

$A\beta$ 形成于 β 和 γ 分泌酶对 APP 的降解, β -分泌酶降解 APP 产生可溶性氨基末端片段和羧基末端, 再由 γ -分泌酶降解释放 40 个和 42 个氨基酸序列组成的多肽即: $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{42}$, 后者更容易形成寡聚体或淀粉样沉积^[8]。早老素 1 是 γ -分泌酶的重要调节亚基。早老素 1 基因位于 14 号染色体长臂, 早老素基因突变可导致 AD。SAMP8 鼠脑中早老素 1 序列 93.4% 与人类相同, 在神经元内以 150kDa 异二聚体或 53kDa 全蛋白形式存在, 异二聚体随年龄增长表达下降, 而全蛋白则相反, 随年龄增长表达增加, 它们反馈调节着 $A\beta$ 沉积^[9]。

tau 蛋白是一种神经元内高度表达的微管相关蛋白, 过度磷酸化的 tau 蛋白易在神经元内聚集成双螺旋丝, 引起微管结构崩解, 促进神经退行性改变。Tau 基因位于 17 号染色体长臂, 共有 16 个外显子, 编码 11 个不同形式 tau 蛋白。SAMP8 脑内存在大量的过磷酸化 Tau 蛋白, 5 月龄 SAMP8 鼠脑内过磷酸化 Tau 蛋白开始增多, 且与细胞周期蛋白依赖性激酶 (cdk5) 表达密切相关^[10]。tau 蛋白受激酶和磷酸酶的调节, 并且与其他蛋白组装和修复有关, 如热休克蛋白。SAMP8 鼠基因多态性筛选 70kDa 热休克蛋白 5、热休克蛋白-4L、血红素氧化酶等蛋白组装和折叠相关基因表达较 SAMR1 鼠下降^[14], 表明 SAMP8 鼠 tau 过磷酸途径受多基因调控。

2. 氧化应激和能量代谢相关蛋白和基因: 氧化应激是生物体内的活性氧族 (ROS) 和活性氮族 (RNS) 处于异常高浓度时的反应, 是氧化和抗氧化作用失衡所致, 可引起脑组织蛋白羰基化终末产物增多、脂质过氧化、DNA 氧化损伤等表现, 导致神经退行性改变。大量研究发现在 SAMP8 鼠脑内谷胱甘肽过氧化氢酶、二氧化锰超氧化物歧化酶、谷氨酰胺合酶、铜/锌超氧化物歧化酶等活性下降, 而一氧化氮合酶、酰基-COS 氧化等酶活性增加^[7,11,12]。褪黑素作为高效抗氧化激素, 可清除机体 ROS 和 RNS, 在长期应用加入褪黑素饮水干预 SAMP8 鼠实验中发现脑组织中脂质过氧化和蛋白羰基化减少, 同时降低了 tau 蛋白磷酸化途径的 cdk5 和糖原合成酶激酶-3 β 活性, 改善 SAMP8 鼠认知障碍^[13]。

$A\beta$ 可以激活 NADPH 氧化酶和刺激巨噬细胞, 诱导氧自由基和 NO 生成, 反之, ROS 和 RNS 可破坏 SAMP8 鼠 $A\beta$ 主链 31 位异亮氨酸氧原子和 35 位甲硫氨酸的硫原子 (Met-35) 之间范德华力, 易于硫自由基游离, 而形成恶性循环, 加速 SAMP8 鼠衰老和认

知障碍^[6,7]。Carter 等^[14]在对 SAMP8 鼠基因多态性筛选中发现金属硫蛋白 2、硫氧还原蛋白等表达增加, 说明 SAMP8 鼠机体存在代偿保护机制, 利于 ROS 和 RNS 清除。

物质能量代谢在衰老的病理生理过程中的作用和氧化应激同样重要, 两者相辅相成, 相互促进。衰老积累的氧自由基导致物质能量代谢相关蛋白氧化损伤, 活性降低; 反之, 在呼吸链中各种酶发生错误折叠而聚集, 破坏其天然构象, 引起线粒体障碍, 诱导氧化应激。Cheng 等^[15]研究发现 SAMP8 鼠线粒体呼吸链相关基因包括: 细胞色素-C 氧化酶亚单位 I、III、ATP 合酶、泛醌-细胞色素还原酶等相比于 SAMR1 鼠表达上调, 反映了 SAMP8 鼠线粒体处于高氧化还原状态和低呼吸控制率, 呼吸链氧化磷酸化解偶联, ROS 溢出增加, 加重氧化应激。同时, 氧化应激损伤了 SAMP8 鼠物质代谢过程中所需的酶。在 SAMP8 鼠衰老过程中糖原分解酶、糖的酵解途径酶、有氧氧化途径酶以及 Δ -9 饱和脂肪酸脱氢酶等表达均降低, 其中, Δ -9 饱和脂肪酸脱氢酶表达下降直接影响细胞膜流动性和突触信号传递, 直接损伤学习记忆^[16,17]。在氧化损伤功能蛋白后, 神经元内存在蛋白修复机制, 而在 SAMP8 鼠脑中的 T-聚合体家族和热休克蛋白家族相关基因表达下调, 进一步说明 SAMP8 鼠 4~6 月龄后即出现类似 AD 的加速衰老和认知障碍^[18]。

3. 信号转导相关蛋白和基因: $A\beta$ 沉积或过磷酸 tau 触发氧化应激, 以及氧化应激诱导蛋白修饰等都是通过胞内信号网络相互联系。在极其复杂的信号网络中, 神经元胞内钙离子浓度的稳定是维持长时程增强的必要条件, 钙结合蛋白和蛋白激酶 C- γ (PKC- γ) 是调节神经元内钙离子浓度的主要信号蛋白。在 SAMP8 鼠脑中钙结合蛋白和 PKC- γ 表达与年龄呈线性下降关系^[19], 从而促使胞内钙离子水平失衡和线粒体通透性改变, 激活下游 caspase-3, 诱发细胞凋亡, 引起神经退行性改变, 损伤认知功能。在信号网络转导的磷酸化和脱磷酸化调节中, 蛋白磷脂酶 1 (Ppp1ca) 是多聚结合蛋白 1 (PP1) 组成部分, 属于丝氨酸/苏氨酸蛋白类家族, 与 PP1、PP2 共同参与蛋白合成和长时程增强, 抑制 PP1 可限制 SAMP8 鼠学习能力, 产生遗忘^[20]。

相对于 SAMR1 鼠, SAMP8 鼠信号转导相关基因已达 43 个改变, 根据其表达蛋白功能分为^[21]: ①丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族 (约占 90%); ②酪氨酸蛋

白激酶家族;③G 蛋白偶联家族;④酪氨酸磷脂酶家族等。其中,丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路相关基因占很大部分,属于丝氨酸/苏氨酸蛋白家族,调节细胞增殖、分化、凋亡。而在不可再生的神经元内,MAPK 可调节突触可塑性,影响学习记忆功能^[22]。神经营养因子 3 表达与 SAMP8 胆碱能神经元内信号网络蛋白分子磷酸化关系密切,其表达下降可导致网络调节失衡而引起胆碱能神经元丢失,提示了 SAMP8 鼠存在与 AD 相似的胆碱能丢失^[21]。

4. 细胞骨架和胞质运输相关蛋白和基因:学习记忆的神经基础是突触可塑性,结构可塑性包括细胞骨架动态改变和树突棘形成。微管蛋白 α 和 β 聚合形成微管,并与肌动蛋白等共同构成细胞骨架,有利于胞内物质运输、维持轴突和树突的形态、细胞器的定位等。微管 β -5 下降可作为 AD 细胞骨架的生物标志物^[23]。在 SAMP8 鼠脑中微管蛋白 α -3、 α -1A、 β -5 和肌动蛋白表达水平下降^[16],导致 SAMP8 皮质萎缩、轴突发育不良、树突棘减少、囊泡运输障碍,改变突触可塑性,引起其学习记忆障碍。并且驱动蛋白超家族轻链 1 基因表达在 SAMP8 鼠中下调,影响与驱动蛋白超家族重链蛋白 5 结合,引起 tau 蛋白、APP 和 APP 清除酶-1 顺向转运至突触末端,释放 A β 和其他水解衍生物障碍,使 A β 局部沉积,加重轴突转运障碍,引起 tau 蛋白途径功能异常^[24]。

三、总结和展望

氧化应激所致错误折叠蛋白的积聚、能量衰竭以及突触功能障碍等因素是导致 AD 的重要机制。衰老作为 AD 发病的危险因素,SAMP8 鼠可能接近 AD 的自然发病的动物模型,同时也可以避免了人为或外在各种损伤因素。本文综述了 SAMP8 鼠在 AD 发病相关的蛋白基因的研究进展,反映了 SAMP8 鼠可以作为 AD 研究的理想模型,可广泛应用于 AD 的基础研究和治疗及预防 AD 药物评价。

参考文献

- 1 Takeda T, Matsushita T, Kurozumi M, *et al.* Pathobiology of the senescence - accelerated mouse(SAM) [J]. *Exp Gerontol*,1997, 32(1-2):117-127
- 2 Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT. The carboxy terminus of the β amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation; implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. *Biochemistry*, 1993,32(18):4693-4697
- 3 Poon HF, Joshi G, Sultana R, *et al.* Antisense directed at the A β region of APP decreases brain oxidative markers in aged senescence accelerated mice[J]. *Brain Res*,2004,1018(1):86-96
- 4 Takemura M, Nakamura S, Akiguchi I, *et al.* Beta/A4 proteinlike

- immunoreactive granular structures in the brain of senescence - accelerated mouse[J]. *Am J Pathol*, 1993,142(6):1887-1897
- 5 lood JF, Morley JE, Roberts E. An amyloid β - protein fragment, A - beta [12-28], equipotently impairs post - training memory processing when injected into different limbic system structures [J]. *Brain Res*,1994,663(2):271-276
- 6 Morley JE, Kumar VB, Bernardo AE, *et al.* β - amyloid precursor polypeptide in SAMP8 mice affects learning and memory [J]. *Pep-tides*,2000,21(12):1761-1767
- 7 Poon HF, Joshi G, Sultana R, *et al.* Antisense directed at the A β - region of APP decreases brain oxidative markers in aged senescence accelerated mice[J]. *Brain Research*,2004,1018(1):86-96
- 8 Del VJ, Duran VJ, Manich G, *et al.* Early amyloid accumulation in the hippocampus of SAMP8 mice [J]. *J Alzheimer's Dis*,2010,19(4):1303-1315
- 9 Kumar VB, Franko M, Banks WA, *et al.* Increase in presenilin 1 (PS1) levels in senescence - accelerated mice (SAMP8) may indirectly impair memory by affecting amyloid precursor protein (APP) processing[J]. *J Exp Biol*,2009,212(Pt4):494-498
- 10 Canudas AM, Gutierrez - Cuesta J, Rodriguez MI, *et al.* Hyperphosphorylation of microtubule - associated protein tau in senescence - accelerated mouse (SAM) [J]. *Mech Ageing Dev*,2005,126(12):1300-1304
- 11 Zhu L, Yu JC, Shi QQ, *et al.* Strain - and age - related alteration of proteins in the brain of SAMP8 and SAMR1 mice[J]. *J Alzheimer's Disease*,2011,23(4):641-654
- 12 Inada K, Yokoi I, Kabuto H, *et al.* Age - related increase in nitric oxide synthase activity in senescence accelerated mouse brain and the effect of long - term administration of superoxide radical scavenger [J]. *Mech Ageing Dev*,1996,89(2):95-102
- 13 Gutierrez CJ, Sureda FX, Romeu M, *et al.* Chronic administration of melatonin reduces cerebral injury biomarkers in SAMP8[J]. *J Pineal Res*,2007, 42(4):394-402
- 14 Carter TA, Greenhall JA, Yoshida S, *et al.* Mechanisms of aging in senescence - accelerated mice[J]. *Genome Biol*,2005,6(6):R48
- 15 Cheng XR, Zhou WX, Zhang YX, *et al.* Differential gene expression profiles in the hippocampus of senescence - accelerated mouse [J]. *Neurobiol Aging*,2007,28(4):497-506
- 16 Cristina DV, Marina G, Silvia GM, *et al.* Proteomic study of neuron and astrocyte cultures from senescence - accelerated mouse SAMP8 reveals degenerative changes[J]. *J Neurochem*,2009,111(4):945-955
- 17 Butterfield DA, Poon HF. The senescence - accelerated prone mouse (SAMP8): a model of age - related cognitive decline with relevance to alterations of the gene expression and protein abnormalities in Alzheimer's disease[J]. *Exp Gerontol*,2005, 40(10):774-783
- 18 Kumar VB, Franko MW, Farr SA, *et al.* Identification of age - dependent changes in expression of senescence - accelerated mouse (SAMP8) hippocampal proteins by expression array analysis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2000,272(3):657-661
- 19 Armbrecht HJ, Boltz MA, Kumar VB, *et al.* Effect of age on calcium

- dependent proteins in hippocampus of senescence - accelerated mice[J]. Brain Res, 1999, 842(2): 287 - 293
- 20 Jouvenceau A, Hédou G, Potier B, *et al.* Partial inhibition of PP1 alters bidirectional synaptic plasticity in the hippocampus[J]. Eur J Neurosci, 2006, 24(2): 564 - 572
- 21 Sowell RA, Butterfield DA. Spontaneous vertebrate models of Alzheimer dementia; selectively bred strains (SAM strains) [J]. Neuro-methods, 2011, 48: 271 - 293
- 22 Thomas GM, Huganir RL. MAPK cascade signaling and synaptic plasticity[J]. Nat Rev Neurosci, 2004, 5(3): 173 - 183
- 23 Zellner M, Veitinger M, Umlauf E, *et al.* The role of proteomics in dementia and Alzheimer disease [J]. Acta Neuropathol, 2009, 118(1): 181 - 195
- 24 Chen SC, Lu G, Chan CY, *et al.* Microarray profile of brain Aging - related genes in the frontal cortex of SAMP8 [J]. J Mol Neurosci, 2010, 41(1): 12 - 16
- (收稿: 2011 - 05 - 08)
(修回: 2011 - 05 - 09)

腺苷及其受体在颅脑创伤及慢性认知损害中的作用及临床应用前景

宁亚蕾 周元国

在现代社会, 交通事故、坠落、运动意外等引起的创伤性脑损伤(traumatic brain injury, TBI)和战争、恐怖袭击中爆炸导致的颅脑冲击伤(bTBI)都具有发生率高和死残率高的特点, 即使患者表面康复, 往往还会遗留慢性神经行为损伤, 不仅影响患者工作、生活质量, 也给家庭和社会带来沉重负担。因此如何提高颅脑创伤的救治率、提高康复质量已为现代创伤、神经外科及康复领域提出了新的课题。

原发性颅脑损伤(包括颅骨骨折、颅内出血等)目前已能通过外科手术得到较好的解决, 但继发性损伤(包括兴奋性毒性、钙超载、过度炎症反应等)尽管进行了较深入的研究, 建立了许多临床处理原则, 也发现了大量能够抗损伤和促进神经功能恢复的药物如谷氨酸受体拮抗剂、 Ca^{2+} 拮抗剂、自由基清除剂、免疫反应调节剂、NO系统调节剂、多肽类神经营养药物、激素等, 但最近的《中国颅脑创伤病人脑保护药物指南》指出^[1], 国内外一些权威机构对200多种颅脑损伤治疗药物进行的临床多中心随机双盲研究未能发现任何一种临床有效的药物, 其中包括了上述临床常用药物^[2-4]。这些药物在治疗颅脑损伤的失败原因与对颅脑创伤继发损伤的机制认识不足、只着眼于单一的致伤机制、未充分考虑不同致伤模型、不同物种等对临床前试验的影响, 以及没有对药物药代动力学进行全盘考虑等^[5]。因此, 探索真正有效、

能够应用于临床的TBI治疗药物或寻找治疗靶点仍然是难点和研究热点。而随着生活水平的提高, 颅脑创伤后的认知行为损伤, 尤其是症状不明显的轻度TBI和bTBI后遗症正逐渐引起关注, 成为新的研究重点。

腺苷作为三磷酸腺苷的代谢产物, 是一种重要的维持内环境稳定的活性分子, 也是重要的神经递质及调质, 颅脑损伤后, 组织大量释放腺苷, 其通过作用于腺苷受体(主要是A1和A2A受体)发挥多种生物学效应, 可对谷氨酸释放、炎症及钙离子进行调节, 对中枢神经系统乃至全身各系统的多种生理、病理过程起调控作用, 与颅脑损伤后的三大继发损伤机制有着密切联系, 近年来受到了广泛的重视, 成为遏制TBI后多因素共同作用所致的继发性损伤的一个新思路^[6,7]。然而腺苷受体在TBI中有何变化, 发挥何种作用研究很少, 同时根据既往报道, 在多种中枢损伤模型中, A2A受体激活后存在保护和损伤的矛盾效应。如A2AR选择性激动剂CGS21680可以减轻缺血或兴奋毒性造成的动物海马损伤以及对兔前脑缺血起保护作用; 同样, 激动剂APEC也能提高缺血后动物的脑血流量及存活率^[8]。但也有实验观察到了截然相反的现象, 如A2AR选择性拮抗剂ZM241385明显降低了人海藻酸引起的海马损伤^[9]。那么在急性颅脑创伤中, 腺苷受体尤其是A2A受体是否也有重要作用? 如果也存在双向调控作用, 其机制是否类似于其他脑损伤模型? 又是什么因素决定了其激活后效应的走向呢?

作者单位: 400042 重庆, 第三军医大学大坪医院野战外科研究所分子生物学中心、国家创伤、烧伤与复合伤重点实验室

快速衰老小鼠 SAMP8 有关 阿尔茨海默病基因蛋白研究进展

吴晓强 王小姗

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种进行性、不能逆转的,以智能衰退为主要特征的神经系统变性疾病,多伴有人格改变,其病理特征包括老年斑 (SP)、神经元纤维缠结 (NFTs)、海马锥体细胞颗粒空泡变性和神经元缺失。AD 至今仍是一种不可治愈疾病。最新人口普查数据显示我国 60 岁以上人口占 13.26%,老龄化进程正逐步加速,随之而来的与衰老相关的 AD 发病率逐年上升,已严重危害到人类的健康,给个人、社会和家庭造成了沉重的负担。

目前,针对 AD 发病机制的研究主要集中在动物实验,为了选择理想的 AD 动物模型,更好地研究 AD 的病理分子机制和临床药物治疗,从体积很小的无脊椎动物蠕虫到身形庞大的哺乳类动物北极熊;从寿命短至数月的果蝇到长至数十年的灵长类动物,都入选过 AD 实验模型且都具有特有研究价值。快速衰老型小鼠 (senescence - accelerated mouse/prone, SAMP) 为一近交系小鼠,以寿命短,短期内即可出现类似人类衰老相关症状行为学和病理生理学等优势,已成为理想的 AD 动物模型。现就 SAMP8 在阿尔茨海默病蛋白基因组学中研究价值做如下综述。

一、快速衰老小鼠生物学特性

快速衰老小鼠 (SAM) 由日本京都大学 Takeda 等人通过对 AKR/J 系小鼠进行选择性地近交繁育,在特定子代中筛选出活动少、毛发脱落且缺乏光泽、生长迟缓、寿命短、白内障等可遗传的快速老化现象的小鼠,再经选择性繁育而成^[1]。根据衰老等级分值、寿命、病理表型等目前已经选育出 18 个亚系,其中 14 个为快速衰老亚系 (senescence - accelerated mouse/ prone, SAMP),4 个正常衰老亚系 (senescence - accelerated mouse/ resistance, SAMR),SAM 中的每

个亚系都具有特征性病理或行为学,且具有特定科研价值。其中,SAMP8 寿命约为 12 个月,远较 SAMR1 的寿命短 (约 24 个月),一般在 4~6 个月出现加速老化的特点,且随着年龄的增长表现学习记忆障碍、后期低恐惧不安状态、昼夜节律紊乱、情感障碍等。病理上亦有类似临床 AD 患者脑内 β 淀粉样蛋白 ($A\beta$) 颗粒样结构广泛沉积、皮质萎缩、海马锥体细胞减少等特征性改变。

二、与 AD 相关蛋白基因

1. SAMP8 鼠特征性蛋白和基因:AD 的特征性蛋白和基因主要为 $A\beta$ 、tau 蛋白等。 $A\beta$ 是老年斑的主要成分,它来源于 β -淀粉样蛋白前体 (APP) 代谢,APP 基因位于 21 号染色体,由于 mRNA 剪切不同可形成氨基酸序列不等的 APP。存在于 SAMP8 鼠神经系统主要是 APP₆₉₅^[2],其氨基酸序列 89.5% 同源人类^[3]。2 月龄的 SAMP8 鼠皮质、内侧隔、海马、小脑等脑组织中可发现直径约 1.5~2.5 μm 、不规则形状的 β 淀粉样颗粒结构 (β -LIGS),4~9 月龄时 β -LIGS 加速沉积。Takemura M 等^[4]应用 $\beta/A4_{1-24}$ 和 $\beta/A4_{1-15}$ 的抗人抗体对 SAMP8 鼠的海马部位进行免疫组化研究表明: β -LIGS 在海马中沉积呈年龄正相关性。在 SAMP8 鼠的边缘系统直接注射 $A\beta$ 的 12~28 序列片段,导致神经元和胶质细胞钾通道功能不协调,而损伤记忆^[5]。Morley 等^[6]发现 SAMP8 鼠在 4~12 月龄期间,海马 APPmRNA 和蛋白表达水平进行性升高,且与非空间记忆能力呈负相关,给 SAMP8 鼠注射 $A\beta$ 抗体可明显改善其非空间记忆能力。同样,Poon 等^[7]在 SAMP8 鼠脑室内注射针对 APP 的 $A\beta$ 序列反义寡核苷酸减少 APP 表达和由 APP 氧化应激形成蛋白羰基化,改善 SAMP8 鼠学习记忆功能。值得注意的是,正常人群或同品系鼠,尸解亦发现脑内亦有 $A\beta$ 沉积,但认知功能并未明显降低,这可能与 $A\beta$ 启动其他分子机制引起认知功能损伤,如氧化应激;或是与 $A\beta$ 沉积量有关。

$A\beta$ 沉积量取决于 $A\beta$ 形成和清除之间的平衡。

基金项目:江苏省自然科学基金 (基础研究计划) 资助项目 (BK2008081);南京医科大学科技发展基金重点项目 (2010NJMUZ4)

作者单位:210029 南京医科大学附属脑科医院老年神经科

通讯作者:王小姗,电子信箱:wangxiaoshan71@yahoo.com.cn