

阿尔茨海默病样三重转基因小鼠血小板的功能改变及机制探讨

刘远新, 刘 涛

(西安体育学院健康科学系, 西安 710068)

【摘要】 **目的** 探讨常见的阿尔茨海默病(AD)小鼠模型 APP/PS-1/tau(3xTg)小鼠血小板功能变化情况及机制分析。**方法** 实验小鼠分为 3xTg-AD 组和 WT 组;采用流式细胞术和粘附试验等方法评价 3xTg-AD 和 WT 小鼠血小板的功能;并采用 Western blotting 方法对其机制进行探讨。**结果** 老年 3xTg-AD 小鼠血小板计数和糖蛋白表达与对照 WT 小鼠差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。但是与对照 WT 小鼠相比,3xTg-AD 小鼠血小板与纤维蛋白原的粘附能力增强 ($P < 0.05$)。此外,与纤维蛋白原粘附功能增强的 3xTg-AD 小鼠血小板信号蛋白的磷酸化也增加,包括 PI3 激酶 Akt 和 p38MAP 激酶 ($P < 0.05$)。然而,两组小鼠中由激动剂诱导的活化血小板无统计学差异 ($P > 0.05$)。**结论** 3xTg-AD 小鼠循环血液中血小板粘附功能增加,可能与 AD 疾病的进展相关。

【关键词】 三重转基因小鼠;阿尔茨海默病;血小板功能

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 06-0017-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.06.004

Changes of platelet function in Alzheimer-like triple transgenic mice and its mechanism

LIU Yuan-xin, LIU Tao

Department of Health Science, Xi'an Physical Education University, Xi'an 710068, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the changes of the platelet function in APP/PS-1/tau(3xTg) mice, a murine model for Alzheimer's disease, and explore its mechanisms. **Methods** We assessed the change of function of platelet in 3xTg-AD mice by flow cytometry. Adhesion assay and Western blotting were used to compare with the data of wild type mice. **Results** Platelets from aged 3xTg-AD mice were normal in number and glycoprotein expression ($P > 0.05$), but adhere more avidly on matrices such as fibrinogen, compared with the platelets from age-matching wild type mice ($P < 0.05$). The washed platelets of 3xTg-AD mice were adherent to fibrinogen, and also showed increased phosphorylation of selected signaling proteins, including PI3 kinase effector Akt and p38MAP kinase ($P < 0.05$). In contrast, activation induced by several agonists in 3xTg-AD mice was similar to that of wild type platelets ($P > 0.05$). **Conclusions** These results demonstrate that Alzheimer's mutations result in a significant hyper-activated adhesion state of circulating platelets, evident with the progression of the disease.

【Key words】 3xTg mice; Alzheimer's disease; Platelet function

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 主要特征是淀粉样 β 肽 ($A\beta$) 在脑实质与脑血管的分布, 后者往往与脑淀粉样血管病相关^[1]。虽然 AD 通常被认为是神经系统疾病, 但实质上是一种系统性疾病, 可以影响外周组织中的血管和血细胞。研究表明, AD 与一些血管疾病相关, 包括中风、动脉粥样硬化和高血压^[2]。同时, 许多血管疾病的危险因素可能增加 AD 的风险^[3]。

在外周血细胞中, 在止血与血栓形成中发挥重要作用的血小板, 最有可能与血管疾病和 AD 有联系^[4]。与同龄健康者比较, AD 患者血小板形态及淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 代谢异常, 特别是 APP 比值明显降低^[5]。此外, AD 患者血小板在一般情况下处于高活化状态, 受到刺激后 P-选择素高表达, 整合素 $\alpha IIb\beta 3$ 激活, 以及高水平的血小板/白细胞聚集^[6]。血小板活化也在 APP23 小鼠 AD 模型中观察到, 老年 APP23 小鼠血小板整合素活化增强, 激活的血小板可导致血管炎症和血栓形成^[7]。研究发现, 3xTg-AD 小鼠血小板 APP 减少, 这是 AD 患者血小板常出现的状况^[8]。此外, 3xTg-AD 小鼠脑血管中 $A\beta$ 、凝血酶、肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1 和 6 等过表达^[9]。然而, 3xTg-AD 小鼠血小板功能变化未被报道。因而, 本研究旨在比较老年 3xTg-AD 和野生型 (WT) 小鼠血小板粘附及活化状态。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

清洁级 C57BL/6 小鼠购于西安交通大学医学部【SCXK(陕)2007-003】; APP/PS1/Tau 三重转基因 (3xTg) 小鼠购于上海斯莱克实验动物有限公司【SCXK(沪)2012-0002】; 鼠龄为 18 个月。实验动物分为两组, 3xTg-AD 组和正常对照 (WT) 组。

1.2 实验仪器及试剂

流式细胞仪 (美国 BD 公司); 荧光显微镜 (日本奥林巴斯); 凝血酶受体活化肽 (TRAP4)、convulxin (CVX) 和 U46619 (美国 Sigma 公司); 糖蛋白 VI、CD42b、CD41 和 CD49b 抗体 (美国 Biologend 公司); TRITC 标记鬼笔环肽 (美国 Sigma 公司); P-Akt、P-p38 和 β -actin 抗体 (美国 CST 公司)。

1.3 血小板制备

从麻醉小鼠的腹腔静脉采集血液, 注射器中含

有 3.8% 枸橼酸钠做为抗凝剂。血液用 HEPES 缓冲液稀释后 180 r/min 离心 10 min, 获得血小板丰富的血浆 (PRP)。再加入 0.02 U/mL 磷酸酶和 1 μ mol/L PGE1 后, 离心 10 min (550 r/min)。去除上清液后, 用 PIPES 缓冲液洗涤血小板颗粒后离心 15 min (720 r/min)。然后制备的血小板悬浮在 HEPES 缓冲液中 (5×10^8 /mL)。

1.4 流式细胞分析

制备好的血小板样品 (在 0.05 mL HEPES 缓冲液中含有 10^6 细胞), 未经处理或 0.5 mmol/L TRAP4、50 ng/mL convulxin 和 5 μ mol/L U46619 刺激的血小板, 在室温下与 FITC 标记的纤维蛋白原反应 30 min。采用特异性抗体检测 WT 和 3xTg-AD 小鼠血小板表面的糖蛋白表达。

1.5 粘附分析

首先, 盖玻片放入 100 μ g/mL 纤维蛋白原溶液中在室温下过夜, 然后用 1% 胎牛血清室温下封闭 2 h。0.5 mL 血小板 (4×10^7 /mL) 放到覆盖纤维蛋白原盖玻片上反应 1 h, 且含有 1 mmol/L $CaCl_2$, 非贴壁血小板移去, 贴壁血小板被固定, Triton X-100 通透, 经 TRITC 标记的鬼笔环肽与血小板肌动蛋白结合, 在荧光显微镜下观察盖玻片上的血小板。

1.6 Western blotting

收集与纤维蛋白原粘附功能增强的 3xTg-AD 小鼠血小板, 进行全细胞裂解。BCA 法蛋白定量, 制备成电泳样品。组取 15 μ g 样品, 进行凝胶电泳。电泳结束后将目的蛋白转移到 PVDF 膜上。然后分别加入 P-Akt、P-p38 和 β -actin 抗体 (1:1000) 中, 室温下孵育 3 h。然后将膜放入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 中, 孵育 1 h。根据 ECL 试剂盒显示特异蛋白条带 X 光片。所得 X-光胶片用 Gel Doc 凝胶成像分析系统分析。

1.7 统计学方法

数据采用 SPSS 19.0 软件进行统计学处理, 数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间比较采用非配对 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3xTg-AD 小鼠血小板计算及糖蛋白表达

流式细胞分析表明, 与对照 WT 组小鼠比较, 3xTg-AD 组小鼠血小板和白细胞计数差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 1A、B)。下一步观察两组小鼠血小板糖蛋白的表达, 包括糖蛋白 Ib α (CD42b)、糖

蛋白 $\alpha 2$ (CD49b)、糖蛋白 $\alpha II b$ (CD41) 和糖蛋白 VI (GPVI)。流式细胞分析结果显示,两组小鼠血小板表面糖蛋白的表达差异也无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 1C)。

2.2 3xTg-AD 小鼠血小板活化状态

通过检测与整合素结合的纤维蛋白原,比较不同激活剂对两组小鼠血小板活化的影响。流式细胞结果显示,两组小鼠血小板纤维蛋白原表达相似,差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 2A)。同时,

研究也观察了两组小鼠血小板 P-选择素的表达,不同激活剂刺激后,差异也无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 2B)。

2.3 3xTg-AD 小鼠血小板粘附功能增加

下面比较两组小鼠血小板与纤维蛋白原结合的能力,粘附分析结果表明,与对照 WT 组小鼠比较,3xTg-AD 组小鼠与纤维蛋白原结合的血小板显著增加 ($P < 0.01$) (图 3)。

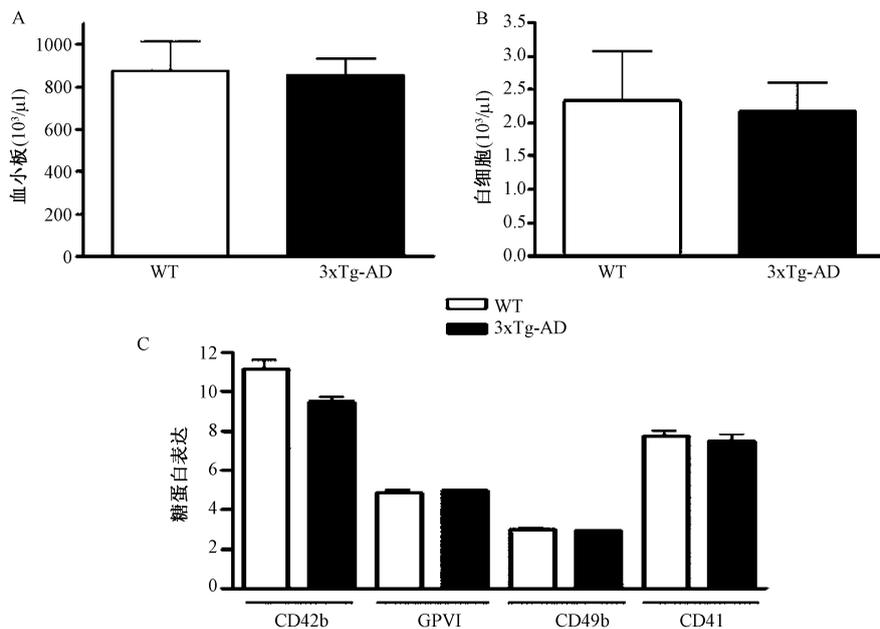


图 1 3xTg-AD 小鼠血小板计算及糖蛋白表达

Fig. 1 Characterization of platelets from the 3xTg-AD mice. A, B: Platelets and white blood cells count in whole blood from WT and 3xTg-AD mice. (C) Surface expression of different glycoproteins on the platelets of WT and 3xTg-AD mice.

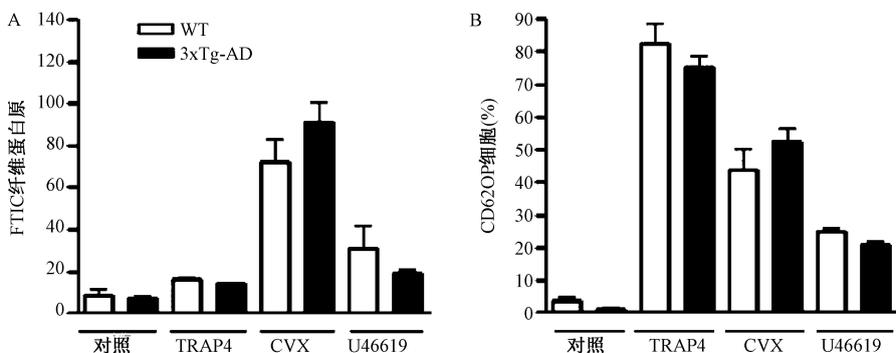
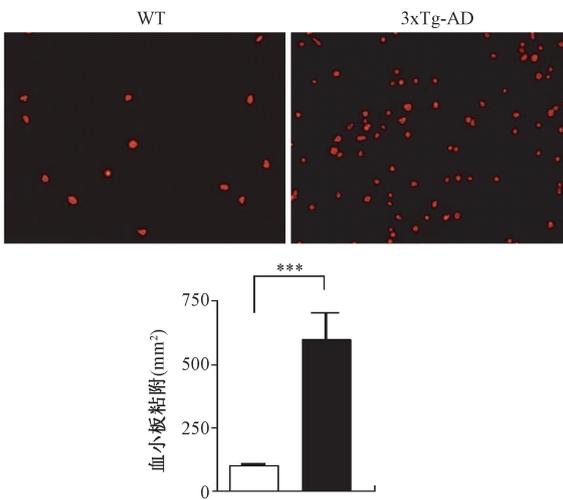


图 2 3xTg-AD 小鼠血小板活化状态

Fig. 2 Integrin $\alpha II b \beta 3$ inside-out activation and P-selectin expression of the 3xTg-AD platelets. (A) Flow cytometric analysis of FITC-labeled fibrinogen binding to WT and 3xTg-AD platelets stimulated with agonist. (B) P-selectin (CD62P) expression on the platelet surface is analyzed in flow cytometry under resting and stimulated conditions.



注: WT 组与 3xTg-AD 组相比较, *** $P < 0.005$

图 3 3xTg-AD 小鼠血小板粘附功能(标尺 = 250 μm)

Note. Wild type compared with the transgenic, *** $P < 0.005$

Fig. 3 Adhesion function of the 3xTg-AD platelets. Representative images of adherent platelets to the indicated substrates are reported (Bar = 250 μm). Quantification of platelets adhesion, evaluated as number of adherent platelets/ mm^2 .

2.4 Western blotting 分析

Western blotting 结果显示,与对照 WT 组小鼠比较,3xTg-AD 组小鼠血小板 P-Akt 和 P-p38 表达显著的增加($P < 0.05$) (图 4)。

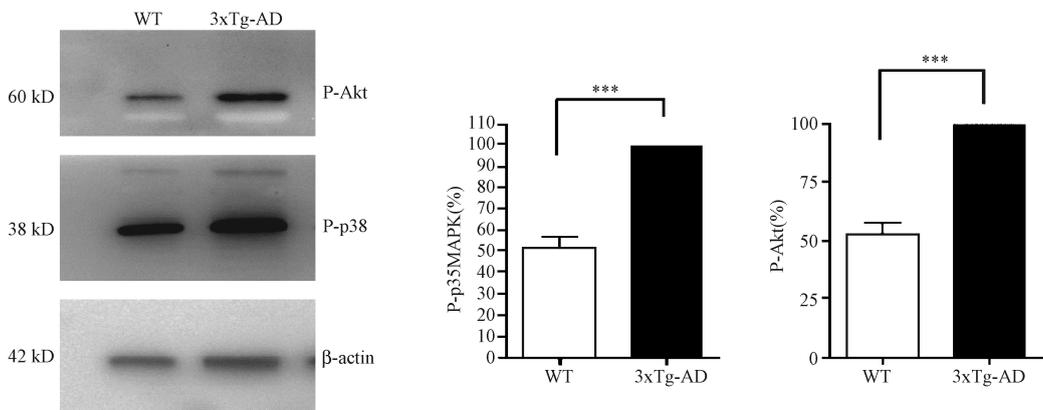
3 讨论

本研究表明,与年龄相匹配的 WT 小鼠血小板比较,老年 3xTg-AD 小鼠循环血液中血小板显示出与内皮下基质(纤维蛋白原)的粘附能力增强。

3xTg-AD 小鼠血小板粘附能力增强或许可以解释 AD 患者血栓形成的风险增加^[10]。使用 AD 小鼠模型而不是 AD 患者去探讨血液中血小板功能的改变具有一定的优势,并可克服内在的局限性。比如,AD 小鼠通常携带特定的突变基因,其与 AD 的发生相关,因此,这种方法可将特定的突变基因与血小板功能改变的机制联系起来。

这些 AD 模型到目前为止已经用于 AD 的病理学多方面的研究,但是血小板功能的变化尚不明确。因此,本研究证实广泛使用的 AD 模型,3xTg-AD 小鼠血小板粘附功能(血栓形成的初始关键步骤)发生改变。以往在相关的 AD 小鼠模型,APP23 小鼠中发现了血小板过度活化^[11]。相对于以往的研究,本研究不仅将血小板功能分析扩展,而且采用目前广泛使用的 3xTg-AD 小鼠模型。事实上,3xTg-AD 小鼠与 APP23 小鼠一样,携带 APP23 突变,同时也携带早老素和 tau 蛋白突变。这些 AD 小鼠的表型和生化特征与 AD 患者有许多相似之处,包括过度磷酸化 tau 蛋白的积累^[12]。

值得注意的是,我们的研究结果与已往在 APP23 小鼠中报道是不一致的^[11]。相对于 APP23 小鼠,3xTg-AD 小鼠与对照 WT 小鼠的血小板,在可溶性激动剂诱导下血小板的活化状态无显著差异。这种差异提示,不同的突变诱导的 AD 可能对血小板功能有影响。然而,也不能排除我们的研究结果与 Jarre 等人报道的差异,可能是由于血小板制备过程中存在差异^[11]。然而,3xTg-AD 小鼠和 APP23 小鼠研究均表明 AD 的发病血小板功能改变有关。在 3xTg-AD 小鼠主要与血小板粘附功能改变;在



注: WT 组与 3xTg-AD 组相比较, *** $P < 0.005$

图 4 3xTg-AD 小鼠血小板 P-Akt 和 P-p38 表达

Note. Wild type compared with the transgenic mice, *** $P < 0.005$

Fig. 4 Expression of P-Akt and P-p38 in the 3xTg-AD platelets

APP23 小鼠主要与激动剂诱导的血小板活化有关。在血栓形成的过程中,粘附能力改变可激活血小板,是血栓形成的关键步骤^[13,14]。在本研究,我们已经证明,3xTg-AD 小鼠血小板与细胞外基质粘附增加,导致血小板活化的信号通路激活,包括 P-Akt 和 P-p38 表达显著增加。粘附血小板的激活是后续血栓形成必不可少的步骤。

总之,本研究证实了广泛使用的 AD 模型,3xTg-AD 小鼠血小板粘附功能发生变化,提示血小板粘附功能改变可能有助于 AD 相关的血管并发症。

参考文献:

- [1] Yamada M. Cerebral amyloid angiopathy: emerging concepts [J]. *J Stroke*, 2015, 17(1): 17-30.
- [2] Mielke MM, Rosenberg PB, Tschanz J, et al. Vascular factors predict rate of progression in Alzheimer disease [J]. *Neurology*, 2007, 69(19): 1850-1858.
- [3] Viswanathan A, Greenberg SM. Cerebral amyloid angiopathy in the elderly [J]. *Ann Neurol*, 2011, 70(6): 871-880.
- [4] Canobbio I, Abubaker A A, Visconte C, et al. Role of amyloid peptides in vascular dysfunction and platelet dysregulation in Alzheimer's disease [J]. *Front Cell Neurosci*, 2015, 9(65): 1-15.
- [5] Veitinger M, Varga B, Guterres SB, et al. Platelets, a reliable source for peripheral Alzheimer's disease biomarkers? [J]. *Acta Neuropathol Comm*, 2014, 2(1): 1-15.
- [6] Laske C. Clinical and biomarker changes in Alzheimer's disease [J]. *New Engl J Med*, 2012, 367(21): 2051-2052.
- [7] Jarre A, Gowert NS, Donner L, et al. Pre-activated blood platelets and a pro-thrombotic phenotype in APP23 mice modeling Alzheimer's disease [J]. *Cell Signal*, 2014, 26(9): 2040-2050.
- [8] Plagg B, Marksteiner J, Kniewallner KM, et al. Platelet dysfunction in hypercholesterolemia mice, two Alzheimer's disease mouse models and in human patients with Alzheimer's disease [J]. *Biogerontology*, 2015, 16(4): 1-16.
- [9] Mervis RF, Mckeon J, Pindell T, et al. A new paradigm for the treatment of Alzheimer's disease: targeting vascular activation [J]. *J Alzheimers Dis*, 2014, 40(3): 619-630.
- [10] Stellos K, Panagiota V, Kögel A, et al. Predictive value of platelet activation for the rate of cognitive decline in Alzheimer's disease patients [J]. *J Cerebral Blood Flow & Metab*, 2010, 30(11): 1817-1820.
- [11] Jarre A, Gowert NS, Donner L, et al. Pre-activated blood platelets and a pro-thrombotic phenotype in APP23 mice modeling Alzheimer's disease [J]. *Cell Signal*, 2014, 26(9): 2040-2050.
- [12] Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, et al. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction [J]. *Neuron*, 2003, 39(3): 409-421.
- [13] Jackson SP, Nesbitt WS, Westein E. Dynamics of platelet thrombus formation [J]. *J Thromb Haemost J*, 2009, 7 Suppl 1 (Supplement s1): 17-20.
- [14] Gowert NS, Donner L, Chatterjee M, et al. Blood platelets in the progression of Alzheimer's disease [J]. *Plos One*, 2013, 9(2): e90523.

[修回日期] 2016-11-26