

β 淀粉样蛋白对阿尔茨海默病转基因果蝇认知功能的影响

徐金静, 方力群, 赵春慧, 唐浩, 高鹏, 张双彦

哈尔滨医科大学附属第四医院神经内科, 黑龙江省哈尔滨市 150001

摘要:目的 探讨 Aβ40、Aβ42、Aβ42Arc 对阿尔茨海默病(AD)转基因果蝇认知功能的影响。方法 分别建立 Aβ40、Aβ42、Aβ42Arc 转基因 AD 果蝇模型。根据实验要求将果蝇分为 4 组, 分别是野生果蝇对照组、Aβ40 组、Aβ42 组、Aβ42Arc 组。在整体动物水平上进行果蝇行为学研究, 分别检测各组果蝇的嗅觉短期记忆能力、攀爬能力和平均寿命。结果 在巴甫洛夫嗅觉相关短期记忆测试、攀爬能力试验、平均寿命测试中, 与对照组相比, 3 组转基因果蝇的嗅觉记忆能力、攀爬能力、平均寿命均明显降低。结论 Aβ 的毒性作用会导致 AD 转基因果蝇认知功能下降。

关键词:阿尔茨海默病; 转基因果蝇; 认知功能; β 淀粉样蛋白

Effect of β-amyloid proteins on cognitive functions in transgenic drosophila with Alzheimer's disease

XU Jin-Jing, FANG Li-Qun, ZHAO Chu-Hui, TANG Hao, GAO Peng, ZHANG Shuang-Yan. Department of Neurology, Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China

Corresponding Author: ZHANG Shuang-Yan, E-mail: shuangyan_z@163.com.cn.

Abstract: Objective To study the effects of β-amyloid proteins Aβ40, Aβ42, and Aβ42Arc on the cognitive functions in the transgenic drosophila with Alzheimer's disease (AD). **Methods** The experiment was designed into four groups: normal wild-type, Aβ40, Aβ42 and Aβ42Arc transgenic drosophila. Pavlovian olfactory memory and climbing abilities and life span were measured in the four groups. **Results** Compared with the control group, the short-term olfactory memory and climbing abilities as well as life span were reduced in the Aβ40, Aβ42 and Aβ42Arc groups. **Conclusions** Aβ may result in a decrease in cognitive functions in transgenic drosophila with AD.

Key words: Alzheimer's disease; transgenic drosophila; cognitive functions; beta-amyloid protein

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是最常见的痴呆类型, 是一种和年龄相关的慢性进行性退行性改变的脑部疾病。临床表现为记忆障碍、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。目前阿尔茨海默病的确切发病机制尚不清楚。相关研究表明中枢胆碱能神经元数量的减少、乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)合成减少、ACh 受体敏感性降低、ACh 通路的解剖异常等都可导致学习记忆功能的障碍^[1-3]。阿尔茨海默病的特征性病理学改变是细胞外淀粉样斑块和细胞内神经纤维缠结。Aβ42 的聚集性较 Aβ40 更强, Aβ42 是淀粉样斑块的核心成分^[4, 5],

而伴有 Arctic 突变的 Aβ 基因, 进一步增强 Aβ 的低聚化。因此, 本研究主要从行为学方面来探索 β 淀粉样蛋白(beta-amyloid protein, Aβ)对 AD 转基因果蝇模型认知功能的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验对象 Aβ40、Aβ42、Aβ42Arc 转基因果蝇是由剑桥大学 D. C. Crowther 博士惠赠。实验在中山大学中山医学院神经解剖实验室完成。实验共分为 4 组: 正常对照组(野生型黑腹果蝇)、Aβ40 组、Aβ42 组、Aβ42Arc 组。

1.1.2 果蝇嗅觉短期记忆缺陷测试材料 1.5%

收稿日期: 2012-12-27; 修回日期: 2013-03-11

作者简介: 徐金静(1987-), 女, 硕士研究生。

通讯作者: 张双彦(1961-), 女, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事脑血管病的研究。邮箱: shuangyan_z@163.com.cn。

辛醇;1‰甲基环己醇;美的加湿器;空调;秒表;整流瓶;EP1013-1500 电源变压器(1500 VA,110 V,广东省佛山市瑞科电器厂);真空泵 AP-9950;分叉真空管;气味管;嗅觉 T-maze 装置;两个密闭的气味瓶;转子流量计(LZB-3 WBF);红色光源;调频仪器;刺激器机箱;万用表;78-1 磁力加热搅拌器(金坛市医疗仪器厂)。

1.1.3 果蝇攀爬能力试验材料 美的加湿器;空调;果蝇瓶(指管);红色光源;镊子。

1.1.4 果蝇平均寿命测定材料 蒸馏水;蔗糖;琼脂;玉米粉;酵母粉;丙酸;乙醇 100%;乙醚;美的加湿器;空调;200 ml 的培养三角瓶;称重器;美的电饭锅;400 ml 烧杯;200 ml 量筒;漏斗;麻醉瓶;镊子;白瓷板;毛笔;吸水纸;海绵垫;果蝇瓶(指管);棉花;解剖镜;死蝇盛留器;灭菌锅。

1.2 方法

1.2.1 建立转基因果蝇 AD 模型 转基因果蝇通过质粒作为外源目的基因载体,用显微注射手段将人源 A β 40、A β 42、A β 42Arc 基因转入果蝇染色体上,以杂交方式建立果蝇品系,应用 UAS/Gal4 激活系统激活在果蝇中枢神经系统中 A β 的表达^[6,7]。杂交方案:①A β 42 转基因果蝇模型:雌性亲本 ♀ elav/gal4 A β 42 (elav-gal4/elav-gal4; UAS-A β 42/cyo; +/+、红眼直翅)与雄性亲本/野生型 2202U ♂ (+/+; +/+; +/+、白眼直翅)进行杂交。子代分配:子代一(elav-gal4/+; cyo/+; +/+、红眼卷翅);子代二(elav-gal4/+; UAS-A β 42/+; +/+、红眼直翅)。目标子代:子代二/红眼直翅为目标子代,雌雄分开后用于试验。②正常对照组果蝇:雌性亲本 ♀ elav/gal4/gal4 (elav-gal4/elav-gal4; +/+; +/+、红眼直翅);雄性亲本/野生型 2202U ♂ (+/+; +/+; +/+、白眼直翅)。子代分配:子代(elav-gal4/+; +/+; +/+、红眼直翅)。目标子代:只有一种子代雌雄分开后即可用于试验。

1.2.2 嗅觉短期记忆缺陷测试 在 25°C、70% 相对湿度 T 型迷宫装置中进行测试。将空气流速为 750 ml/min 的真空管与 T-Maze 相连,把装有 80 只成年果蝇的试管快速震荡后倒至电刺激管中,然后将电刺激管与 T-Maze 相连,用固定器固定 T-Maze,然后将含有 1.5‰辛醇的气味管相连,通气之后马上打开调频仪及刺激器机箱,使用 60 V 的电压持续刺激 1.5 s,然后间隔 3.5 s 再给同样振幅和频率的电刺激,电刺激训练 1 min 后停止(即

重复刺激 12 次)。随后将 1.5‰辛醇的气味管与电刺激管分离,通空气 45 s 后,将含有 1‰甲基环己醇的气味管与电刺激管相连,通气 1 min,但不伴有电刺激。然后将真空管从 T-Maze 上拔下,再将含有 1‰甲基环己醇的气味管与电刺激分离,快速震动电刺激将其中的果蝇震动到 T-Maze 圆洞内,迅速推到两个气味管连接处,将 1500 ml/min 的真空管与 T-Maze 连接,再将两个气味管同时与 T-Maze 相连,用固定器固定 T-Maze,只通气不通电,计时 2 min。最后取下两个气味管震荡,将其中的果蝇分别倒入两个试管中,待冰冻后分别查冻死的果蝇数量。根据选择每种气味的果蝇数目计算每次实验的学习记忆指数(performance index, PI)^[8]: $PI = (Ncs--Ncs+) / (Ncs- + Ncs+) \times 100\%$,其中 Cs (condition stimulus)代表条件电击刺激;Ncs-代表往不伴有电击刺激的气味一侧移动的果蝇数目;Ncs+代表往伴有电击刺激的气味一侧移动的果蝇数目;取两种气味 PI 的平均值作为每组实验数据。为了避免气味引起的偏差,两种气味的实验顺序颠倒过来。其它 3 组实验步骤同前。

1.2.3 果蝇攀爬能力试验 将待测每组果蝇分装成每瓶 20 只,果蝇适应(果蝇置空食瓶内适应 5 min);轻弹果蝇至平底,果蝇由于习性将向上爬,暗室红灯下测试 15 s 到达瓶顶的果蝇个数 A,计算攀附指数(climbing index, CI) = A/总数。

1.2.4 果蝇的平均寿命测定 每组基因的雌果蝇 80 只,分别装入 4 个果蝇专用营养管内,做上标签待观察。每天更换一次培养基,并记录每次死亡果蝇的数量,直至果蝇全部死亡为止。以上实验重复 3 次计算出半数死亡时间、平均寿命和平均最高寿命 3 个指标。全部果蝇存活天数的均数为平均寿命,最后 20 只死亡果蝇的生存天数均值为平均最高寿命。

1.3 统计学分析

果蝇记忆缺陷实验数值以均数 ± 标准差表示,组间比较用单因素方差分析,多重比较用 Bonferroni 进行事后检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 A β 40、A β 42 和 A β 42Arc 诱发短期嗅觉记忆缺陷

在巴甫洛夫经典条件作用下,监测对照组、A β 40、A β 42、A β 42Arc 转基因成年果蝇(3 天龄)记忆缺陷症状。3 个实验组分别与对照组相比,差

异有统计学意义 ($P < 0.01$ 和 $P < 0.001$) ; $A\beta 40$ 组与 $A\beta 42$ 相比,差异有统计学意义 ($P < 0.01$) ; $A\beta 40$ 组与 $A\beta 42$ Arc 相比,差异有统计学意义 ($P < 0.01$) ; $A\beta 42$ 与 $A\beta 42$ Arc 相比,差异无统计学意义 ($P > 0.05$) 。根据评估结果,4 组果蝇的短期嗅觉记忆能力由强到弱依次是:对照组 $> A\beta 40$ 组 $> A\beta 42$ 组 $> A\beta 42$ Arc 组 (图 1)。

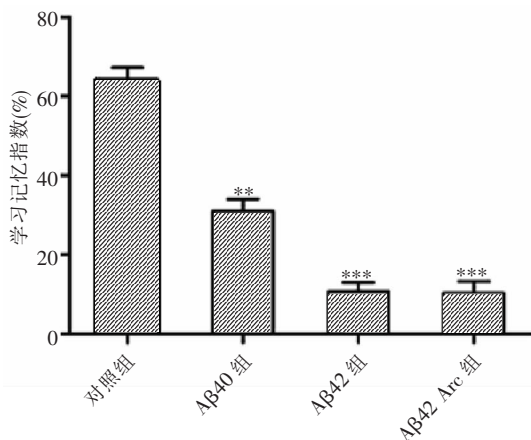


图 1 根据巴甫洛夫相关的嗅觉学习模式来评估 $A\beta$ 介导的短期记忆缺陷。

2.2 $A\beta 40$ 、 $A\beta 42$ 、 $A\beta 42$ Arc 使果蝇攀爬能力下降

在第 10 天时攀爬至顶部的果蝇数:对照组 72 只、 $A\beta 40$ 组 71 只、 $A\beta 42$ 组 70 只和 $A\beta 42$ Arc 组 48 只。第 15 天时,将果蝇轻弹至瓶底,果蝇沿瓶壁向上爬行的动作非常缓慢而且中间会从瓶壁滑落,攀爬至顶部的果蝇数大幅度减少:对照组 68 只、 $A\beta 40$ 组 52 只、 $A\beta 42$ 组 32 只和 $A\beta 42$ Arc 组 20 只。在第 30 天时,攀爬至顶部的果蝇数:对照组 64 只、 $A\beta 40$ 组 24 只、 $A\beta 42$ 组 0 只和 $A\beta 42$ Arc 组 4 只。4 组果蝇的攀爬能力由强到弱依次是:对照组 $> A\beta 40$ 组 $> A\beta 42$ 组 $> A\beta 42$ Arc 组 (图 2)。

2.3 $A\beta 40$ 、 $A\beta 42$ 、 $A\beta 42$ Arc 使果蝇寿命缩短

测定 4 组果蝇 (每组 80 只) 的平均寿命,结果发现它们在生存时间上存在差异。观察到的果蝇的平均寿命中对照组果蝇的平均寿命最长,为 56.9 d。 $A\beta 40$ 组为 49.1 d, $A\beta 42$ 为 45.5 d, $A\beta 42$ Arc 组为 37.3 d。这些结果表明 $A\beta$ 表达导致寿命缩短。各组平均寿命排列如下:对照组 $> A\beta 40$ 组 $> A\beta 42$ 组 $> A\beta 42$ Arc 组 (图 3)。

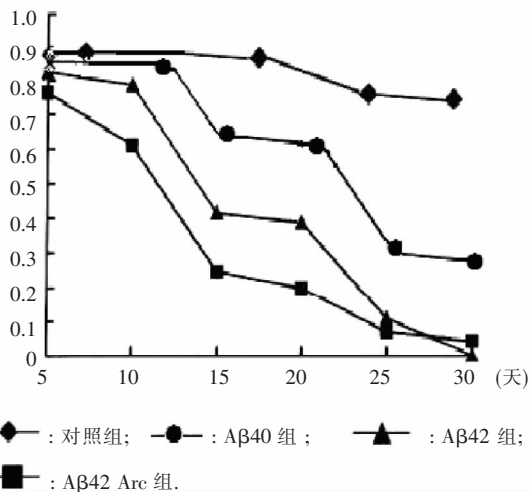


图 2 4 组果蝇的攀爬能力比较。

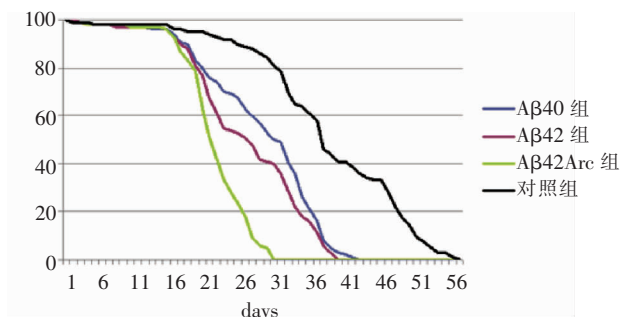


图 3 4 组果蝇的平均寿命比较。

3 讨论

本研究之所以选择转因果蝇作为实验对象,是因为转因果蝇模型是研究人类神经系统退行性疾病的理想模型。首先,人类和果蝇基因组序列不仅具有很多同源基因,如阿尔茨海默病、亨廷顿病和帕金森病等,而且果蝇的神经退行性疾病模型与人类神经退行性疾病还有许多相似的表型^[9]。另外,果蝇饲养容易,生长迅速,因此在短时间内就可获得大量子代^[10]。但也正是因为果蝇生命周期短,不同年龄阶段对其认知功能有一定影响,因此在实验中所用果蝇的年龄需严格控制。

本研究选择转因果蝇模型的另一个原因是果蝇嗅觉传导通路中大部分投射神经元既是胆碱能神经元又是胆碱能神经元受体。乙酰胆碱是果蝇中枢神经系统中一种重要的兴奋性神经递质,烟碱性乙酰胆碱介导快速兴奋性神经传导^[11]。其中,银环蛇毒素敏感的烟碱样胆碱能受体能够介导果蝇浦肯野细胞之间的快速兴奋性突触传递,这些受体可能与嗅觉相关的学习可塑性有关^[12]。果蝇下颚须和触须的嗅觉受体神经元接收的气味信息

在嗅神经元内转换成神经电信号,然后沿嗅神经元的轴突传递到触角叶的投射神经元,并在此形成轴-树突触。在触角叶进行处理后,嗅觉信息由投射神经元传递果蝇大脑的蘑菇体和前脑区,最终引发为嗅觉记忆反应。

A β 如何影响 AD 认知功能障碍的机制,目前尚不清楚。相关研究已经证实 AD 患者认知功能下降与乙酰胆碱突触传递障碍密切相关^[13, 14]。本研究中果蝇短期嗅觉记忆实验证实相对于正常对照组而言,A β 40、A β 42、A β 42 Arc 组的记忆能力明显下降,表明 A β 的过度表达对果蝇的嗅觉记忆能力有明显的损害。结合转基因果蝇的行为学研究结果可以推测在转基因模型中 A β 的过度表达对胆碱能突触传递可能有抑制作用,进而导致转基因果蝇的认知功能障碍。本研究中嗅觉短期记忆能力、攀爬能力实验及平均寿命分析显示,3 组转基因果蝇模型中,A β 42 组和 A β 42 Arc 组的转基因果蝇嗅觉记忆能力、攀爬能力、平均寿命均出现明显的下降,A β 42 Arc 组下降最明显,A β 40 组受损最轻。由此可以得出结论,A β 毒性作用损害转基因果蝇的认知功能,且不同的转基因果蝇模型之间的行为学差异,主要取决于 A β 低聚体的形式。在相对健康的 AD 患者中,A β 40 沉积占主导地位,但是散发和大多数家族型 AD 患者中,A β 42 比 A β 40 的比率增高或 A β 42 的总浓度提高。A β 42 聚集很迅速,因此,在很早的时间内形成了稳定的低聚物。而且,A β 42 趋向形成稳定的三聚体和或四聚体低聚物,而 A β 40 却不会如此^[16, 17]。因此,A β 42 较 A β 40 使转基因果蝇认知功能下降得更明显。此外,伴有 Arctic 突变的 A β 基因,进一步增强 A β 的低聚化,这将会导致 AD 的早发性,这也是 A β 42 Arc 造成 AD 患者认知功能下降最明显的主要原因。

总之,通过本研究证实 A β 导致 AD 转基因果蝇模型认知功能下降,且其认知功能下降的程度取决于 A β 低聚体的形式,亦间接证实 A β 对胆碱能突触传递有抑制作用。A β 对突触传递的具体抑制作用尚有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Mohr F, Zimmermann M, Klein J. Mice heterozygous for AChE are more sensitive to AChE inhibitors but do not respond to BuChE inhibition. *Neuropharmacology*, 2012, 67: 37-45.
- [2] Ahmed F, Chandra JNNS, Manjunath S. Acetylcholine and memory-enhancing activity of *Ficus racemosa* bark. *Pharmacognosy Res*, 2011, 3(4): 246-249.
- [3] 陈小荣.胆碱能系统功能障碍对大鼠空间学习记忆和海马自发放电活动的影响及其机制研究.山西.山西医科大学,2010.
- [4] Hashimoto M, Tanabe Y, Fujii Y, et al. Chronic Administration of docosahexaenoic acid elicits the improvement of spatial cognition learning ability in amyloid beta-infused rats. *J Nutr*, 2005, 135(3): 549-555.
- [5] 刘盈盈,杨玲,杨建光,等. β -淀粉样蛋白寡聚化模拟研究进展. *贵州科学*, 2011, 29(6): 55-58.
- [6] Rush M, Appanah R, Lee S, et al. Targeting of EZH2 to a defined genomic site is insufficient for recruitment of Dnmt3a but not de novo DNA methylation. *Epigenetics*, 2009, 4(6): 404-414.
- [7] 刘晓隽,袁小京,孙侃.用“增强子陷阱”技术构造并筛选果蝇 UAS/GAL4 系统中 GAL4 新品系及脑基因表达图谱数据库的开发. *生物化学与生物物理学进展*, 2008, 35(6): 645-649.
- [8] Gu H, O'Dowd DK. Cholinergic synaptic transmission in adult *Drosophila* Kenyon cells in situ. *Neurosci*, 2006, 26(1): 265-272.
- [9] Reiter LT, Potocki L, Chien S, et al. A systematic analysis of human disease associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res*, 2001, 11(6): 1114-1125.
- [10] Gu H, O'Dowd DK. Whole cell recordings from brain of adult *Drosophila*. *J Vis Exp*, 2007, (6): 248.
- [11] Su HL, O'Dowd DK. Fast synaptic currents in *Drosophila* mushroom body Kenyon cells are mediated by alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic Acetylcholine receptors and picrotoxin-sensitive GABA receptors. *Neurosci*, 2003, 23(27): 9246-9253.
- [12] Touhara K, Vosshall LB. Sensing Odorants and Pheromones with Chemosensory Receptors. *Annu Rev Physiol*, 2009, 71: 307-332.
- [13] Fang L, Duan J, Ran D, et al. Amyloid- β Induced Excitatory Cholinergic Synaptic Transmission Depression in *Drosophila*. *Neurosci Bull*, 2012, 12: 1-10.
- [14] Mitsuyama F, Futatsugi Y, Okuya M, et al. Stimulation-Dependent Intraspinous Microtubules and Synaptic Failure in Alzheimer's Disease: A Review. *Int J Alzheimers Dis*, 2012, 2012: 519682.
- [15] 刘卫刚,刘蓉辉,李玲,等.阿尔茨海默病患者脑脊液中葡萄糖、真胰岛素 A1340 和 Ap4 测定. *脑与神经病学杂志*, 2009, 19(6): 434-436.
- [16] Viet MH, Li MS. Amyloid peptide A β 40 inhibits aggregation of A β 42: evidence from molecular dynamics simulations. *Chem Phys*, 2012, 136(24): 245105.
- [17] Iijima K, Chiang HC, Hearn SA, et al. A β 42 mutants with different aggregation profiles induce distinct pathologies in *Drosophila*. *PLoS ONE*, 2008, 3(2): e1703.