

# 活体观察不同月龄阿尔茨海默病模型小鼠视网膜 A $\beta$ 斑

秦 熙, 卢 艳

基金项目:北京市科委首都特色基金项目(No. Z141107002514116)

作者单位:(100038)中国北京市,首都医科大学附属北京世纪坛医院眼科

作者简介:秦熙,毕业于首都医科大学,硕士研究生,住院医师,研究方向:青光眼、神经眼科。

通讯作者:卢艳,医学博士,主任医师,主任,教授,硕士研究生导师,中国医师协会青光眼委员会委员,中华医学会眼科分会神经眼科学组委员,北京医学会眼科学会委员,研究方向:青光眼、神经眼科。louiselu1964@163.com

收稿日期:2018-03-14 修回日期:2018-09-05

## Observation of $\beta$ - amyloid plaques in retinas from live Alzheimer's model mice in different months

Xi Qin, Yan Lu

Foundation item:Project Supported by Beijing Municipal Science & Technology Commission (No. Z141107002514116)

Department of Ophthalmology, Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China

Correspondence to:Yan Lu. Department of Ophthalmology, Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China. louiselu1964@163.com

Received:2018-03-14 Accepted:2018-09-05

### Abstract

• AIM: To study the correlation of  $\beta$  - amyloid (A $\beta$ ) plaques in retinas from Alzheimer's model mice in different months and progression of disease.

• METHODS: Six-month ( $n=6$ ) and twelve-month ( $n=6$ ) old Alzheimer's model mice, together with six-month ( $n=6$ ) and twelve-month ( $n=6$ ) old C57 mice were in this experiment. Morris water maze test was to assess the spatial memory. After intragastrical administration of curcumin for consecutive three days, the A $\beta$  plaques in retinas ( $n=48$ ) from all mice ( $n=24$ ) were detected by noninvasive *in vivo* optical imaging.

• RESULTS: Morris water maze test: compared with the six-month control group (C6), six-month model mice (AD6) swam longer ( $P<0.05$ ); and AD6 swam longer distance and experienced more crossing times than C6 ( $P>0.05$ ); compared with the twelve-month control group (C12), twelve-month model mice (AD12) swam longer, swam longer distance ( $P<0.05$ ) and experienced more crossing times ( $P>0.05$ ); compared with the six-month model mice (AD6), twelve-month model mice (AD12) swam longer, swam longer distance and experienced more crossing times ( $P<0.05$ ). Moreover,

the result of retinal A $\beta$  plaques: We identified retinal A $\beta$  plaques in postmortem from AD6 and AD12. Two six-month model mice had been detected retinal A $\beta$  plaques, thus the positive rate of retinal A $\beta$  plaques in six-month model mice was 33%; And six twelve-month model mice had been detected retinal A $\beta$  plaques, thus the positive rate of retinal A $\beta$  plaques in twelve-month model mice was 100%; Plaques were undetectable in age-matched non-AD individuals neither in six-month or in twelve-month; the positive rate of retinal A $\beta$  plaques in AD12 was higher than AD6 ( $P<0.05$ ).

• CONCLUSION: Six-month model mice (AD6) had already a decline of cognition; and the illness gradually increased with the extension of the disease, and the positive rate of retinal A $\beta$  plaques is increasing with progression of Alzheimer's disease.

• KEYWORDS: Alzheimer's disease; animal model; morris water maze test; curcumin; noninvasive optical imaging

Citation: Qin X, Lu Y. Observation of  $\beta$  - amyloid plaques in retinas from live Alzheimer's model mice in different months. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2018;18(10):1782-1785

### 摘要

目的:观察不同月龄阿尔茨海默病(AD)模型小鼠视网膜 A $\beta$  斑阳性率与 AD 病程的相关性。

方法:6、12 月龄 APP/PS1 模型小鼠各 6 只,同月龄同背景非转基因 C57 小鼠各 6 只为正常对照。各组小鼠均进行水迷宫实验,检测空间学习记忆能力。姜黄素溶液连续灌胃 3d,对 24 只 48 眼小鼠行眼底自发荧光照相检查,观察视网膜 A $\beta$  斑。

结果:水迷宫试验:与 6 月龄对照组(C6)相比,6 月龄 AD 模型小鼠(AD6)游行时间显著增加( $P<0.05$ ),游行路径长度及穿越站台次数也显著增加( $P>0.05$ );与 12 月龄对照组(C12)相比,12 月龄 AD 模型小鼠(AD12)游行持续时间、路径长度均显著增加( $P<0.05$ ),穿越站台次数也显著增加( $P>0.05$ );12 月龄 AD 小鼠(AD12)与 6 月龄 AD 模型(AD6)小鼠相比,12 月龄 AD 小鼠(AD12)游行持续时间、路径长度及穿越站台次数均显著增加( $P<0.05$ )。姜黄素标记联合眼底自发荧光照相结果:AD6、AD12 的视网膜后极部检测到了 A $\beta$  斑:6 月龄 AD 模型小鼠中有 2 只小鼠出现了视网膜 A $\beta$  斑,视网膜 A $\beta$  斑阳性率为 33%;12 月龄 AD 模型小鼠中有 6 只小鼠出现了视网膜 A $\beta$  斑,视网膜 A $\beta$  斑阳性率为 100%;C6、C12 均未检测出视网膜 A $\beta$  斑;12 月龄 AD 模型小鼠眼底 A $\beta$  斑阳性率明显高于 6 月龄 AD 模型小鼠( $P<0.05$ )。

结论:6 月龄 AD 模型小鼠已有认知功能障碍,且随着病程的延长病情逐渐加重,视网膜 A $\beta$  斑的阳性率也逐渐增加。

**关键词:**阿尔茨海默病;动物模型;水迷宫;姜黄素;眼底自发荧光照相

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2018.10.06

**引用:**秦熙,卢艳.活体观察不同月龄阿尔茨海默病模型小鼠视网膜 A $\beta$  斑.国际眼科杂志 2018;18(10):1782-1785

## 0 引言

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种年龄相关的神经退行性疾病,其标志性病理表现为中枢神经系统的 A $\beta$  蛋白沉积和细胞内 Tau 蛋白过度磷酸化导致的神经元纤维缠结<sup>[1]</sup>,会出现记忆力下降、认知功能障碍及视功能下降等临床表现。AD 患者会出现视野缺损<sup>[2]</sup>、对比敏感度下降<sup>[3]</sup>等视功能异常的症状,在既往的研究中发现 AD 患者视网膜神经纤维层变薄<sup>[4]</sup>、黄斑容积变小<sup>[5]</sup>等异常改变。通过对 AD 模型小鼠的免疫组织学研究,证实了视网膜上同样出现了 A $\beta$  斑<sup>[6]</sup>。上述证据表明视网膜也成为 AD 的受累器官。由于阿尔茨海默病存在起病隐匿、不可逆的特点,因此及时地诊断及干预治疗可延缓病情进展,从而减轻家庭及社会负担。目前对于 AD 的诊断主要依据 MRI、脑脊液 A $\beta$  蛋白、Tau 蛋白以及 PET 对 A $\beta$  蛋白的检测,但由于上述方法有创、昂贵等不足<sup>[7]</sup>,未能广泛普及。而视网膜较大脑拥有更为便利、直观的优势来观察组织病变情况,越来越多的学者致力于探究视网膜是否能够作为 AD 诊断的新平台。目前已有研究发现,利用姜黄素标记联合眼底自发荧光照相技术在活体状态下标记出视网膜 A $\beta$  斑<sup>[6]</sup>,这使得通过检测视网膜 A $\beta$  斑作为 AD 诊断新标准成为可能。那么,视网膜 A $\beta$  斑的阳性率与 AD 疾病进展程度存在何种关系呢?本研究旨在观察不同月龄 APP/PS1 双转基因模型小鼠视网膜 A $\beta$  斑的阳性率与 AD 病程是否存在相关性。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 6、12 月龄 APP/PS1 双转基因雌性小鼠 (AD 模型小鼠) 及同月龄同背景非转基因 C57 雌性小鼠 (C57 小鼠) 作为本实验的实验对象 (所有小鼠均购自中国医学科学院实验动物研究所),每组 6 只。动物实验经首都医科大学附属北京世纪坛医院伦理委员会批准。

## 1.2 方法

**1.2.1 Morris 水迷宫实验** 对 AD 模型小鼠及 C57 小鼠分别进行 Morris 水迷宫实验。首先对每只小鼠进行游泳及寻找站台训练 3d,3d 后正式进行水迷宫实验,持续 3d,每日 1 次。记录并计算小鼠在 120s 内的游泳时间、游泳轨迹以及穿越站台次数。

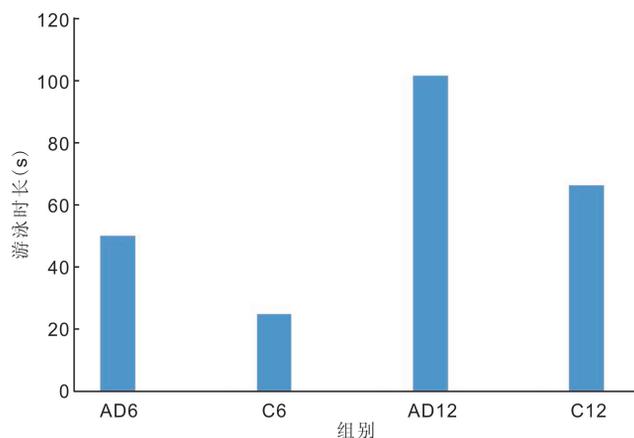
**1.2.2 配制 20mg/mL 姜黄素溶液** 购买第三代姜黄素复合物 (Curcumin C3 Compelx) 作为原材料,将 400mg 姜黄素溶于 4.8mL 0.01mol/L NaOH 溶液中,PBS 液稀释至 20mL,配成 20mg/mL 姜黄素溶液,酸碱度 pH = 7.4 ~ 7.8。配制好的溶液避光保存。

**1.2.3 姜黄素灌胃** 灌胃前对每只小鼠称重,按 7.5mg/(kg·d) 剂量对每只小鼠行姜黄素溶液灌胃,连续灌胃 3d,3d 后再次称重。

**1.2.4 眼底自发荧光照相** 对每只小鼠进行 0.5% 复方托吡卡胺散瞳和 10% 水合氯醛 4mL/kg 腹腔麻醉,麻醉后对其进行眼底自发荧光照相 (海德堡二代),观察视网膜后极部血管及视盘区域的 A $\beta$  斑。双眼中如有 1 处视网膜出现 A $\beta$  斑即认为 A $\beta$  斑阳性。

**表 1 四组小鼠 Morris 水迷宫游泳时长、游泳路长及穿越站台次数对比结果**

组别	只	游泳时长 (s)	游泳路长 (cm)	穿越站台次数 (次)
AD6	6	50.3±23.3	326.2±144.1	2.3±1.1
C6	6	25.0±14.8	260.2±140.4	1.8±1.0
<i>t</i>		2.251	0.804	0.836
<i>P</i>		0.048	0.440	0.423
AD12	6	101.7±18.6	1135.0±161.7	4.8±2.5
C12	6	66.3±19.2	711.7±181.6	3.1±0.5
<i>t</i>		3.25	4.264	1.584
<i>P</i>		0.009	0.002	0.144
AD12	6	101.7±18.6	1135.0±161.7	4.8±2.5
AD6	6	50.3±23.3	326.2±144.1	2.3±1.1
<i>t</i>		4.217	9.148	2.239
<i>P</i>		0.002	<0.01	0.049
C12	6	66.3±19.2	711.7±181.6	3.1±0.5
C6	6	25.0±14.8	260.2±140.4	1.8±1.0
<i>t</i>		4.175	4.818	3.015
<i>P</i>		0.002	0.001	0.013



**图 1 四组小鼠游泳时长对比。**

统计学分析:采用统计学软件 SPSS17.0 分析,水迷宫实验的游泳时间、游泳路长及穿越站台次数用均数±标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示,采用独立样本 *t* 检验;视网膜 A $\beta$  斑阳性率比较采用 Fisher 确切概率法,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 Morris 水迷宫实验** 各组小鼠游泳时长、游泳路长及穿越站台次数见表 1,图 1~3。与 C6 相比,AD6 游行时间、路径长度及穿越站台次数显著增加,游行时间差异有统计学意义 (*P*<0.05),路径长度及穿越站台次数差异无统计学意义 (*P*>0.05);与 C12 相比,AD12 游行时间、游行路长及穿越站台次数显著增加,游行时间及游行路长差异有统计学意义 (*P*<0.05);与 AD6 相比,AD12 游行持续时间、路径长度及穿越站台次数显著增加,差异有统计学意义 (*P*<0.05);与 C6 相比,C12 游行时间、路径长度及穿越站台次数显著增加,差异均有统计学意义 (*P*<0.05)。

**2.2 眼底自发荧光照相结果** 四组小鼠视网膜 A $\beta$  斑阳性率比较结果见表 2。AD6 视网膜 A $\beta$  斑阳性率为 33%,AD12 视网膜 A $\beta$  斑阳性率为 100%,C12、C6 均未检测出视网膜 A $\beta$  斑。AD6 视网膜 A $\beta$  斑阳性率高于 C6,差异无统计学意义 (*P*=0.121);AD12 视网膜 A $\beta$  斑阳性率高于

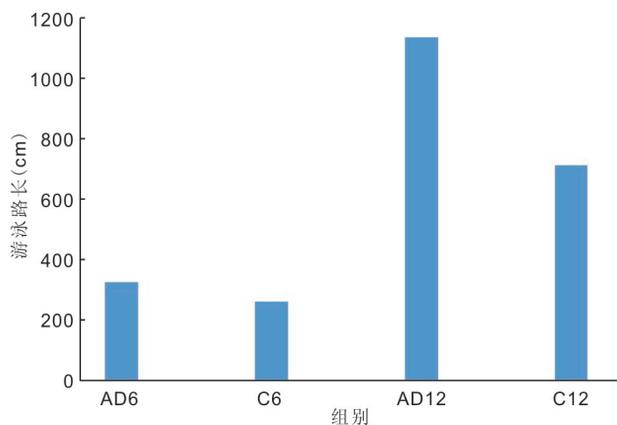


图2 四组小鼠游泳路长对比。

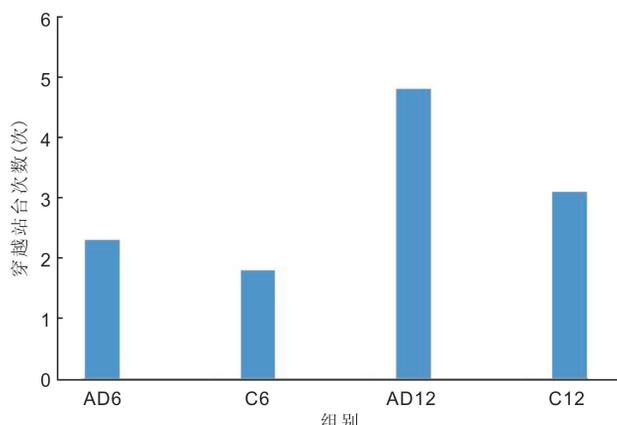


图3 四组小鼠穿越站台次数对比。

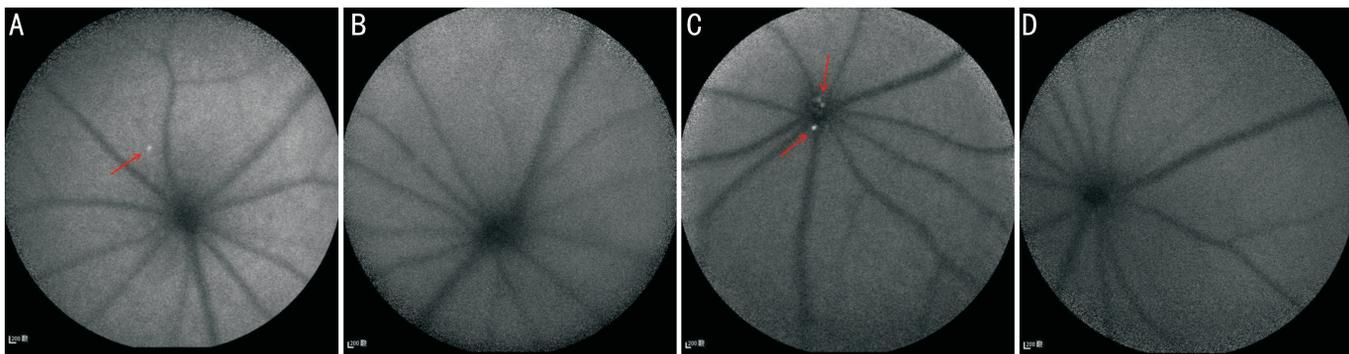


图4 小鼠眼底自发荧光照相 A:6月龄AD模型小鼠,红色箭头所指高荧光为Aβ斑;B:6月龄对照组小鼠;C:12月龄AD模型小鼠,红色箭头所指高荧光为Aβ斑;D:12月龄对照组小鼠。

表2 24只小鼠视网膜Aβ斑阳性率比较

组别	只数	阳性(只)	阴性(只)	阳性率(%)
AD6	6	2	4	33
AD12	6	6	0	100
C6	6	0	6	0
C12	6	0	6	0

C12,差异有统计学意义( $P=0.001$ );AD12视网膜Aβ斑阳性率高于AD6,差异有统计学意义( $P=0.014$ )。各组小鼠眼底自发荧光照相图片见图4。

### 3 讨论

阿尔茨海默病是一种神经退行性疾病,其发病机制尚未完全明确,目前存在多种假说:有β样淀粉样蛋白级联假说<sup>[8]</sup>、神经炎症反应<sup>[9]</sup>、基因突变<sup>[10]</sup>等,这些假说均表明神经细胞产生了神经毒性反应,从而出现AD症状。视网膜与中枢神经系统有着相似的解剖结构,在AD患者的尸检报告中发现了视网膜Aβ斑。同时,在免疫组化的研究中也发现了其外核层至神经节细胞层均有Aβ蛋白的聚集<sup>[6]</sup>,从而出现视网膜神经纤维层变薄<sup>[4]</sup>、黄斑容积变小<sup>[5]</sup>等异常改变。同时,李臻等<sup>[11]</sup>在观察AD小鼠视网膜超微结构变化时发现AD模型小鼠视网膜各层均出现了神经退行性病变,也由此提示我们视网膜可以作为AD诊断新窗口。

眼球特有的屈光介质使得我们可以通过非接触的眼科检查仪器观察到视网膜的病变情况。Koronyo-Hamaoui等<sup>[6]</sup>利用姜黄素对不同病程的AD患者进行尸检,发现正常老年人大脑无Aβ斑块沉积,同样在视网膜上也未发现Aβ斑块;大脑存在少量Aβ斑块但生前无AD症状的老年

人视网膜上也发现了少量Aβ斑块;而生前被确诊为轻度AD患者的大脑和视网膜上探测到了明显的Aβ斑块;而且在生前被确诊为重度AD患者的大脑和视网膜上则同时发现了大量的Aβ斑块聚集。实验说明了视网膜Aβ斑块的分布量与疾病严重程度呈正相关。此外,Koronyo-Hamaoui还发现,2.5月龄的APP<sup>swe</sup>/PS1小鼠大脑组织尚未探测到Aβ斑块沉积时,其视网膜上已可检测到Aβ斑块的存在,更新了以往研究证明Aβ斑块最早出现于5月龄APP<sup>swe</sup>/PS1小鼠大脑组织的记录。这说明Aβ斑块在视网膜上的沉积早于大脑组织,在AD的发病过程中视网膜可能先于大脑受累,这与李臻等<sup>[11]</sup>研究结果相一致。Koronyo-Hamaoui的研究同时也说明了姜黄素可以作为天然安全的荧光染料标记Aβ斑。

姜黄素,一种生姜提取物,具有抗炎、抗氧化、抗癌、保护神经等特性,同时,它也是安全有效的天然染料,能够特异性结合并标记Aβ蛋白。(1)抗Aβ蛋白的产生和聚集:姜黄素能够下调淀粉样前体蛋白(APP)和早老素-1(PS-1)的表达,也可以抑制淀粉样前体蛋白裂解酶(BACE1)的表达,从而减少Aβ蛋白的产生<sup>[12]</sup>,从而保护神经细胞。(2)抑制神经细胞凋亡:糖原合成酶激酶3β(glycogen synthesis kinase 3β,GSK-3β)在AD发病机制中起主要作用,它可以活化半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)诱导神经细胞凋亡,姜黄素可以抑制GSK-3β活性,从而抑制GSK-3β诱导的神经细胞凋亡,同时姜黄素能够加强具有神经保护的丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶(serine/threonine kinase,AKT)、转录因子Nrf2的表达,发挥神经保护作用<sup>[13]</sup>。(3)姜黄素作为一种姜黄染料,其与Aβ蛋白聚集形成的老年斑的自然亲和力,使得姜黄素成为安全的

老年斑块荧光染料<sup>[14]</sup>。

已有研究表明,APP、PS-1、PS-2 基因突变会导致 A $\beta$  蛋白聚集,促使形成老年斑,而 PS-1 会增强 APP 转基因小鼠体内 A $\beta$  蛋白的聚集和细胞内 Tau 蛋白过度磷酸化过程,因此,本实验采用携带有突变人 APP/PS1 基因的双转基因小鼠,从而使 AD 模型小鼠能够很好地表现出 AD 的病理表现及临床特征。在实验之初对各组小鼠进行水迷宫实验,以此来检测各组小鼠的学习、记忆能力,判断其认知功能状态,从而评估病情进展情况。本实验结果显示了 6、12 月龄 AD 模型小鼠均出现了认知功能下降,且 12 月龄 AD 模型小鼠的认知障碍程度较 6 月龄的 AD 模型小鼠更为严重,从而证明了 12 月龄 AD 模型小鼠较 6 月龄 AD 模型小鼠的病情更为严重。众多研究发现,姜黄素能够和 A $\beta$  斑特异性结合,利用这一特性,我们采用姜黄素标记联合眼底自发荧光照相技术,在活体 AD 模型小鼠的视网膜上成功标记出 A $\beta$  斑,而在各对照组的视网膜上均未发现 A $\beta$  斑,这与 Koronyo-Hamaoui 等<sup>[6]</sup> 利用姜黄素对 AD 患者及年龄匹配的正常人进行尸检,在正常老年人视网膜上未发现 A $\beta$  斑块,而生前被确诊为 AD 患者的视网膜上探测到了明显的 A $\beta$  斑块的研究结果相一致。此外,本实验研究结果发现,6 月龄 AD 模型小鼠视网膜 A $\beta$  斑阳性率为 33%,12 月龄 AD 模型小鼠视网膜 A $\beta$  斑阳性率为 100%,12 月龄 AD 模型小鼠视网膜 A $\beta$  斑阳性率明显高于 6 月龄 AD 模型小鼠,且差异有统计学意义,由此说明随着病情进展,视网膜 A $\beta$  斑阳性率也随之增加,进一步提示了姜黄素能够作为评估 AD 病情进展的生物标记物。

本研究的创新之处在于纵向比较了 AD 模型小鼠视网膜 A $\beta$  斑的阳性率与 AD 病程的相关性;不足之处在于:(1)本研究有些结果可能会受样本量的限制受到影响,有待进一步扩大样本量来研究确证;(2)视网膜 A $\beta$  斑的数量、大小与疾病进展程度存在何种关系有待进一步研究。6 月龄、12 月龄 AD 模型小鼠均出现认知功能障碍,且随着病程的延长病情逐渐加重。姜黄素标记联合眼底自发荧光照相,在活体状态下标记出 6 月龄、12 月龄 AD 模型小鼠视网膜 A $\beta$  斑,且随着 AD 病情的进展,AD 模型小鼠

视网膜 A $\beta$  斑的阳性率增加。姜黄素标记联合眼底自发荧光照相为 AD 诊断及病情评估提供了新的方便快捷无创性手段。

#### 参考文献

- 1 李晓,张卯年. Alzheimer 病与视网膜变性. 国际眼科纵览 2013;37(4):260-264
- 2 Valenti DA. Alzheimer's disease: screening biomarkers using frequency doubling technology visual field. *ISRN Neurol* 2013;2013:989583
- 3 Risacher SL, Wudunn D, Pepin SM, et al. Visual contrast sensitivity in Alzheimer's disease, mild cognitive impairment, and older adults with cognitive complaints. *Neurobiol Aging* 2013;34(4):1133-1144
- 4 Shi Z, Wu Y, Wang M, et al. Greater attenuation of retinal nerve fiber layer thickness in Alzheimer's disease patients. *J Alzheimers Dis* 2014;40(2):277-283
- 5 Cheung CY, Ong YT, Hilal S, et al. Retinal ganglion cell analysis using high definition optical coherence tomography in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2015;45(1):45-56
- 6 Koronyo-Hamaoui M, Koronyo Y, Liubimov AV, et al. Identification of amyloid plaques in retinas from Alzheimer's patients and noninvasive *in vivo* optical imaging of retinal plaques in a mouse model. *Neuroimage* 2011;54 suppl: s204-217
- 7 成璐,许迅. 通过视网膜形态功能改变探索阿尔茨海默病的早期诊断. *中华医学杂志* 2016;96(7):482-484
- 8 王春艳,郭景森,田晶,等.  $\beta$  淀粉样蛋白与阿尔茨海默病. *吉林医药学院学报* 2009;30(2):99-102
- 9 许可,李昱. 姜黄素对阿尔茨海默病患者神经保护作用的研究进展. *临床与病理杂志* 2014;34(1):93-98
- 10 卢艳,唐娜,王蓉. 阿尔茨海默病模型小鼠视网膜退行性变研究. *中国医药* 2012;7(8):1031-1032
- 11 李臻,卢艳,王蓉,等. 阿尔茨海默病模型小鼠视网膜超微结构的改变. *医学综述* 2013;19(19):3597-3599
- 12 李娟,聂晶,张敏. 姜黄素对阿尔茨海默病(AD)模型大鼠的抗痴呆作用研究. *医学研究杂志* 2013;42(6):173-176,201
- 13 廖涛,王飞,张占军,等. 姜黄素对痴呆模型小鼠学习记忆能力的改善作用及对细胞凋亡的影响. *中国药理学通报* 2009;25(10):1359-1363
- 14 刘星,耿杰峰,卜宪章,等. 姜黄素及其衍生物对 A $\beta$ 42 引起神经元损伤的保护作用. *中华老年学杂志* 2011;31(13):2522-2524