

基础研究

阿尔茨海默氏病大鼠淀粉样变性脑血管病的病理学变化

吕田明, 梁彦珊, 史翠丽, 黄小玉, 潘志勇, 凌 容, 张文玲, 郝梦渐, 郭秋瑶, 曾 宇, 尹 超
南方医科大学第三附属医院神经内科, 广东 广州 510630

摘要:目的 在建立实验性大鼠阿尔茨海默氏病动物模型基础上探讨淀粉样变性脑血管病变的脑组织病理变化特点。方法 在立体定向仪引导下向大鼠双侧海马内注射 $A\beta_{1-42}$ 纤维, 建立阿尔茨海默氏病动物模型, 应用水迷宫试验评价大鼠高级认知功能情况, 应用HE染色、刚果红染色以及 α -actin、 $A\beta$ 双重标记免疫荧光染色观察淀粉样蛋白在大鼠脑内沉积与淀粉样变性脑血管病变的动态变化情况。结果 模型组与假手术对照组相比逃避潜伏期时间和平台探索次数均有显著性差异。HE染色可见模型组大鼠海马区颗粒细胞减少, 细胞变性, 胶质细胞增生, 海马内小血管壁变性。刚果红染色可见 $A\beta$ 纤维逐渐沉积在小血管壁, 管壁增厚, 小血管狭窄或闭塞; 免疫荧光染色可见模型组脑组织内 $A\beta$ 纤维逐渐向小动脉迁移。结论 淀粉样变性脑血管病变是阿尔茨海默氏病的主要病理变化。

关键词: 淀粉样变性脑血管病; 阿尔茨海默氏病; β -淀粉样蛋白; 大鼠

Pathological study of cerebral amyloid angiopathy in rat models of Alzheimer's disease

LÜ Tianming, LIANG Yanshan, SHI Cuili, HUANG Xiaoyu, PAN Zhiyong, LING Rong, ZHANG Wenling, HAO Mengxi, GUO Qiuyao, ZENG Yu, YIN Jia

Department of Neurology, Third Affiliated Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510630, China

Abstract: Objective To examine cerebral pathologies in cerebral amyloid angiopathy in a rat model of Alzheimer's disease. **Methods** Rat models of Alzheimer's disease was established by stereotactic $A\beta_{1-42}$ fiber injection in the bilateral hippocampus. The cognitive function of the rats was evaluated with water maze test. HE staining, Congo red staining and double-labeling indirect immunofluorescence were used to examine the dynamic distribution of $A\beta$ fiber deposit in the brain. **Results** The model rats showed significant differences from the control rats in the escape latency and the times of crossing platform in waster maze test. HE staining revealed a decreased number and degeneration of the granular cells with increased glial cells in the model rats. Congo Red staining showed that the $A\beta$ fiber was deposited gradually in the small vessels in the brain parenchyma to cause thickening, stenosis or occlusion of the small vessels. Immunofluorescence staining detected $A\beta$ fiber migration from the parenchyma to the walls of the small arteries in the rat models. **Conclusion** Cerebral amyloid angiopathy is a major pathological feature in Alzheimer's disease.

Key words: cerebral amyloid angiopathy; Alzheimer's disease; β -amyloid; rats

阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease, AD)是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退行性病变, 主要病理特征是在大脑皮层和海马出现 β -淀粉样蛋白($A\beta$)聚集形成的老年斑(SP)^[1-2]。近年来发现, 淀粉样变性脑血管病变(CAA)也是AD的主要病理学特征, 甚至在AD的发病过程中扮演着主要角色^[3-4], 但其发生机制仍不明确, 制约了AD的临床诊断和治疗。探明CAA的病理机制具有重要意义, 有助于疾病的早期诊断和找到新的治疗靶点。本文用立体定向双侧海马内注射 $A\beta$ 纤维制备AD动物模型, 探讨淀粉样蛋

白在脑组织内沉积的规律, 并观察CAA的动态变化特点。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物及分组 清洁级健康雄性SD大鼠40只, 体质量200~250 g, 由南方医科大学实验动物中心提供。大鼠随机分为模型组和假手术对照组, 每组分为4个亚组: 1、2、4、12周, 每个亚组各5只。

1.1.2 主要仪器 大鼠脑立体定向仪(江湾 I 型), 10 μ l 微量注射器(Hamilton), 冰冻切片机(LEICA CM1850), 各种规格可调加样器(Eppendorf), 小动物行为记录分析系统(TSE systems), 荧光显微镜(Olympus DP71), 图像分析软件(Olympus DP Manager), -80 $^{\circ}$ C 低温冰箱(Thermo Scientific)

1.1.3 主要试剂 $A\beta_{1-42}$ 纤维(Sigma-Aldrich), 多聚甲醛(广州化学试剂厂), 刚果红(上海试剂三厂), Anti

收稿日期: 2014-02-23

基金项目: 国家自然科学基金(61072033); 广东省自然科学基金(8151051501000053, 1015105150100007)

Supported by National Natural Science Foundation of China (61072033).

作者简介: 吕田明, 医学博士, 主任医师, 硕士生导师, 电话: 020-61641965,

E-mail: lutianming@139.com

Amyloid beta A4 protein (Millipore), anti- α -actin (Millipore), Goat Anti chicken (Jackson Immuno Research), Goat Anti Rabbit, Goat Anti Mouse (Invitrogen), 山羊血清工作液 (中杉金桥), 抗荧光衰减封片剂 (北京普利莱基因)。

1.2 方法

1.2.1 $A\beta_{1-42}$ 纤维的制备 将 $A\beta_{1-42}$ 粉末溶于灭菌 PBS 溶液中, 配制成浓度为 $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的悬液, 将配好的 $A\beta_{1-42}$ 置于 37°C 恒温水浴摇床中, 振荡水浴 7 d 即可熟化成 $A\beta_{1-42}$ 纤维^[5]。

1.2.2 动物模型的制作^[6] 大鼠经 10% 水合氯醛 ($3 \text{ ml}/\text{kg}$) 腹腔注射麻醉后, 固定在立体定位仪上。大鼠顶部备皮, 常规消毒。沿顶部正中中线作 3 cm 切口, 用双氧水腐蚀骨膜。靶点坐标: 前囟后 2.5 mm 、深度 3.2 mm 、左右各旁开 2 mm 。用 $10 \mu\text{L}$ 微量注射器以 $1 \mu\text{L}/\text{min}$ 速度缓慢向靶点内注入 $A\beta$ 纤维, 每侧各 $5 \mu\text{L}$, 静置留针 10 min 后缓慢拔针。术后缝合皮肤, 常规消毒。分笼饲养, 自由饮食。假手术组以同样步骤注射等量灭菌 PBS。

1.2.3 Morris 水迷宫试验 各组大鼠的 4 周和 12 周亚组在造模前和造模 4 周后进行水迷宫试验, 1 周和 2 周组造模时间过短不进行水迷宫试验。按参考文献^[7]方法: ①学习训练: 每只大鼠依次从 4 个象限投入水中, 记录动物找到水下平台的时间 (s)。每次训练 4 个象限, 每只动物每天训练 4 次, 连续训练 5 d; ②定位航行试验: 在学习训练结束后第 5 天进行, 将大鼠从某一固定象限投入水池中, 记录找到平台的时间, 为“逃避潜伏时间”, 120 s 内找不到平台者记为 120 s , 连续测试 4 d; ③空间探索试验: 在定位航行试验后进行, 撤走安全平台, 将大鼠从某一固定象限投入水中, 记录大鼠 120 s 内平台探索次数。

1.2.4 脑组织取材 各组大鼠分别于术后 1、2、4、12 周用

冰冻生理盐水及 4% 冰冻多聚甲醛溶液经心脏灌注, 随后断头取脑, 再用 4% 多聚甲醛固定 24 h 。梯度蔗糖溶液脱水, 液氮速冻, 冰冻切片机行连续切片, 片厚 $6 \mu\text{m}$ 。

1.2.5 HE 染色 常规 HE 染色, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。

1.2.6 刚果红染色 苏木素染色 1 min , 自来水冲洗 1 min , 1% 醋酸酒精分化数秒, 自来水冲洗 1 min , 60°C 自来水返蓝 30 min , 甲醇刚果红染色 25 min , 0.1% 碱性酒精分化数秒, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。

1.2.7 免疫荧光染色 切片经 0.01 mol/L PBS 漂洗后, 经山羊血清封闭液封闭后, 加入 Anti Amyloid beta A4 protein (millionpore 1: 200) 及 anti- α -actin (millipore 1: 1000), 4°C 孵育过夜, PBS 漂洗, 加入稀释后的二抗 (1: 1000) 37°C 孵育 1 h , PBS 漂洗, 然后缓冲甘油封片, 荧光显微镜下观察。

1.2.8 统计分析 Morris 水迷宫测试结果以均数 $\pm$ 标准差表示, 大鼠逃避潜伏期统计方法采用重复测量方差分析, 穿越平台次数统计方法采用单因素方差分析。采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, $P < 0.05$ 为显著性差异。

2 结果

2.1 Morris 水迷宫试验结果

经过 4 d 的训练, 各亚组大鼠的逃避潜伏期时间均逐渐缩短。分别对比 4 周及 12 周亚组大鼠可见, 模型组大鼠每天的逃避潜伏期均较假手术对照组长 ($P < 0.05$); 对比总的逃避潜伏期, 模型组大鼠的逃避潜伏期与假手术对照组时间之间存在显著性差异 ($P < 0.001$, 表 1)。对比大鼠穿越平台次数的变化, 4 周及 12 周亚组大鼠, 模型组大鼠穿越平台次数较假手术对照组要显著减少。

表 1 逃避潜伏期的变化

Tab.1 Changes of escape latency of the rats in water maze test (s, Mean $\pm$ SD, $n=5$)

Group	Day of training in each test				
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Total time
Experiment (4 weeks)	34.82 $\pm$ 5.76**	24.59 $\pm$ 4.95*	19.44 $\pm$ 5.23*	12.28 $\pm$ 2.09*	26.85 $\pm$ 1.30**
Control (4 weeks)	15.93 $\pm$ 3.57	13.05 $\pm$ 4.75	9.50 $\pm$ 3.39	7.99 $\pm$ 2.70	9.78 $\pm$ 0.72
Experiment (12 weeks)	56.92 $\pm$ 11.49 $^\diamond$	44.79 $\pm$ 5.71 $^\diamond$	34.66 $\pm$ 9.59 $^\diamond$	20.08 $\pm$ 7.18 $^\diamond$	47.64 $\pm$ 2.59 $^\diamond$
Control (12 weeks)	36.06 $\pm$ 10.10	22.12 $\pm$ 12.35	15.83 $\pm$ 5.70	10.30 $\pm$ 6.06	14.69 $\pm$ 1.08

** $P < 0.001$ vs control 4 weeks group; * $P < 0.05$ vs control 4 weeks group; $^\diamond P < 0.001$ vs control 12 weeks group; $^\diamond P < 0.05$ vs control 12 weeks group.

2.2 脑组织 HE 染色

经 HE 染色后, 实验组大鼠脑组织切片可见海马区颗粒细胞减少, 细胞变性, 胶质细胞增生, 海马内小血管壁变性; 大脑皮层处可见神经细胞肿胀、变性、坏死, 可

见吞噬细胞吞噬现象。随着时间推移, 上述病理表现逐渐增多, 对照组 HE 染色未见明显病理改变 (图 1)。

2.3 脑组织刚果红染色

经甲醇刚果红染色后, 显微镜下观察可见实验组大

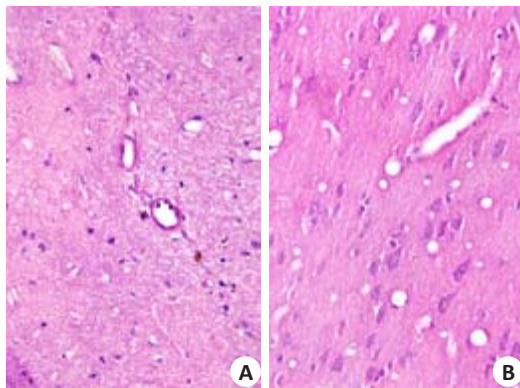


图1 脑组织HE染色

Fig.1 HE staining of the brain tissue of a model (A) and a control (B) rat (Original magnification: $\times 40$).

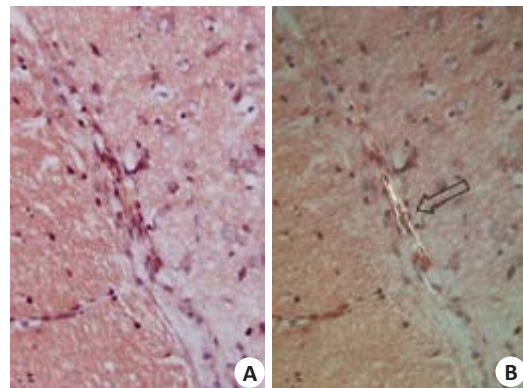


图2 模型组刚果红染色

Fig.2 Congo Red staining of the brain tissue of a model rat under white (A) and polarized (B) light (Original magnification: $\times 40$).

鼠脑组织内及血管壁上可见橘红色均一无结构的淀粉样物质沉积,偏振光显微镜下可观察到呈现苹果绿色双折光现象(图2,箭头所示);对照组刚果红染色未见类似病理改变。

刚果红染色显示,模型1周组未见明显淀粉样蛋白沉积,模型2周组可见淀粉样蛋白在海马小血管周围脑组织中聚集,模型4周组可见小血管周围有淀粉样蛋白沉积;模型12周组可见大量淀粉样蛋白沉积在小血管

壁,管壁增厚,小血管狭窄或闭塞(图3,箭头所示)。

假手术对照组术后各亚组均未见明显淀粉样蛋白沉积(图4)。

2.3 免疫荧光染色

双重染色标记A β 和 α -actin后在荧光显微镜下观察可见:模型1周组及2周组海马内有少量A β 纤维沉积,但小动脉周围未见A β 纤维沉积(图5、6);模型4周组可见少量A β 纤维分布在小动脉(α -actin染色阳性的血管)

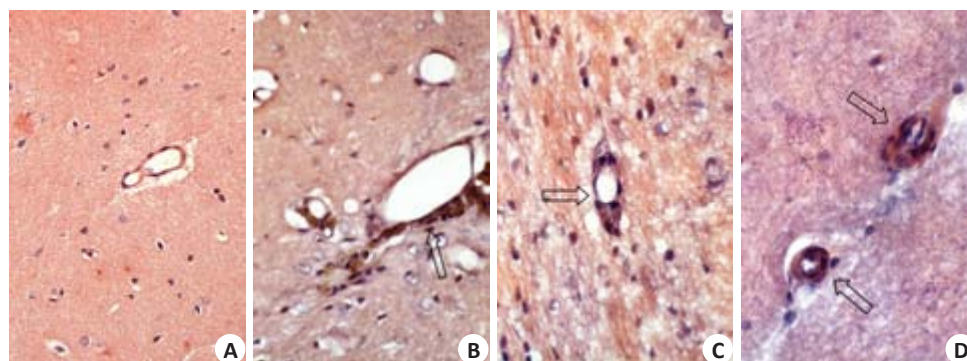


图3 模型组刚果红染色

Fig.3 Congo red staining of the brain tissues in the model rats (Original magnification: $\times 40$). A-D: 1, 2, 4, and 12 weeks after the modeling, respectively.

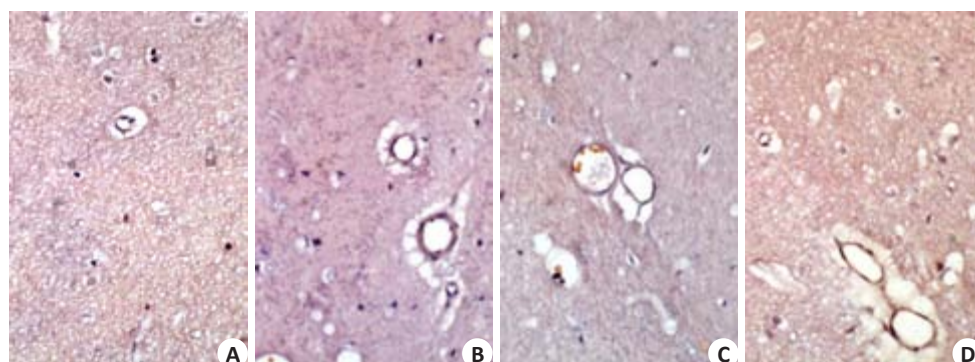


图4 假手术对照组刚果红染色

Fig.4 Congo red staining of the brain tissue in the control group (Original magnification: $\times 40$). A-D: 1, 2, 4, and 12 weeks after sham operation, respectively.

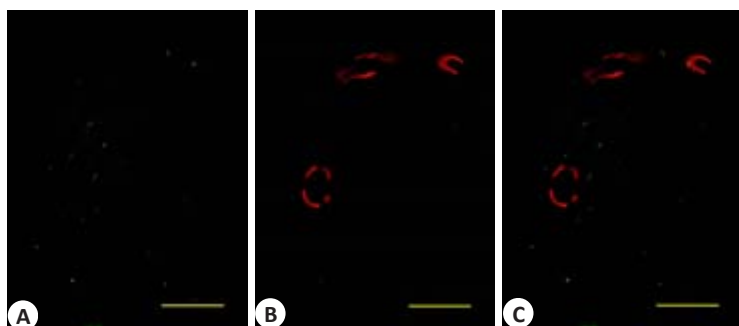


图5 模型1 w组免疫荧光染色

Fig.5 Immunocytochemistry of the brain tissue of a model rat at 1 week after modeling (Bars=50 μm). A: Aβ; B: α-actin; C: Merged.

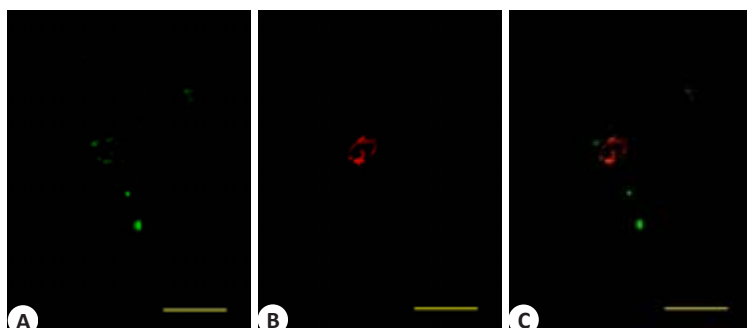


图6 模型2 w组免疫荧光染色

Fig.6 Immunocytochemistry of the brain tissue of a model rat at 2 weeks after modeling (Bars=50 μm). A: Aβ; B: α-actin; C: Merged.

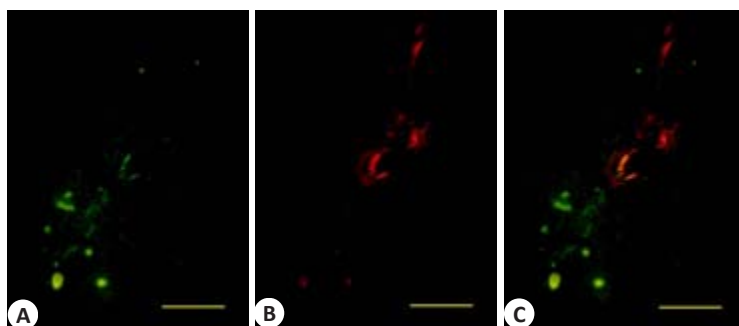


图7 模型4 w组免疫荧光染色

Fig.7 Immunocytochemistry of the brain tissue of a model rat at 4 weeks after modeling (Bars=50 μm). A: Aβ; B: α-actin; C: Merged.

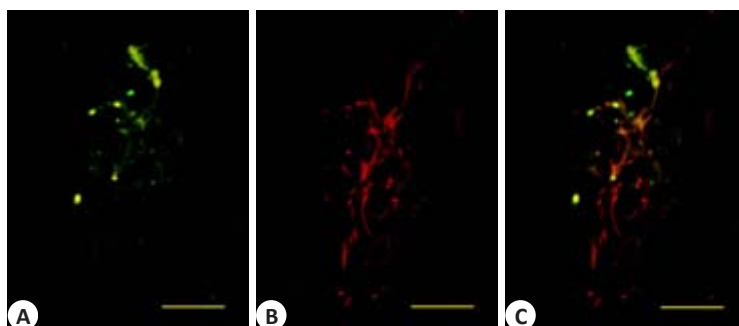


图8 模型12 w组免疫荧光染色

Fig.8 Immunocytochemistry of the brain tissue of a model rat at 12 weeks after modeling (Bars=50 μm). A: Aβ; B: α-actin; C: Merged.

周围(图7);模型12周组海马内聚集在小动脉周围的Aβ纤维较模型4周组明显增多(图8)。

3 讨论

我们采用立体定向双侧海马注射Aβ₁₋₄₂纤维成功制备了大鼠AD动物模型。术后4周及12周亚组进行的Morris水迷宫实验显示模型组大鼠的高级认知功能发生了明显损害,而假手术对照组未提示大鼠高级认知功能损害,HE染色可见模型组大鼠颗粒细胞减少,细胞变性,胶质细胞增生。刚果红染色可见模型组大鼠脑组织内和血管壁上有淀粉样蛋白沉积,免疫荧光染色显示淀粉样蛋白在动物脑内存在动态迁移过程,模型组可见淀粉样蛋白从动物脑组织内逐渐向小动脉迁移,逐渐附着于小动脉壁,导致小动脉狭窄或闭塞,可导致脑血流量下降,造成CAA的发生。

AD的主要病理学特征包括Aβ聚集形成的SP、Tau蛋白异常聚集形成的神经元纤维缠结、突触减少和神经元丢失^[1-2]。近年来越来越多研究发现,CAA也是AD的主要病理学特征,据文献报道,约90%~96%的AD患者脑内毛细血管壁上可见Aβ纤维沉积而形成CAA的病理改变^[8],而无AD的老龄人中,CAA患病率仅为10%~40%^[9],这表明,CAA与AD之间存在着密切的联系。有散发性AD患者脑组织内存在广泛的Aβ纤维沉积导致的CAA和严重的血管周围神经元纤维缠结,却没有发现典型的SP,提示AD与CAA和血管周围病理变化有关,而与SP无关^[10]。CAA是Aβ纤维在脑组织及血管壁中沉积导致的脑组织局限性炎性病变,使小血管与毛细血管的通透性发生改变,最终形成脑血管壁纤维蛋白样坏死、扩张或狭窄,脑血流量降低,导致痴呆的发生^[11]。

一般认为,CAA属于蛋白质清除障碍性动脉病(protein-elimination-failure arteriopathy, PEFA),是脑实质内Aβ清除障碍所致^[12-15]。大量研究表明,Aβ的生成和清除失衡可造成Aβ在血管周围沉积从而导致CAA,由此提出了“Aβ清除障碍假说”^[15]。该假说认为Aβ在特定脑区内聚集引发相应的神经毒性作用,造成突触损伤,神经元死亡,从而导致了AD的发生。Aβ是一个含有39~43个氨基酸(约为42 000)的可溶性多肽,病理状态下,Aβ多肽能够以多肽链间的β-片状折叠形式聚集形成不溶性Aβ纤维,极易在脑组织中沉积形成淀粉样斑块,这可能是导致

AD 发生的主要原因^[16-17]。不溶性A β 纤维等大分子物质主要通过脑淋巴循环途径清除。目前研究表明^[18],虽然脑内缺乏传统意义上的淋巴管,但脑内的血管周围间隙(VRS)成为脑内淋巴引流的主要途径。不溶性A β 纤维在通过VRS引流清除的过程中极易沉积在皮层内和软脑膜下小动脉周围(主要是血管壁和星形胶质细胞胶质界膜),逐渐在局部形成淀粉样斑块,并侵入动脉壁内,导致CAA。脑动脉的搏动是A β 在VRS中清除的动力,而AD患者脑动脉壁上形成的淀粉样斑块将使脑动脉的搏动减弱,必然会导致A β 清除障碍加重,促进A β 纤维在脑动脉壁上的沉积^[19]。此外,淀粉样斑块形成后还可阻塞VRS,导致脑淋巴循环障碍^[9],也会促进A β 纤维在脑动脉壁上的沉积,导致恶性循环。

本研究通过立体定向双侧海马内注射A β_{1-42} 纤维制备AD动物模型,明确了CAA是AD的主要病理学变化。但CAA的发生机制目前仍不清楚,需要进一步从细胞及分子水平进行研究。

参考文献:

- [1] Castellani RJ, Rolston RK, Smith MA. Alzheimer's disease[J]. Dis Mon, 2010, 56(9): 484-546.
- [2] Collie A, Maruff P. The neuropsychology of preclinical Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. Neurosci Biobehav Rev. 2000, 24(3): 365-74.
- [3] Kövari E, Herrmann FR, Hof PR, et al. The relationship between cerebral amyloid angiopathy and cortical microinfarcts in brain ageing and Alzheimer's disease [J]. Neuropathol Appl Neurobiol, 2013, 39(5): 498-509.
- [4] 刘冬戈, 吴浩强, 满开泉, 等. 阿尔茨海默病患者脑组织病理形态学及 β -淀粉样蛋白免疫组织化学观察[J]. 中华病理学杂志, 1999, 28(6): 405-8.
- [5] Souza LC, Filho CB, Goes AT, et al. Neuroprotective effect of physical exercise in a mouse model of Alzheimer's disease induced by β -amyloid₁₋₄₀ peptide[J]. Neurotox Res, 2013, 24(2): 148-63.
- [6] Zussy C, Brureau A, Delair B, et al. Time-course and regional analyses of the physiopathological changes induced after cerebral injection of an amyloid β fragment in rats[J]. Am J Pathol, 2011, 179(1): 315-34.
- [7] Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory[J]. Nat Protoc, 2006, 1(2): 848-58.
- [8] Weller RO, Preston SD, Subash M, et al. Cerebral amyloid angiopathy in the aetiology and immunotherapy of Alzheimer disease[J]. Alzheimers Res Ther, 2009, 1(2): 6.
- [9] de la Torre JC. Alzheimer's disease as a vascular disorder [J]. Stroke, 2002, 33(4): 1152-62.
- [10] Pezzini A, Del Zotto E, Volonghi I, et al. Cerebral amyloid angiopathy: a common cause of cerebral hemorrhage[J]. Curr Med Chem, 2009, 16(20): 2498-513.
- [11] Zhang W, Huang W, Jing F. Contribution of blood platelets to vascular pathology in Alzheimer's disease[J]. J Blood Med, 2013, 4: 141-7.
- [12] Hawkes CA, Härtig W, Kacza J, et al. Perivascular drainage of solutes is impaired in the ageing mouse brain and in the presence of cerebral amyloid angiopathy [J]. Acta Neuropathol, 2011, 121(4): 431-43.
- [13] Carare RO, Bernardes-Silva M, Newman TA, et al. Solute, but not cells, drain from the brain parenchyma along basement membranes of capillaries and arteries. Significance for cerebral amyloid angiopathy and neuroimmunology [J]. Neuropathol Appl Neurobiol, 2008, 34(2): 131-44.
- [14] Weller RO, Subash M, Preston SD, et al. Perivascular drainage of amyloid-beta peptides from the brain and its failure in cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease [J]. Brain Pathol, 2008, 18(2): 253-66.
- [15] Zlokovic BV. New therapeutic targets in the neurovascular pathway in Alzheimer's disease [J]. Neurotherapeutics, 2008, 5(3): 409-14.
- [16] Bieschke J, Russ J, Friedrich RP, et al. EGCG remodels mature alpha-synuclein and amyloid-beta fibrils and reduces cellular toxicity [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(17): 7710-5.
- [17] Maezawa I, Zimin PI, Wulff H, et al. Amyloid-beta protein oligomer at low nanomolar concentrations activates microglia and induces microglial neurotoxicity [J]. J Biol Chem, 2011, 286(5): 3693-706.
- [18] Love S, Miners S, Palmer J, et al. Insights into the pathogenesis and pathogenicity of cerebral amyloid angiopathy [J]. Front Biosci, 2009, 14: 4778-92.
- [19] Chow N, Bell RD, Deane R, et al. Serum response factor and myocardin mediate arterial hypercontractility and cerebral blood flow dysregulation in Alzheimer's phenotype [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(3): 823-8.

(编辑:孙昌朋)