

突变型 A β_{1-42} 致敏树突状细胞疫苗治疗阿尔茨海默病转基因鼠作用机制探讨

李家林 罗仲秋 徐新女 曹传海 王金环

【摘要】 研究背景 β -淀粉样蛋白在脑组织中沉积是阿尔茨海默病的典型病理特征之一,免疫疗法虽可有效清除 β -淀粉样蛋白,但在治疗的同时也伴随出现一些不良反应。为了避免疫苗治疗过程中产生的严重不良反应如脑膜脑炎等,尝试采用突变型 β -淀粉样蛋白(A β_{1-42})致敏树突状细胞制备阿尔茨海默病疫苗,并在充分评价其安全性和有效性的基础上,进一步探讨其治疗阿尔茨海默病转基因鼠的作用机制。方法 提取 C57/B6 小鼠胫骨和股骨树突状细胞,分别以突变型 A β_{1-42} 致敏树突状细胞(实验组)和经弗氏佐剂免疫的野生型 A β_{1-42} 多肽(佐剂阳性对照组)制备疫苗,然后接种于阿尔茨海默病转基因鼠。免疫组织化学染色观察小鼠脑组织中核黄素 X 受体(LXR)、三磷酸腺苷结合盒转运子 1(ABCA1)、CD45、晚期糖基化终产物受体(RAGE)和 β -分泌酶(BACE)表达水平,体视学法半定量检测海马区 CA1、CA2、CA3、DG、Rad 和皮质区阳性神经元。结果 与阴性对照组相比,实验组和佐剂阳性对照组转基因鼠脑组织 β -淀粉样蛋白表达水平显著降低($P=0.000$),阴性对照组治疗前后无变化;经突变型 A β_{1-42} 致敏的树突状细胞疫苗治疗后,转基因鼠脑组织中的 LXR、ABCA1、CD45 和 BACE 表达水平升高($P=0.000$),RAGE 表达水平降低($P=0.000$)。结论 经突变型 A β_{1-42} 致敏树突状细胞制备的疫苗可通过多种因素的相互作用使阿尔茨海默病转基因鼠大脑 β -淀粉样蛋白代谢达到新的免疫平衡,从而减少其在脑组织中的沉积,且无脑膜脑炎等严重不良反应,此与 LXR/ABCA1 通道作用有关。树突状细胞自身也在清除 β -淀粉样蛋白的过程中扮演着预防不良反应发生的重要角色。

【关键词】 阿尔茨海默病; 树突细胞; 淀粉样 β 蛋白; 肽类; 接种; 疫苗

DOI:10.3969/j.issn.1672-6731.2012.03.016

The role of mutated amyloid beta 1-42 stimulating dendritic cells in a PDAPP transgenic mouse

LI Jia-lin¹, LUO Zhong-qiu², XU Xin-nü³, CAO Chuan-hai⁴, WANG Jin-huan⁵

¹Grade 2009, Graduate School, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

²Department of Neurosurgery, ³Key Lab for Critical Care Medicine of the Ministry of Health, Tianjin First Center Hospital, Tianjin, 300192, China

⁴USF/Byrd Alzheimer's Institute, University of South Florida, Tampa, FL 33613, USA

⁵Department of Neurosurgery, Tianjin Huanhu Hospital, Tianjin 300060, China

Corresponding author: WANG Jin-huan (Email: wangjinhuanfch@yahoo.com.cn)

【Abstract】 **Background** Amyloid plaque is one of the pathological hallmarks of Alzheimer's disease (AD). Anti-beta-amyloid (A β) immunotherapy is effective in removing brain A β , but has shown to be associated with detrimental effects. To avoid severe adverse effects such as meningoencephalitis induced by amyloid beta vaccine with adjuvant, and take advantage of amyloid beta antibody's therapeutic effect on Alzheimer's disease sufficiently, our group has developed a new Alzheimer vaccine with mutated amyloid beta 1-42 peptide stimulating dendritic cells (DC). Our previous work has confirmed that DC vaccine can induce adequate anti-amyloid beta antibody in PDAPP Tg mice safely and efficiently. The DC vaccine can improve impaired learning and memory in the Alzheimer's animal model, and did not cause microvasculitis, microhemorrhage or meningoencephalitis in the animal model. However, the exact mechanism of immunotherapy which reduces A β deposition remains unknown. In this report, we studied the mechanism

基金项目:天津市科委重点资助项目(项目编号:09JCZDJ20200);天津市卫生局重点攻关项目(项目编号:06KG09)

作者单位:300070 天津医科大学研究生院 2009 级(李家林);
300192 天津市第一中心医院神经外科(罗仲秋),卫生部危重病急

救医学重点实验室(徐新女);33613 美国南佛罗里达州州立大学阿尔茨海默病研究中心(曹传海);300060 天津市环湖医院神经外科(王金环)

通讯作者:王金环(Email:wangjinhuanfch@yahoo.com.cn)

of the vaccine, thinking that this may have implications for better understanding of the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Methods** A new Alzheimer vaccine with mutated amyloid beta 1-42 peptide stimulating DC which were obtained from C57/B6 mouse bone marrow was developed. Amyloid beta with Freund's adjuvant was inoculated at the same time to act as positive control. After the treatment was done, the samples of brains were collected, fixed, cut. Immunohistochemical staining was performed to observe the expression of the nuclear hormone liver X receptor (LXR), membrane-bound protein tyrosine phosphatase (CD45), the ATP-binding cassette family of active transporters (ABCA1), receptor for advanced glycation end products (RAGE), β -site APP-cleaving enzyme (BACE) and $A\beta$ in mouse brain tissue. Semi-quantitative analysis was used to detect CA1, CA2, CA3, DG, Rad in hippocampus region and positive neuron in cortex region. **Results** $A\beta$ was significantly reduced in the experimental group and the positive control group ($P = 0.000$), but no changes were seen in the negative control group. The levels of LXR, ABCA1, CD45, BACE expression were significantly higher in the PFDM group with DC vaccine treatment and the levels of RAGE were lower than those in the control group. **Conclusion** The reduction of $A\beta$ via the DC vaccine occurs through multiple factors to achieve a new immune balance. The beneficial results of DC vaccine, which did not produce side effects, may be caused by the LXR/ABCA1 path. DC alone may play an important role in clearing the $A\beta$ to prevent the occurrence of adverse reaction.

【Key words】 Alzheimer disease; Dendritic cells; Amyloid beta - protein; Peptides; Vaccination; Vaccines

Fund Project: Key Project of Tianjin Municipal Science and Technology Commission (No. 09JCZDJC20200); Key Project of Tianjin Public Health Bureau (No. 06KG09)

阿尔茨海默病(AD)为临床常见的中枢神经系统退行性病变,其典型病理学表现为 β -淀粉样蛋白($A\beta$)沉积、神经原纤维缠结(NFTs)形成、神经元减少,以及轴索和突触异常、颗粒空泡变性等。目前针对阿尔茨海默病的治疗仅限于缓解临床症状,尚无特殊的有效方法。以往也曾采用免疫疗法治疗阿尔茨海默病,通过减少 $A\beta$ 在脑组织中的沉积而改善临床症状,1999年由美国Elan公司研制成功的首株 $A\beta$ 疫苗[Elan's AN-1792,由野生型 $A\beta$ 配伍佐剂(QS21)配制而成]经美国食品与药品管理局(FDA)批准进入II期临床试验,其结果显示,经免疫接种后可使绝大多数患者临床症状得到明显改善。但是在随后的试验中,由于有6%的患者出现自发性脑膜脑炎而被迫停止临床应用^[1],经证实其反应源来自其中的佐剂成分^[2]。为了避免疫苗中佐剂引起的不良反应,2008年Cao等^[3]选用树突状细胞制成不含佐剂的树突状疫苗,接种于阿尔茨海默病转基因鼠[BALB/c和APP(SW)]取得一定疗效,且未发现明显不良反应。为了进一步研究该疫苗的药理作用机制,在本项研究中我们对多种与 $A\beta$ 清除通道蛋白相关因子进行动物实验观察,包括核激素肝X受体(LXR)、三磷酸腺苷结合盒转运子1(ABCA1)、CD45、 β -分泌酶(BACE)和晚期糖基化终末产物受体(RAGE)等。载脂蛋白E为迟发型阿尔茨海默病的主要遗传学危险因素,而LXR可通过调节细胞内胆固醇及载脂蛋白水平和输出量而影响阿尔茨海

默病的发病机制^[4];ABCA1既为LXR的主要靶点之一,又是三磷酸腺苷结合盒中的活性转运蛋白,为介导反向胆固醇限速步骤的重要运输途径^[5]; β -分泌酶作为 γ -分泌酶的四聚体,可在酶处理 β -淀粉样前体蛋白(APP)的加工过程中作为APP转变为非淀粉样蛋白形成状态的通路,或作为APP与 $A\beta$ 形成之间的穿梭机制,通过阻断 $A\beta$ 的生成而抑制其在脑组织中的沉积^[6]。此外,根据阿尔茨海默病“炎症因子假说”,炎症亦为阿尔茨海默病发病机制之一,而CD45正是脑内炎症即神经小胶质细胞激活的标志蛋白质,为作用于T细胞、B细胞和小神经神经元的由抗原受体介导的信号肽,在阿尔茨海默病患者的脑组织中可见到以p38有丝分裂原激活蛋白激酶(MAPK)或p44/42 MAPK信号转导为特征的神经小胶质细胞激活^[7]。正常脑组织存在使 $A\beta$ 由外周血转运至大脑或从大脑至外周血的平衡机制,通过以内皮低密度脂蛋白受体相关蛋白1(LRP1)和P-糖蛋白(P-gp)为 $A\beta$ 输出蛋白负责将其转运至外周血,RAGE则将 $A\beta$ 转运至大脑^[8]。而阿尔茨海默病患者的这种平衡机制破坏,使 $A\beta$ 输入量超过输出量,因此在脑组织中沉积导致神经原纤维缠结形成。

材料与方法

一、实验材料

1. 试剂与药品 (1)实验肽蛋白:F和D双突变多肽(PFDM)性 $A\beta_{1-42}$ 由美国佛罗里达州阿尔茨海

默病研究中心曹传海博士惠赠,野生型 $A\beta_{1-42}$ 多肽购自美国 Sigma 公司,完全与不完全弗氏佐剂(Freund's adjuvants)为美国波士顿生物技术公司产品。(2)实验所需抗体: I 抗工作液[为小鼠抗人 $A\beta_{6F/3D}$ (1:50)、兔抗人 LXR(1:100)、兔抗人 ABCA1(1:200)、小鼠抗人 CD45(1031 G, 1:50)、小鼠抗人 RAGE(1:100)和小鼠抗人 β 位点 APP 内切酶 BACE(1:200)单克隆抗体]中抗体分别购自美国 Vector、Abcam、Novus、AbD Serotec 和 Santa Cruz 公司;即用型 SABC 免疫组织化学试剂盒[含生物素化大鼠抗小鼠、生物素标记大鼠抗兔 IgG II 和辣根过氧化物酶标记链霉卵白素 II 抗,工作浓度均为(1:500)]由北京中杉金桥生物技术有限公司提供,DAB 显色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。(3)其他试剂:重组小鼠白细胞介素-4(IL-4)和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)由美国 R&D 公司提供。RPMI-1640 细胞培养基购自美国 Gibco 公司。纯胎牛血清(FBS)购自美国 Hyclone 公司。树突状细胞培养基由终浓度为 100 U/ml 的青霉素和链霉素及含体积分数为 0.1% 的 2-巯基乙醇和 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基配制而成。

2. 实验动物 清洁级(SPF 组)PDAPP^{V717}转基因鼠 48 只,雌雄各 24 只,12 月龄,体质量约为 30 g,购于中国医学科学院实验动物研究所。小鼠经耳后打孔编号,随机数字表法分为 PFDM 组(接种经 PFDM $A\beta_{1-42}$ 多肽致敏的树突状细胞疫苗,12 只)、佐剂组(接种经弗氏佐剂免疫的野生型 $A\beta_{1-42}$ 多肽疫苗,为阳性对照组,12 只)、DC 组(接种未经多肽致敏的树突状细胞,为 PFDM 阴性对照组,12 只)和 PBS 组(注射磷酸盐缓冲液,为佐剂组阴性对照组,12 只)。另选择与 PDAPP^{V717} 具有相同遗传背景的健康 8 周龄雌性小鼠(C57/B6 小鼠,普通洁净级)共 50 只,用于树突状细胞的培养,购于解放军军事医学科学院实验动物中心。所有小鼠实验前均于实验室正常环境(12 h 白昼-12 h 夜晚,常温 26 °C)、按性别、正常饮食分笼饲养。

二、实验方法

1. 疫苗制备与接种 (1)经 PFDM $A\beta_{1-42}$ 多肽致敏的树突状细胞疫苗的制备:50 只 C57/B6 小鼠迅速脱颈处死(每次 5 只),消毒后于无菌台内切取股骨和胫骨,RPMI-1640 培养基冲洗骨髓腔,200 目筛网过滤,离心半径 16 cm、1500 r/min 离心 5 min。弃上清液,滴加适量红细胞裂解液,震荡 30 s 后加入

Hank 缓冲液终止反应;再次 1500 r/min 离心 5 min。弃上清液,加入树突状细胞培养基(含质量浓度为 5.50 ng/ml 的 IL-4 和 GM-CSF)稀释细胞密度至 1×10^6 /ml,细胞悬液移至 6 孔板,37 °C、体积分数为 5% 二氧化碳培养箱继续培养至第 4 天,剔除不贴壁细胞,滴加含 PFDM $A\beta_{1-42}$ 多肽、质量浓度为 20 μ g/ml 的 RPMI-1640 培养基;第 8 天时收获致敏树突状细胞疫苗,储存于 -80 °C 冰箱备用。(2)以弗氏佐剂免疫的野生型 $A\beta_{1-42}$ 多肽疫苗的制备:磷酸盐缓冲液稀释野生型 $A\beta_{1-42}$ 多肽至质量浓度为 50 μ g/100 μ l,将弗氏佐剂 37 °C 水浴,融化为液态后与等体积的野生型 $A\beta_{1-42}$ 多肽溶液混合,涡旋 30 min,直至呈淡黄色乳状物,现配现用。(3)免疫接种:取出疫苗、解冻,浓度为 0.10 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 值 7.4)冲洗 3 min($\times 3$ 次),调整细胞密度至 1×10^6 /ml 后行腹腔注射,各组动物均间隔 2 周注射 1 次,共注射 3 次,每次注射体积为 0.20 ml/只。

2. 免疫组织化学染色观察致敏小鼠皮质和海马区蛋白质表达变化 (1)脑组织切片的制备:水合氯醛(0.01 ml/g)腹腔注射麻醉小鼠,暴露心脏、剪开右心耳经左心室灌注生理盐水 50 ml,以质量浓度为 4% 多聚甲醛溶液 50 ml 固定、切取海马,经质量浓度为 4% 多聚甲醛溶液固定后脱水、石蜡包埋,行层厚为 4 μ m 的连续冠状切片,45 °C 水中展片捞起、40 °C 烤片过夜。(2)免疫组织化学染色:采用 SABC 法进行免疫组织化学染色^[2]。脑组织切片脱蜡至水,经体积分数为 3% 过氧化氢反应 10 min 以消除内源性过氧化物酶活性,0.01 mol/L 枸橼酸钠缓冲液 92 ~ 98 °C 反应 30 min 修复抗原,质量浓度为 5% 胎牛血清封闭 30 min,滴加 I 抗、4 °C 过夜;磷酸盐缓冲液冲洗后滴加生物素化 II 抗(1:500),于 37 °C 反应 30 min,再次磷酸盐缓冲液冲洗,加入碱性磷酸酶标记的链霉卵白素工作液(1:200),再于 37 °C 反应 30 min;DAB 显色,苏木素复染,脱水、透明、封片。每组各选择 1 张脑组织切片,以磷酸盐缓冲液取代 I 抗作为阴性对照。低倍镜($\times 100$)下观察显色情况,以目标区域神经元呈棕黄色或黄色者为阳性细胞。(3)半定量分析:于高倍镜($\times 400$)下随机选择海马 CA1、CA2、CA3、DG、Rad 及皮质区进行灰度分析,灰度值由 0(黑色)至 255(白色),灰度值越高,蛋白质表达越强。

三、统计分析方法

采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据计算与分

析。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多个样本均数 (灰度值) 间的比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 两两比较行 LSD-*t* 检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、致敏小鼠皮质与海马区蛋白质表达变化

1. A β 蛋白 免疫组织化学染色显示, A β 主要表达于细胞膜, 偶见细胞质, 呈淡黄色、黄色或棕黄色颗粒状, 阳性细胞主要分布于海马和皮质。其中 PFDM 组和佐剂组小鼠海马和皮质呈弱表达或不表达, DC 组和 PBS 组小鼠呈高表达 (图 1)。

2. LXR 蛋白 不同处理组小鼠大脑皮质神经细胞质均表达 LXR 蛋白, 为浅黄色、黄色或棕黄色颗粒状, 呈点状或弥散分布, 不同处理组表达水平强弱不一, 由高至低依次为 PFDM 组、DC 组、佐剂组和 PBS 组 (图 2)。

3. ABCA1 蛋白 不同处理组小鼠海马区可见大量 ABCA1 表达阳性细胞, 表达部位主要位于神经细胞膜, 偶可见于胞核, 为浅黄色、黄色或棕黄色颗粒状, 呈点状或弥散分布; 表达强度由强至弱, 依次为 PFDM 组、DC 组、佐剂组和 PBS 组 (图 3)。

4. CD45 蛋白 CD45 蛋白在不同处理组小鼠脑组织中均有表达, 主要见于海马区神经细胞质, 胞膜亦偶有表达, 为浅黄色、黄色或棕黄色颗粒状; 大脑皮质中呈点状或弥散分布, 其他部位也可见散在分布 (图 4)。

5. RAGE 蛋白 不同处理组小鼠海马区神经细胞均可见 RAGE 蛋白染色阳性细胞, 主要表达于细胞膜, 偶见胞质和胞核, 为淡黄色或黄色颗粒状物质; 脑皮质仅呈点状或灶状分布 (图 5)。

6. BACE 蛋白 BACE 蛋白主要表达于小鼠海马区神经细胞膜, 偶见胞核染色阳性, 为黄色或棕黄色颗粒; 大脑皮质仅呈点状或弥散分布 (图 6)。

二、半定量分析

PFDM 组和阳性对照组 (佐剂组) 转基因鼠皮质区和海马区神经 A β 蛋白表达水平与阴性对照组 (DC 组和 PBS 组) 相比降低 ($P = 0.000$), 而 PFDM 组与佐剂组 (即树突状细胞疫苗与佐剂疫苗) 之间比较, 差异无统计学意义 ($P = 0.539$); 两阴性对照组 (DC 组与 PBS 组) 比较, 差异亦无统计学意义 ($P = 0.108$, 表 1)。

PFDM 组转基因鼠皮质和海马区 LXR 蛋白表达水平升高, 高于 DC 组 11.66% ($P = 0.031$); 而 DC 组 LXR 蛋白表达水平则分别高于佐剂组和 PBS 组, 约升高 73.96% ($P = 0.031$) 和 70.47% ($P = 0.000$, 表 1)。

与 DC 组相比, PFDM 组转基因鼠皮质区和海马区 ABCA1 蛋白表达水平升高, 约为 DC 组的 2 倍 ($P = 0.000$); 而佐剂组和 PBS 组则表达水平下降, 且低于 DC 组 ($P = 0.000$, 表 1)。

PFDM 组转基因鼠皮质和海马区 CD45 蛋白表达水平升高, 与佐剂组相比约升高 16.70% ($P = 0.001$), 而佐剂组表达水平分别高于 DC 组和 PBS 组 73.98% ($P = 0.000$) 和 73.75% ($P = 0.000$, 表 1)。

与 PBS 阴性对照组相比, PFDM 组、佐剂组和 DC 组转基因鼠皮质和海马区 RAGE 蛋白表达水平分别降低 62.84% ($P = 0.000$)、87.55% ($P = 0.000$) 和 57.22% ($P = 0.000$); 但 PFDM 组与 DC 组之间差异无统计学意义 ($P = 0.172$, 表 1)。

与 PBS 阴性对照组相比, 佐剂组转基因鼠 BACE 蛋白表达水平升高 17.87% ($P = 0.046$); 与 DC 组相比, PFDM 组转基因鼠 BACE 蛋白表达水平升高 19.16% ($P = 0.031$, 表 1)。

讨 论

有研究表明, 转基因鼠无论是接受主动免疫治疗还是被动免疫治疗, 其脑组织中沉积的 A β 均可于数日内被清除, 与之相伴随的是认知功能得到显著改善^[9-10]。从本研究免疫组织化学染色结果亦可看出, 在不同处理方法中, 以 PFDM A β_{1-42} 致敏的树突状细胞疫苗组 PDAPP^{V7171} 转基因鼠脑组织中的 A β 沉积减少程度最为明显, 其表达水平甚至低于野生型 A β_{1-42} 佐剂疫苗组。而野生型 A β_{1-42} 佐剂疫苗即是类似 AN-1792 临床试验中的疫苗, 后者由于在临床试验中有约 6% 的患者发生自发性急性脑膜脑炎而被迫停止试验。树突状细胞疫苗能够有效抑制 A β 在脑组织中的沉积, 且不过分激活神经胶质细胞和 T 细胞, 从而保证了疫苗的安全性^[3]。

A β 是阿尔茨海默病的主要病理特征之一, 是干预防疗阿尔茨海默病的重要靶分子, 可通过预防其形成和积聚或促进其清除而达到治疗目的。LXR 通过调节细胞内胆固醇的输入与输出进而影响阿尔茨海默病的进程^[4], 有研究显示, 采用 LXR 激动药 GW3965 治疗老龄化 Tg2576 小鼠可致敏脑组织

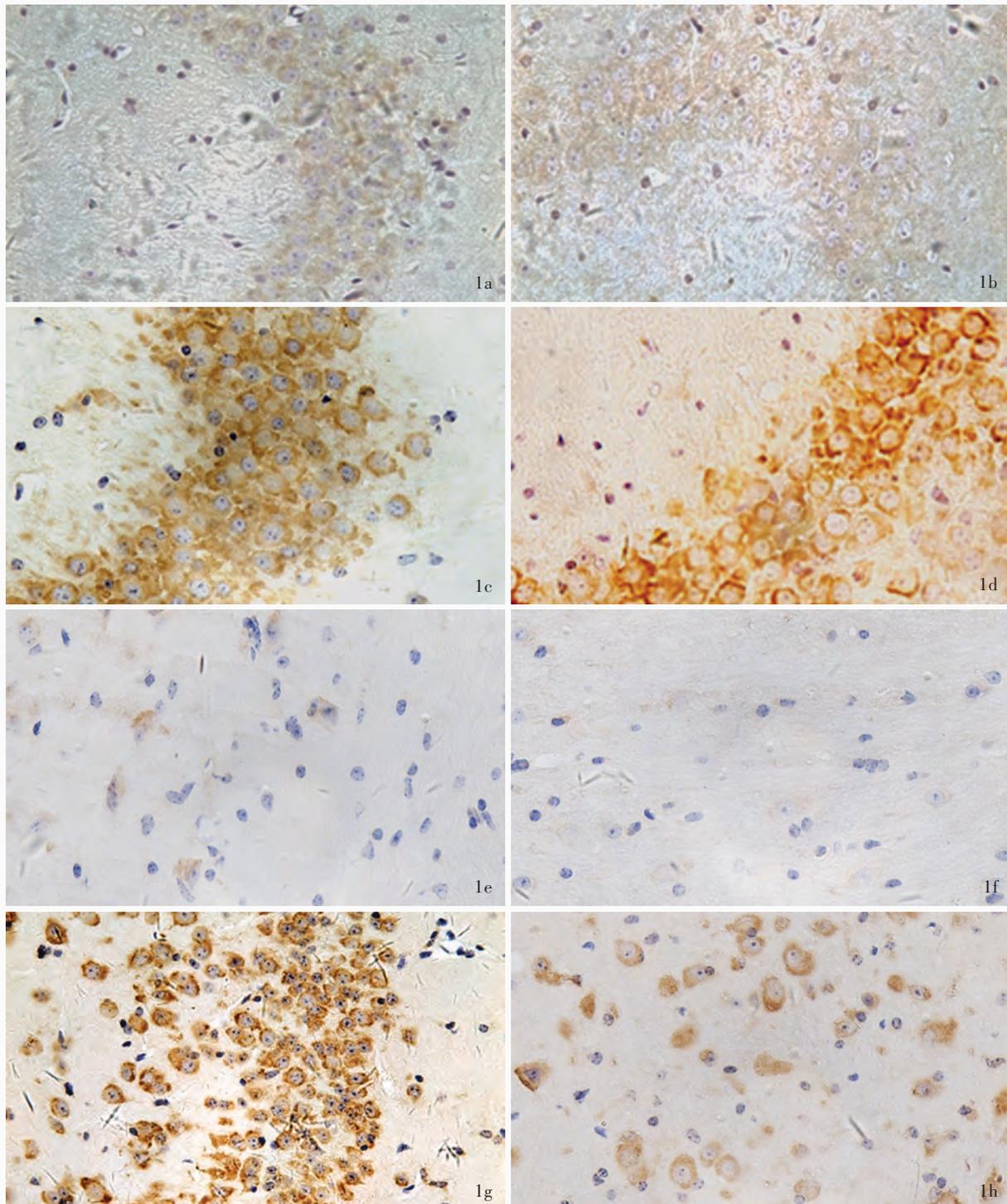


图1 光学显微镜观察所见 免疫组织化学染色(SABC法) ×400 1a PFDM组小鼠海马区弱表达或不表达A β 1b 佐剂组小鼠海马区弱表达或不表达A β 1c DC组小鼠海马区高表达A β 1d PBS组小鼠海马区高表达A β 1e PFDM组小鼠大脑皮质弱表达或不表达A β 1f 佐剂组小鼠大脑皮质弱表达或不表达A β 1g DC组小鼠大脑皮质高表达A β 1h PBS组小鼠大脑皮质高表达A β

Figure 1 Images were observed under light microscope Immunohistochemistry (SABC) ×400 Weak or even no expression of A β in hippocampus of PFDM group (Panel 1a). Weak or even no expression of A β in hippocampus of Adjuvant group (Panel 1b). High expression of A β in hippocampus of DC group (Panel 1c). High expression of A β in hippocampus of phosphate-buffered saline (PBS) group (Panel 1d). Weak or even no expression of A β in cortex of PFDM group (Panel 1e). Weak or even no expression of A β in cortex of Adjuvant group (Panel 1f). High expression of A β in cortex of DC group (Panel 1g). High expression of A β in cortex of PBS group (Panel 1h)

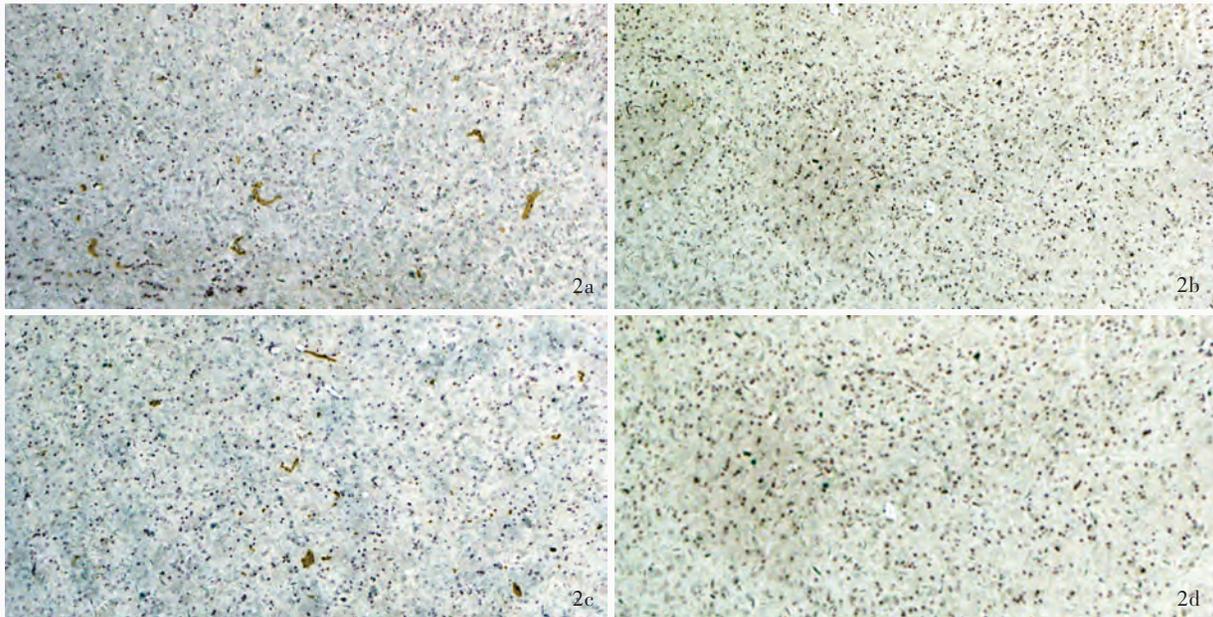


图2 光学显微镜观察显示,不同处理组转基因鼠大脑皮质神经元胞质均表达LXR蛋白 免疫组织化学染色(SABC法) × 100
2a PFDM组小鼠皮质区LXR蛋白呈高表达 2b 佐剂组小鼠皮质区LXR蛋白呈低表达 2c DC组小鼠皮质区LXR蛋白呈高表达 2d PBS组小鼠皮质区LXR蛋白呈低表达

Figure 2 Under light microscope, expression of LXR protein can be seen in the cytoplasm of neurons in the cerebral cortex of transgenic mice within four different groups Immunohistochemistry (SABC) × 100 The expression of LXR is the highest in the PFDM group, followed by DC group and Adjuvant group, while PBS group presents the least expression. PFDM group (Panel 2a). Adjuvant group (Panel 2b). DC group (Panel 2c). PBS group (Panel 2d)

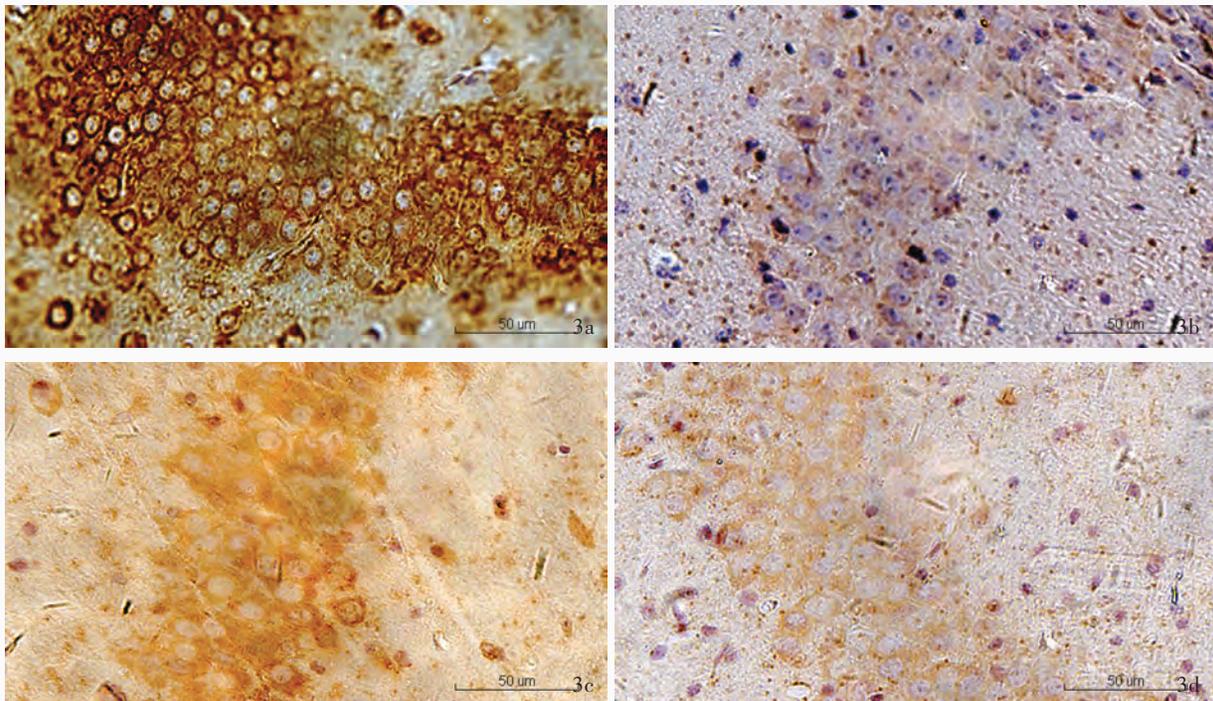


图3 光学显微镜观察显示,不同处理组转基因鼠海马区神经元胞膜ABCA1蛋白表达阳性 免疫组织化学染色(SABC法) × 400
3a PFDM组小鼠海马区神经元ABCA1呈高表达 3b 佐剂组小鼠海马区神经元ABCA1呈低表达 3c DC组小鼠海马区神经元ABCA1呈高表达 3d PBS组小鼠海马区神经元ABCA1呈低表达

Figure 3 There is different expression of ABCA1 protein in cell membranes of hippocampal neurons in transgenic mice under light microscope Immunohistochemistry (SABC) × 400. High expression of ABCA1 in hippocampal neurons of PFDM group (Panel 3a). Weak expression of ABCA1 in hippocampal neurons of Adjuvant group (Panel 3b). High expression of ABCA1 in hippocampal neurons of DC group (Panel 3c). Weak expression of ABCA1 in hippocampal neurons of PBS group (Panel 3d)

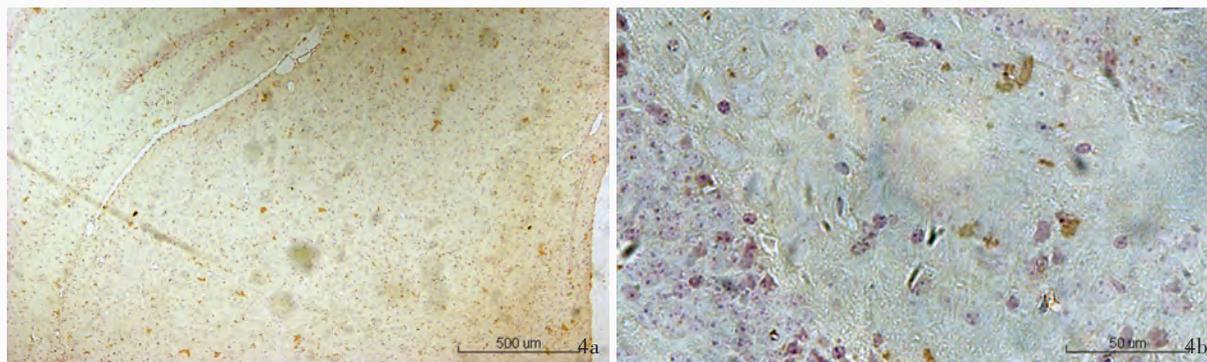


图4 光学显微镜观察显示,PFDM组转基因鼠皮质和海马区神经元CD45蛋白呈高表达 免疫组织化学染色(SABC法) 4a 海马区可见呈散在分布的CD45染色阳性细胞 ×40 4b 大脑齿状回神经元内可见浅黄色、黄色或棕黄色颗粒状物质 ×200

Figure 4 There is high expression of CD45 protein in the cerebral tissue of the PFDM transgenic mice group. Immunohistochemistry (SABC). A scattered distribution of positive CD45 label can be observed in the hippocampal region under low magnification ×40 (Panel 4a). Yellow granular substances ranging from pale to brown can be seen under high magnification in the mice dentate gyrus ×200 (Panel 4b)

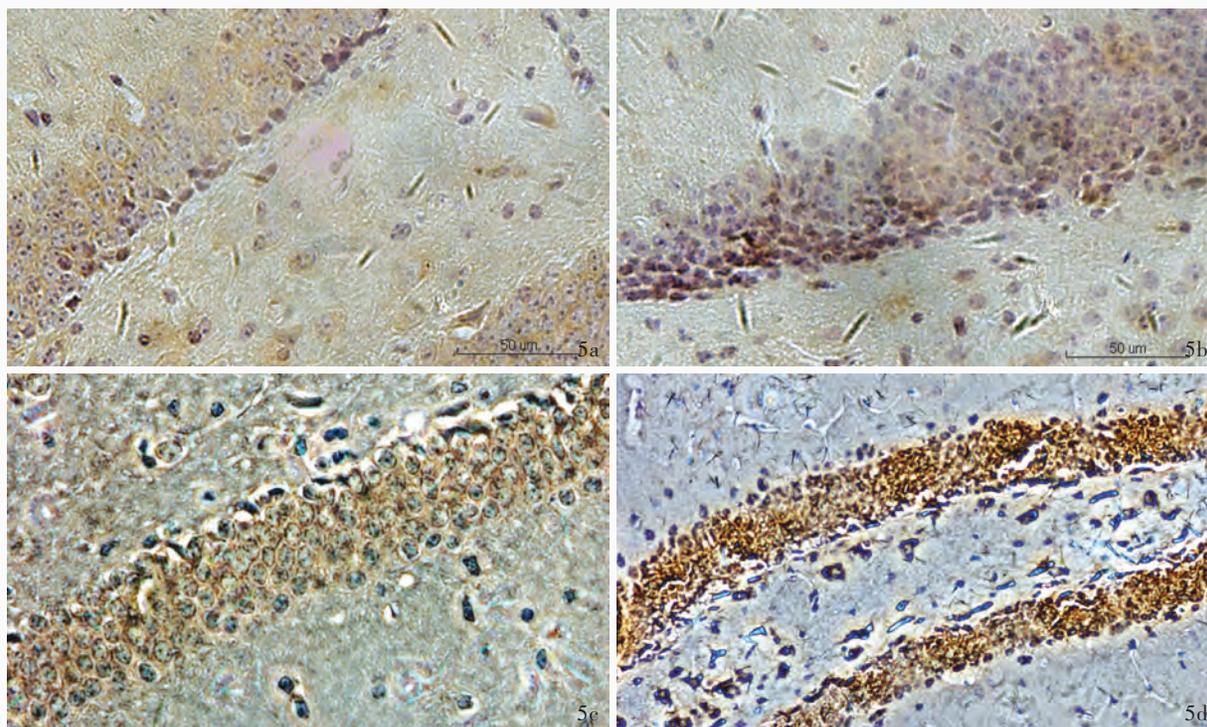


图5 光学显微镜观察显示,不同处理组转基因鼠主要于海马区神经元胞膜表达RAGE蛋白,以PFDM组表达最高,然后依次为佐剂组、DC组和PBS组 免疫组织化学染色(SABC法) ×200 5a PFDM组小鼠海马区神经元RAGE呈过表达 5b 佐剂组小鼠海马区神经元RAGE呈高表达 5c DC组小鼠海马区仅见少数RAGE染色阳性细胞 5d PBS组小鼠海马区仅见少数RAGE染色阳性细胞

Figure 5 Under light microscope, expression of RAGE protein is observed in the hippocampal neurons of transgenic mice within different treatment groups. RAGE expression is the highest in PFDM, then Adjuvant, and finally the DC and PBS groups, with changes particularly evident in the hippocampal regions of the brain. Immunohistochemistry (SABC) ×200. PFDM group (Panel 5a). Adjuvant group (Panel 5b). DC group (Panel 5c). PBS group (Panel 5d)

中的 $A\beta$, 并使其发生降解^[11-12]。ABCA1 作为 LXR 的主要靶点, 通过介导反向胆固醇限速步骤的运输途径, 减少 $A\beta$ 在脑组织中的积聚。此外, ABCA1 还是 γ -分泌酶的四聚体, 在酶处理 APP 的加工处理过程中作为 APP 转变为非淀粉样蛋白状态的通路, 或

为 APP 与 $A\beta$ 形成之间的穿梭机制, 通过阻断 $A\beta$ 生成而减少其沉积^[12]。以往研究显示, LXR 可通过激活 ABCA1 介导途径而减少 BACE 的表达, 但是本研究转基因鼠接种经 PFDM $A\beta_{1-42}$ 多肽致敏的树突状细胞疫苗后却导致 BACE 表达水平升高, 所获结果

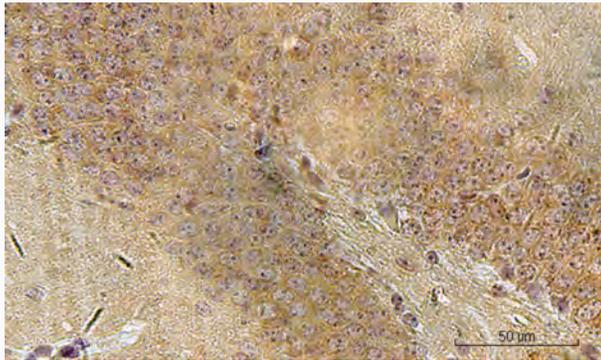


图 6 光学显微镜下观察,PFDM 组转基因鼠海马区可见大量 BACE 蛋白染色阳性细胞 免疫组织化学染色(SABC 法) ×400

Figure 6 There is different expression of BACE protein in cell membranes of hippocampal neurons of PFDM group transgenic mice under light microscope Immunohistochemistry (SABC) ×400

表 1 不同处理组转基因鼠皮质和海马区 Aβ 及 Aβ 清除通道蛋白相关因子表达水平的比较(̄x ± s, 灰度值)

Table 1. Comparison of Aβ, LXR, ABCA1, CD45, RAGE and BACE among the four groups (̄x ± s, gray value)

组别	样本例数	Aβ	LXR	ABCA1	CD45	RAGE	BACE
PFDM 组(1)	12	0.18 ± 0.04	0.05 ± 0.01	9.28 ± 1.04	0.90 ± 0.12	1.75 ± 0.39	1.09 ± 0.32
佐剂组(2)	12	0.29 ± 0.08	0.01 ± 0.00	1.52 ± 0.56	0.75 ± 0.14	0.59 ± 0.22	1.08 ± 0.29
DC 组(3)	12	4.44 ± 0.57	0.04 ± 0.01	4.39 ± 0.60	0.20 ± 0.06	2.02 ± 0.47	0.88 ± 0.11
PBS 组(4)	12	4.74 ± 0.66	0.01 ± 0.00	1.42 ± 0.54	0.20 ± 0.04	4.72 ± 0.74	0.89 ± 0.08
F 值		394.123	119.197	318.163	169.008	167.911	3.060
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.038
组间两两比较的 P 值							
(1) : (2)		0.539	0.000	0.000	0.001	0.000	0.951
(1) : (3)		0.000	0.031	0.000	0.000	0.172	0.031
(2) : (4)		0.000	0.560	0.747	0.000	0.000	0.046
(3) : (4)		0.108	0.000	0.000	0.967	0.000	0.915

注:组间两两比较行 LSD-t 检验

与文献相悖,可能的解释是:虽然 BACE 表达水平的强弱与 LXR 和 ABCA1 有关,但它们之间的具体关联性及其相互作用机制尚未阐明,从本实验结果来看,通过介导 ABCA1 途径降低 BACE 表达水平的联系是十分微弱的。

胆固醇在阿尔茨海默病的发病机制中扮演着重要角色, Katzov 等^[13]认为, ABCA1 的转录激活受 LXRα/β 正向调节。为了验证其理论, Lefterov 等^[14]采用 LXR 激动药 T0901317 经胃灌注对 APP23 转基因鼠进行治疗,结果神经元和胶质细胞 ABCA1 表达水平均显著升高。通过对本组 PDAPP^{V717I}转基因鼠的研究,我们推测 PFDM Aβ₁₋₄₂ 致敏树突状细胞疫苗通过 LXR/ABCA1 通道发挥清除 Aβ 作用;与佐剂疫苗相比,PFDM 对 LXR 和 ABCA1 通道的作用更强,同时,树突状细胞本身也在清除 Aβ 过程中扮演预防不良反应的角色,而非直接参与 Aβ 清除作用。

CD45 是主要表达于 T 细胞、B 细胞和神经小胶质细胞的一种由抗原受体介导的信号肽,阿尔茨海

默病患者脑组织神经小胶质细胞被激活,根据阿尔茨海默病发病炎症假说,慢性炎症和神经小胶质细胞激活可增强促炎性细胞因子及其相关级联反应,从而导致神经元变性和神经小胶质细胞进一步激活^[7,15]。本实验免疫组织化学染色结果亦显示,PFDM 组转基因小鼠脑组织中由 CD45 介导的神经小胶质细胞激活,从而增强了可导致炎症反应的神经小胶质细胞的调节作用。阿尔茨海默病患者由于 Aβ 转运平衡机制被破坏,导致脑组织中 Aβ 输入增加或输出减少。

RAGE 是将 Aβ 前体从周围神经系统经血-脑脊液屏障转运至大脑的转运蛋白,而 LRP1 则起相反作用,位于血-脑脊液屏障上的 LRP1 与 RAGE 共同作用发挥着对脑内外 Aβ 转运水平的影响^[8,16]。对本研究中 PFDM 治疗组转基因鼠观察发现,随着 Aβ 表达水平的降低 RAGE 亦随之减少,呈正向调节作用,但是 RAGE 的表达强度与 Aβ 清除强度之间的关系尚不十分清楚,这主要与本实验未对 LRP1 蛋白

表达水平进行观察有关。

本研究结果表明:LXR、ABCA1、CD45、RAGE 和 BACE 共同作用于脑组织 A β 肽,可逆转阿尔茨海默病的病理过程。经 PFDM A β_{1-42} 致敏的树突状细胞疫苗对治疗 PDAPP^{V717I} 转基因鼠有效且安全性良好,其作用机制可能为:(1)通过多项因素相互作用达到新的免疫平衡,从而减少了 A β 在脑组织中的沉积。(2)LXR/ABCA1 通道可抑制自发性脑膜脑炎等并发症的发生。(3)树突状细胞亦在清除 A β 的过程中扮演着预防不良反应的角色。

参 考 文 献

- [1] Bayer AJ, Bullock R, Jones RW, et al. Evaluation of the safety and immunogenicity of synthetic Abeta42 (AN1792) in patients with AD. *Neurology*, 2005, 64:94-101.
- [2] Vellas B, Black R, Thal LJ, et al. Long-term follow-up of patients immunized with AN1792: reduced functional decline in antibody responders. *Curr Alzheimer Res*, 2009, 6:144-151.
- [3] Cao C, Lin X, Zhang C, et al. Mutant amyloid-beta-sensitized dendritic cells as Alzheimer's disease vaccine. *J Neuroimmunol*, 2008, 200(1/2):1-10.
- [4] Cui W, Sun Y, Wang Z, et al. Liver X receptor activation attenuates inflammatory response and protects cholinergic neurons in APP/PS1 transgenic mice. *Neuroscience*, 2012. [Epub ahead of print]
- [5] Terwel D, Steffensen KR, Verghese PB, et al. Critical role of astroglial apolipoprotein E and liver X receptor- α expression for microglial A β phagocytosis. *J Neurosci*, 2011, 31:7049-7059.
- [6] Zhao Y, Wang Y, Hu J, et al. CutA divalent cation tolerance homolog (*E. coli*) (CUTA) regulates β -cleavage of β -amyloid precursor protein (APP) through interacting with β -Site APP cleaving protein 1 (BACE1). *J Biol Chem*, 2012, 287:11141-11150.
- [7] Park SM, Shin JH, Moon GJ, et al. Effects of collagen-induced rheumatoid arthritis on amyloidosis and microvascular pathology in APP/PS1 mice. *BMC Neurosci*, 2011, 12:106.
- [8] Perrone L, Sbai O, Nawroth PP, et al. The complexity of sporadic Alzheimer's disease pathogenesis: the role of RAGE as therapeutic target to promote neuroprotection by inhibiting neurovascular dysfunction. *Int J Alzheimer Dis*, 2012, 2012: 734956.
- [9] Boche D, Zotova E, Weller RO, et al. Consequence of Abeta immunization on the vasculature of human Alzheimer's disease brain. *Brain*, 2008, 131:3299-3310.
- [10] Ma GZ. Advances in the study on immune mechanism and immunotherapy of Alzheimer's disease. *Zhongguo Xian Dai Shen Jing Ji Bing Za Zhi*, 2010, 10:177-180. [马国诏. 阿尔茨海默病免疫机制及免疫治疗研究进展. 中国现代神经疾病杂志, 2010, 10: 177-180.]
- [11] Jiang Q, Lee CY, Mandrekar S, et al. ApoE promotes the proteolytic degradation of Abeta. *Neuron*, 2008, 58:681-693.
- [12] Cui W, Sun Y, Wang Z, et al. Activation of liver X receptor decreases BACE1 expression and activity by reducing membrane cholesterol levels. *Neurochem Res*, 2011, 36:1910-1921.
- [13] Katzov H, Chalmers K, Palmgren J, et al. Genetic variants of ABCA1 modify Alzheimer disease risk and quantitative traits related to beta-amyloid metabolism. *Hum Mutat*, 2004, 23:358-367.
- [14] Lefterov I, Bookout A, Wang Z, et al. Expression profiling in APP23 mouse brain: inhibition of Abeta amyloidosis and inflammation in response to LXR agonist treatment. *Mol Neurodegener*, 2007, 2:20.
- [15] Akiyama H, Barger S, Barnum S, et al. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 2000, 21:383-421.
- [16] Pascale CL, Miller MC, Chiu C, et al. Amyloid-beta transporter expression at the blood-CSF barrier is age-dependent. *Fluids Barriers CNS*, 2011, 8:21

(收稿日期:2012-05-15)

第四届中国西部地区神经外科学术大会

第四届中国西部地区神经外科大会将于 2012 年 9 月 14-16 日在云南省腾冲市举行,大会组委会诚挚地邀请您参会。会议并征文内容包括:中枢神经系统肿瘤、脑血管疾病、颅脑创伤、功能神经外科、脊柱脊髓疾病、中枢神经系统感染及先天性疾病的诊断与治疗,包括神经外科新技术、新方法、基础理论研究及应用等。征文要求:中、英文摘要各一份,请按照目的、方法、结果、结论格式书写,字数以 1000 字左右为宜。论文版式设计为 Word 格式、A4 页面,宋体、小四号字、1.5 倍行距。

1. 投稿方式 大会仅接受 Email 投稿 (Email: cwc_neurosurgery@163.com)。投稿截止日期为 2012 年 7 月 31 日。

2. 联系方式 云南省昆明市西昌路 295 号昆明医学院第一附属医院神经外科。邮政编码: 650032。电话: (0871) 5324888-2453。会务组联系人: 王进昆: 13708849879; 李向新: 13529032396。

The 5th Academic Congress of International Chinese Neurosurgical Sciences

General Information: All abstracts will be reviewed by experts in the field based on originality, significance, quality and clarity. Deadline of Abstract Submission: Aug. 31 2012. Notification of Abstract Acceptance: Aug. 31 2012. The presenting author must register at the time of abstract submission. Papers for oral or poster presentation will be selected on the basis of submitted abstracts. Both the selection and placement decisions by the Organizing Committee are final. The Organizing Committee reserves the right to edit the abstract for grammatical errors.

Poster Type: E-Poster. Topics of submitted paper: Spine, Vascular, Trauma, Neurointensive Care, Infection, Peripheral Nerves, Tumor, Functional, Skull Base, Intraoperative: monitoring & imaging, Basic neuroscience, Hydrocephalus, Pediatrics, Interventional.

Website: <http://icfns.cnming.com>.