

阿尔茨海默病与野生型小鼠海马中 CREB1 活性差异研究

王 玲¹, 李先发¹, 陈 蒙¹, 王 谦¹, 杨 群², 苏 波³, 刘 洋^{1*}

(¹长江大学医学院机能学部,²医学影像学系,³形态学部,湖北 荆州 434023)

[摘要] 目的:检测阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)和野生型对照组小鼠海马 CREB1 蛋白的活性及意义。方法:D-半乳糖 90 mg/(kg·d)联合三氯化铝(AlCl₃)40 mg/(kg·d)连续 90 d 腹腔注射制造 AD 小鼠模型;通过糖水偏好实验及 Y-迷宫实验初步鉴定模型复制成功;免疫组化检测、比较 AD 及野生型对照组小鼠海马 CA1、CA3 和 DG 区 CREB1 和 p-CREB1 蛋白表达水平。结果:与对照组比较,AD 模型组小鼠糖水偏好百分比明显下降($P < 0.01$)。AD 组小鼠对新异臂的空间辨别能力明显低于野生型对照组($P < 0.01$)。与野生型对照组相比,AD 小鼠海马 CA1、CA3 和 DG 区 CREB1、p-CREB1 蛋白阳性表达强度低,阳性颗粒数目少($P < 0.01$)。结论:D-半乳糖联合 AlCl₃ 通过抑制海马组织关键核转录因子 CREB1 的活性,影响神经元的存活、损伤后的修复及神经细胞再生,导致小鼠学习记忆能力受损,进而引起 AD 的发生、发展。

[关键词] 阿尔茨海默病;CREB1;p-CREB1;海马

[中图分类号] Q421;R592

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)08-956-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20160812

Activity of CREB1 in the hippocampus of Alzheimer's disease and wild type mice

Wang Ling¹, Li Xianfa¹, Chen Meng¹, Wang Qian¹, Yang Qun², Su Bo³, Liu Yang^{1*}

(¹Department of Medical Function,²Department of Medical Imaging,³Department of Morphology, School of Medicine, Yangtze University, Jingzhou 434023, China)

[Abstract] **Objective:** To detect, compare and analyze the activity and significance of CREB1 protein in the hippocampus of Alzheimer's disease (AD) and wild type control mice. **Methods:** Continuous intraperitoneal injection of D-galactose 90 mg/(kg·d) and AlCl₃ 40 mg/(kg·d) for 90 days was performed to mice to make AD mouse model. Preliminary appraisal of AD model was performed by sucrose preference test and Y-maze test. CREB1, p-CREB1 protein expression levels in the hippocampal CA1, CA3 and DG areas of AD and wild type control mice were compared by immunohistochemical detection, respectively. **Results:** Compared with the control group, the sucrose preference percentage of AD mice decreased significantly ($P < 0.01$). The spatial discrimination ability of the AD group was significantly lower than that of the wild-type control group ($P < 0.01$). Compared with the wild type control group, the positive expressions of CREB1 and p-CREB1 proteins in the hippocampal CA1, CA3 and DG areas were significantly decreased in AD mice ($P < 0.01$). **Conclusion:** By inhibiting the activity of key nuclear transcription factor CREB1 in hippocampal tissues, D-galactose combined with AlCl₃ affect neuronal survival, post injury repair and regeneration of nerve cells, resulting in ability of learning and memory impaired, thereby causing the occurrence and development of AD.

[Key words] Alzheimer's disease; CREB1; p-CREB1; hippocampus

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(08):956-959, 990]

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是发生于老年和老年前期、以进行性认知功能障碍和行为

损害为特征的中枢神经系统病变,是一种慢性进行性中枢神经系统变性疾病,是老年期痴呆的最常见类型。临床上表现为渐进性记忆障碍、失语、失用、失认、视空间能力损害、抽象思维和计算力损害、人格和行为的改变等^[1]。老年斑(senile plaque, SP)、神经原纤维缠结(neurofibrillary tangle, NFT)和基底前脑胆碱能神经元丢失为 AD 的主要病理特征^[2],这

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81401095);湖北省卫生计生青年人才项目(WJ2015Q045);长江大学青年人才基金项目(2015cqr24)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: oceanerliu@aliyun.com

种进行性疾病以 β -淀粉样蛋白(amyloid β -protein, A β)累积形成为特征^[2]。A β 来源于 β -淀粉样前体蛋白(β -amyloid precursor protein, APP), APP 是一种跨膜的糖蛋白, 而 β -淀粉样前体蛋白裂解酶(BACE1)是 A β 多肽产物的限速酶, 调节 A β 的生成。在 AD 患者其 BACE1 的表达显著增高^[3]。

环腺苷酸(cAMP)应答元件结合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB) 是一种核转录因子, 可与 cAMP 反应元件结合, 调节基因转录, 具有调节精子生成、昼夜节律、学习记忆等功能。CREB 是细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK) 信号通路和 PI3K 信号通路共同的核内作用靶点^[4]。CREB 的分子量 43 kDa, 属于 CREB/ATF 家族, 其主要的生理功能是调控下游基因的转录^[5]。大量证据表明 CREB 在学习记忆功能的形成、稳定和保持上起着重要作用^[6-7]。CREB 控制着神经细胞对细胞外刺激, 如胰岛素样生长因子 1 在转录水平的反应^[8], 同时, 也参与突触的可塑性和记忆的巩固^[9]。外源性 CREB 基因的导入能增加 CREB 的表达, 并显著提高老年大鼠的学习记忆能力^[10]。研究证实, A β 通过蛋白激酶 A(protein kinase A, PKA) 和丝裂原激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路导致 CREB 功能紊乱^[11]。同时有证据表明 BACE1 通过与腺苷酸环化酶相互作用直接损害 PKA/CREB 信号通路^[12]。提示 AD 中脑组织 CREB1 的活性显著降低。

本研究采用 D-半乳糖联合三氯化铝($AlCl_3$)诱导 AD 小鼠模型^[13], 研究 CREB1 和 p-CREB1 在 AD 组和野生型昆明小鼠海马 CA1 区、CA3 区和 DG 区的表达差异, 探索 AD 形成的可能分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料

清洁级雄性昆明种小鼠, 购于湖北省实验动物研究中心, 动物许可证号: SCXK(鄂)2008-0005。D-半乳糖(武汉科瑞生物); $AlCl_3$ (天津福晨化学试剂厂)。

1.2 方法

1.2.1 建立 AD 小鼠模型

选用清洁级健康雄性昆明种小鼠 30 只, 体重 20-25 g, 安静环境饲养, 自由取食饮水, 通风良好, 室温 22-25 $^{\circ}C$, 适应性喂养 1 周后随机分为 2 组, 每组 15 只。AD 模型组采用 Luo 等^[13]的造模方法: 腹腔注射 D-半乳糖 90 mg/(kg·d) 和 $AlCl_3$ 溶液 40 mg/(kg·d), 均由生理盐水配制, 连续 90 d, 制造 AD 小鼠模型; 野生

型对照组小鼠腹腔注射等量生理盐水。

1.2.2 糖水偏好实验

用糖水和自来水双瓶给实验大鼠供饮, 通过测量剥夺饮水 12 h 后大鼠 1 h 内的糖水和自来水消耗量, 计算糖水偏好百分比(%, 糖水消耗量/总液体消耗 $\times 100\%$)。

1.2.3 Y-迷宫实验

Y-迷宫由灰色 PVC 板制作, 共 3 个臂: 起始臂、新异臂(新臂)和其他臂(旧臂), 各臂夹角 120 $^{\circ}$ 。每臂尺寸 30 cm \times 8 cm \times 15 cm(长 \times 宽 \times 高), 在中央处各有 1 个可移动的隔板。迷宫内铺垫木屑。迷宫上方 1.5 m 处安置摄像头, 全过程录像。Y-迷宫实验分训练和测试阶段。训练时, 将 Y 迷宫中的 1 个臂随机隔开, 将小鼠从起始臂置入, 使之在两个臂中适应 10 min, 然后取出。间隔 1 h 后, 再放入迷宫重复测试。测试时, 将隔板取走, 启动位于 Y 迷宫上方的摄像头进行全过程录像, 观察小鼠 5 min 内在新旧臂中活动的时间和次数, 以检验小鼠对新老臂的记忆能力。记录测试阶段进入各臂的次数(以小鼠后肢完整进入为准), 以及在各臂停留的时间。

1.2.4 免疫组织化学

经小鼠左心室灌注取脑, 置 4%多聚甲醛中固定、过夜。常规梯度脱水后 O.C.T. 胶包埋, 冰冻切片机(Leica 公司, 德国)矢状面连续切片(24 μm), 收集脑片, 每隔 5 片取 1 片用于实验。0.01 mol/L PBS 洗涤脑片 3 次, 3% H_2O_2 孵育 30 min。5% BSA-PBS(含 0.3% Triton X-100)室温下封闭 1 h, 使用一抗兔抗 CREB1 抗体(1:400, #9197, CST 公司, 美国)、一抗兔抗 p-CREB1 抗体(1:400, #9198, CST 公司, 美国), 二抗室温孵育, PBS 洗涤 5 min \times 3 次后二氨基联苯氨(diaminobenzidine, DAB)(上海基因科技公司)避光显色, 观察 CREB1、p-CREB1 表达变化。利用 Image-Pro Plus 6.0 进行图像的分析处理, 测量阳性表达细胞的平均光密度值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件进行分析。实验数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, t 检验进行数据统计分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体重比较和糖水偏好实验结果

与野生型对照组比较, AD 模型组小鼠的体重明显下降($P < 0.05$, 表 1), 糖水偏好百分比也明显下降($P < 0.01$, 表 1)。

表 1 AD 模型和野生型组比较糖水偏好实验结果

Table 1 Results of sucrose preference test in the AD and wild type control groups ($\bar{X} \pm s$)

组别	体重(g)	糖水偏好百分比(%)
对照组	24.87 ± 2.21	94.38 ± 8.39
AD 模型组	20.98 ± 1.65*	56.67 ± 4.46**

与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2.2 Y-迷宫实验结果

实验结果表明, 2 组小鼠进入新异臂停留的时间及次数的差异有统计学意义, AD 模型组小鼠对新异臂的空间辨别能力明显低于野生型对照组 ($P < 0.01$, 图 1)。

2.3 小鼠海马组织 CREB1、p-CREB1 蛋白表达的变化

免疫组化染色结果显示, 野生型对照组小鼠海马 CA1、CA3 和 DG 区 CREB1、p-CREB1 蛋白阳性表达细胞较多, 呈深棕色, AD 模型组小鼠海马 CA1、CA3 和 DG 区 CREB1、p-CREB1 蛋白阳性表达强度低, 阳性颗粒数目明显减少(表 2、图 2)。

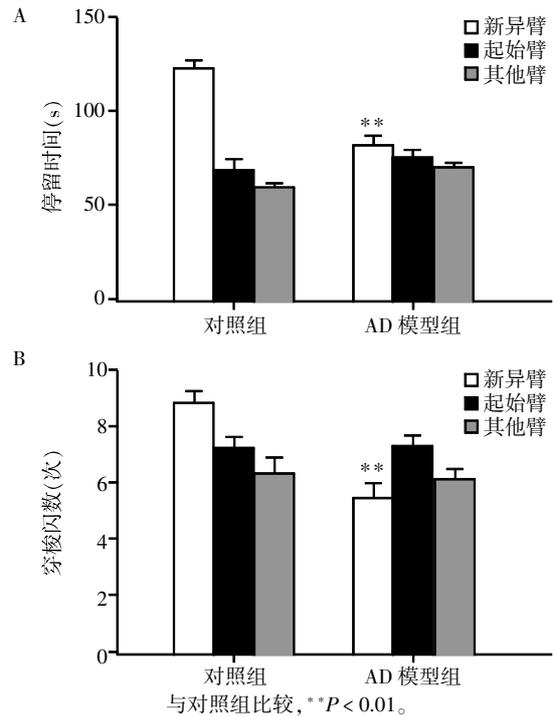


图 1 Y-迷宫实验结果

Figure 1 Results of Y-maze test

表 2 AD 模型小鼠和野生型小鼠海马各区 CREB1 蛋白和 p-CREB1 蛋白的表达

Table 2 CREB1 and p-CREB1 expressions in the hippocampus of the AD and wild type control groups

($n=15, \bar{X} \pm s$)

组别	CREB1			p-CREB1		
	CA1 区	CA3 区	DG 区	CA1 区	CA3 区	DG 区
对照组	69.45 ± 11.11	71.26 ± 12.14	183.58 ± 33.04	72.46 ± 12.78	69.43 ± 10.76	189.43 ± 34.36
AD 模型组	46.76 ± 7.38*	32.37 ± 4.53**	57.49 ± 10.35***	36.76 ± 6.45**	39.32 ± 7.79**	59.37 ± 9.57***

与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

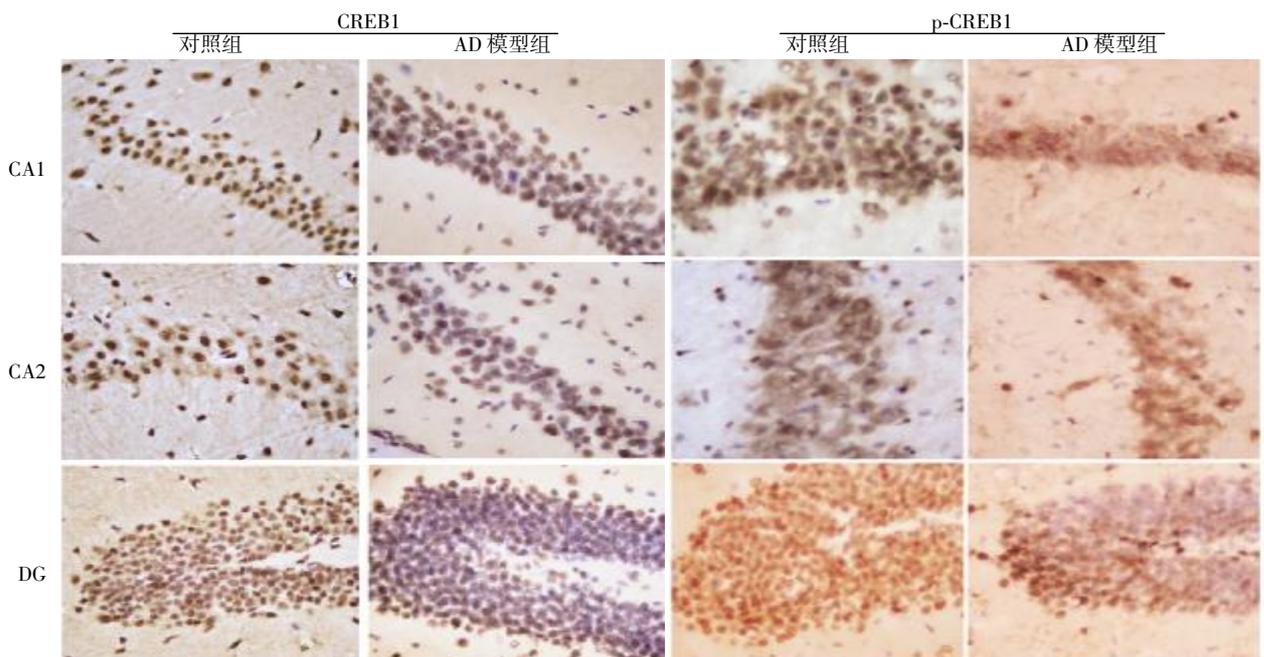


图 2 CREB1 和 p-CREB1 在 AD 模型组和对照组小鼠海马中的免疫组化结果(×200)

Figure 2 Immunohistochemical results of CREB1 and p-CREB1 in the hippocampus of AD and control mice(×200)

3 讨 论

AD 是一种神经系统退行性疾病,是导致老年人痴呆的主要原因。在西方国家 AD 是继心脏病、肿瘤和中风之后排在第 4 位的导致死亡的疾病。AD 可延续 20 年,给个人、家庭、社会带来沉重的负担和痛苦。AD 病因尚不明确,因此使得其治疗变得更为困难。本研究利用 D-半乳糖联合 AlCl_3 制备 AD 小鼠模型^[13],并利用 Y-迷宫实验等行为学实验方法检测模型小鼠学习记忆能力的受损情况。Y-迷宫是 20 世纪 90 年代初 Dellu 等^[14]发明的,该迷宫具有常用的学习记忆测试模型所没有的优点,即避免了奖惩因素可能带来的紧张导致对学习记忆的干扰。其最大的优势在于,这种迷宫利用了啮齿类动物对新异环境天然探究的自然习性,不需要动物学习任何规则来趋利避害,能够有效反映动物对新环境的识别记忆能力^[15-16]。糖水偏好试验结果显示,AD 组小鼠糖水偏好百分比明显下降,Y-迷宫实验结果表明 AD 组小鼠空间识别记忆能力明显受损,提示本研究采用 D-半乳糖联合 AlCl_3 成功复制了小鼠 AD 模型。

目前针对 AD 尚未有十分有效的治疗方案。现有的研究表明, $\text{A}\beta$ 、Tau 蛋白、早老素蛋白(PS)和载脂蛋白 E(ApoE)等均在 AD 的发病过程中起到重要作用,但令人遗憾的是,以上述几个方面做为靶点的治疗未能取得令人满意的效果^[17-18]。因此,有必要从新的角度来研究 AD 的发病机制,从而为其治疗提供新靶点。CREB 是海马神经元中许多信号通路的汇聚点,并在学习记忆功能中扮演关键角色^[9,19]。在老龄化及相关的一些脑组织疾病中,CREB1 的活性显著降低^[20-21]。脑组织主要通过激活 CREB1 来维护神经细胞的健康^[22]。海马在认知、学习、空间识别记忆能力形成过程中起着重要作用^[23]。为全面了解 AD 模型组和野生型对照组小鼠海马中 CREB1 的活性差异,本研究分析比较了各组小鼠海马 CA1、CA3 和 DG 区 CREB1、p-CREB1 的表达,从免疫组化检测结果来看,AD 组小鼠海马 CREB1、p-CREB1 的表达,无论是在 CA1 区、CA3 区,还是在 DG 区,均显著低于野生型对照组,提示 D-半乳糖联合 AlCl_3 通过抑制海马组织关键核转录因子 CREB1 的活性,影响神经元的存活,损伤后的修复及神经细胞再生,导致小鼠学习记忆能力受损,进而引起 AD 的发生、发展。本研究结果为以 CREB1 相关信号通路为治疗靶点的 AD 临床治疗研究提供了可靠的实验基础。在 AD 进程中,主要通过哪条信号通路、哪些

细胞因子影响 CREB1 的活性等具体分子机制,有待进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Magistri M, Velmeshev D, Makhmutova M, et al. Transcriptomics profiling of alzheimer's disease reveal neurovascular defects, altered amyloid- β homeostasis, and deregulated expression of long noncoding RNAs[J]. *J Alzheimers Dis*, 2015, 48(3): 647-665
- [2] Huang YD, Mucke L. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies[J]. *Cell*, 2012, 148(6): 1204-1222
- [3] Ahmed RR, Holler CJ, Webb RL, et al. BACE1 and BACE2 enzymatic activities in Alzheimer's disease[J]. *J Neurochem*, 2010, 112(4): 1045-1053
- [4] Johannessen MP, Moens U. What turns CREB on? [J]. *Cell Signal*, 2004, 16(11): 1211-1227
- [5] Kulik GK, Weber MJ. Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt[J]. *Mol Cell Biol*, 1997, 17(3): 1595-1606
- [6] Yin JC, Wallach JS, Del Vecchio M, et al. Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in *Drosophila* [J]. *Cell*, 1994, 79(1): 49-58
- [7] Bartsch D, Ghirardi M, Skehel PA, et al. Aplysia CREB2 represses long-term facilitation; relief of repression converts transient facilitation into long-term functional and structural change[J]. *Cell*, 1995, 83(6): 979-992
- [8] Balschun D, Wolfer DP, Gass P, et al. Does cAMP response element-binding protein have a pivotal role in hippocampal synaptic plasticity and hippocampus-dependent memory? [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(15): 6304-6314
- [9] Mozzachiodi R, Byrne JH. More than synaptic plasticity: role of nonsynaptic plasticity in learning and memory[J]. *Trends Neurosci*, 2010, 33(1): 17-26
- [10] Mouravlev A, Dunning J, Young D, et al. Somatic gene transfer of cAMP response element-binding protein attenuates memory impairment in aging rats[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(12): 4705-4710
- [11] Ma QL, Harris-White ME, Ubeda OJ, et al. Evidence of abeta- and transgene-dependent defects in ERK-CREB signaling in alzheimer's models[J]. *J Neurochem*, 2007, 103(4): 1594-1607
- [12] Chen Y, Huang X, Zhang YW, et al. Alzheimer's β -secretase(BACE1) regulates the cAMP/PKA/CREB pathway independently of β -amyloid [J]. *J Neurosci*, 2012, 32(33): 11390-11395
- [13] Luo Y, Niu F, Sun Z, et al. Altered expression of Abeta metabolism-associated molecules from D-galactose/ AlCl_3 (下转第 990 页)