

• 论著 •

## 阿尔茨海默病转基因果蝇模型 $\beta$ 淀粉样蛋白对胆碱能突触的毒性影响

方力群<sup>1</sup>, 徐金静<sup>1</sup>, 傅松滨<sup>2</sup>

1. 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

2. 哈尔滨医科大学遗传教研室, 150086

**摘要:** 目的 研究  $\beta$  淀粉样蛋白 ( $A\beta$ ) 多肽对阿尔茨海默病 (AD) 转基因果蝇大脑中胆碱能神经元突触的影响。方法 分别建立转  $A\beta_{40}$ ,  $A\beta_{42}$  基因果蝇 AD 两个模型组, 以野生果蝇 (canton-s) 作为对照组。采用生物素染色和激光共聚焦成像记录投射神经元的形态; 通过全细胞膜片钳方法记录各组投射神经元胆碱能的自发突触后电流和微兴奋性突触后电流; 检测各组果蝇的嗅觉短期记忆能力。结果 与对照组相比较,  $A\beta_{42}$  组的自发突触后电流的频率和振幅均有明显降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );  $A\beta_{42}$  组微兴奋性突触后电流的频率明显下降, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。在巴甫洛夫的嗅觉相关的短期学习记忆测试中, 与对照组相比较,  $A\beta_{40}$ ,  $A\beta_{42}$  两组果蝇学习记忆指数均明显降低, 差异有统计学意义 ( $P$  均  $< 0.05$ )。结论  $A\beta$  肽对胆碱能突触传递的影响提示, 其可能是由  $A\beta$  肽引起胆碱能神经元变性和记忆不断下降的可能机制之一。

**关键词:** 转基因果蝇; 阿尔茨海默病;  $\beta$  淀粉样蛋白肽; 胆碱能突触

### Toxic effects of amyloid- $\beta$ peptides on cholinergic synapses in transgenic *Drosophila* models of Alzheimer's disease

FANG Li-Qun, XU Jin-Jing, FU Song-Bin. Department of Neurology, Fourth Affiliated Hospital, Haerbin Medical University, Haerbin 150001, China

**Abstract: Objective** To study the effects of amyloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) peptides on the cholinergic synapses in the brain of transgenic *Drosophila* with Alzheimer's disease (AD). **Methods** An  $A\beta_{40}$ -expressing transgenic *Drosophila* model of AD ( $A\beta_{40}$  group) and an  $A\beta_{42}$ -expressing transgenic *Drosophila* model of AD ( $A\beta_{42}$  group) were established, and wild-type *Drosophila* (Canton-S) was used as control group. Avidin-biotin staining and confocal laser scanning microscopy were used to record the morphology of projection neurons. The cholinergic spontaneous postsynaptic currents (sPSCs) and miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) of projection neurons were recorded by whole-cell patch clamp technique. The short-term olfactory memory was tested by Pavlovian olfactory learning assay.

**Results** Compared with the control group, the  $A\beta_{42}$  group had significantly decreased frequency and amplitude of sPSCs ( $P < 0.05$ ) and significantly decreased frequency of mEPSCs ( $P < 0.05$ ). The Pavlovian olfactory learning assay showed that the  $A\beta_{40}$  and  $A\beta_{42}$  groups had significantly decreased learning and memory indices compared with the control group ( $P < 0.05$  for both). **Conclusions** The effects of  $A\beta$  peptides on cholinergic synaptic transmission suggest a possible mechanism by which  $A\beta$  peptides cause cholinergic neuron degeneration and the consequent memory loss.

**Key words:** transgenic *Drosophila*; Alzheimer's disease; amyloid- $\beta$ ; cholinergic synapse

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是老年痴呆的主要发病形式, 其特点是逐渐进展的认知功能障碍, 特别是学习和记忆障碍。阿尔茨海默

病能够影响胆碱能系统。尽管  $\beta$  淀粉样蛋白 (Amyloid- $\beta$ ,  $A\beta$ ) 聚集是阿尔茨海默病的病理特征, 但  $A\beta$  肽引起胆碱能神经元变性和记忆障碍

收稿日期: 2013-05-24; 修回日期: 2013-07-23

作者简介: 方力群 (1970-), 女, 副主任医师, 医学博士, 主要从事老年痴呆症的发病机制及神经心理研究。E-mail: fangliquncongcong@aliyun.com。

的机制还不清楚。为探索以上机制,作者设计了此实验。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验对象 转 A $\beta$ 40、A $\beta$ 42 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。实验分为 3 组:对照组、A $\beta$ 40 组和 A $\beta$ 42 组。将野生型黑腹果蝇作为对照组。

1.1.2 实验试剂 分离果蝇脑组织试剂:木瓜蛋白酶、半胱氨酸、人工脑脊液、细胞内液、细胞外液和标准电极内液。细胞内示踪剂:鼠单克隆抗体 nc82、1:200 荧光素 Cy3 标记链霉素和 Alexa Fluor488 标记的鼠抗体。果蝇嗅觉短期记忆缺陷测试试剂:1.5%辛醇和 1%甲基环己醇。

1.1.3 实验器材 果蝇解剖脑的器材:美的加湿器、移液枪、吸头、超滤离心管、培养皿和 CO<sub>2</sub> 培养箱。果蝇电生理器材:奥林巴斯 BX51WI 等。果蝇脑激光共聚焦成像器材:激光扫描共聚焦显微系统 Zeiss LSM 710 德国卡尔 Carl Zeiss 光学仪器(上海)国际贸易有限公司。果蝇嗅觉短期记忆缺陷测试器材:美的加湿器、空调、秒表、整流瓶、EP1013-1500 瑞科电器、1500 VA,110 V 电源变压器(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-3WBF、红色光源、调频仪器、刺激器机箱、万用表和 78-1 磁力加热搅拌器(金坛市医疗仪器厂)。

### 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 $\beta$ 40、A $\beta$ 42 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 $\beta$  的表达。

1.2.2 分离果蝇脑组织 选择羽化前两天的雌果蝇,用镊子从果蝇饲养管夹住果蝇中间处,放到培养皿中,然后放到正荧光显微镜。用 1 ml 的注射器剥离果蝇头与躯干,将头部竖起来,做梯形解剖口,暴露出脑组织,剔除视球和复眼。用半胱氨酸激活蛋白木瓜酶,滴入脑组织周围,待 3~10 min 后剥离脑膜。用特制的移液枪把果蝇的脑组织移到装有人工脑脊液的记录槽中,并用直径 0.07 mm,间隔 0.5 mm 尼龙绳粘成的 U 型框架固定住果蝇脑组织<sup>[1,2]</sup>。

1.2.3 电生理测定 在显微解剖镜下进行细胞封接,调整电流稳定后建立全细胞记录,从电压钳模式下转换到电流钳模式。计算机软件输出刺激命令给膜片钳放大器,通过玻璃微电极施加到细胞内,用于钳制细胞膜电位和诱发电压门控离子通道电流。将河豚毒素(tetrodotoxin, TTX)及印防己毒素(picotoxin, PTX)加到人工脑脊液中,继而在记录槽内加入 0.5  $\mu$ mol 河豚毒素后自发突触后电流(spontaneous excitatory postsynaptic currents, sPSCs)振幅频率下降,说明 sPSCs 为 TTX 阻断电压依赖性钠通道,此时记录的所谓的 mEPSCs 再用印防己毒素阻断  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)剩下就是 Ach 通道。最后通过 Minianalysis 软件检测细胞的自发性微小突触电流。

1.2.4 果蝇聚焦激共聚焦成像 应用共聚焦软件动态扫描取图,并对图像进行三维立体构建。

1.2.5 嗅觉短期记忆缺陷测试 将待测果蝇放入温度 25℃/相对湿度 70% 的训练操作间,检查刺激器机箱的设定,通过特制的枪头从大瓶中将 100 只果蝇装入训练管中,置于自动训练仪接受训练训练时先后通入两种气体 1.5%辛醇和 1%甲基环己醇,一种伴随电击(CS),而另一种不伴随电击(CS-),1 个周期训练结束后立即检测其记忆,检测时将果蝇置于相对而吹的两种气味中央,任其自由选择 120 s。学习记忆指数计算:PI = (Nes<sub>-</sub> - Nes<sub>+</sub>) / (Nes<sub>-</sub> + Nes<sub>+</sub>) × 100%。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。其它三组实验步骤同前<sup>[3]</sup>。

### 1.3 统计分析

膜片钳记录数据采集与分析使用 P Clamp 10 Clamfit 软件,其中 sPSCs 和微兴奋性突触后电流(miniature excitatory postsynaptic currents, mEPSCs)数据分析使用 Minianalysis 软件;共聚焦显微镜记录结果用 3D imaging software (BIT Plan Imaris, Switzerland) 统计分析软件。果蝇记忆缺陷实验数值以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )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 $\beta$  对果蝇投射神经元胆碱能自发的突触后电流的影响

通过生物素染色及激光共聚焦显微镜显示了

投射神经元的形态(图1A)。通过全细胞膜片钳记录了3组果蝇投射神经元胆碱能的 sPSCs,发现3组果蝇中投射神经元胆碱能突触自发活动模式都不相同(图1B和图1C)。比较3组果蝇的平均 sPSCs 频率发现:对照组的 sPSCs 的频率为(13.8 ± 1.21) Hz; Aβ40 组为(11.48 ± 1.05) Hz; Aβ42 组为(8.91 ± 0.81) Hz; Aβ42 组与对照组相比 sPSCs 频率明显减慢,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ;  $n = 10 \sim 12$ ); Aβ40 组与 Aβ42 组比较 sPSCs 频率无明显变化,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ) (图1D)。比较3组果蝇的平均 sPSCs 振幅发现:对照组 sPSCs 振幅为(24.20 ± 3.81) pA; Aβ40 组振幅为(18.34 ± 1.38) pA; Aβ42 组振幅为(15.01 ± 0.67) pA; Aβ42 组与对照组相比 sPSCs 振幅降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ;  $n = 10 \sim 12$ ); Aβ40 组与 Aβ42 组比较 sPSCs 振幅无明显变化,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ) (图1E)

### 2.2 Aβ对果蝇大脑投射神经元胆碱能微兴奋性突触后电流的影响

本实验通过全细胞膜片钳记录了三组果蝇投射神经元 mEPSCs。各组记录是在 TTX 阻止钠离子通道和 PTX 阻断 GABA 受体的情况下得到的。测得的这些 mEPSCs 完全可以被 150 μm/L MCA 阻断,所以可以证明是胆碱能突触电流(如图2)。

3组果蝇经过在灌流液中加入 TTX 和 PTX 处理后,在阈电位 -70 mV 情况下,记录到单个投射神经元的胆碱能 mEPSCs(图3A)。比较3组果蝇的平均 mEPSCs 频率发现:对照组 mEPSCs 为(2.56 ± 0.46) Hz; Aβ40 组为(1.82 ± 0.29) Hz; Aβ42 组为(1.19 ± 0.33) Hz; Aβ42 组和 Aβ40 组分别与对照组相比较,mEPSCs 频率均降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ;  $n = 10 \sim 12$ ) (图3B)。比较3组果蝇间的平均 mEPSCs 振幅发现,差异无统计学意义(图3C)。

### 2.3 Aβ40 和 Aβ42 诱发短期嗅觉记忆缺陷

3组果蝇(每组100只)进行巴甫洛夫的嗅觉相关的短期学习记忆测试。根据评估结果:3组果蝇短时嗅觉记忆能力强弱排列的顺序依次为:对照组 > Aβ40 组 > Aβ42 组(图4)。

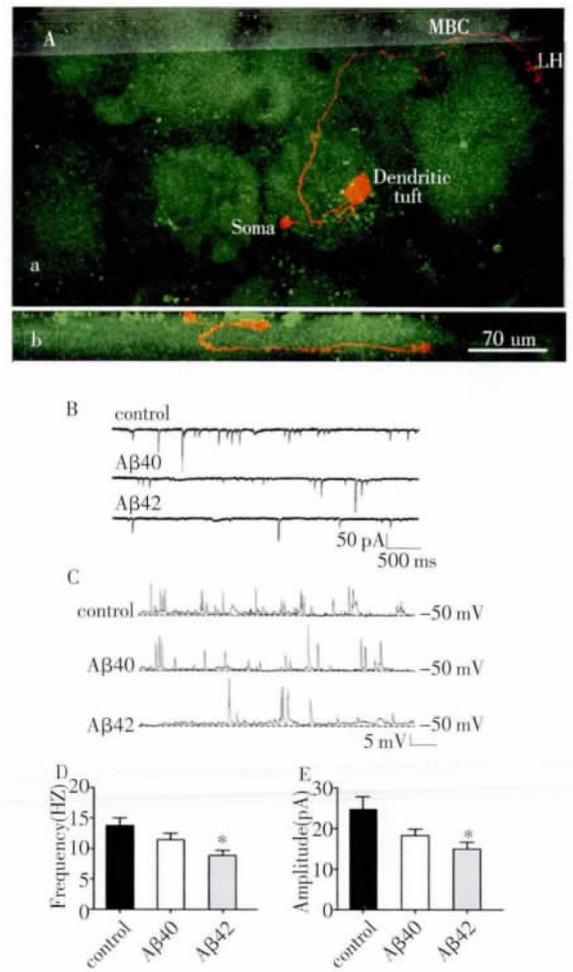


图1 Aβ对果蝇投射神经元胆碱能自发的突触后电流的影响。A:由荧光素 Cy3 标记链霉素和素标记的触角小叶的投射神经元的形态(PN,红色标记)。果蝇的神经毡(nc82,绿色标记)在x-y轴(a)和z轴(b)上界定大脑的轮廓投射神经元三维立体结构显示使用3D成像软件。B:全细胞电压钳记录的3组果蝇 sPSCs。C:全细胞电流钳记录的3组果蝇 sPSCs。D和E: sPSCs 的频率(D)和振幅(E)的均数。



图2 由乙酰胆碱受体介导的不依赖 Na<sup>+</sup> 动作电位的突触电流。

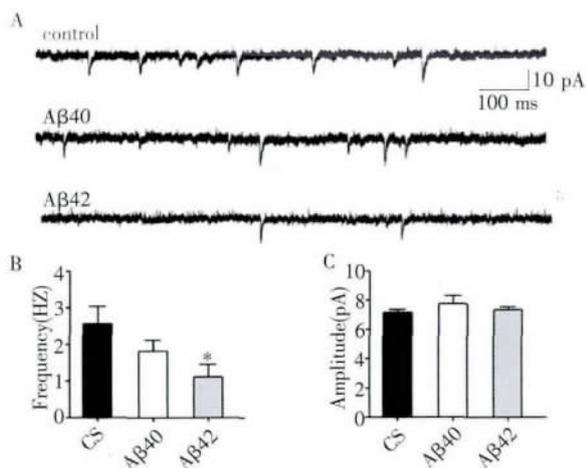


图3 Aβ过度表达影响投射神经元胆碱能突触 mEPSCs 的频率,而不是振幅。

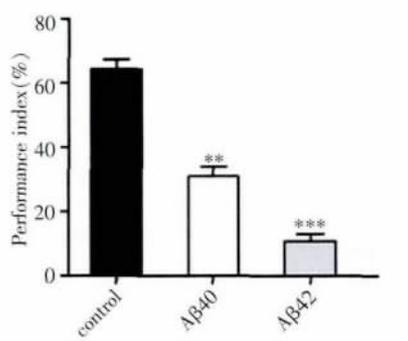


图4 根据巴甫洛夫相关的嗅觉学习模式来评估 Aβ介导的短期记忆缺陷实验。

### 3 讨论

研究发现果蝇只有4对染色体,基因组相对简单,近交对果蝇的生殖能力没有影响,遗传操作非常便利,果蝇与80%以上的人类同源基因有较高的保守性<sup>[4]</sup>。所以果蝇以其结构和基因遗传上的独特优势,成为研究学习记忆机制的经典模式生物。

本实验选择分析投射神经元,是因为它们既是胆碱神经元又是胆碱受体神经元,它们接受来自嗅觉受体神经元的胆碱能突触传入信息和潜在的侧枝兴奋性输入。由于在哺乳动物体内记录中枢胆碱能突触电流受到限制,最近的研究通过记录果蝇神经元细胞内胆碱能突触活动,来提供 Aβ 表达和胆碱能突触调节的证据<sup>[5-7]</sup>。本研究转基因果蝇 AD 模型和全细胞记录技术为观察原位 Aβ 复杂毒性提供了一个理想平台。果蝇原位脑部观察比哺乳动物脑切片有几点主要优势:第一,果蝇的全脑小,足以轻松地放置记录腔,从而避免长投射神经

元组成的从基底前脑到皮质的胆碱能通路的损害;第二,大部分的神经元细胞体分布到大脑表面一定区域附近,并连续几个小时用含氧生理盐水灌注时,他们仍然保持功能活动。这也是本研究研究方法上的创新之处。

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,烟碱乙酰胆碱受体能介导快速兴奋性神经传导<sup>[8]</sup>。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<sup>[9]</sup>。本研究证实了被记录的果蝇投射神经元的微兴奋性突触后电位也是胆碱能的。本研究发现,与对照组比较,Aβ42组微兴奋性突触电流频率的降低;但Aβ40和Aβ42两组的微兴奋性突触后电流的振幅没有变化。微兴奋性突触后电流频率的不同说明了突触前膜释放乙酰胆碱的数量具有差异。实验数据提示了Aβ42对PNs的mEPSCs频率具有调节作用,进而阐明了它们具有调节神经元mEPSCs特性的能力,从而支持本研究之前的假设:Aβ肽能够调节胆碱能输入环路。由于mEPSCs和突触可塑性之间,以及胆碱能传递和突触可塑性之间具有紧密联系,因此本作者可以得出这样的结论:Aβ肽能够潜在影响突触可塑性的形成。并且最终证明不是Aβ40,而是Aβ42对突触前膜的胆碱能突触传递有抑制作用。

嗅觉的胆碱能神经系统与记忆的形成和恢复有关。有资料表明AD患脑中的Aβ的过度表达可能导致各种不同的可塑性和记忆受损<sup>[10]</sup>。电生理分析支持Aβ42组的果蝇短期记忆出现明显的缺陷,这是早期AD患者的主要临床证据。虽然Aβ40组果蝇短期记忆出现了缺陷,但是没有伴随胆碱能突触传递的变化,这表明特定的Aβ肽存在年龄依赖性缺陷和不同的神经毒性。虽然目前尚不清楚这一发现的分子基础,早期认知功能下降支持了这些转基因模型的突触功能异常的证据。本研究中发现,与行为学缺陷相关的微兴奋性突触后电流频率的降低,提示着胆碱能突触传递和Aβ肽对记忆的神经毒性之间可能存在联系。在AD患者中,早于记忆缺损和组织学变化之前,生理功能异常就被发现。本研究结果提示:在观察行为变化之前,就已经记录到突触传递受到抑制。不同的转基因模型之间的电生理和行为学的差异,主要是取决Aβ毒性的不同,这是Aβ低聚体的形式导致

的一个复杂的和多方面的现象。在相对健康的AD患者中, A $\beta$ 40 肽沉积占主导地位, 但是, 在散发和大多数家族型AD患者中, 可见 A $\beta$ 42 比 A $\beta$ 40 的比率增高或 A $\beta$ 42 的总浓度提高。A $\beta$ 42 聚集很迅速, 因此能够在较早的时间内形成了稳定的 A $\beta$  低聚物<sup>[11]</sup>。而且, A $\beta$ 42 的趋向形成稳定的三聚体和/或四聚体低聚物, 而 A $\beta$ 40 却不会如此。

本研究发现, A $\beta$ 42 过度表达导致触角叶投射神经元的胆碱能突触传递明显减少, 结果造成短期记忆破坏。令人疑问的是, A $\beta$ 40 果蝇模型只表现出明显的行为学改变, 却没有显示出胆碱能突触传递的抑制。这种现象可以解释为用于电生理学和行为学研究所要求的果蝇年龄不同而造成的。以上这些结果表明, 与行为相关的神经环路中的胆碱能突触传递和特定 A $\beta$  肽的神经毒性之间存在潜在的联系。

#### 参 考 文 献

- [1] Gu H, O' Dowd DK. Cholinergic synaptic transmission in adult *Drosophila* Kenyon cells in situ. *J Neurosci*, 2006, 26: 265-272.
- [2] Gu H, O' Dowd DK. Whole cell recordings from brain of adult *Drosophila*. *J Vis Exp*, 2007, 6: 248.
- [3] 徐金静, 方力群, 张双艳, 等.  $\beta$  样淀粉蛋白对阿尔茨海默病转基因果蝇认知功能的影响. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2013, 40(2): 101-104.
- [4] Yasuyama K, Meinertzhagen IA, Schürmann FW. Synaptic organization of the mushroom body calyx in *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol*, 2002, 445: 211-226.
- [5] Su H, 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. *J Neurosci*, 2003, 23: 9246-9253.
- [6] Walsh DM, Hartley DM, Kusumoto Y, et al. Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. *J Biol Chem*, 1999, 274: 25945-25952.
- [7] Mohr F, Zimmernann 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.
- [8] Iijima K, Chiang HC, Hearn SA, et al. Abeta42 mutants with different aggregation profiles induce distinct pathologies in *Drosophila*. *PLoS One*, 2008, 3: 703-712.
- [9] Finelli A, Kelkar A, Song HJ, et al. A model for studying Alzheimer's Abeta42-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Neurosci*, 2004, 26: 365-375.
- [10] Baines RA, Bate M. Electrophysiological development of central neurons in the *Drosophila* embryo. *J Neurosci*, 1998, 18: 4673-4683.
- [11] Rubin GM, Yandell MD, Wortman JR, et al. Comparative genomics of the eukaryotes. *Science*, 2000, 287: 2204-2215.

## 《国际神经病学神经外科学杂志》征稿、征订启事

《国际神经病学神经外科学杂志》创刊于1974年, 由教育部主管, 中南大学主办, 中南大学湘雅医院承办。是目前国内唯一一本同时涵盖神经病学和神经外科学两个相联学科的专业学术期刊。本刊被收录为“中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)”。

《国际神经病学神经外科学杂志》现主要栏目有论著、临床经验交流、疑难病例讨论、病例报道、专家论坛和综述等。杂志立足于国内神经病学、神经外科学领域的前沿研究, 及时报道国内外神经科学领域最新的学术动态和信息。促进国内外学术的双向交流, 为中国神经科学走向世界搭建新的平台。

我们热忱欢迎国内外神经科学工作者踊跃来稿, 通过本刊介绍自己的研究成果和临床经验。对于论著、临床经验交流、疑难病例讨论、病例报道等类型的文章将优先发表。

《国际神经病学神经外科学杂志》刊号为CN 43-1456/R, ISSN 1673-2642, 邮发代号42-11, 全国公开发行。读者对象主要为国内外从事神经病学、神经外科专业及相关专业的医务人员。杂志为双月刊, 每期定价13元, 全年定价78元。欢迎各级医师到当地邮局订购。杂志社也可办理邮购。

为更好地筹集办刊资金, 保证刊物的健康发展, 本刊将竭诚为药品厂商、医疗器械厂商和广告公司提供优质服务, 并长期向各级医疗单位征集协办单位, 具体事宜请与本刊编辑部联系。

联系地址: 湖南省长沙市湘雅路87号(中南大学湘雅医院内)《国际神经病学神经外科学杂志》编辑部, 邮编: 410008, 电话/传真: 0731-84327401, E-mail 地址: jinn@vip.163.com, 网址: <http://www.jinn.org.cn/>。