

A β 3-10KLH疫苗改善SAMP8小鼠认知功能和脑衰老

刘欣^{1,2}, 曹云鹏¹, 赵传胜¹

(1. 中国医科大学附属第一医院神经内科, 沈阳 110001; 2. 北华大学附属医院神经二科, 吉林 吉林 132011)

摘要 **目的** 探讨A β 3-10KLH主动免疫对SAMP8小鼠模型脑衰老的影响。**方法** 采用A β 3-10KLH疫苗免疫SAMP8小鼠, 并设立对照组。通过Morris水迷宫实验观察行为学变化, HE染色观察海马组织形态变化, 采用SA- β -gal染色检测海马衰老细胞比例, 生化试剂盒检测氧化应激损伤指标丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)活性变化, 评估海马氧化应激损伤水平。**结果** A β 3-10KLH疫苗能减缓SAMP8小鼠海马组织细胞衰老, 提高SAMP8小鼠记忆能力($P < 0.05$); 改善海马组织形态; 减少海马组织衰老细胞比例($P < 0.05$), 降低MDA含量($P < 0.05$), 提高SOD活性($P < 0.05$)。**结论** A β 3-10KLH疫苗能显著改善SAMP8小鼠认知功能, 减缓海马神经细胞衰老, 并减少氧化应激损伤。

关键词 阿尔茨海默病; 脑衰老; 氧化应激

中图分类号 R749.1 文献标志码 A 文章编号 0258-4646(2024)11-0979-05

网络出版地址 <https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20241120.1428.020>

DOI:10.12007/j.issn.0258-4646.2024.11.004

Improved cognitive function and brain aging in SAMP8 mice after A β 3-10KLH vaccine

LIU Xin^{1,2}, CAO Yunpeng¹, ZHAO Chuansheng¹

(1. Department of Neurology, The First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China; 2. Department of Neurology II, Affiliated Hospital of Beihua University, Jilin 132011, China)

Abstract **Objective** This study aimed to investigate the effects of A β 3-10KLH active immunization on brain aging in the SAMP8 rapid aging mouse model using oxidative stress as the entry point. **Methods** SAMP8 mice were immunized with the A β 3-10KLH vaccine, and a control group was established. Behavioral changes were observed using the Morris water maze test, and hippocampal morphological changes were examined using hematoxylin and eosin staining. The proportion of senescent cells in the hippocampus was detected using SA- β -gal staining. Biochemical kits were used to measure the changes in oxidative stress injury indicators malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) activities to assess oxidative stress damage in the hippocampus. **Results** The A β 3-10KLH vaccine attenuated cellular aging in the hippocampi of SAMP8 mice. It also improved memory ability ($P < 0.05$), ameliorated hippocampal tissue morphology, decreased the proportion of senescent cells in the hippocampus ($P < 0.05$), lowered MDA content ($P < 0.05$), and upregulated SOD activity ($P < 0.05$). **Conclusion** The A β 3-10KLH vaccine significantly improves cognitive function in SAMP8 mice, slows down the aging of hippocampal neurons, and reduces oxidative stress damage.

Keywords Alzheimer disease; brain aging; oxidative stress

阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)作为一种慢性神经系统变性疾病,发病率逐年上升^[1]。AD以其特有的认知功能渐进性恶化为显著特征,最终导致患者记忆丧失、思维混乱,严重损害其日常生活功能。 β 淀粉样蛋白(amyloid β -protein, A β)与AD的发病紧密相关,并可能通过诱导细胞衰老等机制

加剧其病理变化^[2]。

随着年龄的增长,脑组织中会出现一系列与AD相关的病理现象,其中A β 的沉积尤为显著。同时,衰老的神经细胞周围普遍存在着微管相关蛋白tau神经纤维缠结等特征,这些变化都大大增加了AD的发生率^[3]。衰老是一个由生物、化学或物理过程的负面后果介导的复杂过程,其中一个重要的表现为分子损伤的积累。在机体的衰老过程中,脑衰老表现得尤为突出,而这一过程常伴随着AD发生率的增加^[4]。为了更准确地评估衰老状况及其与AD的关系,研究者们提出了多种指标,如衰老细胞的比例

基金项目:辽宁省科学技术计划(2023JH2/101300043)

作者简介:刘欣(1992-),女,主治医师,博士研究生。

通信作者:曹云鹏, E-mail: cypemu@163.com

收稿日期:2024-07-23

网络出版时间:2024-11-21 11:15:00

以及氧化应激水平等,为深入研究AD的发病机制和寻找有效的治疗方法提供了新的思路^[5]。

前期研究^[6]显示,A β 3-10KLH多肽疫苗能够诱导产生高浓度的抗A β 抗体,有效清除A β 斑块,减轻脑组织的炎症反应,并对突触产生保护作用。SAMP8小鼠是从AKR/J品系中精心培育出的快速衰老模型,能够自发地模拟出与AD相关的病理改变。本研究旨在探讨A β 3-10KLH疫苗在延缓SAMP8小鼠脑衰老中的作用,为后期的临床试验提供实验支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:3月龄的雄性SAMP8小鼠和雄性SAMR1小鼠均购自江苏华创信诺医药科技有限公司。提供足量无菌饲料和饮水,小鼠饲养的条件温度为(22±2)℃,湿度为45%~65%,12 h的昼夜交替。其中,光照期发生在7:00~19:00,适应性饲养时间为1周。本研究经中国医科大学动物伦理委员会批准(CMU2023006)。

1.1.2 主要试剂及仪器:A β 3-10KLH多肽疫苗委托南京金斯瑞生物科技有限公司合成,其氨基酸序列为EFRHDSGY。疫苗通过固相合成法及高效液相色谱法纯化,纯度达到96.2%,并通过质谱法验证其相对分子质量为1 113.17。在合成多肽的C端添加一个半胱氨酸用于偶联血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin, KLH)。弗氏不完全佐剂、弗氏完全佐剂购自美国Sigma-Aldrich公司,衰老细胞 β -半乳糖苷酶(senescence-associated β -galactosidase, SA- β -gal)染色试剂盒购自武汉谷歌生物科技有限公司,超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性检测试剂盒购自北京索莱宝生物科技有限公司,丙二醛(malonic dialdehyde, MDA)检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,水迷宫仪器购自上海欣软信息科技有限公司,包埋机购自武汉俊杰电子有限公司,冰冻切片机购自美国Thermo Fisher Scientific公司,组织摊片机购自浙江省金华市科迪仪器设备有限公司,显微镜购自日本Nikon公司,石蜡切片机购自德国Leica公司,酶标仪购自美国Thermo Fisher Scientific公司,离心机购自德国Eppendorf公司。

1.2 分组

将3月龄雄性小鼠分为SAMR1组、SAMP8组和

SAMP8+A β 3-10KLH组。SAMR1组和SAMP8组注射PBS缓冲液100 μ L, SAMP8+A β 3-10KLH组注射A β 3-10KLH疫苗溶液100 μ L,浓度为1 μ g/ μ L^[6]。各组均为颈项部皮下注射,注射间隔为14 d,共注射10次。

1.3 Morris水迷宫检测小鼠的认知功能

水迷宫为圆形水池,直径1.2 m,水深0.37 m,水温22℃。水池分为4个象限,透明隐藏平台设置在东南象限。实验分为熟悉训练、定位航行实验和空间探索实验3个阶段。熟悉训练旨在让小鼠熟悉水池环境;定位航行实验持续5 d,评估小鼠的空间学习能力,记录其到达平台的时间;空间探索实验于第6天进行,分析小鼠在无平台情况下的游泳轨迹,评估其记忆能力。若小鼠在90 s内未找到平台,实验结束,引导其上平台休息,并对小鼠在各象限停留时间和路线进行分析。

1.4 HE染色检测海马区神经组织

4%多聚甲醛固定48 h,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切片(厚4 μ m),烤片,脱蜡再水化, Harris苏木素染色6 min,分化反蓝,伊红染色3 min,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜下观察。

1.5 SA- β -gal染色检测小鼠海马组织衰老细胞比例

按照说明书配置工作液,取小鼠脑组织冰冻切片自然晾干,固定20 min后用SA- β -gal染色液染色,置于PBS缓冲液中浸洗。切片充分染色,在37℃闭光湿箱中孵化18 h。显色后弃染液,用PBS缓冲液和纯水浸洗。核固红染液染色3 min,流水冲洗。切片经无水乙醇脱水、二甲苯透明后封片。衰老细胞胞质呈蓝色,细胞核呈红色。使用显微镜观察海马组织中衰老细胞的比例,并通过ImageJ软件扫描积分光密度(integral optical density, IOD)值进行计算。

1.6 MDA试剂盒检测海马组织MDA浓度

准确称取10 mg海马组织样本,加入适量的裂解液在低温的条件下组织匀浆,12 000 r/min冷冻离心5 min。收集上清后检测每个样本的蛋白浓度。分别配置MDA检测工作液和TBA储存液,稀释标准品及样品测定按照试剂盒说明书操作。使用酶标仪在波长532 nm处测定吸光度,根据标准曲线计算浓度。

1.7 SOD试剂盒检测海马组织SOD活性

海马组织匀浆后上清蛋白定量,样本检测按照试剂盒说明书进行操作,使用酶标仪在波长450 nm

处测定吸光度。根据公式计算样本中的SOD活性。

1.8 统计学分析

采用GraphPad Prism8.0.3软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。行为学数据采用重复测量方差分析,其余数据采用单因素方差分析,并用Tukey's进行事后检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Aβ3-10KLH疫苗改善SAMP8小鼠的认知功能

在定位航行实验阶段,随着训练天数的增加,3组小鼠找到平台的时间均变短,但组间比较无统计学差异($P > 0.05$),见表1。在空间探索实验阶段,与SAMR1组小鼠对比,SAMP8组和SAMP8+Aβ3-10KLH组小鼠在目标象限的停留时间均有所下降($P <$

0.05);而与SAMP8组小鼠相比,SAMP8+Aβ3-10KLH组小鼠在目标象限的停留时间则显著延长($P < 0.05$),见表2。结果表明,与SAMR1组相比,SAMP8组和SAMP8+Aβ3-10KLH组小鼠的记忆能力均有所下降($P < 0.05$);而SAMP8+Aβ3-10KLH组小鼠的记忆能力较SAMP8组小鼠有所提高($P < 0.05$)。

2.2 Aβ3-10KLH改善海马区神经细胞形态

HE染色结果显示,SAMR1组小鼠海马CA1区可见排列紧密且形态规整的神经细胞,细胞质清晰、细胞核可见。SAMP8组小鼠海马CA1区神经细胞形态受损,排列松散,部分细胞出现核固缩现象。与SAMP8组小鼠相比,SAMP8+Aβ3-10KLH组小鼠则表现出明显的改善,小鼠海马CA1区神经细胞排列更为有序,且核固缩现象显著减少。见图1。

表1 寻找隐藏平台的潜伏期 ($\bar{x} \pm s, s$)

Tab.1 Latency to identification of hidden platform in spatial navigation test ($\bar{x} \pm s, s$)

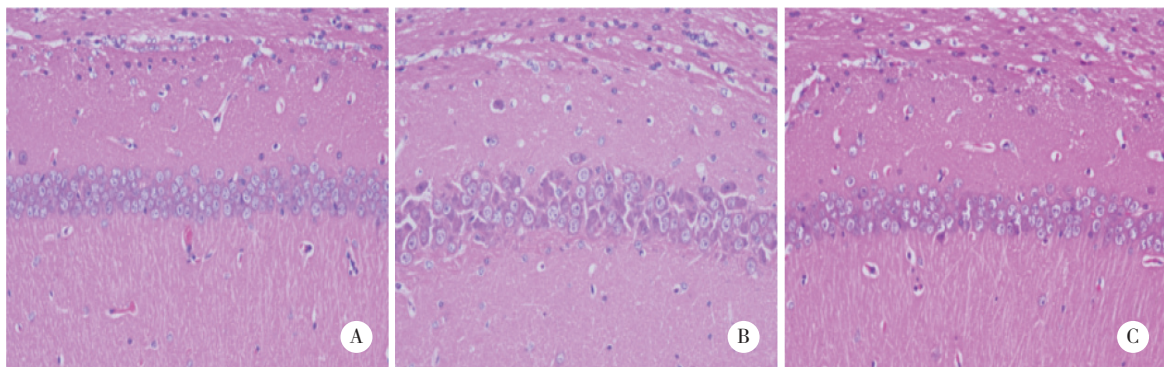
Group	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5
SAMR1	46.02 ± 20.81	34.92 ± 18.07	16.83 ± 4.04	17.21 ± 10.12	19.77 ± 7.01
SAMP8	44.90 ± 9.44	42.16 ± 14.95	31.24 ± 15.28	28.16 ± 14.44	28.83 ± 20.96
SAMP8+Aβ3-10KLH	40.04 ± 17.28	38.83 ± 21.67	21.74 ± 7.87	22.16 ± 9.69	26.23 ± 21.12

表2 空间探索实验中目标象限停留时间和其他象限平均停留时间 ($\bar{x} \pm s, s$)

Tab.2 Time spent in target quadrant and average time spent in other quadrants during spatial exploration test ($\bar{x} \pm s, s$)

Group	Target zone	Other zone
SAMR1	31.48 ± 5.20	17.66 ± 2.37
SAMP8	7.03 ± 5.62 ¹⁾	24.00 ± 2.87 ¹⁾
SAMP8+Aβ3-10KLH	23.30 ± 4.22 ^{1),2)}	20.13 ± 1.41 ²⁾

1) $P < 0.05$ vs. SAMR1 group; 2) $P < 0.05$ vs. SAMP8 group.



A, SAMR1 group; B SAMP8 group; C, SAMP8+Aβ3-10KLH group.

图1 海马CA1区组织形态 HE染色 × 200

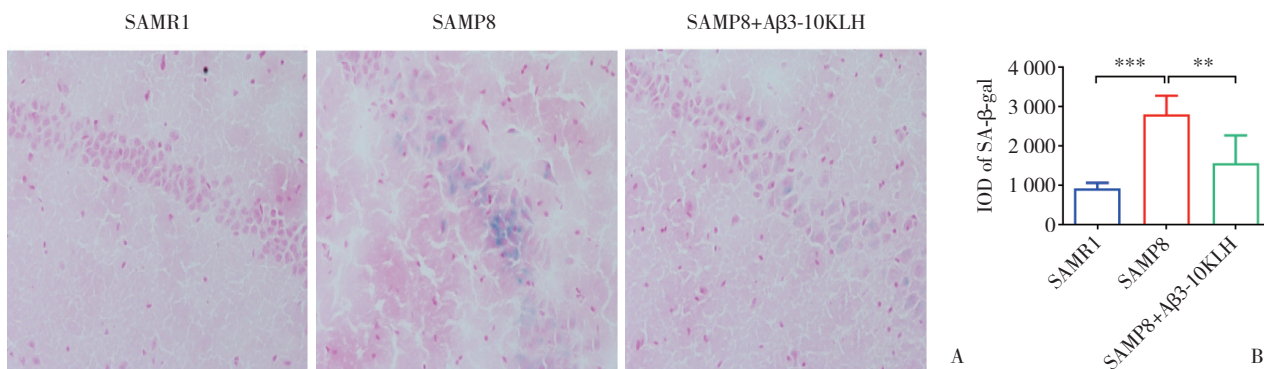
Fig.1 Hippocampal CA1 region tissue morphology Hematoxylin and eosin staining × 200

2.3 Aβ3-10KLH减少SAMP8小鼠海马组织中衰老细胞比例

SA-β-gal染色观察3组小鼠海马组织阳性着色的衰老细胞比例结果显示,与SAMR1组比较,SAMP8组衰老细胞比例明显增加($P < 0.05$),可以观察到明显的被染成蓝色的阳性着色衰老细胞。与SAMP8组比较,SAMP8+Aβ3-10KLH组海马组织中衰老细胞的比例减少($P < 0.05$)。见图2。

2.4 Aβ3-10KLH减轻SAMP8小鼠海马组织中的氧化应激损伤

与SAMP1组小鼠相比,SAMP8组和SAMP8+Aβ3-10KLH组小鼠海马细胞内MDA浓度增加,SOD活性降低。与SAMP8组小鼠相比,SAMP8+Aβ3-10KLH组小鼠海马细胞内MDA浓度显著降低($P < 0.05$),SOD活性明显增加($P < 0.05$),见表3。



A, SA-β-gal staining (×200); B, IOD of positive expression of senescent cells detected by SA-β-gal staining. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图2 Aβ3-10KLH减少SAMP8小鼠海马衰老细胞比例

Fig.2 Aβ3-10KLH reduces proportions of senescent cells in hippocampi of SAMP8 mice

表3 3组小鼠海马组织MDA浓度和SOD活性 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.3 MDA concentration and SOD activity in hippocampal tissue by study group ($\bar{x} \pm s$)

Group	MDA (μmol/mg)	SOD activity (U/mg)
SAMR1	90.49 ± 30.27	91.09 ± 14.64
SAMP8	299.12 ± 37.43 ¹⁾	40.80 ± 5.11 ¹⁾
SAMP8+Aβ3-10KLH	179.44 ± 44.07 ^{1),2)}	74.44 ± 11.39 ²⁾

1) $P < 0.05$ vs. SAMR1 group; 2) $P < 0.05$ vs. SAMP8 group.

3 讨论

AD是一种进行性的神经系统变性疾病,对患者的日常生活和社交能力造成了严重的影响。随着AD病情的恶化,患者可能会出现行为异常、情绪波动以及睡眠障碍等症状^[7]。目前,AD的病因尚未确定,但遗传、环境和年龄等可能是其发病的重要因素。神经细胞衰老作为AD病理过程中的一个核心环节,与患者认知能力的下降密切相关^[8]。因此,研究神经细胞衰老对于揭示AD的发病机制具有重要的意义。

本研究观察到AD模型SAMP8小鼠海马组织中出现了核固缩现象,衰老细胞比例明显增加,并且MDA含量增高,这进一步证实了衰老在AD发病过程中的重要作用。海马是大脑中与学习、记忆和情感等高级功能密切相关的关键区域,在AD的发展中往往最早受到影响^[9]。研究^[10]显示,诱发细胞衰老的主要因素之一是高水平的活性氧,而在AD的早期即可观察到氧化应激的特征。Aβ3-10KLH疫苗能够减少SAMP8小鼠海马组织中MDA的生成,提高SOD的活性。MDA是脂质过氧化的副产物,在神经退行性疾病中常常升高,提示存在氧化损伤^[11],而SOD则是

一种重要的抗氧化防御机制^[12]。因此, Aβ3-10KLH疫苗可能通过特定信号通路增强抗氧化剂, 从而减轻与衰老神经细胞相关的氧化应激, 发挥其有益作用。

空间探索实验结果显示, 应用Aβ3-10KLH后SAMP8小鼠的记忆能力有所提升, 这表明Aβ3-10KLH能够减缓SAMP8小鼠认知功能的退化, 有效提高小鼠的认知功能。此外, Aβ3-10KLH疫苗还能改善SAMP8小鼠的神经细胞形态, 减少海马区神经细胞的核固缩现象。通过SA-β-gal染色观察海马组织的衰老细胞, 发现Aβ3-10KLH疫苗能降低SAMP8小鼠海马区衰老细胞的比例。

综上所述, 本研究中Aβ3-10KLH疫苗能够降低海马组织衰老细胞比例、抑制氧化应激损伤, 并延缓神经细胞衰老过程。尽管Aβ3-10KLH疫苗在延缓脑衰老方面的潜力已初步显现, 但其具体作用机制, 特别是与免疫系统的相互作用及调节氧化应激的途径, 仍有待深入探讨。未来的研究将致力于阐明相关机制, 以期为该疫苗在AD预防和治疗中的应用提供坚实的理论基础和新的策略方向。

参考文献:

- [1] 徐勇, 王军, 王虹峥, 等. 2023中国阿尔茨海默病数据与防控策略[J]. 阿尔茨海默病及相关病, 2023, 6(3): 175-192. DOI: 10.3969/j.issn.2096-5516.2023.03.001.
- [2] ZHANG PS, KISHIMOTO Y, GRAMMATIKAKIS I, et al. Senolytic therapy alleviates Aβ-associated oligodendrocyte progenitor cell senescence and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model [J]. *Nat Neurosci*, 2019, 22(5): 719-728. DOI: 10.1038/s41593-019-0372-9.
- [3] SCHELTENS P, DE STROOPER B, KIVIPELTO M, et al. Alzheimer's disease [J]. *Lancet*, 2021, 397(10284): 1577-1590. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)32205-4.
- [4] GONZALES MM, GARBARINO VR, MARQUES ZILLI E, et al. Senolytic therapy to modulate the progression of Alzheimer's disease (SToMP-AD): a pilot clinical trial [J]. *J Prev Alzheimers Dis*, 2022, 9(1): 22-29. DOI: 10.14283/jpad.2021.62.
- [5] LIGUORI I, RUSSO G, CURCIO F, et al. Oxidative stress, aging, and diseases [J]. *Clin Interv Aging*, 2018, 13: 757-772. DOI: 10.2147/CIA.S158513.
- [6] ZHANG XY, MENG Y, YAN XJ, et al. Immunization with Aβ3-10KLH vaccine improves cognitive function and ameliorates mitochondrial dysfunction and reduces Alzheimer's disease-like pathology in Tg-APP^{swe}/PSEN1^{de9} mice [J]. *Brain Res Bull*, 2021, 174: 31-40. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2021.05.019.
- [7] JAROUDI W, GARAMI J, GARRIDO S, et al. Factors underlying cognitive decline in old age and Alzheimer's disease: the role of the hippocampus [J]. *Rev Neurosci*, 2017, 28(7): 705-714. DOI: 10.1515/revneuro-2016-0086.
- [8] BUSSIAN TJ, AZIZ A, MEYER CF, et al. Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline [J]. *Nature*, 2018, 562(7728): 578-582. DOI: 10.1038/s41586-018-0543-y.
- [9] HORIE K, BARTHÉLEMY NR, SATO C, et al. CSF tau microtubule binding region identifies tau tangle and clinical stages of Alzheimer's disease [J]. *Brain*, 2021, 144(2): 515-527. DOI: 10.1093/brain/awaa373.
- [10] HSU YC, HUANG Y, TSAI SY, et al. Efficacy of probiotic supplements on brain-derived neurotrophic factor, inflammatory biomarkers, oxidative stress and cognitive function in patients with Alzheimer's dementia: a 12-week randomized, double-blind active-controlled study [J]. *Nutrients*, 2023, 16(1): 16. DOI: 10.3390/nu16010016.
- [11] PARK MW, CHA HW, KIM J, et al. NOX4 promotes ferroptosis of astrocytes by oxidative stress-induced lipid peroxidation via the impairment of mitochondrial metabolism in Alzheimer's diseases [J]. *Redox Biol*, 2021, 41: 101947. DOI: 10.1016/j.redox.2021.101947.
- [12] CHIDAMBARAM SB, ANAND N, VARMA SR, et al. Superoxide dismutase and neurological disorders [J]. *IBRO Neurosci Rep*, 2024, 16: 373-394. DOI: 10.1016/j.ibneur.2023.11.007.

(编辑 于 溪)