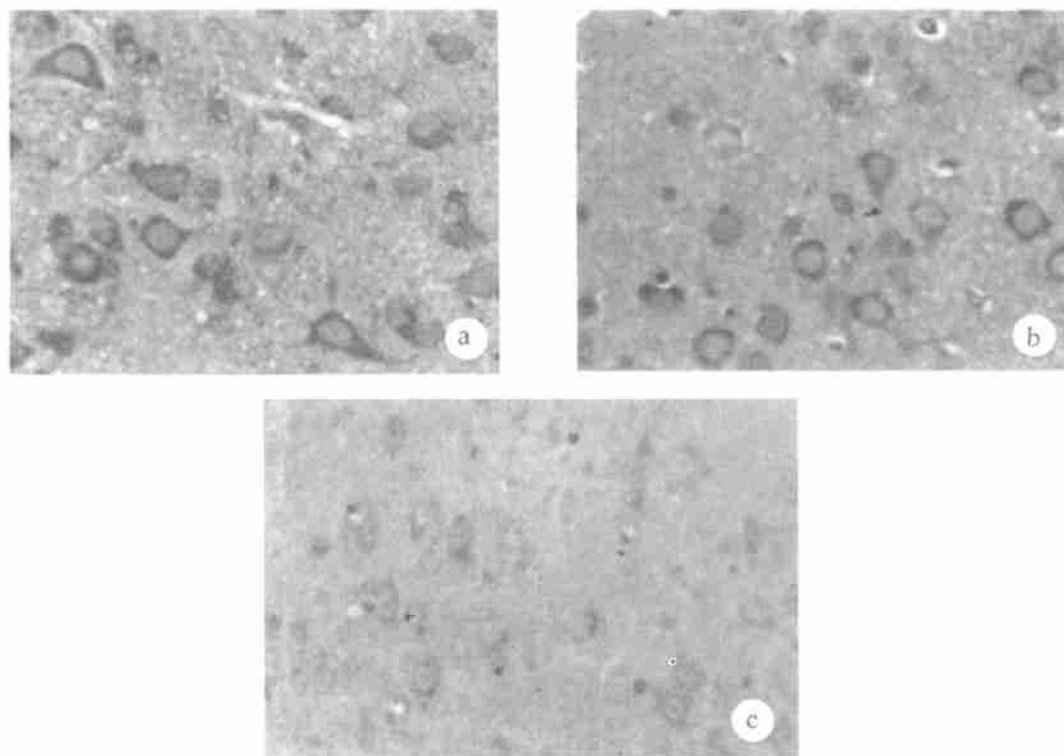


图3 早老素抗体免疫组化结果 (ABC法)
 Fig.3 Immunohistochemical staining of N-presenilin antibody (ABC method)

a: APP695 转基因动物	200 ×
b: APP751 转基因动物	200 ×
c: 阴性对照	200 ×
a: APP695 transgenic mice	200 ×
b: APP751 transgenic mice	200 ×
c: control	200 ×

转基因鼠只在大脑皮层和海马等脑区表达APP, 并产生具有神经毒性的 $A\beta$ 片段。最终只在大脑皮层和海马形成典型的淀粉样斑块, 而小脑没有变化。说明组织特异区域的加工与代谢在沉淀的形成中起重要作用。

人 $A\beta$ 的一级结构是神经细胞毒性作用的决定因素。小鼠的 $A\beta$ 不形成 $A\beta$ 沉积, 而人与鼠的 $A\beta$ 仅3个AA不同(5位R?T, 10位Y?F, 13位H?R)。 $A\beta$ 是疏水性很强的多肽, 疏水性氨基酸主要位于C端。短于 $A\beta$ 1-33的 $A\beta$ 片段不易聚集或沉积, 但长于 $A\beta$ 1-15就能聚集, 随着C端长度增加而溶解度降低, 更易聚集、沉积、且更加稳定。免疫组化染色结果显示, $A\beta$ 1-16抗体染色主要集中在神经细胞的胞质, 而 $A\beta$ 1-42抗体在胞质及间质均有阳性染色。造成这种差别的主要原因可能是胞外的 $A\beta$ 肽段大多是N端经过剪切的, 而不是完整的 $A\beta$, 所以也称为 $A\beta$ $n-42$ 。虽然完整的 $A\beta$ 毒性更强, 但由于C端在 $A\beta$ 聚集相关毒性中起重要作用, 所以去除N端后 $A\beta$ 更易形成沉淀。

早老素PS I位于14号染色体, 由于该基因突变引起的AD在30~60岁之间发病。已有的研究多集中在论证突变的PSI通过提高较长的和具有淀粉样致病性的 $A\beta$ 42/43的浓度来加速淀粉样沉淀的形成。但在本研究中, 首次通过免疫组化在组织原位观察, 发现APP转基因鼠早老素的阳性细胞数明显多于对照鼠, 表达量也高于对照鼠。这个结果说明过度表达突变的APP基因也可以反作用于PS- I, 它们之间的关系可能是双向的。

我们的结果从组织病理学角度验证了此模型的表型与人类病变的相似性。可用于进一步的研究^[8-11]。

参 考 文 献

1 Alter MJ, Coronel C, Shelton E, et al. Increased gene expression of Alzheimer disease beta-amyloid precursor protein in senescent cultured fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, 88:16-20

2 Tenzi RE, St George-Hyslop PH, Gusella JF. Molecular genetic approaches to Alzheimer's disease. *Trends Neuroscience*, 1989, 12: 152-155

3 Davies P, Maloney AJ. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet*, 1976, ii:1403-1407

4 常洋, 秦川, 蔡有余, 等. APP 基因真核表达载体的构建与鉴定. *中国老年学杂志*, 1999, 19: 239-241

5 常洋, 秦川, 尹红星, 等. 阿尔茨海默病转基因动物模型的建立. *解剖学报*, 2000, 31:144-147

6 秦川, 常洋, 朱华, 等. 早老性痴呆转基因小鼠的研究. *中国老年学杂志*, 2000, 20: 31-33

7 常洋, 秦川. 阿尔茨海默症的转基因动物模型 (综述). *中国实验动物学杂志*, 1999, 9:110-111

8 Rubin E M, Witkowska HE, Spangler E, et al. Hypoxia-induced in vivo sickling of transgenic mouse red cells. *Sci Clin Invest*, 1991, 87:639-644.

9 Zheng H, Jiang M, Trumbauer ME, et al. Beta-amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell*, 1995, 81:525-529.

10 Borchelt DR, Ratovitski T, van Lare J, et al. Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron*, 1997, 19:939-942.

(收稿日期:2000-07-10)

欢迎订阅《中国实验动物学杂志》

《中国实验动物学杂志》是由中国实验动物学会主办并发行的国家级学术刊物, 现已经开始办理2001年征订手续。

本刊内容:刊载有关实验动物和动物实验的理论专著、科研成果论文、科学实验新方法、新材料、实验动物新资源开发、新的动物品系的培育和应用以及与实验动物有关的其它学科的科学论述。开设栏目有:研究论著和研究快报、综述与专论、研究简讯、技术与方法、学术动态、国外研究进展、学术信息等重点刊登比较医学、动物模型、三 R 技术、新技术应用(克隆技术、转移基因功能表述、胚胎移植技术等)。

读者对象:农牧渔业、医学、药学、环保、生物、体育、国防等的单位、科技工作者、教育工作者、管理人员以及有关的生产者、大专院校学生等。本刊竭诚为广大读者服务, 欢迎踊跃订阅。

刊期及订价:《中国实验动物学杂志》季刊, 16 开本, 64 页。每逢季月末出版。

每期订价 10 元, 全年 4 期, 合计 40 元。

订阅办法:剪下下面订单或向编辑部索取订单, 通过邮局汇款。(汇款简言注明用途)

联系人:《中国实验动物学杂志编辑部》 吴漪丽

北京朝阳区潘家园南里 5 号(100021) 电话:010-67761337

《中国实验动物学杂志》编辑部

————— (剪下寄回) —————

2001 年《中国实验动物学杂志》 订 单

订 阅 单 位			收件人	
详 细 地 址			邮 编	
订 阅 数 量	套（4期/套）	总金额	元	
备 注	编辑部收到款后随即寄收据			