

【基础研究】

通信作者:董月青(1972-),男,河北河间人,博士,副主任医师,研究方向:脑损伤再生修复;E-mail:dyq301@sohu.com

stereotactically injected into the lateral ventricle of rats in A β -AGE group, the A β -AGE(5 μ g) and Anti-RAGE(50 μ g) were stereotactically injected into the lateral ventricle of rats in A β -AGE + Anti-RAGE group. Morris water maze test was performed on the 2–7 days after administration to detect the latency of rats for searching the hidden platform. The number of crossing platform and the time stayed in the target quadrant of rats were detected on the ninth day after administration. The expression of receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) protein in hippocampus of rats were examined by Western blot. The expression of RAGE in the cortex of rats in each group was detected by immunohistochemistry. **Results** There was no significant difference in the latency period of rats among the groups on the second day after administration ($F = 3.767, P > 0.05$). There was statistic difference in the latency period of rats in each group on the 3–7 day after administration ($F = 9.167, 25.050, 56.980, 62.380, 122.200; P < 0.05$); the latency period of rats in the A β -AGE group was significantly longer than that in the A β group ($P < 0.05$); the latency period of rats in the A β + Anti-RAGE group was significantly shorter than that in the A β group ($P < 0.05$); the latency period of rats in the A β -AGE + Anti-RAGE group was significantly shorter than that in the A β -AGE group ($P < 0.05$). There was significant difference in the number of crossing the platform and the time stayed in the target quadrant of rats among the groups on the ninth day after administration ($F = 12.930, 13.560; P < 0.05$). The number of crossing the platform and the time stayed in the target quadrant of rats in A β -AGE group were significantly lower than those in the A β group ($P < 0.05$); in the A β + Anti-RAGE group the number of crossing the platform was more and the time stayed in the target quadrant of rats was longer than those in the A β group ($P < 0.05$); in the A β -AGE + Anti-RAGE group the number of crossing the platform was more and the time stayed in the target quadrant of rats was longer than those in the A β -AGE group ($P < 0.05$). There was statistic difference in the relative expression of RAGE protein in hippocampus of rats among the groups on the ninth day after administration ($F = 8.626, P < 0.05$). The relative expression of RAGE protein in hippocampus of rats in the A β -AGE group was significantly higher than that in the A β group ($P < 0.05$); there was no statistic difference in the relative expression of RAGE protein in hippocampus of rats between the A β + Anti-RAGE group and A β group ($P > 0.05$); the relative expression of RAGE protein in hippocampus of rats in the A β -AGE + Anti-RAGE group was significantly lower than that in the A β -AGE group ($P < 0.05$). Immunohistochemical staining results showed that there was statistic difference in the number of RAGE positive cells in the cerebral cortex of rats among the groups ($F = 76.370, P < 0.01$). The number of RAGE positive cells in the cerebral cortex of rats in the A β -AGE group was significantly more than that in the A β group ($P < 0.01$); the number of RAGE positive cells in the cortex of rats in the A β + Anti-RAGE group was significantly less than that in the A β group ($P < 0.01$); the number of RAGE positive cells in the cortex of rats in the A β -AGE + Anti-RAGE group was significantly less than that in the A β -AGE group ($P < 0.01$). **Conclusion** A β -AGE may aggravate cognitive dysfunction of AD-like rats through activating RAGE pathway. The A β -AGE and RAGE may be new therapeutic targets for AD.

Key words: Alzheimer's disease; β -amyloid; glycation; receptor of advanced glycation endproducts

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种能导致认知能力严重下降的神经退行性疾病^[1],其主要表现为渐进性记忆障碍、认知功能障碍、人格改变及语言障碍等神经精神症状。 β -淀粉样蛋白(β -amyloid protein, A β)是导致 AD 的关键因素,常以单体、可溶性或不溶性寡聚体及不溶性淀粉样纤维等形式存在,其聚集体具有明显的神经毒性,可在 AD 患者大脑神经细胞间形成老年斑,诱发神经元变性、凋亡。糖化 β -淀粉样蛋白(glycated β -amyloid protein, A β -AGE)是一种高级糖化终产物(advanced glycation endproducts, AGEs),其是以 A β 为底物的蛋白质氨基与还原糖及其衍生物的羰基在无酶条件下发生一系列糖化反应而产生的一种不溶于水、不被降解的交联体。AGEs 通过 AGEs 受体(receptor for advanced glycation endproducts, RAGE)与神经元发生作用,可诱导神经元的氧化应激,促使相关细胞因子和 A β 的释放。A β 是 RAGE 的一种配体,

RAGE 可促进 A β 生成,在 A β 介导的神经细胞毒性中起重要作用^[5]。研究显示,A β -AGE 可进一步促进 A β 聚积,且有更强的神经细胞毒性,在 AD 发病过程中的致病性强于 A β ^[2-3]。本课题组既往研究表明,A β 在体内外均能形成 A β -AGE,且在体外 A β -AGE 会加剧 A β 诱导的神经细胞毒性^[4],但在体实验中,A β -AGE 对 AD 样大鼠行为学改变及其作用机制尚不清楚。本研究旨在观察 A β -AGE 对 AD 样大鼠认知功能的影响,并探讨 RAGE 介导的信号转导通路在 A β -AGE 对 AD 样大鼠认知功能影响中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康无特定病原体级成年 Sprague Dawley 雄性大鼠 40 只,体质量 280 ~ 320 g,由解放军军事医学科学院提供,动物许可证号:0047126。

1.2 主要试剂与仪器 小鼠单克隆 RAGE 抗体

(receptor for advanced glycation endproducts mouse monoclonal antibody, Anti-RAGE)、小鼠单克隆 β -肌动蛋白抗体(beta-actin mouse monoclonal antibody, Anti- β -actin)(美国 Millipore 公司),人 β -淀粉样蛋白 1-42 (amyloid β_{1-42} , $A\beta_{1-42}$)、甲基乙二醛(methylglyoxal, MG)(美国 Sigma 公司),辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠二抗(美国 Pierce 公司),聚丙烯酰胺凝胶电泳蛋白上样缓冲液、二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白定量试剂盒、电化学发光(electro-chemiluminescence, ECL)液(上海碧云天生物技术研究),二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色试剂盒、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)(中国北京索莱宝科技有限公司);DMS-2 型 Morris 水迷宫测试系统(海欣曼科教设备有限公司)。

1.3 $A\beta$ -AGE 的制备 无菌条件下取 $1\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $A\beta_{1-42}$ 0.5 mL 置于 EP 管中,加入 $0.5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MG 缓冲液 0.5 mL ,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育箱温育 1 个月,将混合液移入透析袋,扎紧透析袋并置入 1 mL 的 $0.01\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)中,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内进行转动透析,持续 48 h,每 4 h 更换 1 次 PBS,除去 MG,成功制备 $A\beta$ -AGE。将透析完毕的 $A\beta$ -AGE 混合液于超净台滤过除菌,EP 管分装,密封, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 储存。

1.4 动物分组与模型制备 将 40 只大鼠随机分为 $A\beta$ 组、 $A\beta$ + Anti-RAGE 组、 $A\beta$ -AGE 组、 $A\beta$ -AGE + Anti-RAGE 组,每组 10 只。根据 CHEN 等^[6]文献方法制备大鼠 AD 样模型。各组大鼠按 $6\text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量给予 $60\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 水合氯醛腹腔内注射麻醉,将大鼠固定于立体定向仪器上,选取前囟后 1.0 mm 、中线旁开 1.5 mm 、深度 3.8 mm 的位置,行左侧侧脑室注射,将相应的试剂溶于 0.01 mL $30\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BSA 中,1 次性注入左侧侧脑室,其中 $A\beta$ 组大鼠给予 $A\beta$ $5\text{ }\mu\text{g}$, $A\beta$ + Anti-RAGE 组大鼠给予 $A\beta$ $5\text{ }\mu\text{g}$ 和 RAGE 抗体 Anti-RAGE $50\text{ }\mu\text{g}$, $A\beta$ -AGE 组大鼠给予 $A\beta$ -AGE $5\text{ }\mu\text{g}$, $A\beta$ -AGE + Anti-RAGE 组大鼠给予 $A\beta$ -AGE $5\text{ }\mu\text{g}$ 和 Anti-RAGE $50\text{ }\mu\text{g}$ 。

1.5 各组大鼠空间学习记忆能力检测 采用 Morris 水迷宫实验观察各组大鼠空间学习记忆能力,包括潜伏期(即大鼠从入水至找到平台所用的时间)、目标象限停留时间和穿越平台次数等。在立体定向注射后第 2~7 天,每只大鼠每天在第 III 象限训练 1 次,每次游泳的时间限为 60 s ,大鼠爬上平台后,让其在平台上停留 10 s ;如在 60 s 内未找到平台者,系统自动停止记录,潜伏期记为 60 s ,由测试者引导大鼠至平台,使其休息 30 s ;连续训练 6 d,每日进行 4 次,记录大鼠寻找隐匿平台的潜伏期。立体定向注射后第 9 天移去水下平台,让大鼠自由

游泳 60 s 寻找平台,记录大鼠在目标象限停留时间和穿越平台次数(即穿越平台所在区域的次数)。

1.6 Western blot 法检测各组大鼠海马组织中 RAGE 的表达 注射后第 9 天,水迷宫实验结束后,每组取 5 只大鼠断头取脑,冰上分离海马组织,取适量海马组织放入预冷裂解液(裂解液成分:三羟甲基氨基甲烷盐酸盐 $0.010\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,氟化钠 $0.050\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,正钒酸钠 $0.001\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,乙二醇四乙酸 $0.001\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,甲脒 $0.001\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,苯基甲基磺酰氟 $0.001\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.001\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 丝氨酸蛋白酶抑制剂,基础溶剂为双蒸水)中,加入研磨珠,用组织研磨仪研磨 60 s ,冰上裂解 30 min , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ $12\text{ }000 \times g$ 离心 15 min ,取上清液,加入聚丙烯酰胺凝胶电泳蛋白上样缓冲液制备大鼠脑组织蛋白样本。根据 BCA 蛋白定量试剂盒说明书检测样品中蛋白浓度。聚丙烯酰胺凝胶电泳: 80 V 电泳 30 min ,之后 120 V 电泳 50 min , 300 mA 转膜 90 min , Tris-HCl 缓冲盐溶液洗膜 2 min ,体积分数 $50\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ BCA 封闭,室温摇床 1 h , Tris-HCl 缓冲盐溶液洗膜 3 次,每次 8 min ,分别加入一抗 RAGE 和 Anti- β -actin 进行孵育,其中 RAGE 和 Anti- β -actin 稀释比例为 $1:1\text{ }000$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜,次日洗膜 3 次, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠二抗($1:5\text{ }000$)孵育 1 h ,洗膜 3 次,采用 ECL 液进行显色,胶片曝光,定影,显影,使用 Quantity One 软件对蛋白条带进行灰度值分析,灰度值高则表明蛋白表达量多。

1.7 免疫组织化学染色法检测各组大鼠大脑皮层中 RAGE 蛋白表达 注射后第 9 天,水迷宫实验结束后,每组取 5 只大鼠,按 $6\text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量给予 $60\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 水合氯醛腹腔内注射麻醉,经心脏先灌注 100 mL 生理盐水,然后灌注 $40\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的多聚甲醛溶液 400 mL ,取大鼠大脑组织置于 $40\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的多聚甲醛溶液 20 mL 中固定 24 h 。采用震荡切片机行大脑组织连续切片,制备海马组织的冠状切片,厚度为 $20\text{ }\mu\text{m}$ 。每只大鼠选取 3~5 个连续切片,采用 RAGE 抗体进行免疫组织化学染色:取固定好的大脑震荡切片用 $0.01\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PBS 震洗 3 次,每次 5 min ;然后滴加体积分数 $3\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 缓冲溶液以消除内源性过氧化物酶,室温放置 15 min ,用 $0.01\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PBS 震洗 3 次,每次 5 min ;加入 $50\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA 封闭 60 min ;加入一抗 RAGE($1:1\text{ }000$) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜;次日加入辣根过氧化物酶标记的二抗 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h ,并用 DAB 显色 2 min ,中性树胶封片,随机选取 2 组大鼠大脑皮层切片各 3 张,置于倒置显微镜下,每张切片计数 5 个视野,采用 IPP 6.0 软件计算大鼠大脑皮层 RAGE 阳性表达细胞

数,细胞核呈现棕黄色细颗粒状物质沉积则为 RAGE 表达阳性。

1.8 统计学处理 应用 SPSS 16.0 统计软件进行分析,计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用最小显著差异法 *t* 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4 组大鼠潜伏期比较 结果见表 1。在注射后

表 1 4 组大鼠潜伏期比较

Tab.1 Comparison of the latency of rats among the four groups		$(\bar{x} \pm s)$					
组别	<i>n</i>	潜伏期/s					
		第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天
Aβ 组	10	59.96 ± 1.05	49.37 ± 1.68	32.10 ± 3.05	33.13 ± 3.50	20.80 ± 2.71	9.73 ± 1.62
Aβ-AGE 组	10	60.07 ± 1.21	57.83 ± 3.25 ^a	42.27 ± 1.10 ^a	42.53 ± 4.42 ^a	34.57 ± 1.40 ^{ba}	29.77 ± 2.66 ^a
Aβ + Anti-RAGE 组	10	59.00 ± 1.73	44.67 ± 2.52 ^a	23.00 ± 3.46 ^a	22.30 ± 2.52 ^a	14.32 ± 3.05 ^a	5.34 ± 2.31 ^a
Aβ-AGE + Anti-RAGE 组	10	60.07 ± 1.93	51.77 ± 1.86 ^b	36.83 ± 2.25 ^b	33.30 ± 1.26 ^b	26.03 ± 1.65 ^b	17.57 ± 1.69 ^b
<i>F</i>		3.767	9.167	25.050	56.980	62.380	122.200
<i>P</i>		0.060	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 Aβ 组比较^a $P < 0.05$;与 Aβ-AGE 组比较^b $P < 0.05$ 。

2.2 4 组大鼠穿越平台次数和目标象限停留时间比较 结果见表 2。在立体定向注射后第 9 天,各组大鼠穿越平台次数和目标象限停留时间比较差异均有统计学意义 ($F = 12.930、13.560, P < 0.05$)。Aβ-AGE 组大鼠穿越平台次数和目标象限停留时间显著小于 Aβ 组,Aβ + Anti-RAGE 组大鼠穿越平台次数和目标象限停留时间显著大于 Aβ 组,Aβ-AGE + Anti-RAGE 组大鼠穿越平台次数和目标象限停留时间显著大于 Aβ-AGE 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 2 4 组大鼠穿越平台次数、目标象限停留时间比较

Tab.2 Comparison of the number of crossing platform and the time stayed in the target quadrant of rats among the four groups $(\bar{x} \pm s)$

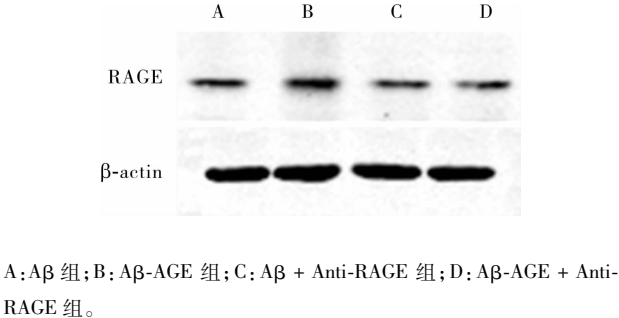
组别	<i>n</i>	穿越平台次数	目标象限停留时间/s
Aβ 组	10	3.60 ± 0.46	29.33 ± 2.52
Aβ-AGE 组	10	1.99 ± 0.11 ^a	19.17 ± 0.76 ^a
Aβ + Anti-RAGE 组	10	4.23 ± 0.71 ^a	31.67 ± 3.06 ^a
Aβ-AGE + Anti-RAGE 组	10	3.23 ± 0.25 ^b	26.83 ± 2.25 ^b
<i>F</i>		12.930	13.560
<i>P</i>		0.000	0.000

注:与 Aβ 组比较^a $P < 0.05$;与 Aβ-AGE 组比较^b $P < 0.05$ 。

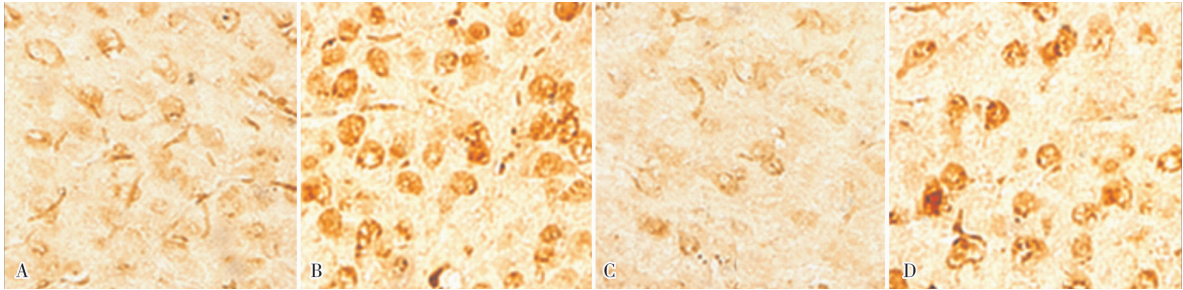
2.3 4 组大鼠海马组织中 RAGE 蛋白表达比较 结果见图 1 和图 2。注射后第 9 天,Aβ 组、Aβ + Anti-RAGE 组、Aβ-AGE 组、Aβ-AGE + Anti-RAGE 组大鼠海马组织中 RAGE 蛋白相对表达量分别为 $0.56 \pm 0.03、0.47 \pm 0.08、0.77 \pm 0.11、0.48 \pm 0.07$,各组大鼠海马组织中 RAGE 蛋白相对表达量比较差异有统计学意义 ($F = 8.626, P < 0.05$);其中 Aβ-

第 2 天,各组大鼠潜伏期比较差异无统计学意义 ($F = 3.767, P > 0.05$)。注射后第 3 ~ 7 天,各组大鼠潜伏期比较差异均有统计学意义 ($F = 9.167、25.050、56.980、62.380、122.200, P < 0.05$);Aβ-AGE 组大鼠潜伏期显著长于 Aβ 组,Aβ + Anti-RAGE 组大鼠潜伏期显著短于 Aβ 组,Aβ-AGE + Anti-RAGE 组大鼠潜伏期显著短于 Aβ-AGE 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

AGE 组大鼠海马组织中 RAGE 蛋白相对表达量显著高于 Aβ 组 ($P < 0.05$),Aβ + Anti-RAGE 组大鼠海马组织中 RAGE 蛋白相对表达量与 Aβ 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$);Aβ-AGE + Anti-RAGE 组大鼠海马组织中 RAGE 蛋白相对表达量显著低于 Aβ-AGE 组 ($P < 0.05$)。免疫组织化学染色结果显示,Aβ 组、Aβ + Anti-RAGE 组、Aβ-AGE 组、Aβ-AGE + Anti-RAGE 组大鼠大脑皮层中 RAGE 阳性细胞数分别为 $(25.10 \pm 0.15)、(17.23 \pm 2.25)、(38.17 \pm 2.16)、(23.16 \pm 1.20)$ 个 · cm^{-2} ,各组大鼠大脑皮层中 RAGE 阳性细胞数比较差异有统计学意义 ($F = 76.370, P < 0.01$);Aβ-AGE 组大鼠大脑皮层中 RAGE 阳性细胞数显著高于 Aβ 组 ($P < 0.01$),Aβ + Anti-RAGE 组大鼠皮层中 RAGE 阳性细胞数显著低于 Aβ 组 ($P < 0.01$);Aβ-AGE + Anti-RAGE 组大鼠皮层中 RAGE 阳性细胞数显著低于 Aβ-AGE 组 ($P < 0.01$)。



A: Aβ 组; B: Aβ-AGE 组; C: Aβ + Anti-RAGE 组; D: Aβ-AGE + Anti-RAGE 组。
图 1 各组大鼠海马组织中 RAGE 表达 (Western blot)
Fig.1 Expression of RAGE in hippocampus of rats in each group (Western blot)



A: Aβ 组;B: Aβ-AGE 组;C: Aβ + Anti-RAGE 组;D: Aβ-AGE + Anti-RAGE 组。

图2 各组大鼠大脑皮层中 RAGE 阳性表达情况(免疫组织化学染色,×400)

Fig.2 Positive expression of RAGE in the cerebral cortex of rats in each group (immunohistochemical staining, ×400)

3 讨论

AD 是一种以进行性认知功能障碍为主要临床表现的神经退行性病变,其主要病理学特征是位于细胞内的神经纤维缠结和位于细胞外的老年斑。前者主要由过度磷酸化的 tau 蛋白聚积而成,后者的主要成分是 Aβ^[7]。大脑中葡萄糖代谢严重紊乱与 AD 的发展密切相关^[8-9],其会导致体内大量 AGEs 的形成和积聚,而 AGEs 已被证明与 AD 的发生密切相关^[10-11]。AGEs 的产生是一种涉及细胞内外环境的复杂的非酶促阶梯式反应过程^[10]。在葡萄糖代谢和氧化应激过程中,AGEs 的水平会显著提高,AGEs 会导致许多活性羰基化合物的形成,而这些羰基化合物又可与蛋白质反应形成 AGEs。AD 患者或动物模型体内的 AGEs 水平明显升高。体外研究显示,AGEs 修饰增加淀粉样蛋白的错误折叠^[2]。在体研究表明,AGEs 与 AD 病理性蛋白 Aβ 是共定位的^[12]。以上研究提示,AGE 修饰的蛋白质可能与 AD 的病理和发病机制有关。本课题组以往研究表明,Aβ-AGE 可加重 Aβ 介导的体外培养海马神经元的神经毒性^[13],但其作用和潜在的体内机制仍有待进一步研究。为验证 Aβ-AGE 对 AD 样大鼠认知功能的影响,本研究将 Aβ-AGE 注入大鼠侧脑室,通过 Morris 水迷宫实验检测发现,与 Aβ 组相比,Aβ-AGE 能显著延长大鼠寻找隐匿平台的潜伏期,减少穿越平台次数和目标象限停留时间,表明 Aβ-AGE 可加重 AD 样大鼠认知功能障碍。

RAGE 是免疫球蛋白家族中的一个多配体受体,可与 AGEs 和 Aβ 结合。研究表明,RAGE 在 Aβ 介导的细胞功能紊乱中起重要作用^[14]。当 Aβ 在 AD 患者脑中累积时,RAGE 表达水平增加,这种机制可能加重 RAGE 与配体相互作用所引起的细胞功能障碍^[15]。之前本课题组观察到 RAGE 参与了 Aβ-AGE 对体外培养的神经元的损伤作用^[13],但尚不清楚 RAGE 是否参与在体实验中 Aβ-AGE 诱导的 AD 样认知功能障碍。本研究通过观察 RAGE 是否

参与 Aβ-AGE 对 AD 样大鼠认知功能的影响,Western blot 结果发现,Aβ-AGE 组大鼠海马组织中 RAGE 蛋白表达水平与 Aβ 组比较明显增高,Aβ-AGE + Anti-RAGE 组大鼠海马组织中 RAGE 蛋白相对表达量显著低于 Aβ-AGE 组。免疫组织化学染色结果同样显示,Aβ-AGE 组大鼠大脑皮层中 RAGE 阳性细胞数显著高于 Aβ 组,Aβ + Anti-RAGE 组大鼠大脑皮层中 RAGE 阳性细胞数显著低于 Aβ 组;Aβ-AGE + Anti-RAGE 组大鼠大脑皮层中 RAGE 阳性细胞数显著低于 Aβ-AGE 组,提示 RAGE 参与了 Aβ-AGE 诱导的认知功能障碍这一过程。

细胞内的 AGEs 可能是直接通过交联作用对蛋白产生影响,而细胞外的 AGEs 可能是通过与其受体相结合将信号传入细胞内而影响细胞内蛋白表达。有证据表明,RAGE 表达的增加可使其诱导更为严重的细胞功能紊乱^[16]。为了探讨 RAGE 介导的通路是否与 Aβ-AGE 的作用相关,本研究使用 RAGE 抗体阻断 RAGE 信号转导通路,结果观察到立体定向注射后第 3 ~ 7 天,Aβ + Anti-RAGE 组大鼠寻找隐匿平台的潜伏期显著短于 Aβ 组,Aβ-AGE + Anti-RAGE 组大鼠寻找隐匿平台的潜伏期同样显著短于 Aβ-AGE 组;在立体定向注射后第 9 天,Aβ + Anti-RAGE 组大鼠穿越平台次数和目标象限停留时间显著长于 Aβ 组,Aβ-AGE + Anti-RAGE 组大鼠穿越平台次数和目标象限停留时间同样显著大于 Aβ-AGE 组;以上结果提示,给予 RAGE 抗体阻断后,可以有效减轻大鼠空间记忆功能损伤,由此提示 Aβ-AGE 诱导的 AD 样认知功能障碍可能是通过干预 RAGE 信号转导通路而产生的。

综上所述,Aβ-AGE 可加重 AD 样大鼠的认知功能障碍,并增加 AD 样大鼠脑组织 RAGE 的表达,而 RAGE 抗体能有效减轻由 Aβ-AGE 诱导的认知功能障碍。本研究进一步证实了 Aβ-AGE 可加重大鼠的神经损害,其机制可能是通过激活 RAGE 信号转导通路介导加重 AD 样大鼠的认知功能障碍,Aβ-AGE 和 RAGE 可能成为新的 AD 治疗靶点。

参考文献:

[1] LI K,WEI Q,LIU F F,*et al.* Synaptic dysfunction in Alzheimer's disease: A β , Tau, and epigenetic alterations [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(4):3021-3032.

[2] FAWVER J N,SCHALL H E,PETROFES C R D,*et al.* Amyloid- β metabolite sensing: biochemical linking of glycation modification and misfolding[J]. *J Alzheimers Dis*, 2012, 30(1):63-73.

[3] DRENTH H,ZUIDENA S U,KRIJNEN W P,*et al.* Association between advanced glycation end-products and functional performance in Alzheimer's disease and mixed dementia [J]. *Int Psychogeriatr*, 2017, 29(9):1525-1534.

[4] ZHANG J, GUO Y, WANG Y, *et al.* Long-term treadmill exercise attenuates A β burdens and astrocyte activation in APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Neurosci Lett*, 2018, 666:70-77.

[5] TAKUMA K, FANG F, ZHANG W, *et al.* RAGE-mediated signaling contributes to intraneuronal transport of amyloid-beta and neuronal dysfunction [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(47):20021-20026.

[6] CHEN C, LI X H, TU Y, *et al.* A β -AGE aggravates cognitive deficit in rats via RAGE pathway [J]. *Neuroscience*, 2014, 257:1-10.

[7] FREDERIKSEN K S, GJERUM L, WALDEMAR G, *et al.* Effects of physical exercise on Alzheimer's disease biomarkers: a systematic review of intervention studies [J]. *J Alzheimers Dis*, 2018, 61(1):359-372.

[8] 王晓燕. 血清胱抑素 C、 β 2-微球蛋白、视黄醇结合蛋白、尿微量白蛋白及 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶在诊断糖尿病早期肾损

伤中的临床意义 [J]. 新乡医学院学报, 2017, 34(2):143-146.

[9] TSUTSUI Y, HAYS F A. A link between Alzheimer's and type II diabetes mellitus? Ca²⁺-mediated signal control and protein localization [J]. *Bioessays*, 2018, 40(6):e1700219.

[10] KAMYNINA A V, ESTERAS N, KOROEV D O, *et al.* Synthetic fragments of receptor for advanced glycation end products bind beta-amyloid 1-40 and protect primary brain cells from beta-amyloid toxicity [J]. *Front Neurosci*, 2018, 12:681.

[11] 张英博, 费洪新, 郭家, 等. 蝙蝠葛碱对阿尔茨海默病小鼠海马晚期糖基化终产物受体和核转录因子- κ Bp65 的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(19):4697-4700.

[12] VOLPINA O M, SAMOKHIN A N, KOROEV D O, *et al.* Synthetic fragment of receptor for advanced glycation end products prevents memory loss and protects brain neurons in olfactory bulbectomized mice [J]. *J Alzheimers Dis*, 2018, 61(3):1061-1076.

[13] LI X H, DU L L, CHENG X S, *et al.* Glycation exacerbates the neuronal toxicity of β -amyloid [J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4:e673.

[14] STEUCHER E, GALICHET A, WEIBEL M, *et al.* Site-specific blockade of RAGE-Vd prevents amyloid-beta oligomer neurotoxicity [J]. *J Neurosci*, 2008, 28(20):5149-5158.

[15] CAI Z, LIU N, WANG C, *et al.* Role of RAGE in Alzheimer's disease [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2016, 36(4):483-495.

[16] CHEN W, CHAN Y, WAN W, *et al.* A β ₁₋₄₂ induces cell damage via RAGE-dependent endoplasmic reticulum stress in bEnd.3 cells [J]. *Exp Cell Res*, 2018, 362(1):83-89.

(本文编辑:李胜利 英文编辑:孟 月)

(上接第 510 页)

[2] WANG L,ZHANG S,CHENG H,*et al.* Nrf2-mediated liver protection by esculetin A against acetaminophen toxicity through the AMPK/Akt/GSK3 β pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2016, 101(3):401-412.

[3] ZHENG L, YIN L, XU L, *et al.* Protective effect of dioscin against thioacetamide-induced acute liver injury via FXR/AMPK signaling pathway *in vivo* [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 97:481-488.

[4] 石计朋, 孙亚洲, 栗延伟, 等. ω -3 多不饱和脂肪酸和 ω -6 多不饱和脂肪酸对脂多糖致脑损伤新生大鼠 Toll 样受体 4/核因子- κ B 信号通路及炎症因子的影响 [J]. 中华实用儿科临床杂志, 2018, 33(12):918-922.

[5] LI Y, TANG Y, WANG S, *et al.* Endogenous n-3 polyunsaturated fatty acids attenuate T cell-mediated hepatitis via autophagy activation [J]. *Front Immunol*, 2016, 7:350.

[6] YANG W, CHEN X, CHEN M, *et al.* Fish oil supplementation inhibits endoplasmic reticulum stress and improves insulin resistance; involvement of AMP-activated protein kinase [J]. *Food Funct*, 2017, 8(4):1481-1493.

[7] NAKAMOTO K, SHIMADA K, HARADA S, *et al.* DHA supplementation prevent the progression of NASH via GPR120 signaling [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 820:31-38.

[8] CHEN D, NI H M, WANG L, *et al.* p53 up-regulated modulator of apoptosis induction mediates acetaminophen-induced necrosis and liver injury in mice [J]. *Hepatology*, 2019, 69(5):2164-2179.

[9] 徐礼通, 陈松海, 李忠斌, 等. 肝活检确诊药物性肝损害的病因及临床特征分析 [J]. 解放军医学杂志, 2018, 43(2):130-134.

[10] YANG J, FERNANDEZ-GALILEA M, MARTINEZ-FERNANDEZ L, *et al.* Oxidative stress and non-alcoholic fatty liver disease: effects

of omega-3 fatty acid supplementation [J]. *Nutrients*, 2019, 11(4):872.

[11] SISCOVICK D S, BARRINGER T A, FRETTS A M, *et al.* Omega-3 polyunsaturated fatty acid (fish oil) supplementation and the prevention of clinical cardiovascular disease [J]. *Circulation*, 2017, 135(15):e867-e884.

[12] 陈则华, 胡慧芸, 陈鹰, 等. ω -3 多不饱和脂肪酸调节血脂及抗动脉粥样硬化作用机制研究进展 [J]. 医药导报, 2018, 37(11):1334-1338.

[13] KANG J X, WANG J, WU L, *et al.* Transgenic mice: fat-1 mice convert n-6 to n-3 fatty acids [J]. *Nature*, 2004, 427(6974):504.

[14] KANG S W, HAYDAR G, TANIANE C, *et al.* AMPK activation prevents and reverses drug-induced mitochondrial and hepatocyte injury by promoting mitochondrial fusion and function [J]. *PLoS One*, 2016, 11(10):e165638.

[15] FAN X, LV H, WANG L, *et al.* Isoorientin ameliorates APAP-induced hepatotoxicity via activation Nrf2 antioxidative pathway: the involvement of AMPK/Akt/GSK3 β [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9:1334.

[16] KIM N, JEONG S, JING K, *et al.* Docosahexaenoic acid induces cell death in human non-small cell lung cancer cells by repressing mTOR via AMPK activation and PI3K/Akt inhibition [J]. *Bio Med Res Int*, 2015, 2015(2):239764.

[17] 石计朋, 栗延伟, 郭丽娟, 等. ω -3 多不饱和脂肪酸对脂多糖所致脑损伤新生大鼠海马组织中氧化应激产物和细胞凋亡的影响 [J]. 新乡医学院学报, 2018, 35(6):455-458.

(本文编辑:徐自超 英文编辑:徐自超)