

慢性脑低灌注对小鼠认知功能的影响及其机制研究

张倩 文婷婷 张振涛 张兆辉

【摘要】 目的 探讨慢性脑低灌注对小鼠认知功能的影响及其可能作用机制。**方法** 分别准备 24 只雄性 Tau 基因敲除(Tau knockout, Tau-KO)小鼠和野生型(Wild-type, WT)小鼠,随机分为 4 组($n = 12$): Tau-KO 假手术组(Tau-KO Sham)、Tau-KO 慢性脑低灌注模型组(Tau-KO chronic cerebral hypoperfusion, Tau-KO CCH)、WT 假手术组(WT Sham)和 WT 慢性脑低灌注模型组(WT CCH),采用双侧颈总动脉置入血管剪切应力调节器方法制备慢性脑低灌注模型,10 周后 Morris 水迷宫检测 4 组小鼠学习记忆能力,免疫荧光和免疫组化检测 Tau 蛋白磷酸化(Tau phosphorylation, p-Tau)及纤维蛋白原(Fibrinogen, Fg)的表达水平。**结果** 慢性脑低灌注可上调 p-Tau 和 Fg 的表达并加剧小鼠认知功能障碍,而阻断 Tau 蛋白后 Fg 表达减少且小鼠认知功能得到明显改善。**结论** 慢性脑低灌注可增加 p-Tau 蛋白及 Fg 表达,两者协同作用于小鼠认知功能的损伤,而阻断 Tau 蛋白后小鼠认知功能障碍得到改善。

【关键词】 慢性脑低灌注 Tau 蛋白 纤维蛋白原 认知功能 血管性认知功能障碍

【中图分类号】 R743.9 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2023)03-0289-05

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2023.03.011

Effects of chronic cerebral hypoperfusion on cognitive function in mice and its molecular mechanism Zhang Qian, Wen Tingting, Zhang Zhentao, et al. Department of Neurology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060

【Abstract】 Objective To investigate the effect of chronic cerebral hypoperfusion on cognitive function in mice and the molecular mechanism. **Methods** 24 male Tau knockout (Tau-KO) mice and wild-type (WT) mice were respectively prepared and randomly divided into 4 groups ($n = 12$): Tau-KO sham operation group (Tau-KO Sham), Tau-KO chronic cerebral hypoperfusion model group (Tau-KO CCH), WT sham operation group (WT Sham) and WT chronic cerebral hypoperfusion model group (WT CCH), and the chronic cerebral hypoperfusion was prepared by bilateral common carotid artery implanted vascular shear-stress regulator. After 10 weeks, we use Morris water maze to test the learning and memory abilities of 4 groups of mice, and the expression levels of tau phosphorylation (p-Tau) and fibrinogen (Fg) was detected by immunofluorescence and immunohistochemistry. **Results** Chronic cerebral hypoperfusion could upregulate the expression levels of p-Tau and Fg, and aggravate cognitive impairment in mice, while Fg expression was reduced and cognitive function was significantly improved after blocking Tau protein. **Conclusion** Chronic cerebral hypoperfusion can increase the expression of p-Tau and Fg, which synergistically affect the impairment of cognitive function in mice, and the cognitive impairment of mice is improved after blocking Tau protein.

【Key words】 Chronic cerebral ischemia Tau protein Fibrinogen Cognitive function Vascular cognitive impairment

血管性认知功能障碍(Vascular cognitive impairment, VCI)是指与脑血管疾病相关的所有形式的认知功能障碍,它涵盖了从轻度认知功能障碍到

痴呆症的所有认知功能缺陷;血管性痴呆现在被认为是仅次于阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的第二种最常见的痴呆形式^[1]。流行病学证据表明 VCI 和 AD 之间有显著的联系,两者不仅有相同的病因即脑血管功能障碍,VCI 还表现出 AD 样病理变化^[2-3]。

有研究证明,慢性脑低灌注(Chronic cerebral

基金项目:纤维蛋白通过诱导 tau 蛋白聚集介导卒中后认知功能障碍的机制研究(8207050623)

作者单位:430060 武汉大学人民医院神经内科 I 科[张倩 文婷婷 张振涛 张兆辉(通信作者)]

hypoperfusion, CCH) 不仅是 VCI 的主要致病因素^[4], 还是导致 AD 发展的潜在机制^[5]。脑低灌注降低了组织氧水平, 导致氧化应激和内皮损伤, 驱动微血管炎症, 进而破坏神经胶质血管单元^[6], 诱导了血管周围淀粉样蛋白 β (Amyloid- β , A β) 聚集, 进一步加速神经退行性改变^[7-8]。最近, Cortes-canteli 等人研究发现 A β 和 Fg 之间存在相互作用而直接影响脑血管系统中 A β 沉积物的沉积和清除^[9]。由于在慢性低灌注脑组织同样观察到 Tau 蛋白表达增多和磷酸化^[10]以及 Fg 在脑实质中的沉积^[11], 因此本研究猜想慢性脑低灌注中 Tau 蛋白和 Fg 也存在相互关联, 共同参与长期脑供血不足所致学习记忆损伤的病理调节过程。

本研究通过在 Tau-KO 小鼠和 WT 小鼠双侧颈总动脉分别置入血管剪切应力调节器来制备慢性脑低灌注缺血模型, 观察 Tau 蛋白和 Fg 在低灌注脑组织中的表达, 初步探究血管性认知功能障碍发生过程中可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠及 Tau-KO 小鼠各 24 只, 体重(18 ± 2)g, 均由武汉大学人民医院动物实验中心无特定病原体 (Specific pathogen free, SPF) 级屏障环境自行繁殖获得, 温度 22℃, 保持 12 h 光照周期循环, 自由进食水和食物。按数字随机法将小鼠分为 4 组 ($n = 12$): Tau-KO Sham 组、Tau-KO CCH 组、WT Sham 组、WT CCH 组。

1.2 主要试剂及仪器

血管剪切应力调节器购自荷兰 Promolding 公司; AT8 抗体 (MN1020) 购自赛默飞公司; Fg 抗体 (ab58207) 购自 Abcam 公司; 免疫荧光二抗 (Alexa Fluor 594, ab150116) 购自 Abcam 公司; 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6-Diamidino-2-phenylindole, DAPI, EZ3412B205) 购自 BioFRox 公司; 免疫组化试剂盒购自中山金桥公司; 解剖显微镜及倒置荧光显微镜均为 Olympus 公司产品。

1.3 方法

1.3.1 慢性低灌注模型小鼠的制备

参照文献^[12]方法, 采用小鼠双侧颈总动脉血管剪切应力调节器置入术制备小鼠慢性脑低灌注模型, 对照组仅给予麻醉和手术切开缝合处理, 术前 8~12 h 禁食, 自由饮水, 采用 5% (体积分数) 水合

氯醛按体重 0.7 mL/100 g 注射麻醉小鼠, 胶条固定四肢使小鼠呈仰卧位, 充分暴露颈部, 备皮消毒, 行 2 cm 颈正中垂直切口, 钝性分离皮下组织, 暴露气管, 在气管两侧寻找并分离颈总动脉, 切忌过度刺激迷走神经, 充分暴露双侧颈总动脉, 以 6-0 非吸收外科缝线自颈总动脉下穿过, 系 1 个松的缝合环, 选取 300 μ m 的铸件半壳, 将半壳置于缝合环底部, 放置方向为大管径位于近心端, 半壳凹槽托起颈总动脉, 随后将另 1 个半壳置于动脉表面, 使用缝合环将 2 个半壳收紧 (即血管剪切应力调节器) 以形成锥形内腔; 生理盐水缓慢冲洗, 缝合手术创口, 将小鼠置于保温垫, 待小鼠苏醒后放回饲养笼; 10 周后用 Morris 水迷宫实验测试各组小鼠空间学习记忆能力及后续生化实验。

1.3.2 Morris 水迷宫实验

Morris 水迷宫测试在一圆柱形水池中进行; 水池中加入无毒水基染料, 使水成为不透明的乳白色, 并调节水温在 (25 ± 0.5)℃; 连续 7 d 对小鼠进行训练, 每只小鼠每天分别随机从 4 个象限各进行 1 次训练; 设置小鼠搜索平台的时间为 60 s, 记录小鼠到达平台所需潜伏期, 前 6 d 的训练中若小鼠未能在 60 s 内找到平台则将其引导置于平台上停留 10~15 s; 训练结束后将老鼠毛发烘干, 放回饲养笼, 2 次训练之间间隔 30 min; 在最后 1 个训练日 (第 7 d), 撤去平台, 进行空间探测试验; 让小鼠在水池中自由游泳 60 s, 测量小鼠的穿台次数及在各象限花费的时间、路程百分比, 观察受试鼠的空间定位能力; 所有试验都由计算机化跟踪系统记录, 该系统使用 ANY-Maze 软件 (San Diego Instruments) 记录分析。

1.3.3 小鼠灌注取材

水迷宫实验结束后经 5% 水合氯醛麻醉小鼠, 打开胸腔暴露心脏, 注射器经心尖刺入左心室, 剪破右心耳, 推注生理盐水持续冲洗至肝脏颜色变白; 然后用 4% 多聚甲醛灌流固定后断头取脑, 石蜡包埋, 制备厚约 5 μ m 的连续冠状位切片。

1.3.4 免疫荧光染色

选取各组小鼠海马组织石蜡切片, 连续放入二甲苯 I \rightarrow 二甲苯 II \rightarrow 二甲苯 III 中各 15 min 进行脱蜡, 然后依次入无水乙醇 \rightarrow 95% 乙醇 \rightarrow 85% 乙醇 \rightarrow 75% 乙醇 \rightarrow 蒸馏水各 5 min 水化; 切片放入 94℃ 的柠檬酸钠抗原修复缓冲液中高温水浴 20 min, 自然冷却至室温后磷酸缓冲盐溶液 (Phosphate buffer

saline,PBS)洗 3 次,5 min/次,3%牛血清白蛋白(Bovine serum albumin,BSA)室温封闭 30 min,滴加一抗 Anti-AT8(1:1000)4 ℃孵育过夜,第 2 d 用 PBS 清洗 3 次后加入荧光二抗(1:500)避光室温孵育 2 h,最后用 DAPI(1:8000)室温避光复染 5 min,PBS 洗涤后加抗荧光淬灭剂封片,荧光显微镜下观察。

1.3.5 免疫组织化学染色

选取各组小鼠海马组织石蜡切片,脱蜡、水化及抗原修复后 PBS 洗 3 次,5 min/次,3% H_2O_2 室温避光反应 10 min,PBS 清洗,3% BSA 封闭 30 min,加入 Fg 抗体(1:2500)于 4 ℃孵育过夜;第 2 d PBS 洗涤一抗后室温孵育酶标二抗 10 min,PBS 洗 3 次,3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-Diaminobenzidine,DAB)显色,苏木素复染细胞核,分化、反蓝,梯度酒精及二甲苯脱水透明后中性树脂封片,显微镜下观察。

1.3.6 统计学处理

采用 GraphPad Prism8.3.0 统计分析软件,所有计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2 组比较采用 *t* 检验,多组数据比较采用方差分析(One/Two-way ANOVA),以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结 果

2.1 慢性脑缺血诱导海马组织 p-Tau 表达

与假手术组比较,WT 小鼠模型组海马及皮层中 p-Tau 表达水平均明显升高($P < 0.05$)(图 1),即慢性脑缺血可诱导脑实质 p-Tau 的表达。

2.2 慢性脑缺血诱导 Fg 在脑实质中沉积

生理状态下由于血脑屏障的阻隔,中枢神经系统中不能检测到 Fg,免疫组织化学染色显示,脑低灌注模型小鼠脑组织中可检测到 Fg 沉积,且 Fg 主要沉积在脑实质和血管周围(图 2),假手术组小鼠脑组织中无明显 Fg 沉积。半定量分析显示,与假手术组比较,Fg 在脑缺血模型小鼠脑组织中表达显著增加($P < 0.01$),且 WT CCH 组小鼠比 Tau-KO CCH 组小鼠显示出更多的纤维蛋白原沉积($P < 0.01$),即慢性脑缺血诱导了 Fg 在中枢神经系统的沉积,而阻断 Tau 蛋白后 Fg 沉积减少。

2.3 水迷宫阻断 Tau 蛋白后可改善慢性脑缺血所致的认知功能障碍

Morris 水迷宫定位航行实验显示,与 WT CCH 组小鼠比较,其他 3 组小鼠在第 3、4、5 d 训练日逃避潜伏期均明显缩短($P < 0.01$);与 WT Sham 组比较,Tau-KO Sham 组逃避潜伏期缩短($P < 0.05$),而 Tau-KO CCH 组逃避潜伏期无显著性变化($P > 0.05$);与 Tau-KO CCH 组比较,Tau-KO Sham 组逃避潜伏期缩短($P < 0.05$)。空间探索实验显示,各组小鼠游泳速度无显著差异,即小鼠运动功能无明显损害,而其他 3 组比 WT CCH 组小鼠更频繁地越过隐藏平台所在区域($P < 0.05$),且在目标象限游泳时间及路程明显延长($P < 0.05$)(图 3)。即慢性脑缺血组小鼠显示出更严重的学习和记忆缺陷,而阻断 Tau 蛋白表达后小鼠认知能力得到明显改善。

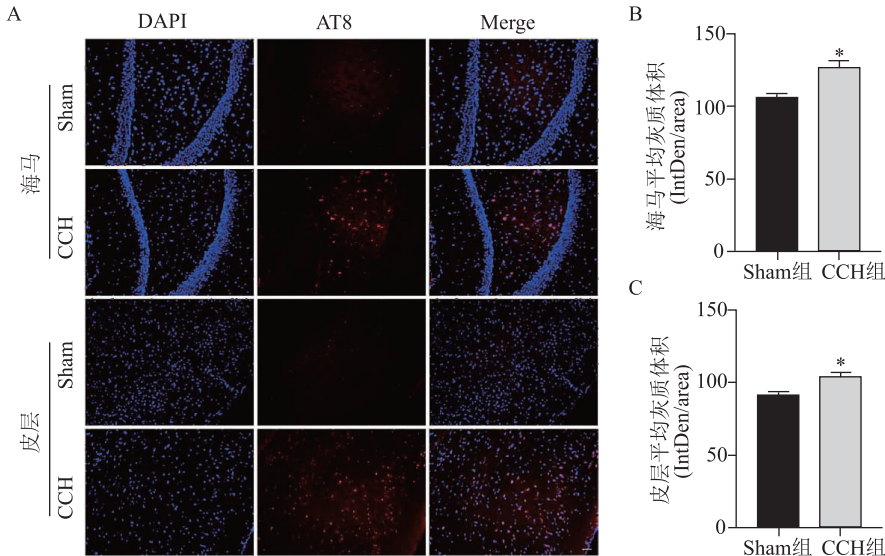


图 1 免疫荧光染色检测 p-Tau 表达水平 A 为显微镜下观察小鼠海马组织 p-Tau 表达水平(Bar = 50 μm);B,C 为与假手术组比较,* $P < 0.01$

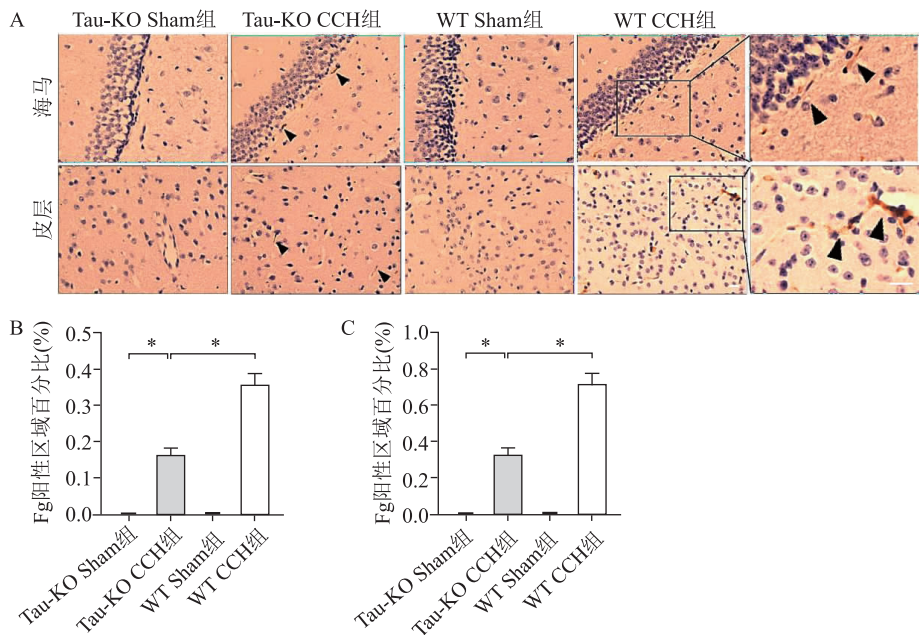


图2 免疫组织化学染色检测 Fg 在脑实质中的沉积 A 为显微镜下观察各组小鼠海马和皮层中 Fg 的沉积(Bar = 25 μ m)(黑色箭头所示);B,C 为两两比较, * $P < 0.01$

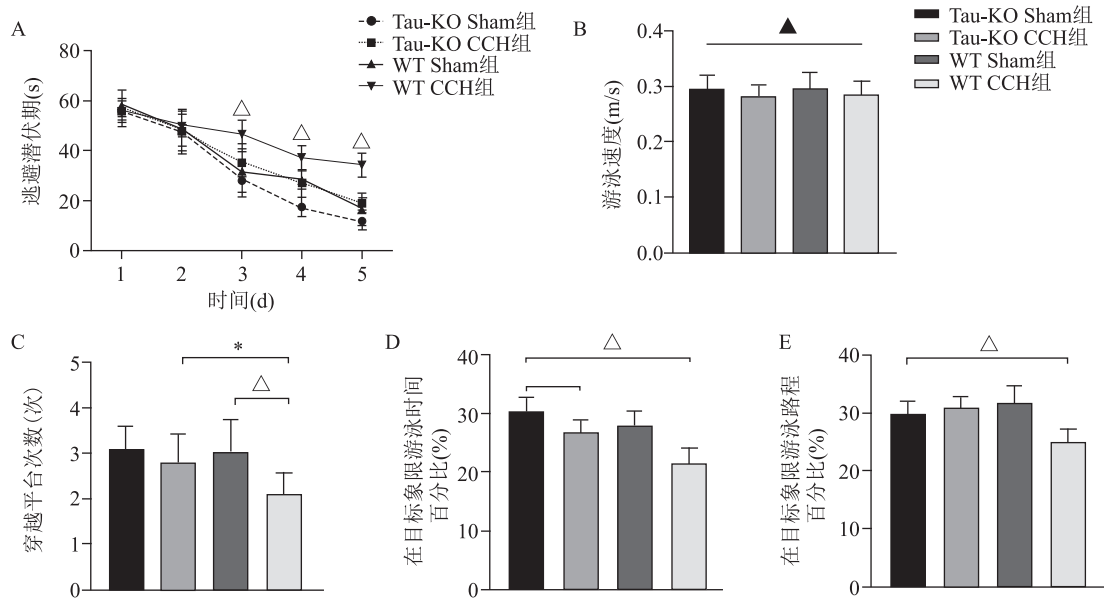


图3 Morris 水迷宫实验 A 为各组小鼠逃避潜伏期随时间变化;B 为各组小鼠游泳速度;C 为穿越平台次数;D,E 分别为在目标象限的游泳时间、游泳路程百分比;两两比较, * $P < 0.05$, $\Delta P < 0.01$, $\blacktriangle P > 0.05$

3 讨论

慢性脑低灌注是临床常见慢性脑功能障碍综合征,其发病率在不断上升。慢性脑低灌注可诱发各种脑血管功能障碍和血管病理学,并通过各种分子级联反应引起血脑屏障损伤,使血液来源的有害物质进入大脑,启动神经变性的多种途径,且与认知功能障碍密切相关^[13-14]。

Tau 蛋白是脑组织中一种正常表达的微管相关蛋白,可维持微管的稳定、调节轴突运输,Tau 蛋白过度磷酸化可驱动 Tau 病理性聚集,是多种神经退行性疾病的共同特征^[15]。近年来研究发现脑内异常聚集的 Tau 蛋白具有类似朊蛋白的病理特征,可诱导可溶性蛋白形成不溶性蛋白聚集体,从而导致 Tau 蛋白播散到其它脑区^[16-17]。

Fg 的蛋白构象和聚集过程与 Tau 蛋白相似,

在 AD 发展中起着重要作用。Fg 通过受损的血管或血脑屏障渗漏到脑组织中,在脑实质中播散^[18-19]。抑制 AD 模型小鼠中 Fg 表达,发现血脑屏障功能障碍、神经血管损伤、神经炎症和小鼠认知功能均得到明显改善^[20]。在 AD 脑中发现,Fg 可与 A β 相互作用,诱导更难降解的异常纤维蛋白凝块的形成,促进 AD 脑实质和血管中 Fg 和 A β 的沉积^[9,21]。这些事件最终可能导致血管损伤、突触功能障碍、神经元死亡和认知功能障碍。

鉴于 Tau 蛋白和 Fg 在形态及聚集过程中的相似性,且两者均在慢性低灌注脑组织中沉积,本研究猜想 Tau 蛋白和 Fg 也存在相互关联并在脑血管病理学中发挥作用。本研究选用 WT, Tau-KO 小鼠通过建立双侧颈总动脉狭窄模型,模拟慢性脑低灌注过程,探索了 Tau 蛋白和 Fg 在低灌注脑组织中的表达情况,并观察阻断 Tau 蛋白表达后 Fg 的表达变化;最后通过水迷宫实验观察小鼠认知能力。本研究发现,慢性脑低灌注可诱导 p-Tau 和 Fg 在大脑皮层及海马中表达和沉积, Tau-KO 小鼠脑实质中 Fg 的表达明显下调,初步说明 Tau 蛋白可加剧 Fg 在脑实质中的沉积。行为学实验显示, WT CCH 组小鼠认知功能障碍最为严重,提示 Tau 蛋白与 Fg 共同参与慢性脑低灌注所致认知功能损伤的病理调节过程。

慢性脑缺血演变为 VCI 的分子机制及病理过程仍不明确,本研究只是初步验证了 Tau 蛋白与 Fg 在慢性脑低灌注中的表达有一定关联,协同加剧认知功能障碍的发生发展,但两者相互作用的机制仍需进一步研究,这将为 VCI 的机制研究及潜在靶向药物开发提供了新思路。

参 考 文 献

- [1] Dichgans M, Leys D. Vascular cognitive impairment[J]. *Circ Res*, 2017, 120(3):573-591.
- [2] Wolters FJ, Ikram MA. Epidemiology of vascular dementia [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019, 39(8):1542-1549.
- [3] Iadecola C, Duering M, Hachinski V, et al. Vascular cognitive impairment and dementia: JACC scientific expert panel [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2019, 73(25):3326-3344.
- [4] Rajeev V, Fann DY, Dinh QN, et al. Pathophysiology of blood brain barrier dysfunction during chronic cerebral hypoperfusion in vascular cognitive impairment [J]. *Theranostics*, 2022, 12(4):1639-1658.
- [5] Salvadores N, Searcy JL, Holland PR, et al. Chronic cerebral hypoperfusion alters amyloid- β peptide pools leading to cerebral amyloid angiopathy, microinfarcts and haemorrhages in Tg-SwDI mice[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2017, 131(16):2109-2123.
- [6] Duncombe J, Kitamura A, Hase Y, et al. Chronic cerebral hypoperfusion: a key mechanism leading to vascular cognitive impairment and dementia. Closing the translational gap between rodent models and human vascular cognitive impairment and dementia[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2017, 131(19):2451-2468.
- [7] Choi BR, Lee SR, Han JS, et al. Synergistic memory impairment through the interaction of chronic cerebral hypoperfusion and amyloid toxicity in a rat model[J]. *Stroke*, 2011, 42(9):2595-2604.
- [8] Ayman, ElAli, Peter, et al. Mild chronic cerebral hypoperfusion induces neurovascular dysfunction, triggering peripheral beta-amyloid brain entry and aggregation [J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2013, 1(1):75.
- [9] Cortes-Canteli M, Zamolodchikov D, Ahn HJ, et al. Fibrinogen and altered hemostasis in Alzheimer's disease[J]. *J Alzheimers Dis*, 2012, 32(3):599-608.
- [10] Zhao Y, Gu JH, Dai CL, et al. Chronic cerebral hypoperfusion causes decrease of O-GlcNAcylation, hyperphosphorylation of tau and behavioral deficits in mice[J]. *Front Aging Neurosci*, 2014, 6:10.
- [11] Ahn HJ, Zamolodchikov D, Cortes-Canteli M, et al. Alzheimer's disease peptide beta-amyloid interacts with fibrinogen and induces its oligomerization[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(50):21812-21817.
- [12] Vkuhlmann MT, Cuhlmann S, Hoppe I, et al. Implantation of a carotid cuff for triggering shear-stress induced atherosclerosis in mice[J]. *J Vis Exp*, 2012(59):3308.
- [13] Nation DA, Sweeney MD, Montagne A, et al. Blood-brain barrier breakdown is an early biomarker of human cognitive dysfunction[J]. *Nat Med*, 2019, 25(2):270-276.
- [14] Sweeney MD, Sagare AP, Zlokovic BV. Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders[J]. *Nat Rev Neurol*, 2018, 14(3):133-150.
- [15] Wang YP, Mandelkow E. Tau in physiology and pathology [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2016, 17(1):5-21.
- [16] Goedert M. Neurodegeneration. Alzheimer's and Parkinson's diseases; the prion concept in relation to assembled A β , tau, and α -synuclein [J]. *Science*, 2015, 349(6248):1255-1255.
- [17] Jucker M, Walker LC. Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases[J]. *Nature*, 2013, 501(7465):45-51.
- [18] Kell DB, Pretorius E. To what extent are the terminal stages of sepsis, septic shock, systemic inflammatory response syndrome, and multiple organ dysfunction syndrome actually driven by a prion/amyloid form of fibrin? [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2018, 44(3):224-238.
- [19] Liu YT, Chen HJ, Kai Z, et al. High levels of plasma fibrinogen are related to post-stroke cognitive impairment[J]. *Brain Behav*, 2019, 9(10):e01391.
- [20] Paul J, Strickland S, Melchor JP. Fibrin deposition accelerates neurovascular damage and neuroinflammation in mouse models of Alzheimer's disease[J]. *J Exp Med*, 2007, 204(8):1999-2008.
- [21] Bian ZH, Yamashita T, Shi XW, et al. Accelerated accumulation of fibrinogen peptide chains with A β deposition in Alzheimer's disease (AD) mice and human AD brains[J]. *Brain Res*, 2021, 1767:147569.