

文章编号 1006-8147(2017)05-0385-04

论 著

H102-BD 经鼻腔给药后对 PAP 双转基因 AD 小鼠行为学及脑内 APP 和 A β 蛋白表达的影响

孙凤仙,徐淑梅

(天津医科大学生理学与病理生理学系,天津 300070)

摘要 目的:观察 β 片层阻断肽 H102-BD 经鼻腔给药后对 PAP 双转基因阿尔茨海默病(AD)模型小鼠行为学、脑内 APP 及 A β 蛋白表达的影响。**方法**:将 PAP 转基因小鼠随机分为模型组和 H102-BD 给药组,并设同月龄同背景 C57BL/6J 小鼠为正常对照组。鼻腔给药 4 周后行 Morris 水迷宫实验,利用免疫组织化学方法和 Western blot 方法测定小鼠脑内 APP 和 A β 蛋白的表达。**结果**:(1)Morris 水迷宫结果显示鼻腔给予 H102-BD 后 AD 模型鼠的空间记忆能力有了明显的提高。(2)免疫组化及 Western blot 结果显示,H102-BD 可显著降低 AD 模型鼠脑内 APP 及 A β 蛋白表达。**结论**: β 片层阻断肽 H102-BD 经鼻腔给药后对 AD 有一定的治疗作用。

关键词 H102-BD;鼻腔给药;Morris 水迷宫;阿尔茨海默病;小鼠

中图分类号 R33

文献标志码 A

Effect of H102-BD on behavior and the expression of APP and A β in PAP double transgenic AD mice after intranasal administration

SUN Feng-xian, XU Shu-mei

(Department of Physiology and Pathophysiology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To investigate the effect of H102-BD on behavior and the expression of APP and A β in PAP transgenic AD mice after intranasal administration. **Methods:** The PAP transgenic mice were randomly divided into model group and H102-BD treatment group, and a group of C57BL/6J mice with the same age and background was set as normal. After intranasal administration for four weeks, the ability of spatial reference memory was tested by Morris water maze, and then the immunohistochemical stain and western blot were carried out to detect the content of APP and A β in mice brain. **Results:** (1) The memory of H102-BD group was significantly improved compared with that in model group by the test of Morris water maze. (2) The contents of APP and A β were significantly decreased in H102-BD group compared with those in model group by the test of immunohistochemical stain and western blot. **Conclusion:** β -sheet breaker H102-BD may be an effective therapeutic strategy for AD after intranasal administration.

Key words H102-BD; intranasal administration; Morris water maze; Alzheimer's disease; mice

对于很多中枢神经性系统疾病来说,由于血脑屏障的存在,多种药物尤其是蛋白质和肽类药物很难通过血脑屏障进入中枢神经系统发挥其治疗作用^[1],并且蛋白和多肽类药物容易被肠道或血液中的酶水解^[2]。该课题组在前期的研究中采用侧脑室直接给药法给予药物治疗老年痴呆模型小鼠^[3],但是该方法不能作为临床用药时的给药方法。最近发展起来的经鼻腔给药方法可以使药物绕过血脑屏障入脑,这主要是由于鼻黏膜在解剖生理上与脑部存在独特的天然联系,药物经鼻腔给药后可通过嗅觉区的嗅黏膜上皮途径及嗅神经途径直接入脑^[4-5]。

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种常见的中枢神经系统退行性疾病,其主要的病理特征有老年斑的形成、神经纤维的缠结及大量神经元的丢失。目前有多种关于 AD 发病机制的学说,如 A β 淀粉样蛋白学说、胆碱能学说、tau 蛋白异常磷酸化学说、载脂蛋白基因多态性学说、基因突变学说等等,其中 A β 毒性学说占主导地位^[6]。H102-BD 是一个能够抑制 A β 错误折叠和聚集、并可阻断其神经毒性的 β 片层阻断肽,本实验我们将研究 H102-BD 经鼻腔给药后对脑内 APP 及 A β 蛋白表达的影响,探讨 H102-BD 经鼻腔给药后对 AD 的治疗作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物 6 月龄 PAP 双转基因小鼠 20 只,同月龄 C57BL/6J 小鼠 10 只,雌雄随机提供,购自北京华阜康生物科技有限公司,饲养于天津医科大学

基金项目 国家科技重大专项基金资助(2009ZX09103-029);天津市科技计划项目(16YFZCSY01000)

作者简介 孙凤仙(1984-),女,助理实验师,硕士,研究方向:生理学;通信作者:徐淑梅,E-mail:xushm@tmu.edu.cn。

动物中心。

1.2 主要药物及试剂 H102-BD 用固相合成法合成,高效液相色谱纯化,经质谱仪(MS)分析鉴定纯度均>95%,由上海吉尔生物公司合成。APP 抗体购自 Abcam 公司,A β 1-42 抗体购于 Chmecon 公司,DAB 显色试剂盒及即用型 SABC 免疫组化试剂盒购自武汉博士德生物公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及给药方法 将 PAP 双转基因小鼠 20 只,随机分为 H102-BD 给药组及 AD 模型组,同月龄同背景的 C57BL/6J 小鼠作为正常对照组。H102-BD 给药组每日经鼻腔给予 32.6 mg/mL H102-BD 溶液 5 μ L,正常对照组及 AD 模型组每日给予同等体积的 H102-BD 空白辅料溶液(0.5% 壳聚糖、0.1% BSA),每日给药 1 次,给药 30 d。30 d 后行 Morris 水迷宫实验^[7]。Morris 水迷宫实验结束后,取脑,一半脑组织放入 4% 多聚甲醛溶液内固定,蜡块包埋切片,一半脑组织分离海马与皮层放于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

1.3.2 免疫组化染色 组织切片常规脱蜡至水;3% H₂O₂ 室温孵育 10 min,以消除内源酶活性;枸橼酸缓冲液微波沸腾抗原修复,5 min \times 2 次,取出冷却至室温;5% BSA 封闭 15 min;分别加入稀释一定比例的一抗(A β 1:100、APP 1:100)工作液,4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜;根据一抗来源分别滴加相应生物素标记的羊抗鼠和羊抗兔通用二抗,37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min。滴加 SABC 液,37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min;DAB 显色剂显色,苏木素复染,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,于显微镜下观察。阴性对照用 0.01 mol/L PBS 溶液代替一抗,其余步骤相同。

1.3.3 Western blot 检测 于冰箱中取出分离的小鼠海马和皮层组织,根据组织量加入适量蛋白裂解液匀浆,BCA 法测定蛋白后调定各组蛋白为等浓度,加适量上样缓冲液,煮沸变性 5 min。10%~15% 分离胶电泳分离蛋白后湿转到 PVDF 膜上,膜用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,TBS-T 漂洗后加入一定比例(A β 1:500,APP 1:1 000)的一抗,4 $^{\circ}$ C 过夜,加入稀释的二抗(1:5 000),室温下孵育 2 h,然后化学发光法曝光。

1.4 统计学分析 所得数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS17.0 统计学软件处理数据,各组间的比较采用单因素方差分析法。

2 结果

2.1 行为学实验结果

2.1.1 逃避潜伏期的比较 模型组小鼠的逃避潜

伏期显著长于正常组($P<0.01$),H102-BD 给药组与模型组相比,逃避潜伏期明显缩短($P<0.01$),见表 1。

表 1 各组小鼠每天平均逃避潜伏期变化 ($n=10,\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Comparison of average escape latency in navigation test among three groups of mice ($n=10,\bar{x}\pm s$)

时间	对照组	模型组	H102-BD 给药组
1 d	41.224 \pm 9.743	78.740 \pm 15.366 [#]	53.058 \pm 8.567 [*]
2 d	20.962 \pm 3.327	78.428 \pm 19.941 [#]	20.403 \pm 10.683 [*]
3 d	17.316 \pm 8.285	78.238 \pm 22.879 [#]	20.743 \pm 9.588 [*]
4 d	15.575 \pm 4.677	71.305 \pm 12.354 [#]	18.279 \pm 7.279 [*]
5 d	13.512 \pm 3.640	63.969 \pm 19.059 [#]	11.625 \pm 2.953 [*]

与对照组相比,[#] $P<0.01$;与模型组相比,^{*} $P<0.01$

2.1.2 跨越隐性平台的次数及朝向角的比较 模型组与正常对照组相比小鼠跨越隐性平台的次数明显减少,入水朝向角明显增大($P<0.01$)。与模型组相比,H102-BD 给药组小鼠跨越隐性平台的次数显著增多,入水朝向角显著减小($P<0.01$),见表 2。

表 2 各组小鼠空间探索实验中穿越隐性平台的次数及朝向角比较 ($n=10,\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Comparison of frequency span hidden PL atform and the original angle in space exploration experiment among three groups of mice ($n=10,\bar{x}\pm s$)

组别	跨越隐性平台次数/(次/90s)	入水朝向角/度
对照组	2.00 \pm 0.894	43.514 \pm 22.098
模型组	0.17 \pm 0.408 [#]	132.746.17 \pm 34.532 [#]
H102-BD 给药组	1.80 \pm 0.837 [*]	47.175 \pm 23.706 [*]

与对照组相比,[#] $P<0.01$;与模型组相比,^{*} $P<0.01$

2.2 免疫组化法测定小鼠脑内 APP 及 A β 蛋白的表达

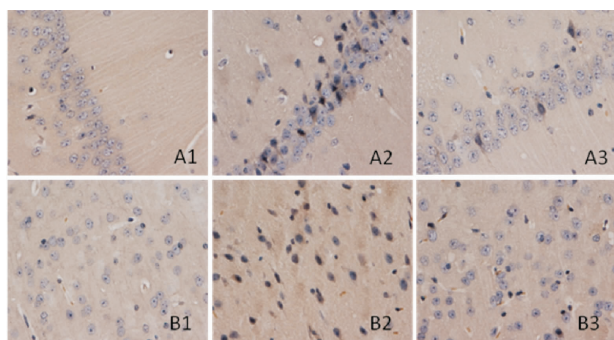
2.2.1 H102-BD 对脑内 APP 表达的影响 APP 免疫组化染色结果显示,与正常对照组相比,模型组小鼠脑内阳性细胞数较多,阳性细胞率明显提高($P<0.01$),APP 表达明显较高;H102-BD 给药组小鼠脑内阳性细胞率较模型组显著降低($P<0.01$),APP 表达明显较低。见表 3,图 1。

表 3 各组小鼠皮层及海马 CA1 区 APP 活性比较 ($n=10,\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Expression of APP detected in cerebral cortex and hippocampal CA1 area by immunohistochemistry ($n=10,\bar{x}\pm s$)

组别	阳性率/%	
	皮层	海马 CA1 区
对照组	14.68 \pm 4.08	13.59 \pm 9.15
模型组	80.80 \pm 14.62 [#]	53.93 \pm 19.40 [#]
H102-BD 给药组	15.76 \pm 6.43 [*]	17.87 \pm 8.05 [*]

与对照组相比,[#] $P<0.01$;与模型组相比,^{*} $P<0.01$



1:正常对照组 2:模型组 3:H102-BD 给药组;

A:海马 CA1 区 B:大脑皮层

图1 各组小鼠大脑皮层及海马 CA1 区 APP 表达($\times 400$)

Fig 1 Expressions of APP detected in cerebral cortex and hippocampal CA1 area by immunohistochemistry($\times 400$)

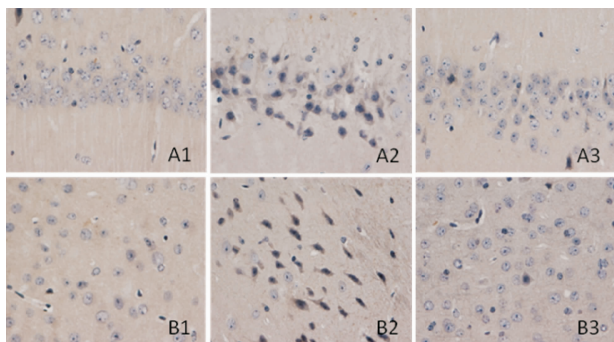
2.2.2 H102-BD 对脑内 A β 表达的影响 与正常对照组相比,模型组小鼠海马 CA1 区及皮层神经细胞浆着色明显加深成强阳性,阳性细胞率明显较高,A β 表达增强($P < 0.01$)。给药组较模型组细胞浆着色较浅,阳性细胞率较低,A β 表达较弱($P < 0.01$)。见表 4,图 2。

表 4 各组小鼠皮层及海马 CA1 区 A β 活性比较 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab 4 Expressions of A β detected in cerebral cortex and hippocampal CA1 area by immunohistochemistry ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	阳性率/%	
	皮层	海马 CA1 区
对照组	16.91 \pm 4.93	9.77 \pm 4.55
模型组	85.90 \pm 7.67 [#]	49.01 \pm 21.00 [#]
H102-BD 给药组	16.32 \pm 7.66 [*]	9.36 \pm 3.68 [*]

与对照组相比,[#] $P < 0.01$;与模型组相比,^{*} $P < 0.01$



1:正常对照组 2:模型组 3:H102-BD 给药组

A:海马 CA1 区 B:大脑皮层

图2 各组小鼠大脑皮层及海马 CA1 区 A β 表达的影响($\times 400$)

Fig 2 Expressions of A β detected in cerebral cortex and hippocampal CA1 area by immunohistochemistry($\times 400$)

2.3 Western blot 实验结果 Western blot 结果显示,与正常对照组比较,模型组小鼠蛋白条带明显增粗,颜色加深,APP 及 A β 蛋白的表达量显著增

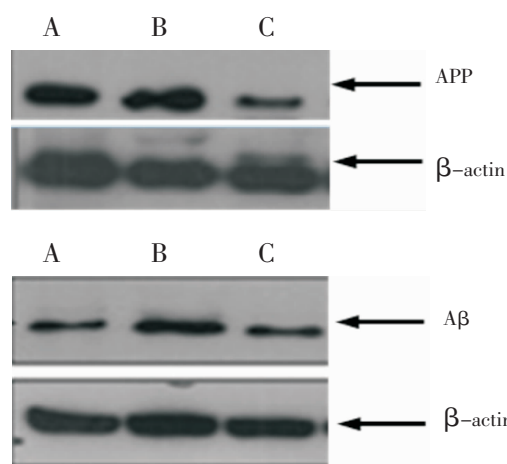
多,差异有统计学意义($P < 0.01$);H102-BD 给药组明显降低了 AD 小鼠脑内 APP 及 A β 表达,蛋白条带明显变细,颜色变浅,与模型组相比,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 5,图 3。

表 5 各组小鼠脑内 APP 及 A β 蛋白相对表达量 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab 5 Expressions of APP and A β detected in mice brain by Western blot assay ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	APP 蛋白相对表达量	A β 蛋白相对表达量
对照组	0.701 \pm 0.223	0.610 \pm 0.094
模型组	1.286 \pm 0.107 [#]	1.141 \pm 0.253 [#]
H102-BD 给药组	0.643 \pm 0.098 [*]	0.604 \pm 0.070 [*]

与对照组相比,[#] $P < 0.01$;与模型组相比,^{*} $P < 0.01$



A:正常对照组 B:模型组 C:H102-BD 给药组

图3 Western blot 检测各组小鼠脑内 APP 及 A β 蛋白的表达

Fig 3 Expressions of APP and A β detected in mice brain by Western blot assay

3 讨论

神经系统的很多疾病特别是老年性神经退行性疾病,如阿尔茨海默病、帕金森疾病、血管性痴呆等,一直困扰着病人。现有的治疗大部分都是通过口服或静脉给药,但由于存在血脑屏障,能有效到达脑组织起到治疗作用的药物含量很低^[8-9],生物利用度仅约 0.01%~0.1%。最近,随着多种给药系统的发展,鼻腔给药越来越引起学者关注。鼻腔可分为前庭区、呼吸区和嗅觉区。呼吸区的黏膜较厚,黏膜下分布着丰富的毛细血管、静脉窦等,是药物经鼻腔给药进入体循环的主要途径;嗅觉区主要由支持细胞构成,其间分布着嗅神经,嗅神经纤维聚集成束,穿过位于黏膜下的筛孔,与大脑的嗅球相连,这是唯一与外周系统直接相通的部位^[9]。鼻腔给药后,药物可以被嗅神经元轴突摄取后经轴突、神经束,到达嗅球,进入脑内;也可以通过嗅觉区支持细胞和嗅神经之间的间隙直接进入脑组织内^[10]。因此经

鼻给药可以使药物绕过血脑屏障靶向递到脑部,为治疗中枢神经系统疾病提供了一种极有发展前景的给药途径,这也就使得通过鼻腔给药治疗阿尔茨海默病成为可能。

阿尔茨海默病是老年痴呆各种类型中最常见的形式,是主要伴有认知障碍和记忆损伤的中枢神经退行性疾病。众多的实验研究表明 A β 淀粉样蛋白是各种原因诱发 AD 的共同通路,是 AD 形成和发展的关键因素^[1]。A β 寡聚物既可通过 GSK-3 β 诱导 tau 蛋白过度磷酸化^[12-13],又可直接引起 tau 蛋白异常磷酸化和神经元纤维缠结的形成^[14]。A β 沉积物可直接激活小胶质细胞引起其释放 IL-1、IL-6、TNF- α 等致炎细胞因子,进而使星形胶质细胞被激活释放炎性蛋白,这些炎性蛋白可进一步促进 A β 沉积,形成恶性循环,使脑中慢性神经炎症长期存在,引发大量神经细胞凋亡^[15]。A β 也可以诱发小胶质细胞产生大量的过氧自由基(ROS、NO 等),造成脂质过氧化,再透过介导凋亡和兴奋性神经毒性作用最终导致神经元丢失^[16]。由此可见 A β 在 AD 发病机制中起着核心作用,因此减少 A β 的形成、抑制 A β 聚集是预防和治疗 AD 的根本途径^[6,17]。

本研究中的药物 H102-BD 的设计就是根据 A β 的化学结构特性和聚集原理,利用计算机药物设计平台-DDS-VM 系统,通过药物靶向的三维立体显示设计出的,该类药物是由 10 个氨基酸组成、C 端经腐胺修饰的十肽。H102-BD 含有 β 折叠抑制剂脯氨酸、与 A β 疏水区域相结合的氨基酸及与 A β 片段中相反电荷的氨基酸,从而达到与 A β 的结合,抑制 A β 自身的 β 折叠的形成和 β -折叠间的相互结合,减少 A β 聚合物的沉积,从而降低 A β 寡聚物的神经毒性。

本实验结果表明,H102-BD 经鼻腔给药后能够入脑与 A β 结合,减少 A β 的表达,抑制了 A β 的错误折叠,减少 A β 寡聚物的毒性,同时减少了 APP 的表达,提高 AD 小鼠的学习记忆能力。因此该药物可通过鼻腔给药达到治疗 AD 的作用。

参考文献:

- [1] Lalatsa A, Schatzlein A G, Uchegbu I F. Strategies to deliver peptide drugs to the brain[J]. *Mol Pharm*, 2014,11(4):1081
- [2] Gao H, Pang Z, Jiang X. Targeted delivery of nano-therapeutics for major disorders of the central nervous system[J]. *Pharm Res*, 2013, 30(10):2485
- [3] Lin L X, Bo X Y, Tan Y Z, et al. Feasibility of β -sheet breaker peptide-H102 treatment for Alzheimer's disease based on β -amyloid hypothesis[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11):e112052
- [4] Ghalamfarsa G, Hojjat-Farsangi M, Mohammadnia-Afrouzi M, et al. Application of nanomedicine for crossing the blood-brain barrier: theranostic opportunities in multiple sclerosis[J]. *J Immunotoxicol*, 2016,13(5):603
- [5] Schaefer M L, Böttger B, Silver W L, et al. Trigeminal collaterals in the nasal epithelium and olfactory bulb: a potential route for direct modulation of olfactory information by trigeminal stimuli[J]. *J Comp Neurol*, 2002, 444(3):221
- [6] Hardy J, Selkoe D J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics[J]. *Science*, 2002, 297(5580):353
- [7] 王冰艳,孙凤仙,林来祥,等. β 片层阻断肽 H102 对 PAP 小鼠脑内 ERK 信号转导通路的影响[J]. *天津医药*, 2014, 42(7):650
- [8] Graft C L, Pollack G M. Nasal drug administration: potential for targeted central nervous system delivery[J]. *J Pharm Sci*, 2005, 94(6): 1187
- [9] Illum L. Nasal drug delivery-possibilities, problems and solutions[J]. *J Control Release*, 2003,87(1/3):187
- [10] Mittal D, Ali A, Md S, et al. Insights into direct nose to brain delivery: current status and future perspective[J]. *Drug Deliv*, 2014, 21(2):75
- [11] Ryan S D, Whitehead S N, Swayne L A, et al. Amyloid- β 42 signals tau hyperphosphorylation and compromises neuronal viability by disrupting alkylacylglycerophosphocholine metabolism[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2009, 106(49): 20936
- [12] Huang J, Chen Y J, Bian W H, et al. Unilateral amyloid- β 25-35 injection into the rat amygdala increases the expressions of aberrant tau phosphorylation kinases[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2010, 123(10): 1311
- [13] Llorens-Martín M, Jurado J, Hernández F, et al. GSK-3 β , a pivotal kinase in Alzheimer disease[J]. *Front Mol Neurosci*, 2014, 7(46):1
- [14] De Felice F G, Wu D, Lambert M P, et al. Alzheimer's disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by A beta oligomers[J]. *Neurobiol Aging*, 2008, 29(9):1334
- [15] Yu X, Wang L N, Du Q M, et al. Akebia Saponin D attenuates amyloid β -induced cognitive deficits and inflammatory response in rats: involvement of Akt/NF- κ B pathway[J]. *Behav Brain Res*, 2012, 235(2):200
- [16] Saha R N, Pahan K. Regulation of inducible nitric oxide synthase gene in glial cells[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2006, 8(5/6):929
- [17] Frenzel D, Glück J M, Brener O, et al. Immobilization of homogeneous monomeric, oligomeric and fibrillar A β species for reliable SPR measurements[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3):e89490

(2017-03-06 收稿)