

阿尔茨海默病转基因模型 *Tg2576* 小鼠血清的代谢组学研究

黎冰林, 卢鑫, 李江超, 王佳, 王丽京, 杨永霞*

(广东药科大学基础学院, 广州 510006)

【摘要】 目的 *Tg2576* 转基因小鼠与阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 患者的病理改变相近, 本文动态研究了 *Tg2576* 小鼠在 AD 发病不同阶段的血清代谢物特征, 为临床 AD 的早期诊断提供代谢依据。**方法** 收集 *Tg2576* 小鼠在 AD 发病初期 (6 个月) 和末期 (12 个月) 时的血清样本, 采集样本的 ¹H NMR 谱并运用多变量分析方法进行代谢特征的分析。**结果** 结果显示 *Tg2576* 与 *C57* 小鼠分别在 6 和 12 个月时的血清代谢特征有明显差异, 且不同 AD 发病阶段的 *Tg2576* 小鼠具有明显的代谢差异。与 *C57* 小鼠相比, 在 AD 出现的初期阶段, *Tg2576* 小鼠血清中乳酸、肌醇和氨基酸 (如亮氨酸、异亮氨酸、丙氨酸) 的含量升高, 而脂质、胆碱、磷脂酰胆碱/甘油磷脂酰胆碱、甜菜碱、甘氨酸和葡萄糖含量降低; 在 AD 发病的末期, 血清中乳酸、肌醇和丙氨酸的含量继续上升, 脂质、胆碱、磷脂酰胆碱/甘油磷脂酰胆碱、甜菜碱和甘氨酸含量持续降低, 同时谷氨酸和肌酸含量初步显示出下降趋势。通过比较 AD 的初期和末期血清代谢物, 我们能够发现疾病末期血清中乳酸、肌醇和丙氨酸含量升高, 脂质、胆碱、磷脂酰胆碱、甘油磷脂酰胆碱含量降低。在这些代谢物中, 乳酸、脂质、胆碱、磷脂酰胆碱和甘油磷脂酰胆碱在 AD 发生初期已具有显著性变化, 且与 AD 发生的严重程度密切相关。**结论** 结果表明 *Tg2576* 小鼠中乳酸与阿尔茨海默病程度的加重呈正相关变化, 而脂质、胆碱、磷脂酰胆碱和甘油磷脂酰胆碱呈负相关改变, 且这些代谢物随着疾病的发展呈动态进行性变化, 可能是 AD 早期诊断的重要代谢标志物。

【关键词】 阿尔茨海默病; *Tg2576* 小鼠; 核磁共振氢谱; 代谢组学

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2017) 02-0218-07

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2017.02.019

Serum metabolic changes in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease

LI Bing-lin, LU Xin, LI Jiang-chao, WANG Jia, WANG Li-jing, YANG Yong-xia*

(School of Basic Courses, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

【Abstract】 Objective To provide a basis for clinical diagnosis, a serum metabonomic dynamic study was carried out on the *Tg2576* mouse model at different stages of Alzheimer's disease (AD) whose pathological progress is similar to that of human AD patients. **Methods** Serum samples of *Tg2576* mice were collected at the early (6 months) and late (12 months) stages of Alzheimer's disease. The ¹H NMR spectra of the serum samples were collected and the metabolic characteristics were analyzed by multivariate analysis. **Results** Significant differences in serum metabonomics were found in the transgenic *Tg2576* mice and *C57* mice at 6 and 12 months of age, and there were significant metabolic changes in *Tg2576* mice at different stages of Alzheimer's disease. Compared with *C57* mice, the *Tg2576* mice at early stage of Alzheimer's disease showed higher levels of serum lactate, myo-inositol and amino acids (such as leucine, isoleucine, alanine), and lower levels of lipids, choline, phosphorylcholine, glycerol phosphoglycerolcholine, betaine, glycine and glucose. At the late

[基金项目] 广东省科技计划项目 (编号: 2016A030303062)。

[作者简介] 黎冰林 (1992 -), 男, 硕士研究生, 研究方向: 病理学与病理生理学。E-mail: libinglin0913@163.com

[通讯作者] 杨永霞 (1979 -), 女, 博士, 教授, 研究方向: 生物波谱与代谢组学。E-mail: sheepma@163.com

stage of Alzheimer's disease, the transgenic *Tg2576* mice had higher levels of lactate, myo-inositol and alanine, while the serum levels of lipids, choline, phosphorylcholine, glycerophosphorylcholine, betaine, and glycine continued to drop. Meanwhile glutamine and creatine levels started to decline. By comparing the early and late serum metabolites of Alzheimer's disease, serum metabonomic profiles of the late stage of Alzheimer's disease indicated an up-regulation of lactate, myo-inositol and alanine, and a down-regulation of lipids, choline, phosphorylcholine and glycerophosphorylcholine levels. Moreover, the levels of lactate, lipids, choline, phosphorylcholine and glycerophosphorylcholine showed statistical significance at the early stage of AD, and they were closely correlated with the severity of Alzheimer's disease. **Conclusions** The above results show that the changes of lactate, myo-inositol and alanine are positively-correlated with the development of AD, while the serum levels of lipids, choline, phosphorylcholine and glycerophosphorylcholine are inversely-proportional to the severity of AD. These metabolites are dynamically and progressively changed along with the disease progression, which hopefully may serve as early metabolic markers for the diagnosis of AD in clinical practice.

【Key words】 Alzheimer's disease; *Tg2576* mice; Metabonomics; NMR¹H spectra

Corresponding author: YANG Yong-xia, E-mail: sheepma@163.com

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 为老年期痴呆中最常见的一种类型, 是一种慢性中枢神经系统变性病 (neurodegenerative disease), 其主要的神经病理特征主要包括脑神经组织中淀粉样 β 蛋白 (amyloid beta protein, A β) 的积聚, 神经斑块的出现以及神经元纤维的交联^[1]。随着我国老龄化的加剧, 国内 AD 的发病率也逐年升高, 人们对 AD 的诊断与治疗也日益关注。由于 AD 的发病机理尚未明确, 临床诊断上主要依靠临床表现和神经心理学评估, 缺乏客观的、有效的、无创的诊断技术, 早期诊断还很困难^[2]。*Tg2576* 转基因鼠是由 Hsiao 等^[3]创建的, 用于研究 AD 的经典动物模型^[4]。我们研究发现, *Tg2576* 小鼠在 6 个月时初步呈现老年痴呆症状, 但脑组织切片染色并未观察到淀粉样 β 斑块, 属于 AD 发病早期; 在 12 个月时, 脑组织切片已明显观察到淀粉样斑块^[1], 属于阿尔茨海默病发病末期, 这与已报道的研究结果一致^[4,5]。

代谢组学 (metabonomics) 可以动态描述体内代谢循环中基本化合物性质与含量改变的一门学科, 已经被广泛地应用到药物研发、分子生理学、分子病理学、临床诊断等重要领域^[6]。在阿尔茨海默病的研究中, 该方法已经用来研究脑组织的代谢改变, 并筛选出可能的生物标志物^[7,8]。我们前期研究发现阿尔茨海默病患者血清的代谢特征与健康人具有明显的差异^[9], 但是与该病发病程度相关的动态代谢改变还不清楚。因此, 本研究拟用基于核磁共振氢谱的代谢组学技术, 动态研究 *Tg2576* 小鼠在老年痴呆发生的初期和末期血清的代谢特征, 筛选与发病程度密切相关的代谢标志物, 为临床 AD 患者的早期无创诊断提供具有潜在价值的代谢依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物和饲养环境

阿尔茨海默症 *Tg2576* 转基因小鼠构建于 *C57B6/SJL* 背景, 购自美国 Taconic Company (Taconic: Stock #1349)。*C57BL/6* 小鼠购自广东省医学实验动物中心【SCXK(粤) 2013-0002】。以上实验用鼠均自由饲养在校内动物中心【SYXK(粤) 2012-0125】: 室内温度维持在 (24 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$ 之间, 湿度保持在 40%~60%, 噪音小于 60 分贝。

1.2 试剂和仪器

重水 (D_2O) (青岛腾龙科技有限公司), 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS) 配制试剂均为国产分析纯; 5 mm 核磁管 (北京欣维尔玻璃仪器有限公司), 500 MHz Bruker AVANCE III 超导液体 NMR 波谱仪 (瑞士 Bruker 公司), Sorvall Primo R 台式冷冻离心机 (Thermo)。

1.3 血样的收集处理

用乙醚迷昏小鼠, 眼眶静脉丛取血常温静置一段时间后, 室温 6000 r/min 离心 30 min, 吸取上层血清待存于 -80°C 备用。样品检测前处理: 血清解冻后在 4°C 条件下 15 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液 300 μL , 与 100 μL 的 D_2O 和 100 μL 的 PBS 于核磁管中混匀, 放置 4°C 待测。

1.4 数据的采集和分析

对每份血清样本分别进行代谢数据采集, NMR 波谱仪探头温度设为 25°C (298 K), 选用已编定的 Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) 脉冲序列。采样的重要参数: 谱宽为 20 ppm, 延迟时间设为 3 s, 回波时间为 0.1 s, 测样点数 32 k, 测样循环次数为 128 次, 将自由感应衰减 (free induction decay, FID) 信号

在 Topspin 2.1 软件中经 32 k 傅立叶变换为核磁共振谱图,随后手动调相位和基线校正,以乳酸的双峰 δ 1.33 进行化学位移定标,然后参考文献和 2D 谱对谱图中的各类代谢物逐一归属。

对所有的 NMR ^1H 谱采用 Bruker Amix 软件进行积分,积分区间为 δ 0.5 ~ 9.0,积分间隔为 0.004 ppm,为避免积分区间在 δ 4.7 ~ 5.2 的水峰影响,将其积分值设为零。在数据分析前,需对每份积分数据进行归一化处理。然后采用 SIMCA-P + 12.0 软件对归一化后的数据进行多变量分析,包括:主成分分析(principal component analysis, PCA)和正交偏最小二乘判别法(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)模式识别分析。在 PCA 分析中,结果用得分矩阵图(score plot)表示。OPLS-DA 分析中,结果用得分矩阵图和负荷图(loading plot)表示。其中负荷图中相关系数编码图是采用 Matlab(the Math Works, Inc., USA)脚本直接处理 OPLS-DA 模型中 loading 和 correlation coefficient 值得到。

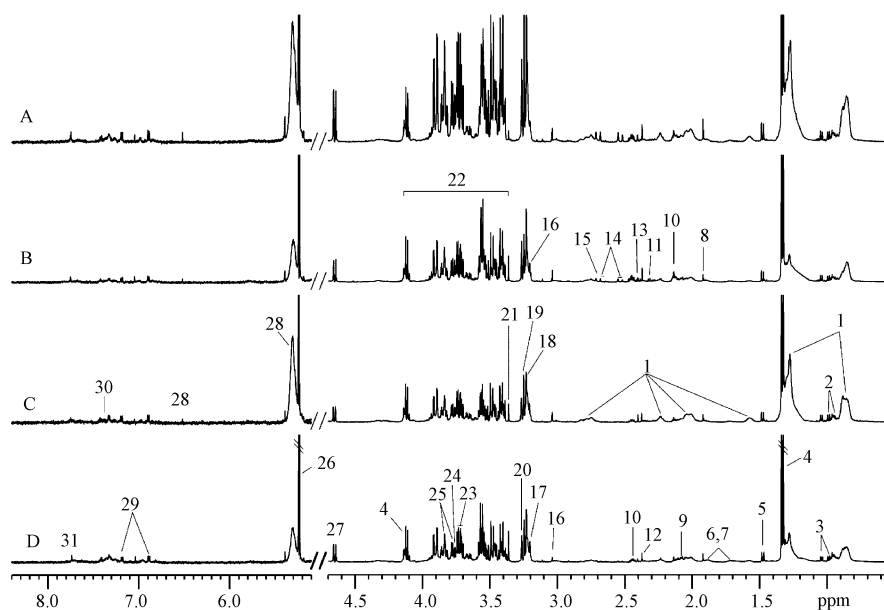
1.5 统计学检验

对上述筛选得到对样本区分有贡献的代谢物积分值使用 SPSS(Version 16.0, SPSS Inc., USA) 软件做统计学检验($P < 0.05$)。

2 结果

2.1 Tg2576 和 C57 小鼠血清的 NMR ^1H 谱比较

图 1 为 Tg2576 小鼠和 C57 小鼠在 6 个月和 12 个月时血清的 NMR ^1H 谱,主要的代谢物有:脂质(lipids, δ 0.82 ~ 0.88, 1.27)、亮氨酸/异亮氨酸(leucine/isoleucine, δ 0.93, 1.01)、缬氨酸(valine, δ 0.98, 1.04)、乳酸(lactate, δ 1.33, 4.11)、丙氨酸(alanine, δ 1.48)、赖氨酸(lysine, δ 1.72, 1.89)、精氨酸(arginine, δ 1.68, 1.90)、乙酸盐(acetate, δ 1.91)、谷氨酸(glutamate, δ 2.06, 2.36)、谷氨酰胺(glutamine, δ 2.15, 2.44)、D-3-羟基丁酸(D-3-hydroxybutyrate, δ 2.31, 2.41)、丙酮酸盐(pyruvate, δ 2.37)、琥珀酸盐(succinate, δ 2.41)、柠檬酸(citrate, δ 2.52, 2.69)、天冬氨酸盐(aspartate, δ 2.68,



注:1. 脂质; 2. 亮氨酸/异亮氨酸; 3. 缬氨酸; 4. 乳酸; 5. 丙氨酸; 6. 赖氨酸; 7. 精氨酸; 8. 乙酸盐; 9. 谷氨酸盐; 10. 谷氨酰胺; 11. D-3-羟基丁酸; 12. 丙酮酸盐; 13. 琥珀酸盐; 14. 柠檬酸盐; 15. 天冬氨酸盐; 16. 肌酸; 17. 胆碱; 18. PC; 19. GPC; 20. 甜菜碱; 21. 鲨肌醇; 22. 葡萄糖/氨基酸; 23. 牛磺酸; 24. 甘氨酸; 25. 肌醇; 26. α -葡萄糖; 27. β -葡萄糖; 28. 不饱和脂肪酸; 29. 酪氨酸; 30. 苯丙氨酸; 31. 组氨酸。

图 1 C57 小鼠(6 m, A; 12 m, B)和 Tg2576 小鼠(6 m, C; 12 m, D)血清 NMR ^1H 谱

Note. (A) C57 mice at 6 m, (B) C57 mice at 12 m, (C) Tg2576 mice at 6 m, (D) Tg2576 mice at 12 m. Keys: 1. lipids; 2. leucine / isoleucine; 3. valine; 4. lactate; 5. alanine; 6. lysine; 7. arginine; 8. acetate; 9. glutamate; 10. glutamine; 11. D-3-hydroxybutyrate; 12. pyruvate; 13. succinate; 14. citrate; 15. aspartate; 16. creatine; 17. choline; 18. PC; 19. GPC; 20. betaine; 21. scyllitol; 22. glucose / amino acid; 23. taurine; 24. glycine; 25. myo-inositol; 26. α -glucose; 27. β -glucose; 28. unsaturated fatty acid; 29. tyrosine; 30. phenylalanine; 31. Histidine.

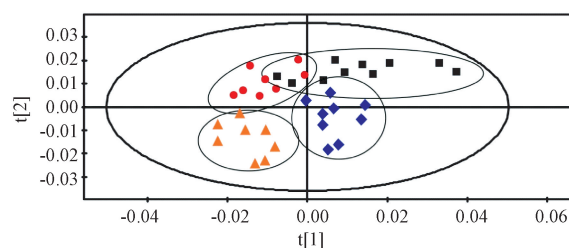
Fig. 1 Serum NMR ^1H spectra of Tg2576 and C57 mice at different stages of age

2.83)、肌酸(creatine, 83.03)、胆碱(choline, 83.21)、磷脂酰胆碱/甘油磷脂酰胆碱(phosphocholine/glycerolphosphocholine, PC/GPC, 83.22, 3.24)、甜菜碱(betaine, 83.27)、鲨肌醇(scyllitol, 83.36)、牛磺酸(taurine, 83.43)、甘氨酸(glycine, 83.56)、肌醇(myo-inositol, 83.56, 3.66)、葡萄糖(glucose, 83.70~3.90)、不饱和脂肪酸(unsaturated fatty lipid, 85.3)、酪氨酸(tyrosine, 86.87, 7.17)、苯丙氨酸(phenylalanine, 87.33~7.5)、组氨酸(histidine, 87.75)。从图1我们可以观察到 *Tg2576* 小鼠血清中脂质含量明显低于对照鼠。为了进一步全面分析所有样本中血清代谢物的变化,我们采用模式识别方法进行分析。

2.2 数据分析结果

Tg2576 和 *C57* 小鼠 6 个月和 12 个月的血清¹H CPMG 谱的 PCA 分析见图 2。结果显示 *Tg2576* 小鼠在阿尔茨海默病发病初期(6 个月)与 *C57* 鼠具有明显区分,且这种区分在,在 AD 末期(12 个月)时更加明显;

Tg2576 小鼠在阿尔茨海默病发病初期和末期的血清具有明显不同的代谢特征。为了筛选出各组样本之间的差异代谢物,我们进一步做了 OPLS-DA 分析。



注: $t[1]$ 代表第一主成分, $t[2]$ 代表第二主成分 ($R^2 = 87.8\%$, $Q^2 = 70.3\%$)。

图 2 *C57* 小鼠(6 m ■、12 m ●)和 *Tg2576* 小鼠(6 m ◆、12 m ▲)血清 PCA 分析结果
Note. $t[1]$: The first principal component, $t[2]$: The second principal component ($R^2 = 87.8\%$, $Q^2 = 70.3\%$), (■) *C57* mice at 6 m, (●) *C57* mice at 12 m, (◆) *Tg2576* mice at 6 m, (▲) *Tg2576* mice at 12 m.

Fig. 2 PCA analysis results of *Tg2576* and *C57* mice at different stages of age

OPLS-DA 分析结果见图 3。*Tg2576* 和 *C57* 两组小鼠分别在 6 个月龄和 12 个月龄时,以及 *Tg2576* 小鼠在阿尔茨海默病发病的初期和末期血清样本均在 $t[1]$ 维可以明显区分开,且得到了对区分有较大贡献的代谢物。与 *C57* 相比,在 AD 发病

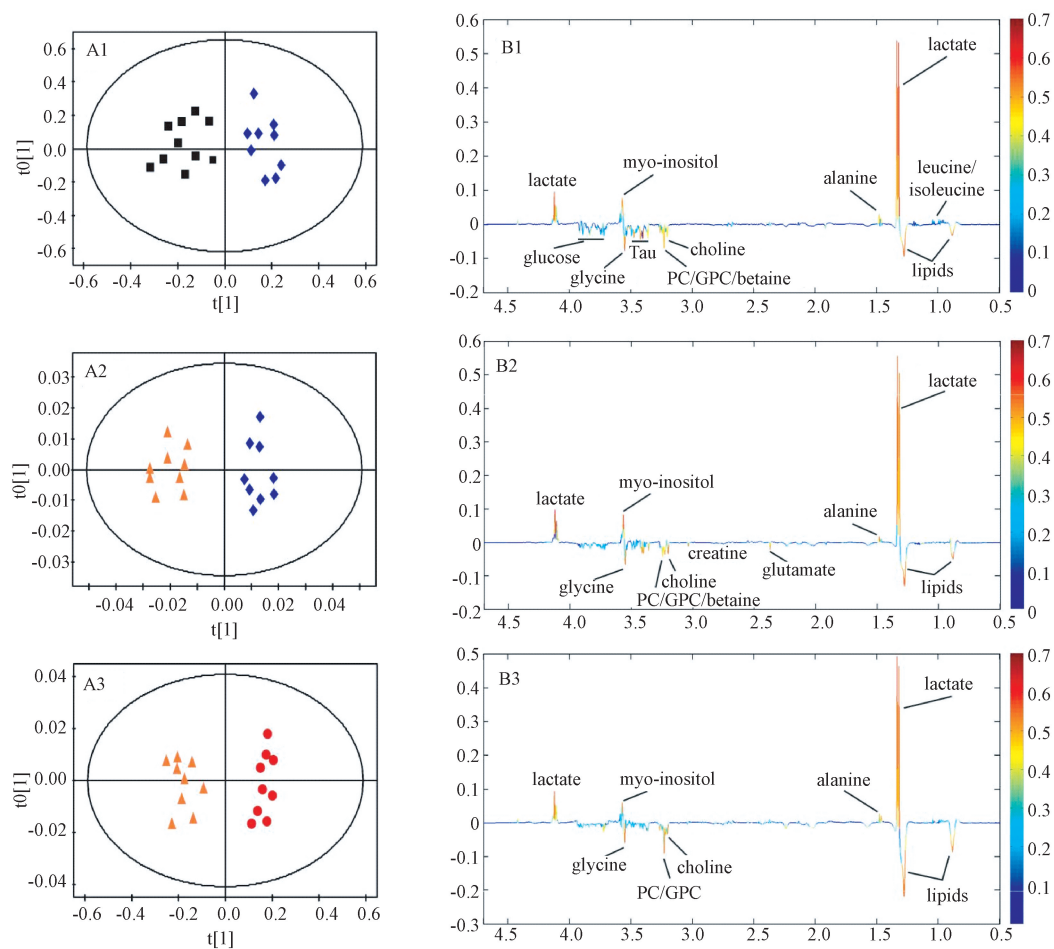
初期, *Tg2576* 小鼠血清中乳酸、肌醇和氨基酸(如亮氨酸、异亮氨酸、丙氨酸)的含量升高,而脂质、胆碱、磷脂酰胆碱/甘油磷脂酰胆碱、甜菜碱、甘氨酸和葡萄糖含量降低;在 AD 发病末期(表达淀粉样蛋白斑), *Tg2576* 小鼠血清中乳酸、肌醇和丙氨酸的含量继续上升,脂质、胆碱、磷脂酰胆碱/甘油磷脂酰胆碱、甜菜碱和甘氨酸含量持续降低,同时谷氨酸盐和肌酸含量初步显示出现下降。进一步对比 *Tg2576* 小鼠在阿尔茨海默病发病初期和末期的血清,发现小鼠发病末期血清中乳酸、肌醇和丙氨酸含量升高,脂质、胆碱、磷脂酰胆碱、甘油磷脂酰胆碱含量降低。在这些代谢物中,乳酸、脂质、胆碱、磷脂酰胆碱和甘油磷脂酰胆碱与阿尔茨海默病的发病程度密切相关,且随着病情的程度加重它们呈现出动态进行性改变。

2.3 统计学分析

为了进一步确定 *Tg2576* 小鼠在 AD 发病初期和末期的血清代谢变化,找出具有统计意义的差异代谢物,将上述经 OPLS-DA 初步筛选得到的对样本区分有贡献的血清代谢物积分值进行统计学分析。结果表明在 AD 发生初期,乳酸、脂质、胆碱、磷脂酰胆碱和甘油磷脂酰胆碱的变化具有统计学意义,且随着 AD 程度的加重,这些代谢物的变化进一步加剧(表 1)。从上述研究结果,我们可以初步推断 *Tg2576* 小鼠血清中乳酸与阿尔茨海默病程度的加重呈动态正相关变化,而脂质、胆碱、磷脂酰胆碱和甘油磷脂酰胆碱呈动态负相关改变,这些代谢物可能是阿尔茨海默病早期诊断的重要代谢标志物。

3 讨论

代谢组学技术可以筛选出与疾病发生发展密切相关的代谢物,在疾病的临床诊断和预测中有着广泛应用^[10-12]。我们前期研究发现 AD 患者血清代谢特征与健康人具有明显差异,AD 患者血清中异亮氨酸和乳酸含量升高,而脂质、谷氨酰胺、肌酸和葡萄糖含量降低^[9]。但是与该病发病程度相关的动态代谢改变,尤其是发病早期的代谢变化还不清楚。因此,本研究动态分析了 *Tg2576* 小鼠在 AD 发生初期和末期的血清代谢特征,结果表明乳酸、脂质、胆碱、磷脂酰胆碱和甘油磷脂酰胆碱与 AD 的发病程度密切相关,且随着疾病的加重,这些代谢物呈现出动态进行性改变,可能是 AD 早期诊断的重要代谢标志物。



注: A1 ~ A3: 得分矩阵图; B1 ~ B3: 负荷图。A1、B1: 6 个月龄的 C57 和 Tg2576 小鼠血清 OPLS-DA 分析结果 ($R^2X = 67.6\%$, $Q^2Y = 93.9\%$); A2、B2: 12 个月龄的 C57 和 Tg2576 小鼠血清 OPLS-DA 分析结果 ($R^2X = 97.5\%$, $Q^2Y = 96.7\%$); A3、B3: Tg2576 小鼠 (6 M, 12 M) 的血清 OPLS-DA 分析结果 ($R^2X = 84.3\%$, $Q^2Y = 91.8\%$)。

图 3 血清代谢物的 OPLS-DA 的分析结果

Note. A1, B1: Scores plot and loading plot of OPLS-DA for 6-month-old Tg2576 and C57 mice ($R^2X = 67.6\%$, $Q^2Y = 93.9\%$). A2, B2: Scores plot and loading plot of OPLS-DA for 12-month-old Tg2576 and C57 mice, ($R^2X = 97.5\%$, $Q^2Y = 96.7\%$). A3, B3: Scores plot and loading plot of OPLS-DA for 6 and 12-month-old Tg2576 mice ($R^2X = 84.3\%$, $Q^2Y = 91.8\%$).

Fig. 3 OPLS-DA analysis of the serum metabolites

表 1 Tg2576 和 C57 小鼠血清中潜在生物标志物的统计分析

Tab. 1 Statistical analysis of potential biomarkers in different months old Tg2576 and C57 mice

代谢物 (Metabolite)	化学位移 (Chemical shift, δ)	C57, 6 m/%	C57, 12 m/%	Tg 2576, 6 m/%	Tg 2576, 12 m/%
脂质 Lipids	0.93 (m), 1.28 (m)	13.84 $\pm$ 0.84	11.77 $\pm$ 1.11	10.47 $\pm$ 0.49 **	8.36 $\pm$ 0.32 [#] $\Delta\Delta$
异亮氨酸 Isoleucine	0.99 (t), 1.02 (d)	0.66 $\pm$ 0.03	0.64 $\pm$ 0.01	0.69 $\pm$ 0.03	0.85 $\pm$ 0.07 ^{##}
乳酸 Lactate	1.33 (d), 4.11 (q)	10.39 $\pm$ 0.66	11.39 $\pm$ 0.62	13.27 $\pm$ 0.63 **	16.03 $\pm$ 0.64 ^{###} $\Delta\Delta\Delta$
丙氨酸 Alanine	1.46 (d)	0.52 $\pm$ 0.05	0.55 $\pm$ 0.04	0.60 $\pm$ 0.06	0.63 $\pm$ 0.08
谷氨酸 Glutamate	2.06 (m), 2.36 (m)	0.65 $\pm$ 0.04	0.83 $\pm$ 0.03	0.67 $\pm$ 0.04	0.66 $\pm$ 0.02 ^{##}
肌酸 Creatine	3.03 (s)	0.28 $\pm$ 0.02	0.27 $\pm$ 0.02	0.23 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.01 ^{###} $\Delta\Delta\Delta$
胆碱 Choline	3.2 (s), 3.51 (t)	1.18 $\pm$ 0.09	1.73 $\pm$ 0.10	0.90 $\pm$ 0.02 *	0.84 $\pm$ 0.06 [#] Δ
磷脂酰胆碱/甘油磷脂酰胆碱 PC/GPC	3.22 (s), 3.60 (m) / 3.24 (s), 3.69 (m)	8.92 $\pm$ 0.23	8.79 $\pm$ 0.19	7.81 $\pm$ 0.23 *	5.97 $\pm$ 0.51 ^{###} Δ
肌醇 Myo-inositol	3.57 (m), 3.65 (m)	4.14 $\pm$ 0.36	3.75 $\pm$ 0.44	4.25 $\pm$ 0.16	4.68 $\pm$ 0.31
葡萄糖 Glucose	3.40 - 3.90	33.27 $\pm$ 0.92	32.31 $\pm$ 1.45	27.93 $\pm$ 0.89 ***	24.89 $\pm$ 0.97 ^{###} Δ

注: 与正常 C57 小鼠 6 m 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 C57 小鼠 12 m 比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$; 与 Tg2576 小鼠, 6 m 比较, Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta$ $P < 0.001$ 。

Note. Compared with the C57 mice at 6 m, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$; Compared with the C57 mouse at 12 m, # $P \leq 0.05$, ## $P \leq 0.01$, ### $P \leq 0.001$; and compared with the Tg2576 mice at 6 m, Δ $P \leq 0.05$, $\Delta\Delta$ $P \leq 0.01$, $\Delta\Delta\Delta$ $P \leq 0.001$. PC/GPC: phosphorylcholine/glycerol phosphorylcholine.

本研究显示 *Tg2576* 小鼠的血清中与能量相关的代谢物发生了明显变化。葡萄糖含量在 *Tg2576* 小鼠血清中降低,在不同的 AD 转基因小鼠的血清中也发现其含量有明显的降低^[13,14],并在前期研究中 AD 患者血清也有明显下降。同时,我们发现在 *Tg2576* 小鼠血清中乳酸浓度明显高于正常鼠,且随着病情的加重其浓度进一步增加,这与临床 AD 患者中的乳酸变化一致。葡萄糖和乳酸含量的变化预示着 AD 的发生过程中能量代谢系统中糖代谢和糖酵解过程发生紊乱。此外,我们同样发现肌酸浓度在 *Tg2576* 小鼠发病末期血清中是降低的,González-Domínguez 等^[15]对 AD 患者血清的研究中也报道了肌酸浓度降低。Adhihetty 等^[16]研究表明肌酸通过肌酸激酶/磷酸肌酸系统将能源从线粒体转移到细胞质,对细胞整体起着能量缓冲和生物能学的基础性作用。并且在动物模型中有研究表明肌酸能够抗神经变性和老化^[17],同时 AD 患者通过补充肌酸能够减轻中枢神经疾病引起的神经性退化^[18]。因此,肌酸可能在 AD 的发生发展过程起着关键性作用。

氨基酸的含量在 *Tg2576* 小鼠发病末期血清中也有明显改变。异亮氨酸水平升高结果与 AD 临床患者血清的代谢研究一致。而谷氨酸的含量水平下降,谷氨酸作为不可缺少的兴奋性神经递质在中枢神经系统中的表达丰富^[19],对大脑的突触传递和神经元的生长和分化起着重要的生理作用^[20,21]。相关文献报道,谷氨酸代谢通路的调节异常可能导致神经递质合成途径受阻,从而引起突触过程失败,最终引发神经退行性疾病^[22]。以上结果说明在 *Tg2576* 转基因小鼠中与谷氨酸相关代谢通路调节异常,谷氨酸浓度的变化可能对 AD 的发生具有重要意义。

脂质含量在 *Tg2576* 转基因小鼠的发病前后明显低于正常鼠,随着病情的加重其浓度也进一步降低,这与临床 AD 患者血清中的研究结果一致。神经系统中脂质含量非常丰富,且生物膜脂质的构成和代谢的改变是 AD 发病机制的重要环节,膜质类代谢异常可能导致胞膜功能的改变进而诱发神经退行性疾病^[23],所以脂质的变化与 AD 疾病的发生发展有着密切关联。同时,我们在 *Tg2576* 转基因小鼠发病初期和末期发现胆碱、磷脂酰胆碱/甘油磷脂酰胆碱含量也下降。胆碱摄取对于质膜的构建、甜菜碱的合成以及胆碱能神经递质的产生起着举足轻重的作用^[24]。Davies 等^[25]报告显示,胆碱能神经元

的损失与 AD 的发生发展相关。在 AD 中,胆碱的变化可能与胆碱能神经递质的产生有所关联;在大多数细胞膜磷脂中磷脂酰胆碱约占 40%,膜磷脂的变化发生在 AD 的病理学进程中,且为 AD 突触丢失的提供分子基础^[26]。我们初步推测胆碱、磷脂酰胆碱/甘油磷脂酰胆碱的变化与 AD 疾病的发生发展有着密切联系。尽管在临床 AD 患者血清没有观察到胆碱类代谢物的变化,我们将在后续的研究中收集临床不同发病程度的 AD 患者血清样本进行验证分析。

本研究采用代谢组学的方法动态研究了 *Tg2576* 小鼠在不同发病阶段血清样本的代谢特征,筛选出 *Tg2576* 小鼠在 AD 发生早期且与疾病严重程度密切相关的血清代谢标志物,这可能为 AD 的早期诊断提供辅助的代谢依据。

参 考 文 献

- [1] Li JC, Han L, Wen YX, et al. Increased permeability of the blood-brain barrier and Alzheimer's disease-like alterations in slit-2 transgenic mice[J]. J Alzheimer's Dis, 2015, 43(2):535-548.
- [2] 陈传锋,何承林,潘鑫,等.我国老年痴呆研究概况[J].宁波大学学报(教育科学版).2012,34(2):45-50.
- [3] Hsiao K, Borchelt DR, Olson K, et al. Age-related CNS disorder and early death in transgenic FVB/N mice overexpressing Alzheimer amyloid precursor proteins[J]. Neuron, 1995, 15(5):1203-1218.
- [4] 李国营,汪华侨,姚志彬,等. AD 转基因模型 *Tg2576* 鼠阳性子鼠的病理和认知行为变化[J]. 神经解剖学杂志,2006,22(4):384-388.
- [5] Kevin AC, Ye L, Stephen M. Overexpression of hAPPswe impairs rewarded alternation and contextual fear conditioning in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease[J]. Learn Mem, 2002,9(5):243-252.
- [6] Tang HR, Wang YL. Metabonomics: A revolution in progress [A]. Progr Biochem Biophys,2006, 33(5):401-417.
- [7] Salek RM, Griffin JL, Robert A, et al. A metabolomic study of the CRND8 transgenic mouse model of Alzheimer's disease[J]. Neurochem Int. 2010,56(8):937-947.
- [8] Lalande J, Halley H, Malet MM, et al. 1H NMR metabolomic signatures in five brain regions of the A β PPsw *Tg2576* mouse model of Alzheimer's disease at four ages[J]. J Alzheimers Dis. 2014,39(1):121-143.
- [9] 张静丽,李江超,杨永霞,等.阿尔茨海默病和帕金森病患者血清代谢组学研究[J]. 第三军医大学学报,2016,38(5):522-526.
- [10] Jiang N, Yan X, Zhou W, et al. NMR-based metabolomic investigations into the metabolic profile of the senescence-accelerated mouse[J]. J Proteome Res, 2008, 7(9):3678-3686.

- [11] Brindle JT, Antti H, Holmes E, et al. Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using ¹H-NMR-based metabolomics [J]. Nat Med, 2002, 8 (12):1439–1444.
- [12] Marchesi JR, Holmes E, Khan F, et al. Rapid and noninvasive metabolomic characterization of inflammatory bowel disease [J]. J Proteome Res, 2007, 6(2):546–551.
- [13] Hu ZP, Browne ER, Liu T, et al. Metabolomic profiling of TASTPM transgenic Alzheimer's disease mouse model [J]. J Proteome Res, 2012, 11(12):5903–5913.
- [14] Graham SF, Holscher C, McClean P, et al. H-1 NMR metabolomics investigation of an Alzheimer's disease (AD) mouse model pinpoints important biochemical disturbances in brain and plasma [J]. Metabolomics, 2013, 9:974–983.
- [15] GonzálezDR, GarcíaBT, GómezA. JL. Using direct infusion mass spectrometry for serum metabolomics in Alzheimer's disease [J]. Anal Bioanal Chem, 2014, 406(28):7137–7148.
- [16] Adhihetty PJ, Beal MF. Creatine and its potential therapeutic value for targeting cellular energy impairment in neurodegenerative diseases [J]. Neuromol Med, 2008, 10(4):275–290.
- [17] Klopstock T, ElstnerM, BenderA, et al. Creatine in mouse models of neurodegeneration and aging [J]. Amino Acids, 2011, 40 (5), 1297–1303.
- [18] GualanoB, Artioli GG, PoortmansJR, et al. Exploring the therapeutic role of creatine supplementation [J]. Amino Acids, 2010, 38(1):31–44.
- [19] Gasic GP, Hollmann M. Molecular neurobiology of glutamate receptors [J]. Annu Rev Physiol, 1992, 54: 507–536.
- [20] Butterfield DA, Pocernich CB. The glutamatergic system and Alzheimer's disease: therapeutic implications [J]. CNS Drugs, 2003, 17:641–652.
- [21] Francis PT. Glutamatergic systems in Alzheimer's disease [J]. Int J Geriatr Psychiatry, 2003, 18: S15–S21.
- [22] Jiménez JF, Molina J, Vargas C, et al. Neurotransmitter amino acids in cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease [J]. J Neurol Sci, 1996, 141(1–2):39–44.
- [23] Klein J. Membrane breakdown in acute and chronic neurodegeneration: focus on choline-containing phospholipids [J]. J Neural Transm, 2000, 107(8–9):1027–1063.
- [24] Ibáñez C, Simó C, Cifuentes A, et al. Toward a predictive model of Alzheimer's disease progression using capillary electrophoresis-mass spectrometry metabolomics [J]. Anal Chem, 2012, 84 (20): 8532–8540.
- [25] Davies P, Maloney AJ. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease [J]. Lancet, 1976, 2(8000):1403.
- [26] SimonyiA, He Y, Sheng W, et al. Targeting NADPH oxidase and phospholipases A2 in Alzheimer's disease [J]. Mol Neurobiol, 2010, 41(2–3):73–86.

[收稿日期] 2016–10–09

书 讯

《实验动物比较组织学彩色图谱》正式出版

《实验动物比较组织学彩色图谱》日前由科学出版社正式出版。本书由中国医学科学院医学实验动物研究所秦川教授主编。该书共分十章, 248 页。

本书主要针对常用实验动物(小鼠、大鼠、豚鼠、兔)的各种组织器官, 阐述其组织形态学以及器官、组织、细胞功能, 特别是针对各种实验动物之间以及实验动物与人之间的相同或相近组织器官进行比较组织形态描述和功能比较。以供实验动物学科研、药物安全评价、实验动物检测等各领域以及基础医学、临床医学、药理学、毒理学等各学科的工作参考。

书中配备组织学彩色图片 700 余张, 组织切片采用了 HE 染色、特殊染色、免疫组化、电镜等技术进行辅助诊断。具有内容详实、图片质量高、染色方法多、实用性强等特点, 科学性强, 准确性高、特点鲜明、重点突出、图文并茂。实为一本难得的学术专著和重要的工具书。

中国实验动物学会现有少量藏书, 价格 180 元/本。欲购者请与中国实验动物学会秘书处联系。010-67781534