

DMXB对 β 淀粉样蛋白所致痴呆小鼠的空间记忆及回避记忆的影响

王昊飞¹, 吴玉琴¹, 李勇¹, 丛晓银¹, 陈玲², 贺丹军¹

(1.南京医科大学第一附属医院临床心理科,南京 210029;

2.南京医科大学大学生理教研室,南京 210029)

【摘要】 目的:探讨选择性激动 $\alpha 7$ -N型乙酰胆碱受体($\alpha 7$ nAChR)对痴呆小鼠空间参考记忆和被动回避记忆功能的影响。**方法:**小鼠45只随机分为3组:对照组、模型组、干预组。对照组侧脑室内注射生理盐水,模型组侧脑室内注射 $A\beta_{25-35}$,干预组连续14天腹腔注射 $\alpha 7$ nAChR激动剂DMXB,采用Morris水迷宫和Y型电迷宫观察3组小鼠的行为学表现,电生理检测脑片海马CA1区突触长时程增强(LTP)以观察小鼠的学习记忆功能。**结果:**水迷宫训练第5天,模型组小鼠与对照组相比逃逸潜伏期增加,目标象限探索距离百分比、目标象限探索时间百分比、穿越原平台位置次数显著减少,干预组与对照组小鼠之间各项指标无显著性差异。与对照组相比,模型组小鼠在Y型电迷宫训练第5天的错误反应次数和全天总反应时间明显增加,干预组与模型组小鼠之间无显著性差异。侧脑室内注射 $A\beta_{25-35}$ 损害海马LTP诱导,DMXB的干预可恢复LTP。**结论:** $A\beta_{25-35}$ 介导的神经毒性作用诱导AD小鼠,空间参考记忆和被动回避记忆明显减退,选择性激动 $\alpha 7$ nAChR可以改善小鼠空间参考记忆,对被动回避记忆没有影响。

【关键词】 $\alpha 7$ -N型乙酰胆碱受体; β 淀粉样蛋白; 阿尔茨海默病; 空间参考记忆; 被动回避记忆

中图分类号: R395.1

DOI: 10.16128/j.cnki.1005-3611.2015.03.013

Effects of DMXB on Memory of $A\beta_{25-35}$ Induced Alzheimer Disease Mice

WANG Hao-fei¹, WU Yu-qin¹, LI Yong¹, CONG Xiao-yin¹, CHEN Lin², HE Dan-jun¹

¹Department of Psychology, the First Affiliated Hospital With Nanjing Medical University, Nanjing

210029, China; ²Department of Physiology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

【Abstract】 Objective: To explore effects of selective activation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7$ nAChR) on spatial reference memory and avoidance learning memory in Amyloid β -peptide($A\beta_{25-35}$) induced Alzheimer Disease(AD) mice. **Methods:** Forty-five mice were randomly divided into 3 groups: control group, model group and. The control group received the intracerebroventricular(ICV) saline injection, the dementia mice model group received , and the DMXB group received the ICV injection of $A\beta_{25-35}$ and followed the ICV injection of $\alpha 7$ nAChR agonist. Using Morris water maze and Y type maze, the mice behavior was measured, electrical synapses physiological testing in mice brain slices hippocampal CA1 was used to measure the synaptic long-term potentiation(LTP) related to learning and memory functions. **Results:** On the day 5 of Morris water maze test, escape latency of the model group was significantly higher than the control group, whereas the percentage of distance exploration target quadrant, the percentage of time exploring the target quadrant, and the times of crossing the situation of platform were significantly lower than the control group. There was no significant difference between the DMXB group and the control group. On the day 5 of Y-maze test, the model group showed higher error numbers (EN) and total reaction time(TRT) than control group. There was no significant difference between the DMXB group and the model group. ICV injection $A\beta_{25-35}$ damaged hippocampus LTP induction, and DMXB intervention could facilitate LTP. **Conclusion:** These findings suggested that the $A\beta_{25-35}$ -induced neurodegeneration in AD model by $\alpha 7$ nAChR mediated neurotoxicity. Selective activation of $\alpha 7$ nAChR can improve spatial reference memory in mice, had no effect on avoidance learning memory.

【Key words】 Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor($\alpha 7$ nAChR); Amyloid β -peptide; Alzheimer disease(AD); Spatial learning and memory; Avoidance learning memory

外显记忆的损伤被认为是阿尔茨海默病(Alzheimer's Disease, AD)患者特征性的功能障碍^[1],它也和 β 淀粉样蛋白(β -amyloid protein, $A\beta$)沉淀,神经纤维缠结和神经细胞死亡等AD的特征性病理改变

相关联。内隐记忆,也称为非陈述性记忆,和我们技巧、习惯和行为的记忆,以及情感的表达密切相关。早期AD患者的外显记忆和正常对照组之间差异显著,而内隐记忆无显著差异^[2]。胆碱能系统被认为和记忆障碍密切相关,特别是外显记忆,研究发现

AD患者认知过程相关的海马和皮层区域的 $\alpha 7$ -N型乙酰胆碱受体($\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor, $\alpha 7$ nAChR)水平降低^[3]。PET研究发现AD患者认知功能下降和皮层 $\alpha 7$ nAChR的缺失水平明显相关^[4], $\alpha 7$ nAChR同时参与AD患者的神经保护和神经营养功能^[5]。 $\alpha 7$ nAChR与A β 蛋白有很高的亲和力,并促进其在神经元内的沉积^[6]。A β 是AD特征性病理改变老年斑的组分^[7],其毒性作用的部位位于第25~35位氨基酸残基之间,通过侧脑室灌注A β_{25-35} 制作的AD模型动物,其病理形态学和行为学实验结果也已得到肯定^[8]。本研究拟通过A β_{25-35} 制作AD小鼠病理模型,并观察选择性刺激 $\alpha 7$ nAChR对小鼠空间参考记忆和被动回避记忆功能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物分组 雄性健康成年昆明小鼠45只,体重25~35g,由南京医科大学实验动物中心提供,实验前自由饮水、摄食,恒温、恒湿,适应性饲养1周。分为对照组、模型组、干预组,每组15只。

1.1.2 主要仪器和试剂 A β_{25-35} 为美国Sigma公司生产,DMXB为日本大鹏制药公司生产,Morris水迷宫选用上海吉量科技有限公司研制的DigBehv动物行为分析系统,电生理检测刺激器为日本Nihon公司生产的Kohden SEN-3301型,电极放大器为美国Axon公司生产的Axonclamp-2B型,数模采集转换及数据分析仪选用美国Axon公司生产的Digidata 1200A/D和Clampex软件。

1.2 方法

1.2.1 AD模型的制备与干预 将1mg的A β_{25-35} 溶解于0.33ml水中(浓度3mmol/L),置于37℃水浴箱中孵育96h,肽段聚集老化后备用。腹腔麻醉(10%水合氯醛0.3~0.4ml/100g)小鼠后置于脑三维立体定位仪上,备皮、消毒后从正中切开皮肤,按Paxinos-Watson立体定位图谱,以前囟中点后0.3mm,右侧1mm为坐标,深2.5mm为侧脑室注射部位。对照组小鼠侧脑室注射生理盐水3 μ l,模型组及干预组小鼠侧脑室注射A β_{25-35} 3 μ l,持续5分钟微量注射后留置针3分钟以保证溶液充分吸收,缓慢拔针后以局部软组织覆盖后缝合皮肤。干预组实验第2天开始,连续14天每天腹腔注射 $\alpha 7$ -N型乙酰胆碱受体($\alpha 7$ nAChR)激动剂DMXB 5mg/kg。

1.2.2 Morris水迷宫检测 实验第5天用Morris水迷宫检测小鼠的空间参考记忆。参考先前的检测方

法^[9],获得性训练为5天,每天训练前将平台拆除,小鼠自由游泳2分钟熟悉环境,训练时在东北象限水下2cm安装隐蔽的平台,先将小鼠置于其上1分钟,随后训练4次,分别从东西南北四象限顺序入水,面向池壁轻放入水池,记录入水到爬至平台的时间,即逃逸潜伏期(Escape Latency),如果90秒仍找不到平台,潜伏期记为90秒,以4次平均值作为统计数据。第6天行探查训练,拆除水平平台,让实验小鼠自由游泳,记录目标象限(原平台象限)探索时间/总时间(90秒)百分比,目标象限(原平台象限)探索距离/总游泳距离百分比,以及穿过原平台位置的次数。

1.2.3 Y电迷宫检测 参照王跃春^[10]的Y型迷宫检测方法,脑立体定位注射术后,第10天小鼠进行Y型电迷宫检测,连续检测5天。自制Y迷宫由20cm等长的I、II、III臂和三者的交接区组成,底部铺设电栅,顶端刺激信号灯由计算机软件随机控制。电刺激幅度为30V。采用随机不休息法,安全区以无规则次序变换,以训练小鼠辨别灯光刺激及安全方位的能力。实验前小鼠放置于迷宫内,自由探索,熟悉时间为3分钟,开始位置为I臂,每次测试安全区的指示灯先亮,延迟5秒中,其他两臂才开始产生电刺激。当小鼠逃避到安全区后,灯光持续10秒。小鼠所在支臂为下一次测试的起点,每天训练20次,足底通电后10s内未跑向安全区为错误反应,记录总错误反应次数(error number, EN),总反应时间(total reaction time, TRT)。

1.2.4 海马CA1区长时程增强(Long-term Potentiation, LTP)诱导 实验第15天对海马CA1区开始进行电生理实验,乙醚麻醉下小鼠快速取脑组织,置于持续通饱含氧混合气(95%O₂, 5%CO₂)的0~4℃人工脑脊液(ACSF)中,保持pH值为7.4,使用振动切片机冠状位切取脑片6~8片,每片厚度400 μ m,保存在22~25℃的ACSF中,并保持通混合气大于1小时后,移至恒温箱(33.0 \pm 0.2)℃浴槽,浴槽以速度2.5~3.0ml/min浸润式灌流。用微推进器将双极钨丝刺激电极插入海马脑片的CA1的Schaffer侧支路径上。记录电极充以2mol/L的NaCl的硼酸盐玻璃微电极,阻抗3~8M Ω ,插入海马CA1区的辐射层,记录电极经放大器和记录仪相连,经数模转换连接数据采集软件保存,记录兴奋性突触后电位(excitatory postsynaptic potential, EPSP)。

首先以产生最大反应EPSP的刺激强度的50%为基础刺激强度,15秒/次,以1分钟4次叠加,采集20分钟作为基线值(100%),稳定基础性突触传递。

给予高频刺激(high-frequency stimulation, HFS)诱导LTP, 频率100Hz, 以最大反应的刺激强度的80%为刺激强度, 持续1秒后再施以相同基础刺激, 稳定记录60分钟, 以观察LTP的长时程特点, EPSP斜率是负波峰与扫描基线之间的幅值与所需时程的比值(mv/ms)。HFS后EPSP斜率/基线斜率的均值 $\times 100\% > 20\%$ 认为诱发LTP成功。

1.3 统计学处理

数据处理采用SPSS19.0统计软件进行, 数据资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验及单因素方差分析(ANOVA)进行统计学分析, $P < 0.05$ 被认为有显著性差异。

2 结果

2.1 Morris 水迷宫测试

获得性训练中, 以逃逸潜伏期作为空间参考记忆的指标。训练3天后, 模型组与对照组小鼠相比, 逃逸潜伏期明显延长, 第5天模型组小鼠逃逸潜伏期比对照组明显增加, 表明模型组的行为学表现符合痴呆的表征, 用DMXB干预后痴呆小鼠的逃逸潜伏期较模型组明显缩短($P < 0.05$), 干预组与对照组无统计学差异。见表1。

探查训练中, 模型组与对照组相比在目标象限探查时间百分比, 距离百分比明显减少($P < 0.01$), 穿越原平台位置次数明显下降($P < 0.05$)。给予DMXB处理后在目标象限的探索时间百分比、距离百分比、穿过原平台位置次数较模型组显著增加($P < 0.05$), 对照组和干预组之间无统计学差异。见表2。

表1 各组小鼠Morris水迷宫逃逸潜伏期比较($n=15, \bar{x} \pm s$)

	1st d	2nd d	3rd d	4th d	5th d
对照组	63.23 \pm 18.06	51.19 \pm 23.16	48.60 \pm 20.93	34.33 \pm 17.01	33.40 \pm 6.97
模型组	80.10 \pm 14.22	73.63 \pm 20.07	67.71 \pm 16.04*	61.17 \pm 18.52*	52.10 \pm 17.99*
干预组	65.25 \pm 19.66	49.67 \pm 15.63	48.23 \pm 16.99 Δ	41.73 \pm 18.10 Δ	33.99 \pm 15.24 Δ

注: *与对照组相比 $P < 0.05$; Δ 与模型组相比 $P < 0.05$; 下同。

表2 各组小鼠Morris水迷宫探查训练比较($n=15, \bar{x} \pm s$)

组别	穿越原平台 位置次数	目标象限探索 距离百分比	目标象限探索 时间百分比
对照组	4.08 \pm 1.73	41.70 \pm 8.86	40.38 \pm 10.64
模型组	1.58 \pm 1.16*	28.54 \pm 4.98*	26.81 \pm 7.48*
干预组	3.25 \pm 1.66 Δ	47.79 \pm 9.09 Δ	40.69 \pm 13.29 Δ

2.2 Y型电迷宫检测

在训练中分别测定小鼠全天总反应时间(TRT)和错误反应的次数(EN)作为被动回避记忆的指标, 结果显示检测第5天模型组较对照组TRT和EN明显增加($P < 0.05$), 干预组和模型组之间没有统计学意义上的差异, 见表3、表4。

表3 各组小鼠Y型电迷宫总反应时间(TRT)比较($n=15, \bar{x} \pm s$)

组别	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天
对照组	221.06 \pm 42.77	189.32 \pm 35.04	150.24 \pm 23.90	119.32 \pm 17.04	107.37 \pm 19.25
模型组	241.18 \pm 36.16	200.08 \pm 16.11	183.94 \pm 25.87	160.08 \pm 16.16*	152.94 \pm 25.21*
干预组	211.08 \pm 17.02	198.08 \pm 15.34	197.54 \pm 19.17	159.08 \pm 25.34	163.34 \pm 21.17

表4 各组小鼠Y型电迷宫错误反应的次数(EN)比较($n=15, \bar{x} \pm s$)

组别	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天
对照组	16.72 \pm 1.05	9.20 \pm 1.40	4.17 \pm 1.25	1.56 \pm 0.98	1.63 \pm 1.57
模型组	17.28 \pm 2.23	16.80 \pm 1.99*	12.53 \pm 1.56*	12.55 \pm 1.43*	9.0 \pm 1.70*
干预组	16.92 \pm 2.68	17.04 \pm 1.89	15.95 \pm 2.12	11.25 \pm 1.65	8.9 \pm 1.62

2.3 DMBX对痴呆模型小鼠的LTP诱导障碍的影响

给予对照组海马CA1区HFS后EPSP斜率持续增加 $>20\%$ (149.71 \pm 8.62%, $n=15$), 成功诱导LTP。相同的实验条件下, 模型组的EPSP斜率没有增加(100.23 \pm 10.09%, $n=15$), 结果表明 $A\beta_{25-35}$ 导致海马LTP损伤, 符合痴呆模型的生理学特征。干预组EPSP斜率增加超过20%(155.33 \pm 9.31%, $n=15$, $P < 0.01$), LTP恢复诱导。

3 讨论

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是老年人中常见的中枢神经系统的退行性疾病, 起病隐匿, 早期发现困难, 临床上患者往往以近事遗忘, 陈述性记忆障碍为首发症状, 而内隐记忆系统相对保持完整或很少严重的损伤^[1]。本研究行为学中采用经典的Morris水迷宫所检测的是AD模型动物以视觉为基础的定向和定位能力, 所形成的记忆是一种空间参考记忆^[2]。结果显示模型组比对照组逃逸潜伏期延长, 符合痴呆模型的行为学特征, 选择性激动 $\alpha 7nAChR$ 可以改善记忆功能障碍, 这也与先前的研究结果一致^[3]。采用Y型电迷宫来检测模型动物的被动回避条件反射, 其属于联合型学习与记忆模型^[10]。选择性激动 $\alpha 7nAChR$ 结果显示未能改善模型组小鼠的记忆障碍, 其可能的机制在于联合型学习是由于海马和纹状体相互作用共同促进学习和记忆^[14], 而外显记忆与皮层结构更相关。两种特定的记忆功能系统在其神经结构基础上的潜在机制仍需进一步研究。

海马CA1区突触传递的LTP被认为是学习记忆, 特别是空间记忆的神经生理的内在基础。本研究中侧脑室注射 $A\beta_{25-35}$ 制作AD模型出现海马CA1区LTP诱导障碍, 成功建立了痴呆小鼠的生物模型, DMBX能恢复 $A\beta$ 所致的LTP障碍, 这个与先前的研

究^[15]结果相一致,也与 Morris 水迷宫检测的行为学表现相符合。Meyer^[16]等人的研究发现在大鼠模型中选择 $\alpha 7$ nAChR 激动可减少神经元损伤, Medeiros 等^[17]研究发现 $\alpha 7$ nAChR 激动剂能够有效的改善 AD 等神经退行性疾病的认知缺陷。其内在机制在于 c-Fos、脑源性神经营养因子、cAMP 反应元件结合蛋白的磷酸化及神经营养酪氨酸受体激酶 2 型的表达。Thomsen 等^[18]研究发现在幼年大鼠给予选择性 $\alpha 7$ nAChR 激动剂可以提高内侧额叶皮质(边缘系统)的立早基因,如 Arc 和 c-Fos 的 mRNA 表达活化,从而改善记忆和注意障碍,这都显示了 $\alpha 7$ nAChR 的神经保护作用及其机制。本实验中采用选择性的 $\alpha 7$ nAChR 激动剂 DMBX 恢复 LTP 诱导,并缓解了空间学习障碍,特别是外显记忆,这个说明海马的胆碱能受体的功能在空间学习的机制中占有重要的地位,但对类似于厌恶回避等联合型学习障碍无明显作用,其潜在机制仍需进一步探讨。

参 考 文 献

- Kessels RP, Feijen J, Postma A. Implicit and explicit memory for spatial information in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 2005, 20(2-3): 184-191
- Beaunieux H, Eustache F, Busson P, et al. Cognitive procedural learning in early Alzheimer's disease: impaired processes and compensatory mechanisms. *J Neuropsychol*, 2012, 6(1): 31-42
- Burghaus L, Schütz U, Krempel U, et al. Quantitative assessment of nicotinic acetylcholine receptor proteins in the cerebral cortex of Alzheimer patients. *Brain Res Mol Brain Res*, 2000, 76(2): 385-388
- Kadir A, Darreh-Shori T, Almkvist O, et al. Changes in brain 11C-nicotine binding sites in patients with mild Alzheimer's disease following rivastigmine treatment as assessed by PET. *Psychopharmacology(Berl)*, 2007, 191(4): 1005-1014
- Ni R, Marutle A, Nordberg A. Modulation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor and fibrillar amyloid- β interactions in Alzheimer's disease brain. *J Alzheimers Dis*, 2013, 33(3): 841-851
- D'Andrea MR, Nagele RG. Targeting the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor to reduce amyloid accumulation in Alzheimer's disease pyramidal neurons. *Curr Pharm Des*, 2006, 12(6): 677-684
- 陈卫蓉,肖志杰,王鹏,等. 胆固醇酯转运蛋白(CETP)—TaqIB 基因多态性与散发性阿尔茨海默病相关性研究. *中国临床心理学杂志*, 2012, 20(5): 619-622
- Maurice T, Lockhart BP, Privat A. Amnesia induced in mice by centrally administered beta-amyloid peptides involves cholinergic dysfunction. *Brain Res*, 1996, 706: 181-193
- 黄劲松,王育红,周旭辉,等. 丁丙诺啡、异丙嗪与东莨菪碱联合使用对大鼠空间记忆的影响. *中国临床心理学杂志*, 2008, 16(2): 151-153
- 王跃春. 大鼠 Y-型迷宫测试法的筛选与优化. *中国行为医学科学*, 2005, 14(1): 50-53
- Klimkowicz-Mrowiec A, Slowik A, Krzywoszanski L. Severity of explicit memory impairment due to Alzheimer's disease improves effectiveness of implicit learning. *J Neurol*, 2008, 255(4): 502-509
- Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*, 1984, 11: 47-60
- Chen L, Wang H, Zhang Z, et al. DMXB(GTS-21) ameliorates the cognitive deficits in beta amyloid(25-35) injected mice through preventing the dysfunction of alpha7 nicotinic receptor. *J Neurosci Res*, 2010, 88(8): 1784-1794
- Sadeh T, Shohamy D, Levy DR, et al. Cooperation between the hippocampus and the striatum during episodic encoding. *J Cogn Neurosci*, 2011, 23(7): 1597-1608
- Isono T, Yamashita N, Obara M, et al. Amyloid- β_{25-35} induces impairment of cognitive function and long-term potentiation through phosphorylation of collapsin response mediator protein 2. *Neurosci Res*, 2013, 77(3): 180-185
- Meyer EM, King MA, Meyers C. Neuroprotective effects of 2, 4-dimethoxybenzylidene anabaseine(DMXB) and tetrahydroaminoacridine(THA) in neocortices of nucleus basalis lesioned rats. Isono T, Yamashita N, Obara M, et al. Amyloid- β_{25-35} induces impairment of cognitive function and long-term potentiation through phosphorylation of collapsin response mediator protein 2. *Neurosci Res*, 2013, 77(3): 180-185
- Medeiros R, Castello NA, Cheng D, et al. $\alpha 7$ nicotinic receptor agonist enhances cognition in aged 3xTg-AD mice with robust plaques and tangles. *Am J Pathol*, 2014, 184(2): 520-529
- Thomsen MS, Mikkelsen JD, Timmermann DB. The selective alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist A-582941 activates immediate early genes in limbic regions of the forebrain: Differential effects in the juvenile and adult rat. *Neuroscience*, 2008, 154(2): 741-753

(收稿日期:2014-11-04)