

急性低压低氧对小鼠学习记忆及海马 ACh 水平、磷酸化 tau 蛋白表达的影响

钟 玲,宋永斌,徐建春,焦 岩,王 荣,杨 遥,刘 静,徐江涛

摘要 目的 探讨模拟高原急性低压低氧环境对小鼠学习记忆行为及乙酰胆碱水平(ACh)、磷酸化 tau 蛋白(P-tau)表达的影响。方法 将小鼠置于模拟海拔 6 000 m 的低压低氧舱内 8 h 后,用 Morris 水迷宫测定小鼠的空间学习记忆能力;用比色法测定海马 ACh 水平和胆碱乙酰转移酶(ChAT)活性的变化;用免疫组织化学方法观察其海马区总 tau 蛋白(T-tau)和 P-tau 表达的变化。结果 与常压常氧组比较,低压低氧组小鼠寻找平台的潜伏期延长($P < 0.01$),目标象限停留时间减少($P < 0.05$),海马区 ACh 水平和 ChAT 水平显著下降($P < 0.05$, $P < 0.01$) P-tau 表达增加($P < 0.05$)。结论 急性低压低氧环境可使小鼠学习记忆能力下降,这可能与海马区 ACh 水平和 ChAT 减少以及 P-tau 表达增加有关。

关键词 低压低氧;学习记忆;海马;乙酰胆碱;磷酸化 tau 蛋白

中图分类号 R 741

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)11-1610-04

高原低压低氧环境下,大脑因缺少氧供而导致认知功能下降^[1]。研究^[2]表明胆碱能系统功能障碍是低压低氧产生认知障碍的机制之一,胆碱能受体激动剂可恢复大脑皮层和海马的胆碱能系统功能使记忆能力增加。Zhao et al^[3]发现 tau 蛋白磷酸化可导致大鼠侧脑室乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)水平和胆碱乙酰转移酶(cholinacetyltransferase, ChAT)活性均下降。该研究在观察急性低压低氧对小鼠学习记忆功能的影响的同时,观察小鼠海马区 tau 蛋白磷酸化水平及 ACh 含量变化。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器 主要试剂:ACh 测定试剂盒和 ChAT 活性测定试剂盒均购自南京建成生物工程

研究所;多克隆兔抗鼠磷酸化 tau 蛋白(phosphorylated tau protein, P-tau)抗体 Ser199(1:200,特异性识别 Ser199 位点 P-tau)、tau 蛋白抗体[1:100,检测总 tau 蛋白(total tau protein, T-tau)]购自北京博奥森生物工程有限公司。主要仪器:FLYDWC-IA 型低压低氧动物实验舱(中航工业贵州风雷公司);超净工作台(上海博迅实业有限公司);Morris 水迷宫 MT2000(成都泰盟科技有限公司)。

1.2 实验动物及分组 SPF 级健康雄性成年昆明小鼠 34 只,体重 19~23 g,由新疆维吾尔自治区疾病控制中心提供,在兰州军区乌鲁木齐总医院实验动物科标准化饲养。饲养室及实验室温度保持在 23~25℃,湿度在 40%~45%,自由进食水。适应性喂养 1 周后,根据水迷宫训练前 4 d 的平均逃避潜伏期成绩从 20 只小鼠中挑选 14 只成绩好的小鼠,随机分为常压常氧组(800 m)和低压低氧组(6 000 m),各 7 只;余 14 只根据体重随机分为常压常氧组(800 m)、低压低氧组(6 000 m),各 7 只,取海马组织行 ACh 含量和 ChAT 活性测定以及 tau 蛋白水平和 P-tau 表达的测定。

1.3 模拟环境的方法 低压低氧环境:将小鼠置于低压低氧舱内,按 100 m/min 的减压速度达到预定海拔(6 000 m),持续 8 h 后按同样速度增压至实验室环境气压水平。舱内温度、湿度与实验室环境一致,小鼠在实验舱内可自由进食水。常压常氧环境:与周围实验室环境相通的低压低氧实验舱内。

1.4 Morris 水迷宫实验^[4] Morris 水迷宫分为 4 个象限,见图 1,将平台置于 WS 象限,距水面下约 1 cm。定位航行实验:分别随机从 4 个不同的入水点(WN、N、E 和 ES)将小鼠面向池壁放入水中训练 4 次,连续 4 d,如果小鼠在 60 s 内未找到平台(逃避潜伏期记为 60 s),则将其引至平台,站立于平台 15 s 后,从下一入水点进行下一次训练。观察并记录训练期间小鼠每次寻找平台所需的逃避潜伏期。第 5 天训练前将小鼠置于舱内 8 h,从舱内取出小鼠后于前 4 d 相同时间进行定位航行实验,取第 5 天的 4 次成绩的平均值为正式结果。空间探索实验:第 5

2014-05-19 接收

基金项目:全军“十一五”计划课题项目(编号:06MB106);全军心理卫生应用性科研课题项目(编号:12XLZ302)

作者单位:兰州军区乌鲁木齐总医院神经内科,乌鲁木齐 830000

作者简介:钟 玲,女,硕士研究生;

徐江涛,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: xujiangtao1959@163.com

天定位航行实验结束后,撤去平台,观察并记录小鼠在 60 s 内穿越原平台次数、目标象限停留时间。

1.5 海马 ACh 含量和 ChAT 活性测定 立即断头处死于低压低氧舱内放置 8 h 结束后的小鼠,迅速取脑,置于冰盒上,称重脑组织,分离出海马,按照重量和体积比 1:10 的比例,加入生理盐水冰浴匀浆,4 ℃、3 500 r/min 离心 10 min,取上清液,立即按胆碱能指标测定盒说明书测定左侧海马组织 ACh 含量和 ChAT 活性。

1.6 海马区 P-tau、T-tau 表达检测 小鼠右侧海马组织,0~4 ℃生理盐水洗净,10% 甲醛固定,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,制成石蜡切片,行 P-tau 和 T-tau 免疫组化染色,按说明书操作,苏木精复染、中性树胶封片。每组取 3 张切片,400 倍显微镜下于海马区随机选取 5 个视野,以胞质呈棕黄色染色为阳性,采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统对各组阳性细胞进行平均光密度 (absorbance, OD) 值检测。

1.7 统计学处理 运用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,满足参数检验条件的使用两独立样本 *t* 检验;不满足参数检验条件的,采用两独立样本秩和检验,双尾检验,以 $\alpha = 0.05$ 为标准。

2 结果

2.1 小鼠 Morris 水迷宫实验 与常压常氧组比较,低压低氧组的潜伏期明显延长 ($P < 0.01$),即寻找平台时间及距离延长,见图 1;目标象限停留时间减少 ($P < 0.05$),而两组之间穿越原平台次数差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 1。

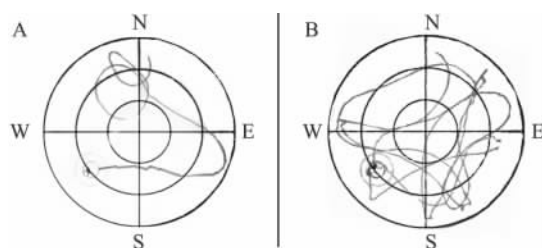


图 1 常压常氧组与低压低氧组小鼠游泳轨迹
A:常压常氧组;B:低压低氧组

表 1 两组小鼠 Morris 水迷宫实验结果比较 ($n = 7, \bar{x} \pm s$)

组别	潜伏期 (s)	目标象限停留时间 (s)	穿越原平台次数
常压常氧	26.39 ± 8.44	22.98 ± 6.14	3.88 ± 1.73
低压低氧	44.60 ± 7.80**	19.78 ± 2.74*	3.85 ± 1.41
<i>t</i> 值	-4.193	2.851	0.192

与常压常氧组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 小鼠脑组织 ACh、ChAT 和 tau 检测 与常压常氧组比较,低压低氧组 ACh 含量和 ChAT 活性显著降低、P-tau OD 值显著升高 ($P < 0.05, P < 0.01$),但 T-tau OD 值差异无统计学意义,见表 2;P-tau 阳性神经元呈棕黄色,主要在胞质和轴突处着色,胞核周围也染成棕黄色,见图 2。

表 2 两组小鼠海马组织 ACh、ChAT 和 tau 检测结果比较 ($n = 7, \bar{x} \pm s$)

组别	乙酰胆碱 (U/mg)	ChAT 活性 (U/mg)	tau OD 值	P-tau OD 值
常压常氧	8.11 ± 0.35	271.0 ± 70.1	0.16 ± 0.01	0.10 ± 0.003
低压低氧	7.56 ± 0.42*	167.4 ± 46.2**	0.16 ± 0.02	0.13 ± 0.024*
<i>t</i> 值	2.657	3.267	0.706	-2.784

与常压常氧组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

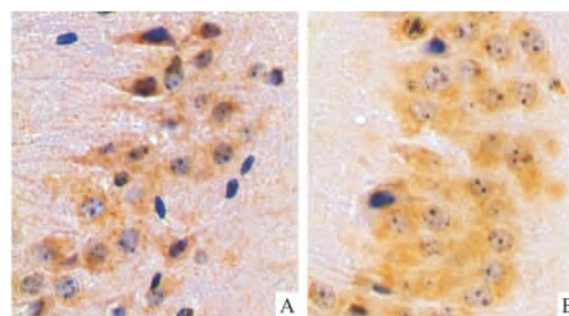


图 2 各组小鼠海马 P-tau (Ser191) 表达的比较 DAB × 400
A:常压常氧 8 h; B: 低压低氧 8 h

3 讨论

Morris 水迷宫是学习记忆量化的良好指标,可以反映鼠类空间学习记忆的形成和维持时间,定位航行试验测定动物获取经验能力即学习能力,逃避潜伏期的长短代表学习能力的高低;空间探索试验测定动物记忆保持的能力,测量值增加或减少提示记忆保持能力增强或减弱^[4]。本研究结果显示,在 Morris 水迷宫试验中模拟高原环境可使小鼠寻找平台的潜伏期较正常对照组明显延长。目标象限停留时间减少,这表明模拟高原低压低氧环境可使小鼠的空间学习能力和记忆保持能力下降,对学习记忆行为具有损害作用。然而,这一损害的神经生物学机制尚不清楚。ACh 是中枢胆碱能神经系统的一种重要递质,作用于突触后膜的 ACh 受体,介导信息的传递,参与学习和记忆等相关的生理活动^[5]。ACh 受体分为神经型尼古丁乙酰胆碱受体

(nAChRs)和毒蕈碱样乙酰胆碱受体(mAChRs)两种类型。ChAT为ACh的合成酶,是中枢胆碱能神经元的标志酶。Muthuraju et al^[2]将大鼠放置于低压低氧舱模拟海拔6 100 m下,大鼠记忆功能下降伴随ACh下降,AChE活性增加和AChT表达下降,表明胆碱功能失调参与了低压低氧导致的记忆功能障碍损害的机制,本研究结果与此一致。本研究显示急性低压低氧环境下,小鼠认知功能下降伴随海马P-tau的表达增加。tau蛋白是一种高度不对称的磷蛋白,主要功能是促进轴突微管的装配和稳定,保持微管间的距离^[3],影响神经细胞轴突的物质运输功能。研究^[4]表明tau蛋白磷酸化是调节神经元功能的主要手段,tau被异常磷酸化后可极大地削弱tau蛋白结合稳定微管的功能而阻碍微管的组装过程,造成相关神经递质的运输、储存和释放障碍,从而导致学习记忆损害^[5-9]。本研究显示急性低压低氧下小鼠学习记忆能力下降伴随P-tau表达增加,也表明学习记忆能力的下降可能与P-tau表达增加有关。

研究^[3]显示P-tau与胆碱能受体之间存在相互作用的关系,本研究显示急性低压低氧环境下小鼠海马ACh水平变化伴随着tau磷酸化蛋白表达水平的改变。体外研究^[10]显示通过尼古丁及其他胆碱能受体激动剂处理SH-SY5Y细胞,能显著增加tau蛋白磷酸化水平。Wang et al^[11]使用 $\alpha 7$ nAChRs激动剂能够增加A β 诱导的tau蛋白的磷酸化,而用 $\alpha 7$ nAChRs阻滞剂预先处理则可减弱tau蛋白磷酸化作用。Gu et al^[12]研究发现M1胆碱能受体激动剂能提高分泌型神经细胞淀粉样蛋白前体蛋白(APP)的水平,减少tau蛋白磷酸化、高磷酸化,并且使患者的认知功能恢复。Forlenza et al^[13]的研究也指出,神经元细胞非选择性M受体激动剂卡巴胆碱能够减轻tau蛋白磷酸化,非神经元细胞M1受体激动剂能够减轻tau蛋白磷酸化。一系列的实验证实激活nAChRs导致P-tau增加,而激活mAChRs可减少tau蛋白磷酸化。Silveyra et al^[14]研究发现tau蛋白过度磷酸化的转基因小鼠和SH-SY5Y细胞中乙酰胆碱酯酶表达明显增加,表明tau蛋白过度磷酸化导致ACh水平下降。

参考文献

[1] Maiti P, Singh S B, Mallick B, et al. High altitude memory impair-

ment is due to neuronal apoptosis in hippocampus, cortex and striatum [J]. *J Chem Neuroanat*, 2008, 36(3-4): 227-38.

[2] Muthuraju S, Maiti P, Pati S, et al. Role of cholinergic markers on memory function of rats exposed to hypobaric hypoxia [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 672(1-3): 96-105.

[3] Zhao L, Chu C B, Li J F, et al. Glycogen synthase kinase-3 reduces acetylcholine level in striatum via disturbing cellular distribution of choline acetyltransferase in cholinergic interneurons in rats [J]. *Neuroscience*, 2013, 255: 203-11.

[4] Vorhees C V, Williams M T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory [J]. *Nat Protoc*, 2006, 1(2): 848-58.

[5] Winkler J, Suhr S T, Gage F H, et al. Essential role of neocortical acetylcholine in spatial memory [J]. *Nature*, 1995, 375(6531): 484-7.

[6] Cleveland D W, Hwo S Y, Kirschner M W. Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin [J]. *J Mol Biol*, 1977, 116(2): 207-25.

[7] De Calignon A, Fox L M, Pitstick R, et al. Caspase activation precedes and leads to tangles [J]. *Nature*, 2010, 464(7292): 1201-4.

[8] Onishi T, Iwashita H, Uno Y, et al. A novel glycogen synthase kinase-3 inhibitor 2-methyl-5-(3-{4-[(s)-methylsulfinyl]phenyl}-1-benzofuran-5-yl)-1,3,4-oxadiazole decreases Tau phosphorylation and ameliorates cognitive deficits in a transgenic model of Alzheimer's disease [J]. *J Neurochem*, 2011, 119(6): 1330-40.

[9] Wang Q, Hu Z H, Wang J Z, et al. Impact of repeated starvation on neuronal cytoskeleton protein phosphorylation and spatial learning and memory in rats [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2010, 26(11): 1023-7.

[10] Hellstrom-Lindahl E, Moore H, Nordberg A. Increased levels of tau protein in SH-SY5Y cells after treatment with cholinesterase inhibitors and nicotinic agonists [J]. *J Neurochem*, 2000, 74(2): 777-84.

[11] Wang H Y, Li W, Benedetti N J, et al. Alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors mediate beta-amyloid peptide-induced tau protein phosphorylation [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(34): 31547-53.

[12] Gu Z, Zhong P, Yan Z. Activation of muscarinic receptors inhibits beta-Amyloid peptide-induced signaling in cortical slices [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(19): 17546-56.

[13] Forlenza O V, Spink J M, Dayanandan R, et al. Muscarinic agonists reduce tau phosphorylation in non-neuronal cells via GSK-3beta inhibition and in neurons [J]. *J Neural Transm*, 2000, 107(10): 1201-12.

[14] Silveyra M X, García-Ayllón M S, de Barreda E G, et al. Altered expression of brain acetylcholinesterase in FTDP-17 human tau transgenic mice [J]. *Neurobiol Aging*, 2012, 33(3): 624. e23-34.

sTRAIL 及受体 TRAIL-R1 在 DNT 细胞抑制胰腺癌细胞中的作用及意义

赵 跃, 陈 炯, 杨仁保, 陈龙江, 胡立威, 马小磊, 徐 弘

摘要 目的 探讨肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(sTRAIL)与其受体 TRAIL-R1 在 DNT 细胞杀伤胰腺癌细胞中的作用及意义。方法 采用抗体吸附法培养外周血中分离的 DNT 细胞, ELISA 法检测其细胞培养上清液中的 sTRAIL 水平。采用 qPCR、Western blot 法检测 TRAIL-R1 在 5 株胰腺癌细胞株中的表达, 免疫组织化学法检测 48 例胰腺癌组织标本中 TRAIL-R1 的表达情况, 分析其与病理参数之间的关系。结果 DNT 细胞数目逐渐增多, 其培养液中 sTRAIL 与对照组相比浓度明显升高($t = 17.24, P < 0.05$)。qPCR 检测受体 TRAIL-R1 在 5 株胰腺癌细胞中均有表达,

Western blot 法检测 TRAIL-R1 受体表达发现在胰腺癌细胞系 CFPAC-1 中表达高, 在 MIA PaCa-2 和 panc-1 中表达较高, BXP-3 中表达较低, 在 Capan-1 细胞系中不表达。TRAIL-R1 在胰腺癌组的阳性表达率及染色强度低于相应的癌旁组织($\chi^2 = 7.43, 12.48, P < 0.05$); TRAIL-R1 的表达与染色强度有关($\chi^2 = 12.48, P < 0.05$)。结论 外周血来源的 DNT 细胞可分泌 sTRAIL, sTRAIL 与胰腺癌细胞和组织所表达的受体 TRAIL-R1 结合诱导细胞凋亡, 可能是 DNT 细胞抑制胰腺癌细胞增殖的机制之一。

关键词 胰腺癌; DNT 细胞; TRAIL-R1

中图分类号 R 735.9

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)11-1613-05

2014-08-09 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81071985); 安徽省国际科技合作项目(编号: 10080703038)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院普通外科, 合肥 230001

作者简介: 赵 跃, 男, 硕士研究生;

陈 炯, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: ch_jiong@126.com

胰腺癌是一种高度恶性且预后极差的肿瘤, 患者的 5 年生存率不足 5%^[1], 早期即可转移, 目前没有有效的治疗方法, 因此亟需寻找更为有效的胰腺癌治疗方法。近来, 一类具有独特免疫调节功能的双阴性 T (double negative T, DNT) 细胞在多种疾病

Effects of acute hypobaric hypoxia on learning memory behaviors and the level of acetylcholine, expression of phosphorylated tau protein in hippocampus of mice

Zhong Ling, Song Yongbin, Xu Jianchun, et al

(Dept of Neurology, Urumqi General Hospital of Lanzhou Command, PLA, Urumqi 830000)

Abstract Objective To examine the effects of acute hypobaric hypoxia on the capabilities of learning and memory, the level of acetylcholine and the expression of P-tau in hippocampus of mice. **Methods** The acute hypobaric hypoxia environment were imitated by putting the mice in a hypobaric chamber at altitude of 6 000 meters for 8 hours. Morris water maze test to detect the capabilities of learning and memory of mice. The level of ACh and the activity of ChAT in hippocampus were examined by colorimetric method and the expression P-tau and T-tau were examined by immunohistochemistry. **Results** The mean escape latency of mice in the hypobaric hypoxia group were longer than the normobaric normoxia group ($P < 0.01$), and the target quadrant residence time were decreased ($P < 0.05$). Compared with the normobaric normoxia group, level of ACh and the activity of ChAT in hippocampus of mice in the hypobaric hypoxia group were all reduced ($P < 0.05$ & $P < 0.01$), otherwise, the expression of P-tau in hippocampus of mice were increased. **Conclusion** Acute hypobaric hypoxia environment can decrease the abilities of learning and memory of mice, and these changes might be related with the reduction of the level of ACh and the expression of P-tau in hippocampus of mice.

Key words hypobaric hypoxia; learning and memory; hippocampus; acetylcholine; phosphorylated tau protein