

ApoE 基因敲除小鼠海马 CA3 区神经元形态学和微管相关蛋白 2 表达变化

季 丹^{1,2}, 黄大可³, 桂 丽³, 贾雪梅¹

摘要 目的 观察载脂蛋白 E 基因敲除 (ApoE KO) 对小鼠海马 CA3 区神经元形态结构改变以及微管相关蛋白 2 (MAP-2) 表达的影响。方法 10 只野生型 C57BL/6J 小鼠为对照组, 10 只 ApoE 基因敲除小鼠为 KO 组, 普通饲料喂养 3 个月。采用分光光度计检测血脂变化; 取两组小鼠脑组织, HE 染色和电镜技术观察海马 CA3 区结构改变, 免疫组织化学技术观察两组小鼠海马 CA3 区 MAP-2 表达变化, 采用计算机图像分析系统检测其平均光密度 (MOD) 值。结果

与对照组比较, KO 组小鼠血浆总胆固醇、血浆三酰甘油、低密度脂蛋白含量明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。光镜下, KO 组小鼠海马 CA3 区锥体细胞较小, 排列稀疏松散。电镜下, KO 组海马神经元内线粒体肿胀变性, 嵴消失; 神经纤维髓鞘松懈; 突触小泡数量减少, 突触间隙模糊等。免疫组织化学结果显示, 对照组小鼠海马神经元内 MAP-2 高表达, KO 组含量明显减少; 图像分析显示 KO 组 CA3 区 MAP-2 MOD 值明显降低 ($P < 0.05$)。结论 ApoE KO 小鼠海马神经元结构出现病理改变, MAP-2 表达下降, 提示 ApoE KO 与神经退行性病变有一定联系。

关键词 载脂蛋白 E 基因敲除; 微管相关蛋白 2; 超微结构; 海马 CA3 区; 小鼠

中图分类号 R-332

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)11-1600-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.11.010

载脂蛋白 E (apolipoprotein E, ApoE) 是一种转运血脂的血浆蛋白, 参与调节机体脂质代谢和胆固醇平衡^[1]。在神经系统中, ApoE 参与胆固醇及磷脂的动员和再分布, 可调节突触可塑性和修复神经元损伤, 是目前已知的唯一与神经系统密切关联的载脂蛋白, 也是第一个被确认的散发型和迟发家族型阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 的重要易感

基因^[2]。近年来, 胆固醇代谢异常、ApoE 对胆固醇代谢的调节等已越来越多地被证实与 AD 的发生和发展密不可分。本课题组前期研究^[3]表明, ApoE 基因敲除 (ApoE gene knockout, ApoE KO) 小鼠会引起海马神经元中 β 淀粉样蛋白 (amyloid protein β , A β) 的沉积, 可能会引起 AD 等神经退行性疾病的认知功能障碍。研究^[4]显示, 作为一种新型动物模型——ApoE 基因敲除小鼠, 已应用于认知障碍和记忆关系的研究。AD 确切发病机制目前尚不明确, 有研究者认为, 细胞骨架的异常装配和信号传递的障碍可引发 AD 等神经退行性疾病^[5]。微管相关蛋白-2 (microtubule-associated proteins-2, MAP-2) 是构建细胞骨架的结构性微管相关蛋白家族, 可促进微管形成、维持微管稳定、诱导微管成束, 参与神经元发育、突起的形成和生长以及信息传导等过程^[6]。海马 CA3 区是与记忆相关情报储存的关键部位, 该研究通过外购 ApoE 基因敲除小鼠, 对海马神经元 CA3 区进行超微结构及 MAP-2 表达观察, 旨在为进一步探讨 ApoE 异常引发 AD 等神经退行性疾病的可能机制提供形态学依据。

1 材料与方法

1.1 动物模型制备 20 只清洁级野生型 C57BL/6J 小鼠购自中国协和医科大学, 其中 10 只作为对照组, 另 10 只为 ApoE 基因敲除小鼠作为 KO 组, 单笼饲养 12 周, 此期间各组动物均不限制饮食和饮水。普通饮食喂养 3 个月, 禁食 12 h 后, 将两组小鼠水合氯醛麻醉下行下腔静脉采血, 离心后取血清, -20°C 保存, 待测血清总胆固醇 (total cholesterol, TC)、三酰甘油 (triglyceride, TG)、低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 水平。取脑组织, 用 10% 福尔马林固定, 常规石蜡包埋, 切片 (厚 $4\ \mu\text{m}$, 矢状面切片), 待后续实验。

1.2 主要试剂 兔抗鼠 MAP-2 单克隆抗体购自美国 Sigma 公司, SP 免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。常用生化试剂: LDL 试剂盒、TC 试剂盒、TG 试剂盒等均购自南京建成生物工程

2016-07-06 接收

基金项目: 安徽高校省级自然科学基金项目 (编号: KJ2012A164)

作者单位: ¹安徽医科大学组织学与胚胎学教研室, 合肥 230032

²安徽医学高等专科学校基础部, 合肥 230061

³安徽医科大学综合实验室, 合肥 230032

作者简介: 季 丹, 女, 讲师, 硕士研究生;

贾雪梅, 女, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: jiaxuemei@126.com

研究所,严格按照试剂盒说明书,采用分光光度计检测。

1.3 HE 染色 石蜡切片脱蜡至水,入苏木精染色 10 min,再进行盐酸乙醇分色、蓝化,入伊红染色 1 min,脱水、透明、封片,显微镜观察并摄片。

1.4 电镜观察 将两组小鼠新鲜海马组织预固定于 4% 戊二醛,1% 锇酸后固定,梯度乙醇脱水,常规 Epon-812 包埋、定位,60 nm 超薄切片,醋酸铀及柠檬酸铅双重染色,置日产 JEO L-1230 透射电镜下观察并摄片。

1.5 免疫组织化学染色 采用免疫组织化学 SP 法染色,按照试剂盒说明书进行。3% 过氧化氢溶液处理,微波中火抗原修复,山羊血清封闭,滴加兔抗鼠 MAP-2 抗体(稀释度为 1:100),37℃ 孵育 30 min 后,置 4℃ 过夜;二抗为生物素化羊抗兔 IgG 血清,37℃ 孵育 30 min;辣根酶标记链酶卵白素工作液 37℃ 孵育 30 min。DAB 显色,脱水、透明、封片。用 PBS 替代一抗作阴性对照。

1.6 计算机图像分析 采用南京大学捷达公司 801 计算机病理图象分析系统,应用日本 Nikon E-clipse-800i 显微镜,随机选取 20 倍物镜下 6 个视野,计算海马 CA3 区神经元内 MAP-2 阳性染色平均光密度(mean optical density,MOD)值。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析,数据结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析,然后用 Dennett t 检验进行多重比较。

2 结果

2.1 血清血脂生化指标检测结果 与对照组比较,KO 组血清 TC、TG、LDL 水平明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),见表 1。

表 1 两组小鼠血清脂质生化指标比较($n = 10$, $\bar{x} \pm s$)

项目	对照组	KO 组	t 值	P 值
TC(mmol/L)	4.08 $\pm$ 0.31	10.56 $\pm$ 2.43 **	5.326	0.006
TG(mmol/L)	1.86 $\pm$ 0.39	2.64 $\pm$ 0.63 *	2.894	0.042
LDL(mmol/L)	1.27 $\pm$ 0.38	2.51 $\pm$ 0.57 *	6.341	0.005

2.2 HE 染色检查结果 HE 染色后在光镜下显示,海马由 CA1 ~ CA4 区域组成,可分为分子层、锥体细胞层和多形细胞层。对照组海马 CA3 区锥体细胞层的神经元排列紧密,胞体呈锥体形,神经元的细胞核大而圆,着色浅。KO 组小鼠海马 CA3 区锥体细胞排列紊乱、松散,胞体较小,见图 1。

2.3 电镜观察结果 电镜下显示,对照组海马 CA3

区锥体细胞胞质丰富,内含较多游离核糖体、线粒体成分;KO 组海马神经元内线粒体肿胀变性,嵴断裂,粗面型内质网扩张,见图 2。对照组神经纤维髓鞘结构完整,密度均匀一致;KO 组神经纤维髓鞘结构不完整、松懈,密度较对照组降低,见图 3。对照组突触结构完整,突触前成分中有大量突触小泡,突触间隙清晰,突触后膜特化增厚;KO 组神经末梢可见突触结构小泡明显减少,突触间隙模糊,见图 4。

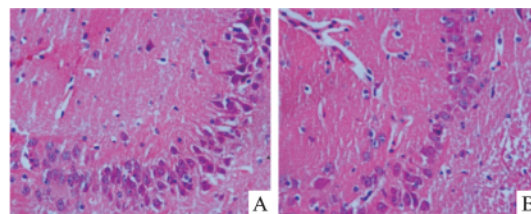


图 1 小鼠海马 CA3 区神经元 HE $\times 200$
A: 对照组; B: KO 组

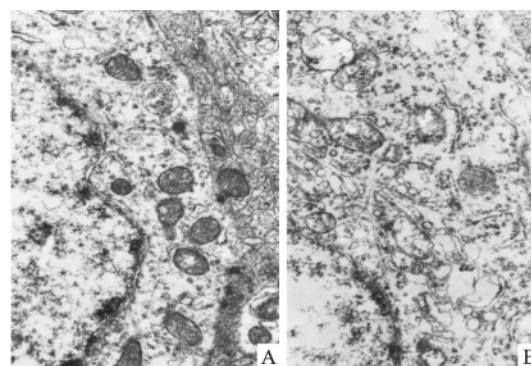


图 2 小鼠海马 CA3 区神经元超微结构 电镜 $\times 15\ 000$
A: 对照组; B: KO 组

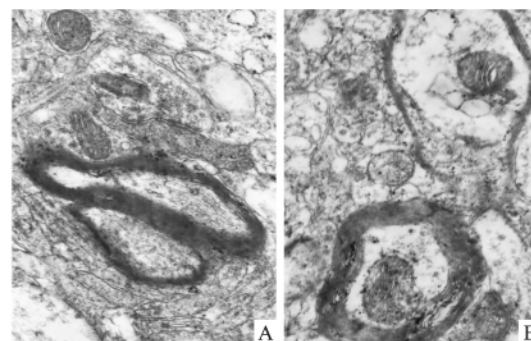


图 3 小鼠海马 CA3 区神经纤维超微结构 电镜 $\times 25\ 000$
A: 对照组; B: KO 组

2.4 MAP-2 免疫组化染色结果 本研究阳性染色结果为细胞质中出现明显的黄色或棕黄色颗粒。在对照组中,MAP-2 黄褐色阳性产物主要表达在海马神经元胞质和树突内,且阳性染色显示的黄色颗粒

样物质表达较高,神经元突起较为光滑,呈连续而纤细的条索状。KO 组含量较少,MAP-2 免疫阳性产物在胞体和树突中较对照组明显减少,条索状阳性产物连续性不完整。阴性对照结果呈阴性,见图 5。

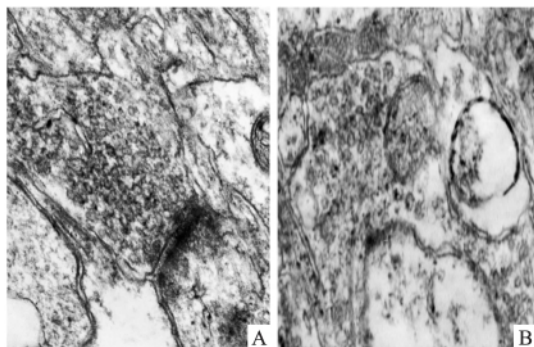


图4 小鼠海马 CA3 区神经突触超微结构 电镜 $\times 50\ 000$
A: 对照组; B: KO 组

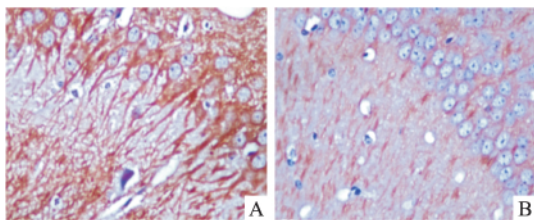


图5 小鼠海马 CA3 区神经元 MAP-2 表达 SP 法 $\times 400$
A: 对照组; B: KO 组

2.5 计算机图像分析海马 CA3 区 MAP-2 表达与对照组比较,KO 组小鼠海马 CA3 区神经元内 MAP-2 MOD 值明显降低,差异有统计学意义(0.489 ± 0.065 vs 0.339 ± 0.029 $t = 2.659$ $P < 0.05$)。

3 讨论

ApoE 主要分布于乳糜微粒(chylomieron, CM)、LDL 中,是机体 LDL 受体的配体,在脂蛋白代谢中作用显著^[1]。基因敲除 ApoE 的小鼠因清除脂质障碍,易在短期内形成高脂血症^[2]。本研究结果证实,与对照组比较,ApoE 基因敲除 3 个月后,KO 组小鼠血清中 TC、TG、LDL 水平显著升高,说明 KO 组小鼠已存在严重脂蛋白代谢障碍,模型建立成功。血浆蛋白 ApoE 与血脂转运相关,在神经损伤的再生、神经元轴突的延伸中起一定的作用^[1]。本课题组前期研究^[3]表明,ApoE 可调控大脑中 $A\beta$ 的沉积和降解, $A\beta$ 与机体的学习、记忆、信息存储等功能关系密切,海马区 $A\beta$ 的沉积受累,是引起 AD 的重要原因。文献^[7-8]报道,ApoE 基因敲除可致 $A\beta$ 沉

积,可能与 AD 认知功能障碍有关。MAP-2 是正常脑组织的神经元胞质中含量最丰富的细胞骨架蛋白,具有调节微管稳定性作用,作为神经元突起的可塑性的调节蛋白发挥作用。研究^[5]表明,细胞骨架的异常装配和信号传递的障碍亦可引发 AD 等神经退行性疾病。

大脑海马区兴奋阈值低,海马 CA3 区神经元数量多,功能重要,探讨海马 CA3 区锥体神经元的形态发育对阐明 AD 发病机制具有非常重要的意义^[9]。本实验形态学结果证实,KO 组较对照组 CA3 区锥体细胞排列紊乱、松散。电镜下,KO 组海马神经元内线粒体肿胀变性,嵴断裂,粗面型内质网扩张;神经纤维髓鞘结构松懈,密度下降;突触小泡数量显著减少,突触间隙模糊。电镜结果提示,KO 组小鼠学习记忆的海马 CA3 区神经元、神经纤维、突触均发生变化,这些可能是 ApoE 基因敲除小鼠产生学习记忆功能障碍的原因之一。MAP-2 属于热稳定的磷蛋白,在神经元的胞体及树突内分布广泛,调节神经元的生长、轴突和树突的形成以及突触可塑性^[5,9]。本研究中免疫组化结果显示 KO 组小鼠海马 CA3 区神经元中 MAP-2 的表达明显下降。分析其下降的可能机制有^[8-10]: ① ApoE 基因敲除后,小鼠海马 CA3 区结构改变,锥体细胞线粒体结构不可逆性损伤,致使细胞能量代谢障碍;② 锥体细胞粗面型内质网扩张,细胞蛋白质的合成能力削弱;③ ApoE 基因敲除后,引起第二信使系统、谷氨酸受体亚单位和蛋白激酶受损,使得 MAP-2 表达下降,神经纤维修复障碍,并进一步引发加重 AD 等神经退行性疾病的发生发展。在神经细胞发育过程中,MAP-2 可以调节微管聚合和稳定性,对神经元突起的发生、延长和稳定发挥着重要作用,微管结构蛋白 MAP-2 的下降,减弱了神经纤维轴突和树突的产生和突触的重建;MAP-2 表达下降,加重了微管的不稳定性,其聚合作用下降,影响细胞有丝分裂和细胞骨架的正常装配,这些变化有可能导致 AD 病变的发生^[10]。但是,MAP-2 表达在 ApoE 基因敲除小鼠海马 CA3 区神经元的分子机制,以及其与神经元损伤恢复与行为能力的改变有何内在联系,有无 AD 特征性的病理改变如神经纤维缠结等尚需进一步研究。

综上所述,本实验通过 ApoE 基因敲除小鼠,证实其存在脂蛋白代谢障碍。ApoE 基因敲除小鼠海马 CA3 区神经元超微结构明显变化,这种改变可能与 MAP-2 表达下降有关。

参考文献

- [1] Tai L M , Ghura S , Koster K P , et al. APOE-modulated A β -induced neuro inflammation in Alzheimer's disease: current landscape , novel data , and future perspective [J]. *J Neurochem* , 2015 ,133(4) : 465 – 88.
- [2] Davies G , Harris S E , Reynolds C A , et al. A genome-wide association study implicates the APOE locus in nonpathological cognitive ageing [J]. *Mol Psychiatry* 2014 ,19(1) : 76 – 87.
- [3] 张 宁 ,倪 普 ,徐凌凡 ,等. ApoE 基因敲除小鼠海马神经元内 β 淀粉样蛋白的表达变化 [J]. *安徽医科大学学报* 2011 ,46(6) : 531 – 4.
- [4] 刘 娟 ,贾雪梅. 高脂饮食对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠海马 CA3 区形态学及 Mortalin 蛋白表达的研究 [D]. *安徽医科大学* 2011.
- [5] Vemuri P , Wiste H J , Weigand S D , et al. Effect of apolipoprotein E on biomarkers of amyloid load and neuronal pathology in Alzheimer disease [J]. *Ann Neurol* , 2010 ,67(3) : 308 – 16.
- [6] Haley G E , Kohama S G , Urbanski H F , et al. Age-related decreases in SYN levels associated with increases in MAP-2 , apoE , and GFAP levels in the rhesus macaque prefrontal cortex and hippocampus [J]. *Age(Dordr)* , 2010 ,32(3) : 283 – 96.
- [7] Zhu H Q , Li Q , Dong L Y , et al. MicroRNA-29b promotes high-fat diet-stimulated endothelial permeability and apoptosis in apoE knock-out mice by down-regulating MT1 expression [J]. *Int J Cardiol* , 2014 ,176(3) : 764 – 70.
- [8] Verghese P B , Castellano J M , Garai K , et al. ApoE influences amyloid- β (A β) clearance despite minimal apoE/A β association in physiological conditions [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* , 2013 ,110(19) : E1807 – 16.
- [9] Bien-Ly N , Gillespie A K , Walker D , et al. Reducing human apolipoprotein E levels attenuates age-dependent A β accumulation in mutant human amyloid precursor protein transgenic mice [J]. *J Neurosci* , 2012 ,32(14) : 4803 – 11.
- [10] Haley G E , Eghlidi D H , Kohama S G , et al. Association of microtubule associated protein-2 , synaptophysin , and apolipoprotein E mRNA and protein levels with cognition and anxiety levels in aged female rhesus macaques [J]. *Behav Brain Res* , 2012 ,232(1) : 1 – 6.

Neuronal morphology and microtubule associated protein 2 expression changes in ApoE knockout mice hippocampal CA3 area

Ji Dan^{1 2} , Huang Dake³ , Gui Li³ , et al

(¹Dept of Histology and Embryology , Anhui Medical University , Hefei 230032; ²College of Basic Medicine , Anhui Medical University , Hefei 230061; ³Comprehensive Laboratory , Anhui Medical University , Hefei 230032)

Abstract Objective To observe the effect of apolipoprotein E knockout (ApoE KO) on structural changes in neuronal morphology of hippocampal CA3 area of mice and microtubule-associated protein 2 (MAP-2) expression.

Methods 10 normally-fed C57BL/6J wild mice were chosen as the control group , and 10 gene knockout mice were selected as ApoE KO group fed with a common diet for 3 months. Blood lipid changes were detected by spectrophotometer testing. Brain tissues of the two groups of mice were taken out to observe structural changes in hippocampal CA3 area by HE staining and electron microscopy techniques. MAP-2 protein expression changes in hippocampal CA3 area were observed by immunohistochemical technique. Average optical density (MOD) expression changes were analyzed by computer image system. **Results** Compared with the control group , plasma total cholesterol , triglyceride and low density lipoprotein cholesterol levels of the KO group were significantly higher ($P < 0.05$, $P < 0.01$) . Light microscope showed that hippocampal CA3 pyramidal cells of KO group mice were smaller , sparsely and loosely arranged. Under the electron microscope , hippocampal neurons mitochondria of KO group swelled and degenerated and ridge disappeared , myelin sheath of nerve fibers relaxed , the number of synaptic vesicles decreased and synaptic cleft obscured. Immunohistochemical results indicated that the MAP-2 in hippocampal neuron was higher in the control group , whereas that of KO group was remarkably diminishing; image analysis showed that MAP-2 OD value in CA3 area of KO group significantly decreased ($P < 0.05$) . **Conclusion** ApoE KO may contribute to pathological changes of hippocampal neuron structure of mice and decrease MAP-2 expression , which signifies that ApoE KO is correlated with neurodegenerative disorders.

Key words apolipoprotein E gene knockout; microtubule associated protein 2; ultra microstructure; hippocampal CA3 area; mice