

高胆固醇饮食加铜水喂养 WHBE 兔引起的脑组织病理学改变

徐剑钦¹, 陈民利¹, 刘军平¹, 陈娇娇¹, 陈诚¹, 潘永明^{1,2*}

(1. 浙江中医药大学动物实验研究中心/比较医学研究所, 杭州 310053; 2. 浙江大学动物科学学院, 杭州 310058)

【摘要】 目的 观测散发性 WHBE 兔阿尔茨海默症(AD)模型脑组织病理学变化。**方法** 取雄性 WHBE 兔 30 只,随机分成 3 组:正常对照(NC)组,高胆固醇饮食(HCD)组,高胆固醇饮食 + 铜饮水(HCD + Cu²⁺)组,每组 10 只;另取 10 只老年 WHBE 兔作为老年(Senile)组。NC 组和 Senile 组给予普通饲料,HCD 组给予 2% 胆固醇饲料,HCD + Cu²⁺ 组给予 2% 胆固醇饲料和添加 0.12 ppm 铜饮水,连续造模 12 周。造模 12 周时,取血测定总胆固醇(TC)和 β 淀粉样蛋白(A β)1-42 水平;取部分脑组织测定脑皮质和海马组织中超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量,另取冠状切片脑组织行免疫组化染色观察 A β 、 β -分泌酶 1(BACE1)、磷酸化 tau(p-tau)蛋白的阳性表达情况,同时切片行刚果红和皮尔苏斯基氏(Bielschowsky)染色分别观察老年斑和神经纤维缠结情况。**结果** 老年组 WHBE 兔的体重明显高于 NC 组($P < 0.01$),各组血浆 TC、A β 1-42 明显高于 NC 组($P < 0.05$, $P < 0.01$);且各组脑组织中 SOD 活性明显低于 NC 组($P < 0.05$),MDA 含量显著高于 NC 组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。免疫组化染色显示,各组脑组织中 A β 、BACE1、p-tau 蛋白阳性表达均显著高于 NC 组($P < 0.05$, $P < 0.01$),且 HCD + Cu²⁺ 组脑组织中 BACE1 和 p-tau 蛋白阳性表达亦显著高于 HCD 组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。刚果红和 Bielschowsky 染色显示 HCD 组、HCD + Cu²⁺ 组和老年组 WHBE 兔脑组织中观察到大量的老年斑和神经纤维缠结。**结论** 高胆固醇饮食或复合添加微量铜饮水能诱导散发性 AD 模型 WHBE 兔脑部明显的 AD 病理学变化,包括氧化损伤、脑内 A β 沉积增多、老年斑和 tau 病理学等改变,WHBE 兔可用于神经退行性疾病动物模型的研究。

【关键词】 WHBE 兔;散发性阿尔茨海默症;动物模型; β 淀粉样蛋白;高胆固醇血症

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2018) 03-0357-08

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2018.03.014

Brain histopathological changes in WHBE rabbits fed with high cholesterol diet plus copper drinking water

XU Jianqin¹, CHEN Minli¹, LIU Junping¹, CHEN Jiaojiao¹, CHEN Cheng¹, PAN Yongming^{1,2*}

(1. Laboratory Animal Research Center/Comparative Medical Research Institute, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2. College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058)

Corresponding author: PAN Yongming. E-mail: pym918@126.com

【Abstract】 Objective To observe the pathological changes of brain tissues in the WHBE rabbit model of sporadic Alzheimer disease (AD). **Methods** Thirty 3-4-month old male WHBE rabbits were randomly divided into 3 groups: normal control (NC) group, high cholesterol diet (HCD) group, high cholesterol diet + copper drinking water (HCD +

【基金项目】浙江省科技厅公益性项目(No. 2016C37092);浙江中医药大学比较医学创新团队(No. XTD201301);浙江省医药卫生科研基金(No. 2017KY123);浙江省中医药科学研究基金(No. 2018ZA057)。

Funded by Public Projects of Zhejiang Province Science and Technology Department (No. 2016C37092); Zhejiang Chinese Medical University Comparative Medicine Innovation Team (No. XTD201301); Medical Science and Technology Project of Zhejiang Province (No. 2017KY123); Traditional Chinese Medicine Scientific Research Funds of Zhejiang Province (No. 2018ZA057).

【作者简介】徐剑钦(1980—),男,实验师,研究方向:实验动物与比较医学。E-mail: xujianqing1@zcmu.edu.cn

【通信作者】潘永明(1979—),男,副研究员,研究方向:实验动物与比较医学。E-mail: pym918@126.com

Cu^{2+}) group, 10 in each group. Another 10 senile (36–48-month old) male WHBE rabbits were taken as senile group. The NC group and the senile group were fed a normal basic diet, the HCD group fed a 2% cholesterol diet, and the HCD + Cu^{2+} group fed a 2% cholesterol diet plus 0.12 PPM copper drinking water for 12 weeks. The levels of total cholesterol (TC) and β -amyloid protein ($\text{A}\beta$) 1–42 were measured at 12 weeks. The activity of superoxide dismutase (SOD) and the content of malondialdehyde (MDA) in the cortex and the hippocampus were detected. In addition, the covered area of $\text{A}\beta$, β -site APP cleaving enzyme 1 (BACE1) and phosphorylated tau (p-tau) protein in coronal sections of brain tissues were also observed by immunohistochemical staining. The senile plaques and the neurofibrillary tangles were observed by Congo red and Bielschowsky staining, respectively. **Results** The body weight of WHBE rabbits in the senile group was significantly higher than that of the NC group ($P < 0.01$), and the plasma TC and $\text{A}\beta$ 1–42 in each group were significantly higher than that in the NC group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The activity of SOD in brain tissues was significantly lower than that of NC group ($P < 0.05$), and the MDA content was significantly higher than that of NC group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Immunohistochemical staining showed that the covered area of $\text{A}\beta$, BACE1 and p-tau in brain tissues of all groups were significantly higher than that of NC group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the covered area of BACE1 and p-tau protein in the brain tissues of HCD + Cu^{2+} group was also significantly higher than that of the HCD group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Congo red and Bielschowsky staining showed that the number of senile plaques and neurofibrillary tangles were observed in the brain tissues of the HCD, HCD + Cu^{2+} and senile groups. **Conclusions** High cholesterol diet or supplemented with trace copper drinking water can induce obvious AD pathological changes in WHBE rabbit models of sporadic AD with obvious oxidative damage, increased $\text{A}\beta$ deposition and senile plaque in the brain, and pathological changes of tau. WHBE rabbit can be used in the study of animal models of neurodegenerative diseases.

【Key words】 WHBE rabbit; sporadic Alzheimer's disease; animal models; β -amyloid protein; hypercholesterolemia

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种以记忆减退和认知功能障碍等为主的神经退行性疾病,也是老年痴呆的主要类型^[1]。AD 主要病理特征包括细胞外大量 β -淀粉样蛋白 (β -amyloid, $\text{A}\beta$) 沉积形成的老年斑 (senile plaque, SP)、tau 蛋白过度磷酸化导致的细胞内神经纤维缠结 (neurofibril tangles, NFTs) 和神经元丢失^[2]。但到目前为止,AD 的病因尚未明确。临床上仅有 5% 患者是以淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP)、早老素 1、早老素 2 基因突变为主的家族性 AD (familial AD, FAD), 而 95% 患者属于散发性 AD (sporadic AD, SAD)^[3], 表明 AD 的发生与遗传和环境因素有关^[4]。

动物模型是了解疾病的病因、发病机制以及防治药物研发的主要研究手段。虽然目前尚无完全理想的 AD 模型, 主要以 APP^{swe} / PS1^{dE9} 双转基因小鼠、快速老化小鼠、或通过脑内注射 $\text{A}\beta$ 、链脲佐菌素、 AlCl_3 造成细胞损伤等, 且模型动物大多以大小鼠为主, 但由于它们缺乏正确的 APP 序列和缺少触发 $\text{A}\beta$ 肽形成的切割酶^[3], 使其并不适合作为 SAD 的天然模型。临床试验表明, 在 AD 患者中 $\text{A}\beta$ 依赖的信号传导途径不足以引起严重的神经系统衰退和痴呆^[5–6]。但最近临床流行病

学、动物实验和细胞研究表明高胆固醇可引起 $\text{A}\beta$ 积累, 高胆固醇血症被认为是 AD 发生的一个重要危险因素^[7–9]。因此, 研究人员正试图通过胆固醇代谢与 $\text{A}\beta$ 的关系, 来揭示 AD 的病因和病理机制。Sparks 等^[8] 首次应用兔报道了胆固醇和 $\text{A}\beta$ 斑块之间的联系, 并进一步发现在兔中给予高胆固醇饲料的同时添加微量铜离子的饮水后, 可在皮质中观察到淀粉样蛋白沉积物以及至少十二种在人类 AD 患者脑内也观察到的病理特征^[10], 包括学习障碍^[11]。提示兔可作为于散发性 AD 模型动物, 因其能自发产生 $\text{A}\beta$ 肽的切割酶, 且兔 $\text{A}\beta$ 肽序列与人类相同^[12]。白毛黑眼 (White hair and black eye, WHBE) 兔是由本中心自主培育的新的实验兔品系, 最近对 WHBE 兔脑 MRI 分析中, 意外发现部分 WHBE 兔脑 T2WI 中颞叶海马区信号增强^[13], 表现出侧脑室扩张、海马萎缩的迹象, 是否提示 WHBE 兔在神经退行性疾病模型研究具有潜在的应用价值。为此, 本研究分别采用高胆固醇饮食、高胆固醇饮食添加微量铜饮水诱导 WHBE 兔散发性 AD 模型, 并与老年 WHBE 兔比较, 观察各组脑部病理学的变化, 为 WHBE 兔今后在神经退行性疾病中的应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

普通级成年雄性白毛黑眼兔 (WHBE rabbit) 30 只, 体重为 1.8 ~ 2.0 kg, 3 ~ 4 月龄; 普通级老年雄性 WHBE 兔 10 只, 体重为 3.0 ~ 4.2 kg, 36 ~ 48 月龄, 由新昌大市聚镇欣健兔场提供【SCXK(浙)2015-0104】, 饲养于浙江中医药大学动物实验研究中心兔实验室【SYXK(浙)2013-0184】, 环境温度 20 ~ 22℃, 湿度 40% ~ 60%, 12 h/12 h 明暗交替。所有操作均遵守浙江中医药大学实验动物管理与伦理委员会要求(伦理批准号: ZSLL-2016-115)。

1.1.2 主要试剂与仪器

全自动生化分析仪(7020, 日立公司, 日本), 连续光谱酶标仪(Thermo Varioskan Flash, Thermo Fisher 公司, 芬兰), 徕卡病理切片仪(RM2245, 徕卡公司, 美国), 全自动病理扫描切片仪(Nanozoomer S210, 滨松公司, 日本); 总胆固醇(TC)试剂盒, 购自上海申能德赛诊断技术有限公司; 超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和 A β 1-42 ELISA 试剂盒, 购自南京建成生物工程研究所; β -amyloid 抗体、 β -分泌酶 1(β -site APP cleaving enzyme 1, BACE1) 抗体、p-tau 抗体, 购自美国 Santa Cruz 公司。甲醇刚果红(Congo red)染色试剂盒, 购自珠海贝索生物技术有限公司; 皮尔苏斯基氏(Bielschowsky)改良法神经染色试剂盒, 购自北京天恩泽基因科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 散发性 WHBE 兔 AD 模型的建立

适应性饲养 2 周后, 成年 WHBE 兔随机分成 3 组, 即正常对照组(normal control group, NC)、高胆固醇饮食组(high cholesterol diet group, HCD)和高胆固醇饮食 + 铜水组(HCD + Cu²⁺ group), 每组 10 只; 另外 10 只老年 WHBE 兔作为老年组(senile)。正常对照组和老年组 WHBE 兔饲喂普通饲料和蒸馏水喂养; HCD 组饲喂 2% 胆固醇饲料和蒸馏水喂养, HCD + Cu²⁺ 组饲喂 2% 胆固醇饲料和添加饮用含 0.12 ppm 铜离子(以硫酸铜的形式)蒸馏水, 连续造模 12 周, 并观察动物的精神行为及活动情况。

1.2.2 血浆 TC 和 A β 1-42 水平测定

造模 12 周后, 动物禁食不禁水 12 h, 空腹称重, 取耳中动脉肝素抗凝血 2 mL, 分离血浆, 在全自动生化分析仪上测定血浆 TC 水平, 并用 ELISA 法在连续光谱酶标仪上检测 A β 1-42 水平, 具体操作按试剂盒说明书进行。

1.2.3 脑组织中 SOD 活性和 MDA 含量的测定

取部分皮质和海马组织各 100 mg, 以 1:9 比例加入 4℃ 冷生理盐水, 用组织匀浆机匀浆成 10% 匀浆液, 然后在 4℃ 3000 r/min 离心 20 min, 吸取上清液, 按试剂盒说明书测定脑组织中 SOD 活性和 MDA 含量。并采用考马斯亮兰法测定所有样品的蛋白质浓度, SOD 和 MDA 水平标准化为样品中的总蛋白质含量。

1.2.4 免疫组化法检测 A β 、BACE-1、p-tau 蛋白的表达

动物安乐死后, 取出大脑行冠状面切成 5 mm 厚小片, 固定于 4% 甲醛溶液中至少 24 h。用梯度乙醇脱水、石蜡包埋、切成 6 μ m 厚切片, 并脱蜡至水, 3% 过氧化氢溶液灭活过氧化酶 10 min, PBS 液冲洗 3 次, 滴加一抗: β -amyloid 抗体(B-4, 能识别 APP 和 A β , 1:100)、BACE-1 抗体(1:100)、p-tau 抗体(Thr231, 1:300), 4℃ 孵育过夜。阴性对照用 PBS 替代一抗, PBS 液冲洗 3 次, 切片用二抗(HRP-标记的抗小鼠 IgG)室温孵育 1 h, PBS 液冲洗 3 次, DAB 显色, 苏木精复染, 脱水, 树脂封片。图像分析与阳性面积计算: 滨松全自动病理扫描切片仪扫描切片, 采用双盲法随机取 400 倍下 4 个不重复的视野图像, 用 Image Pro Plus 6.0 软件分析所捕获的图像中被染成黄色或棕黄色物质的阳性面积和统计场总面积, 以阳性面积/统计场总面积比值作为脑皮质和海马中的阳性表达百分率。

1.2.5 甲醇刚果红染色观察老年斑情况

取 6 μ m 厚冠状切片, 脱蜡至水, 入 Mayer 苏木素染色 10 min, 水洗, 1% 盐酸乙醇分化数秒, 温水显蓝, 水洗; 甲醇刚果红染色 15 min, 自来水冲洗数分钟, 0.2% 碱性乙醇分化数秒钟, 水洗, 常规乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片。

1.2.6 Bielschowsky 改良法染色观察神经纤维缠结情况

取 6 μ m 厚冠状切片, 脱蜡至水, 加入预热至 37℃ Bielschowsky 硝酸银溶液避光浸染 30 min; 水洗, 4% 中性甲醛液还原数秒; 用 Bielschowsky 氨银溶液滴染 30 s, 倾去染液, 再用 4% 甲醛液还原, 水洗; 用氯化金溶液调色, 水洗, 加入海波溶液作用 5 min; 水洗, 脱水, 透明, 中性树脂封固。神经元、轴突、神经纤维染成黑色。

1.3 统计学分析

所有数据均用平均数 $\pm$ 标准误($\bar{x} \pm \text{SEM}$)表示, 应用 Graphpad Prism 6.0 统计软件包进行统计处理, 采用单因素方差分析和 Tukey's 多重比较检

验, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

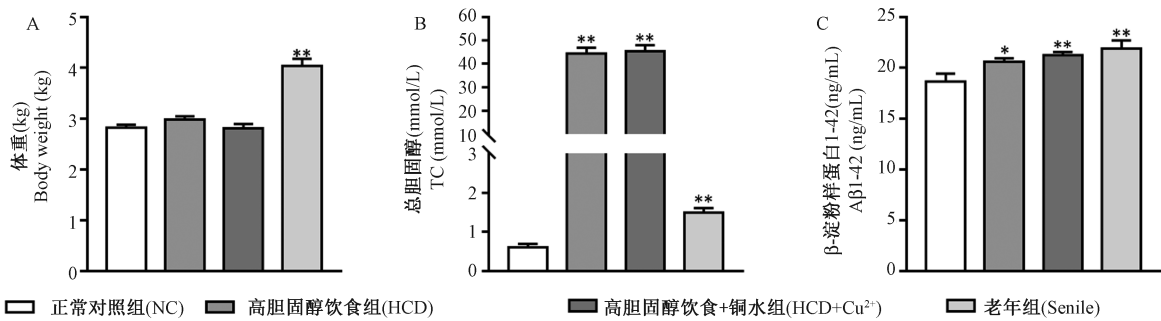
2.1 实验动物一般观察

造模 12 周后,正常对照组 WHBE 兔精神良好、活动好动、饮食正常,肢体健壮有力;HCD 组 WHBE 兔有时出现眼睑半闭等精神恍惚症状,活动尚可;HCD + Cu²⁺ 组 WHBE 兔时常出现眼睑半闭等精神恍惚症状,甚至严重者出现前肢无力,常保持躺卧姿势、活动减少,并对外来刺激反应不敏感;老年组

WHBE 兔偶尔有眼睑半闭等精神恍惚症状,活动有所减少,对外来刺激反应相对较差。

2.2 各组 WHBE 兔的体重、血浆总胆固醇和 Aβ1-42 水平的变化

造模 12 周时,HCD 组和 HCD + Cu²⁺ 组 WHBE 兔的体重与正常对照组比差异无显著性 ($P > 0.05$),而老年组 WHBE 兔的体重显著高于正常对照组 ($P < 0.01$);另外,HCD 组、HCD + Cu²⁺ 组和老年组 WHBE 兔的血浆 TC 和 Aβ1-42 水平均显著高于正常对照组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) (图 1)。



注:A. 体重;B. 总胆固醇水平;C. Aβ1-42 水平。与正常对照组比,* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;HCD 组与 HCD + Cu²⁺ 组比较,# $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 1 各组 WHBE 兔的体重、总胆固醇和 Aβ1-42 水平的变化($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Note. A. Body weight. B. Total cholesterol (TC) level. C. Aβ1-42 level. Compared with the NC group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. HCD group vs HCD + Cu²⁺ group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

Fig.1 Changes of body weight, total cholesterol and Aβ1-42 levels in the rabbit groups($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

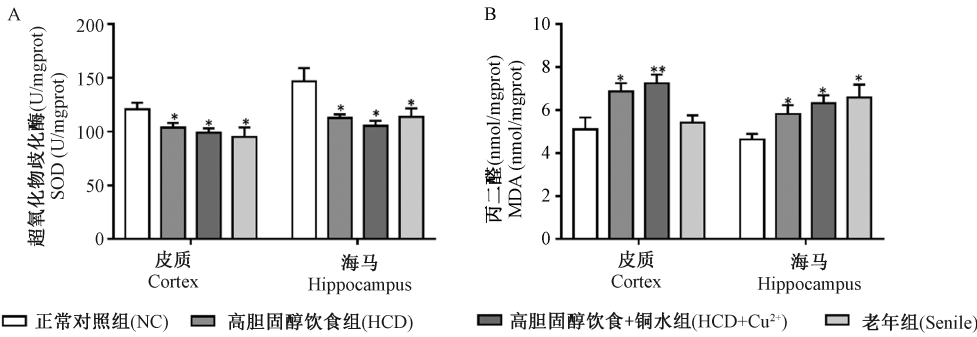
2.3 各组 WHBE 兔脑组织中 SOD 活性和 MDA 含量的变化

与正常对照组比,HCD 组和 HCD + Cu²⁺ 组 WHBE 兔脑皮质和海马组织中 SOD 活性均显著降低 ($P < 0.05$),MDA 含量均显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);另外,老年组 WHBE 兔脑皮质和海马组

织中 SOD 活性也显著降低 ($P < 0.05$),海马组织中 MDA 含量显著升高 ($P < 0.05$),但脑皮质 MDA 含量与正常对照组比差异无显著性 ($P > 0.05$) (图 2)。

2.4 各组 WHBE 兔脑组织中 Aβ 表达的变化

免疫组化染色显示 HCD 组、HCD + Cu²⁺ 组和老



注:A. 各组脑皮质和海马组织中 SOD 活性水平;B. 各组脑皮质和海马组织中 MDA 含量。与正常对照组比,* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;HCD 组与 HCD + Cu²⁺ 组比较,# $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 2 各组 WHBE 兔脑组织中 SOD 活性和 MDA 含量的变化($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

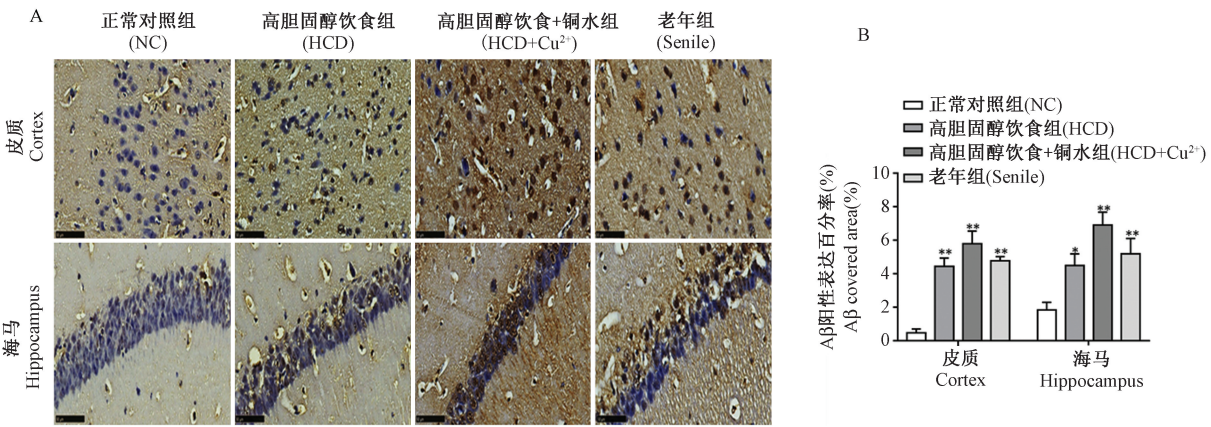
Note. A. The levels of SOD activity in the cortex and the hippocampus of each group. B. The MDA contents in the cortex and the hippocampus of each group. Compared with the NC group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. HCD group vs HCD + Cu²⁺ group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

Fig.2 Changes of SOD activities and MDA contents in the brain tissues of the rabbit groups($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

年组 WHBE 兔脑皮质和海马组织中 Aβ 免疫染色阳性表达比正常对照组明显增加;定量分析显示,HCD 组、HCD + Cu²⁺ 组和老年组 WHBE 兔脑皮质和海马组织中 Aβ 阳性表达百分率均显著高于正常对照组 ($P < 0.05, P < 0.01$) (图 3)。

2.5 各组 WHBE 兔脑组织中 BACE1 表达的变化
与正常对照组比,免疫组化染色显示 HCD 组、

HCD + Cu²⁺ 组和老年组 WHBE 兔脑皮质和海马组织中 BACE1 阳性表达明显增加;定量分析显示,HCD 组、HCD + Cu²⁺ 组和老年组 WHBE 兔脑皮质和海马组织中 BACE1 阳性表达百分率均显著高于正常对照组 ($P < 0.05, P < 0.01$);另外,HCD + Cu²⁺ 组 WHBE 兔脑皮质和海马组织中 BACE1 阳性表达百分率均显著高于 HCD 组 ($P < 0.05$) (图 4)。

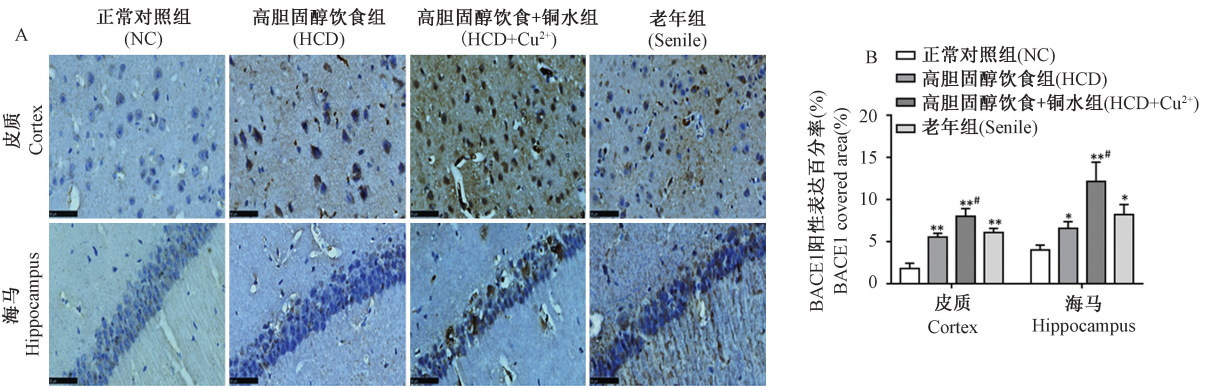


注:A. 各组脑皮质和海马组织中 Aβ 染色代表图 (×400); B. 各组 Aβ 阳性表达百分率。与正常对照组比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; HCD 组与 HCD + Cu²⁺ 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 3 各组 WHBE 兔脑组织中 Aβ 表达的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Note. A. Representative Aβ-staining images in the cortex and the hippocampus of each group (×400). B. The covered area of Aβ staining in each group. Compared with the NC group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. HCD group vs the HCD + Cu²⁺ group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

Fig. 3 Changes of Aβ expression in the brain tissues of each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)



注:A. 各组脑皮质和海马组织中 BACE1 染色代表图 (×400); B. 各组 BACE1 阳性表达百分率。与正常对照组比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; HCD 组与 HCD + Cu²⁺ 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

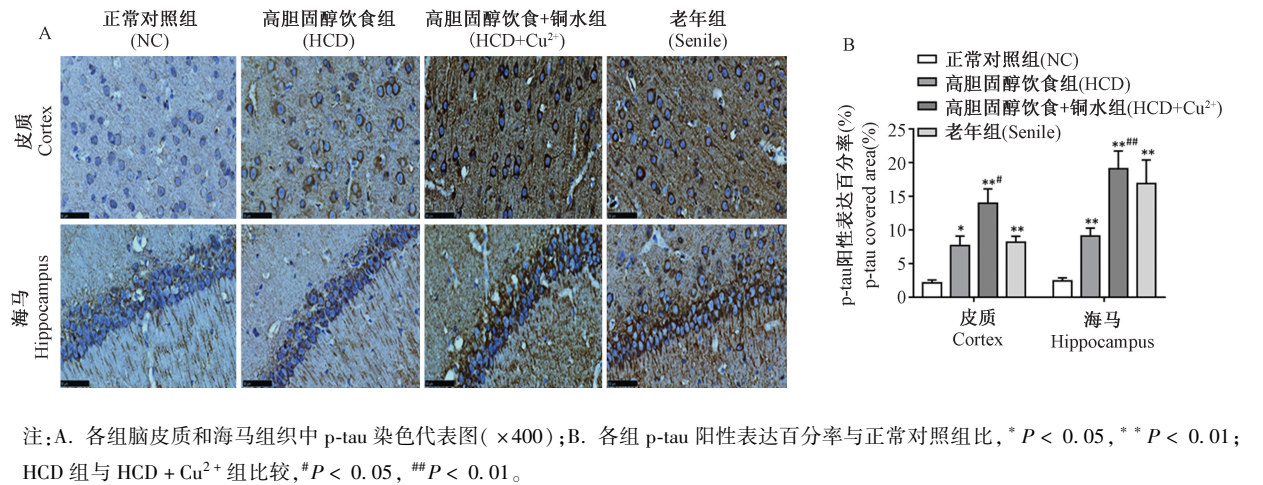
图 4 各组 WHBE 兔脑组织中 BACE1 表达的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Note. A. Representative BACE1-staining images in the cortex and hippocampus (×400). B. The percentage of positive BACE1 expression area. Compared with the NC group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. HCD group vs the HCD + Cu²⁺ group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

Fig. 4 Changes of BACE1 expression in the brain tissues of the rabbit groups ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

2.6 各组 WHBE 兔脑组织中 p-tau 表达的变化
免疫组化染色显示 HCD 组、HCD + Cu²⁺ 组和老年组 WHBE 兔脑皮质和海马组织中 p-tau 染色阳性表达比正常对照组明显增加;定量分析显示,HCD 组、HCD + Cu²⁺ 组和老年组 WHBE 兔脑皮质和海马

组织中 p-tau 阳性表达百分率均显著高于正常对照组 ($P < 0.05, P < 0.01$);另外,HCD + Cu²⁺ 组 WHBE 兔脑皮质和海马组织中 p-tau 阳性表达百分率均显著高于 HCD 组 ($P < 0.05, P < 0.01$) (图 5)。



注:A. 各组脑皮质和海马组织中 p-tau 染色代表图(×400);B. 各组 p-tau 阳性表达百分率与正常对照组比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; HCD 组与 HCD + Cu²⁺ 组比较, # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$ 。

图 5 各组 WHBE 兔脑组织中 p-tau 表达的变化($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

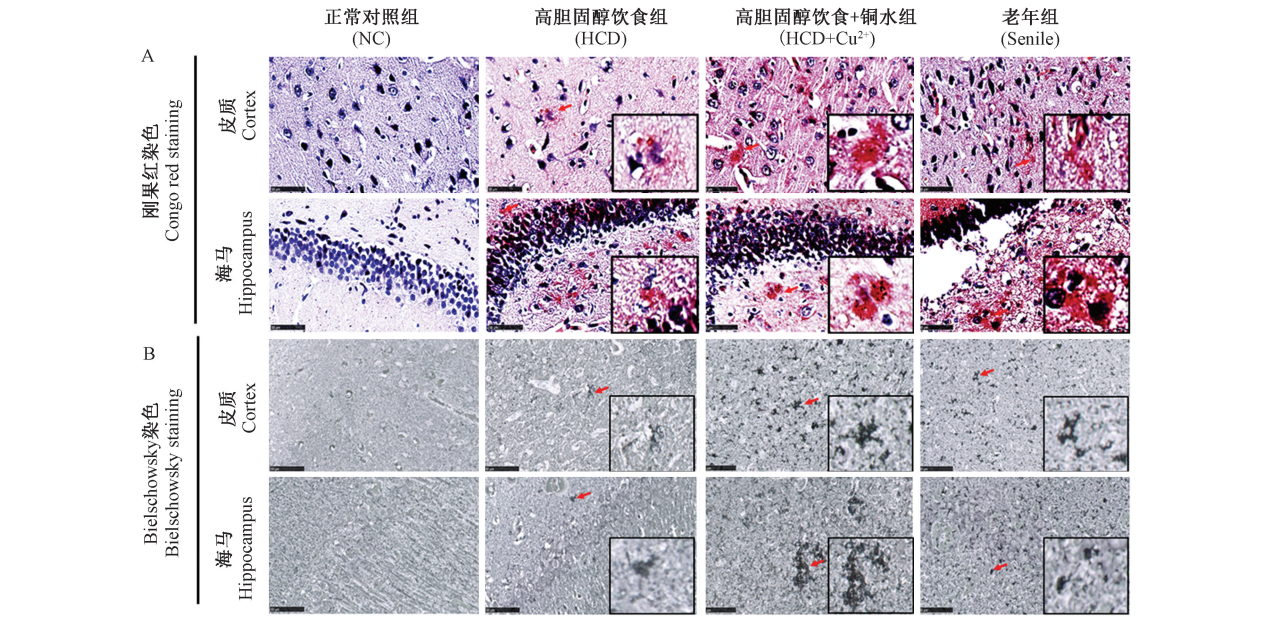
Note. A. Representative p-tau-staining images in the cortex and the hippocampus (×400). B. The percentage of positive p-tau expression area. Compared with the group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. HCD group vs HCD + Cu²⁺ group, # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$.

Fig. 5 Changes of p-tau expression in the brain tissues of the rabbit groups($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

2.7 各组 WHBE 兔脑组织老年斑和神经纤维缠结的观察

刚果红染色可反映老年斑沉积,结果显示,正常对照组 WHBE 兔脑皮质和海马区未见红色斑块样物质沉积;HCD 组、HCD + Cu²⁺ 组和老年组 WHBE 兔脑皮质和海马区可见有大量的红色斑块样物质沉积,主

要沉淀在细胞外(图 6A);Bielschowsky 染色可反映神经纤维缠结,结果显示,正常对照组 WHBE 兔脑皮质和海马区未见黑色银染的物质沉积;HCD 组、HCD + Cu²⁺ 组和老年组 WHBE 兔脑皮质和海马区可见有大量的火焰状或球形的黑色银染的物质即为神经纤维缠结(图 6B)。



注:A. 各组脑皮质和海马组织中刚果红染色代表图(×400),红色箭头所示为红色斑块样物质(老年斑,SP),黑色方框为放大图;B. 各组脑皮质和海马组织中 Bielschowsky 染色代表图(×400),红色箭头所示为黑色银染物质(神经纤维缠结,NFT),黑色方框为放大图。

图 6 各组 WHBE 兔脑组织老年斑和神经纤维缠结的变化

Note. A. Representative Congo red-staining images in the cortex and the hippocampus (×400). The red arrow indicates the red plaque-like substance (senile plaque, SP) with the black square as an enlarged view. B. Representative Bielschowsky-staining in the cortex and hippocampus tissues (×400). The red arrow shows the black silver-stained substance (neurofibrillary tangles, NFT) with the black square as an enlarged view.

Fig. 6 Changes of senile plaques and neurofibrillary tangles in brain tissues of the rabbit groups

3 讨论

本研究发现 WHBE 兔给予 2% 高胆固醇饲料 12 周后产生明显的高胆固醇血症、血浆 $A\beta_{1-42}$ 升高、氧化损伤、脑内 $A\beta$ 沉积增多和 tau 病理学等改变,且发现给予 2% 高胆固醇饲料同时添加微量铜饮水能进一步加重氧化损伤,其 AD 的形态和病理表现更为突出,而这与 Sparks 等^[8]的研究较为一致。上述实验结果提示,高胆固醇血症能加剧 AD 的病理进程,同时脑内铜代谢水平也与 AD 的进展有关,符合临床显示 AD 患者脑内老年斑中有胆固醇沉积^[14],并在老年斑中心及周围也存在高浓度的铜离子^[15];表明高胆固醇血症是 AD 发生的一个重要危险因素。另外,在 36 ~ 48 月龄的老年 WHBE 兔中也观察到轻微的高胆固醇血症、氧化损伤、脑内 $A\beta$ 沉积增多和 tau 病理学等改变,表明年龄因素也是 AD 发生的危险因素^[16]。同时,一般观察显示高胆固醇饲料或复合添加微量铜饮水的 WHBE 兔有表现出眼睑半闭等精神恍惚的症状,甚至出现前肢肌肉无力的病症,这与肌肉无力会增加老年人患 AD 的风险符合。可见,高胆固醇饲料或复合添加微量铜饮水能诱发 WHBE 兔散发性 AD 模型的形成。

众所周知,胆固醇作为神经元细胞膜的基本成分之一,与 $A\beta$ 代谢及异常聚集密切相关^[17]。若脑内胆固醇水平过高,使得神经元细胞膜的脂质循环减慢,导致 $A\beta$ 生成和聚集增加。Helmuth 等^[18]发现血中胆固醇每升高 10%,脑内 $A\beta$ 沉积就相应增加 1 倍。相反,给予他汀类药物降低胆固醇水平的同时,也能使 AD 的发生率降低 60% ~ 70%^[19]。这些现象与本研究结果较为一致:无论老年期还是高胆固醇饮食的 WHBE 兔,不仅循环中胆固醇和 $A\beta$ 水平均升高,同时也存在脑内 $A\beta$ 染色阳性的高表达和刚果红染色老年斑增多,提示高胆固醇血症影响 $A\beta$ 代谢和 $A\beta$ 异常聚集增加。

高胆固醇血症与 $A\beta$ 生成有关,但其机制尚不清楚。目前认为,高胆固醇血症能提高 γ 分泌酶与 β 分泌酶的活性,促进淀粉样前体蛋白的代谢,加剧 $A\beta$ 沉积和老年斑的形成,导致 AD 的发生^[20]。 β -分泌酶(BACE1)是启动 $A\beta$ 生成的第一个蛋白酶,主要定位于脂筏上,并依赖于胆固醇代谢。其中富含胆固醇的脂筏是 $A\beta$ 产生和聚集的主要原因。高胆固醇血症促进 $A\beta$ 水平升高与 BACE1 表达增加有关^[21];在散发性 AD 患者中 BACE1 活性也明显上调,而在敲除 BACE1 基因的小鼠不产生

$A\beta$,且表型正常^[22,23]。本研究也发现老年期或高胆固醇饮食的 WHBE 兔脑内 BACE1 阳性表达明显上调,且在高胆固醇饮食并添加微量铜饮水的 WHBE 兔脑内表达增加更为显著,提示高胆固醇血症激活了 BACE1 裂解酶活性,促进 APP 淀粉样裂解途径,最终导致 $A\beta$ 沉积增多。

同样,高胆固醇血症也可引起氧化应激介导的 DNA 损伤^[24],氧化应激还可促进 $A\beta$ 聚集,并通过凋亡途径损伤神经元,而抗氧化酶和维生素 E 可拮抗这种作用^[25]。SOD 是公认氧自由基清除剂之一,MDA 含量是反映自由基产生量和氧化应激反应程度的敏感指标^[26]。本研究结果显示,高胆固醇饮食或复合添加微量铜饮水的 WHBE 兔以及老年期的 WHBE 兔表现出脑内 SOD 活性降低,MDA 含量升高,存在明显的氧化应激,表明氧化应激参与了 AD 的病理过程。

除 $A\beta$ 病理外,tau 蛋白过度磷酸化也是 AD 患者脑内的又一病理性特征。tau 蛋白是一种微管相关蛋白,具有促微管形成和稳定性的作用。在正常状态下 tau 蛋白呈适度的磷酸化,但在 AD 患者中由于 tau 蛋白过度磷酸化,降低了微管组装的能力,引起微管解聚,影响胞体和轴突树突间的运输、引起神经元突起断裂或变形解体,继发神经元退行性病变,导致 NFTs^[27]。本研究也发现,无论老年期还是高胆固醇饮食的 WHBE 兔脑内 tau 蛋白的磷酸化明显增加,且在给予高胆固醇饮食的基础上添加微量铜饮水的 WHBE 兔脑内 tau 蛋白的磷酸化进一步加剧,同时,Bielschowsky 染色显示脑内 NFT 明显增加,表明散发性 WHBE 兔 AD 模型脑内存在 tau 蛋白过度磷酸化进程,导致 NFT 形成。

本研究仍存在一定局限性,尽管 Schreurs 等^[11]已报道了高胆固醇饲料或添加微量铜饮水诱导 AD 模型兔学习记忆功能的障碍,但本研究仅观察了 WHBE 兔 AD 模型的一般行为活动,缺乏学习记忆能力的评估,仍需后期进一步完善 WHBE 兔 AD 模型的行为学评价。

综上所述,高胆固醇饮食或复合添加微量铜饮水能诱导散发性 AD 模型 WHBE 兔脑部明显的 AD 病理学变化,包括氧化损伤、脑内 $A\beta$ 沉积增多、老年斑和 tau 病理学等改变,WHBE 兔可用于神经退行性疾病动物模型的研究。

参 考 文 献 (References)

- [1] Gupta A, Iadecola C. Impaired $A\beta$ clearance: a potential link between atherosclerosis and Alzheimer's disease [J]. Front Aging Neurosci, 2015, 7: 115.

- [2] Cummings JL, Cole G. Alzheimer disease [J]. JAMA, 2002, 287 : 2335 – 2338.
- [3] Liu QY, Chang MN, Lei JX, et al. Identification of microRNAs involved in Alzheimer's progression using a rabbit model of the disease [J]. Am J Neurodegener Dis, 2014, 3(1) : 33 – 34.
- [4] Jung YY, Kim KC, Park MH, et al. Atherosclerosis is exacerbated by chitinase-3-like-1 in amyloid precursor protein transgenic mice [J]. Theranostics, 2018, 8(3) : 749 – 766.
- [5] Sambamurti K, Greig NH, Utsuki T, et al. Targets for AD treatment: conflicting messages from gamma-secretase inhibitors [J]. J Neurochem, 2011, 117 : 359 – 374.
- [6] Golde TE, Schneider LS, Koo EH. Anti- $\alpha\beta$ therapeutics in Alzheimer's disease; the need for a paradigm shift [J]. Neuron, 2011, 69(2) : 203 – 213.
- [7] Gonzalo-Ruiz A, Pérez JL, Sanz JM, et al. Effects of lipids and aging on the neurotoxicity and neuronal loss caused by intracerebral injections of the amyloid-beta peptide in the rat [J]. Exp Neurol, 2006, 197(1) : 41 – 55.
- [8] Sparks DL, Scheff SW, Rd HJ, et al. Induction of Alzheimer-like beta-amyloid immunoreactivity in the brains of rabbits with dietary cholesterol [J]. Exp Neurol, 1994, 126(1) : 88 – 94.
- [9] Galbete JL, Peressini E, Modena P, et al. Cholesterol decreases secretion of the secreted form of amyloid precursor protein by interfering with glycosylation in the protein secretory pathway [J]. Biochem J, 2016, 348(Pt 2) : 307 – 313.
- [10] Sparks DL, Schreurs BG. Trace amounts of copper in water induce β -amyloid plaques and learning deficits in a rabbit model of Alzheimer's disease [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(19) : 11065 – 11069.
- [11] Schreurs BG. Cholesterol and copper affect learning and memory in the rabbit [J]. Int J Alzheimers Dis, 2013, 2013(10) : 518780.
- [12] Johnstone EM, Chaney MO, Norris FH, et al. Conservation of the sequence of the Alzheimer's disease amyloid peptide in dog, polar bear and five other mammals by cross-species polymerase chain reaction analysis [J]. Mol Brain Res, 1991, 10(4) : 299 – 305.
- [13] 潘永明, 金平, 徐剑钦, 等. 基于 3.0 T 磁共振成像系统初步观察 WHBE 兔脑部形态解剖结构 [J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(4) : 356 – 361.
Pan YM, Jin P, Xu JQ, et al. Preliminary observation of the anatomical structures of the brain in WHBE rabbits by 3.0 T magnetic resonance imaging system [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2017, 25(4) : 356 – 361.
- [14] Mori T, Paris D, Town T, et al. Cholesterol accumulates in senile plaques of Alzheimer disease patients and in transgenic APP(SW) mice [J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2001, 60(8) : 778 – 785.
- [15] Lovell MA, Robertson JD, Teesdale WJ, et al. Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques [J]. J Neurol Sci, 1998, 158(1) : 47 – 52.
- [16] Véléz JI, Lopera F, Patel HR, et al. Mutations modifying sporadic Alzheimer's disease age of onset [J]. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2016, 171(8) : 1116 – 1130.
- [17] Ehehalt R, Keller P, Haass C, et al. Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts [J]. J Cell Biol, 2003, 160(1) : 113 – 123.
- [18] Helmuth L. New therapies. New Alzheimer's treatments that may ease the mind [J]. Science, 2002, 297(5585) : 1260 – 1262.
- [19] Wolozin B, Kellman W, Ruosseau P, et al. Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors [J]. Arch Neurol, 2000, 57(10) : 1439 – 1443.
- [20] Kuo PH, Lin CI, Chen YH, et al. A high-cholesterol diet enriched with polyphenols from Oriental plums (*Prunus salicina*) improves cognitive function and lowers brain cholesterol levels and neurodegenerative-related protein expression in mice [J]. Br J Nutr, 2015, 113(10) : 1550 – 1557.
- [21] Prasanthi J, Schommer E, Thomasson S, et al. Regulation of β -amyloid levels in the brain of cholesterol-fed rabbit, a model system for sporadic Alzheimer's disease [J]. Mech Ageing Dev, 2008, 129(11) : 649 – 655.
- [22] Vassar R, Kuhn PH, Haass C, et al. Function, therapeutic potential and cell biology of BACE proteases: current status and future prospects [J]. J Neurochem, 2014, 130 : 4 – 28.
- [23] Neumann U, Ruegger H, Machauer R, et al. A novel BACE inhibitor NB-360 shows a superior pharmacological profile and robust reduction of amyloid- β and neuroinflammation in APP transgenic mice [J]. Mol Neurodegener, 2015, 10(1) : 44.
- [24] Enríquez-Cortina C, Bello-Monroy O, Rosales-Cruz P, et al. Cholesterol overload in the liver aggravates oxidative stress-mediated DNA damage and accelerates hepatocarcinogenesis [J]. Oncotarget, 2017, 8(61) : 104136 – 104148.
- [25] Mecocci P, MacGarvey U, Beal MF. Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease [J]. Ann Neurol, 1994, 36(5) : 747 – 751.
- [26] Mancini S, Balducci C, Micotti E, et al. Multifunctional liposomes delay phenotype progression and prevent memory impairment in a presymptomatic stage mouse model of Alzheimer disease [J]. J Control Release, 2017, 258 : 121 – 129.
- [27] Götz J, Xia D, Leinenga G, et al. What renders TAU toxic [J]. Front Neurol, 2013, 4 : 72.