



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109430166 A

(43)申请公布日 2019.03.08

(21)申请号 201811519705.9

(22)申请日 2018.12.12

(71)申请人 徐州医科大学

地址 221008 江苏省徐州市铜山路209号

(72)发明人 张洋 武煜

(74)专利代理机构 西安研创天下知识产权代理  
事务所(普通合伙) 61239

代理人 杨凤娟

(51)Int.Cl.

A01K 67/02(2006.01)

C12N 5/0793(2010.01)

C12Q 1/32(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

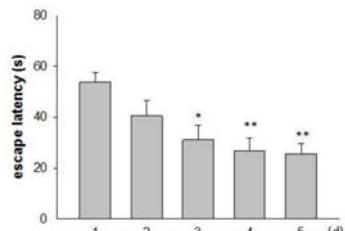
权利要求书7页 说明书24页 附图14页

(54)发明名称

一种学习记忆功能保护机制的研究方法

(57)摘要

本发明公开了一种学习记忆功能保护机制的研究方法,采用ICR雄性小鼠随机分组,检测小鼠在经典空间认知记忆实验,学习记忆的不同阶段,不同时间的效果,并检测小鼠脑内皮层神经突触体的自噬表达情况;然后利用 $\gamma$ -氨基丁酸受体抑制剂荷包牡丹碱和自噬抑制剂6-氨基-3-甲基嘌呤分别用于分离培养的ICR小鼠原代神经元和侧脑室注射ICR小鼠,Morris水迷宫和条件恐惧实验检测小鼠学习记忆情况,免疫组织化学,检测小鼠大脑皮层自噬蛋白与PSD蛋白的表达以及神经突触体形态学的改变,再观察NMDA受体亚型与自噬进程之间的调节机制。



1.一种学习记忆功能保护机制的研究方法,其特征在于,包括以下步骤:

步骤1 Morris水迷宫实验

实验总时间为完整的5天,训练前4天,第5天进行空间记忆测试,训练阶段每天固定时间按顺序从4个象限标志处,将小鼠面向池壁分别放入水中,1分钟或者90秒内记录其寻找隐藏在水面下站台并且保持10-15秒的逃离潜伏期,如果在规定时间内没有找到水面下的站台则需人工引导至站台并同样保持10-15秒;完成的小鼠移出水池,迅速擦干体毛放回笼内,每只小鼠每天每个象限训练一次,连续4天,第五天在相同时间将小鼠由除了站台所在象限的其他三个任意象限面朝池壁放入水中,记录小鼠找到水下站台时间并保持的时间为逃离潜伏期作为评价小鼠空间学习记忆建立快慢的指标;

步骤2 条件恐惧实验

实验开始先给与实验对象声音作为条件刺激信号,然后给予电击刺激作为非条件信号,这种条件反射训练结束后在进行单纯条件刺激讯号的训练,最后在检测只有单纯条件信号情况下小鼠恐惧记忆消退的情况;训练成功的小鼠在相同的环境或不同环境下,对同样的声音信号都会做出明显的恐惧不动姿态;实验方案简述如下:条件恐惧系统是由数据采集分析盒、弱刺激器、强刺激器、摄像头、测试箱组成;实验期间要保证实验室除受训小鼠外,无其他组别小鼠,因为本实验采用的是声音和电击两个刺激器,期间会产生分贝较高的声响;系统能自动检测和记录僵直时间相关实验数据:总的僵直时间,僵直出现次数和百分比等;整个实验分为三个阶段,分三天进行;第一阶段为训练期;实验前,先设置好测试条件:开启指示灯,小鼠放入箱中首先适应3分钟,然后开启声音刺激器2.5赫兹,85分贝保持30秒后停止,开启电刺激器0.75毫安保持2秒后停止,间歇2分钟,从声音刺激开始实验,重复6次上述过程,重复7次,总时间1244秒;打开条件恐惧系统软件,确保摄像头正常开启,画面均匀度一致;将小鼠轻轻放入恐惧箱中,关好恐惧箱,点击开始按钮,进行实验,软件会自动采集和记录小鼠活动度数据;实验结束后,取出小鼠,会发现小鼠会因为收到刺激而排泄粪便和尿液,所以在进行下一只小鼠测试前将恐惧箱内的小鼠粪便和尿液用酒精擦拭干净,否则会因为气味改变,影响实验;第二阶段为Contextual期,既不给予声音刺激也不给予电刺激,让其自由活动,时间为1200秒,每只小鼠实验结束后都要清理恐惧箱;第三阶段为记忆期,即:改变恐惧箱内在环境,在恐惧箱内铺上纸板,对角线也加上纸板;设置测试条件为:打开恐惧箱内室灯,刚入小鼠,适应3分钟,首先开启声音刺激器,2.5赫兹,85分贝,保持30秒后停止,再间歇2分钟,从声音刺激开始实验,重复9次上述过程,重复10次,总时间1680秒;

步骤3 制备组织蛋白样本

步骤4 小鼠神经元突触体制备

步骤5 原代小鼠大脑皮层神经元分离培养

步骤6 大脑皮层神经元Golgi染色

4%多聚甲醛的配制:取适量的PBS+多聚甲醛粉,40℃烘箱中隔夜溶解;或者购买配好的多聚甲醛溶液来用;14%氨水500ml配制:25%氨水336ml+264ml去离子水混匀;95%乙醇500ml配制:取475ml 100%乙醇,向其中加入25ml去离子水;90%乙醇500ml配制:取450ml 100%乙醇,向其中加入50ml去离子水;80%乙醇500ml配制:取400ml 100%乙醇,向其中加入100ml去离子水;75%乙醇500ml配制:取375ml 100%乙醇,向其中加入125ml去离子水;

50%乙醇500ml配制:取250ml 100%乙醇,向其中加入250ml去离子水;70ml去离子水+30g蔗糖,搅拌充分,完全溶解成30%蔗糖溶液100ml;Golgi Cox液:由A液(5%重铬酸钾),B液5%氯化汞和C液5%铬酸钾组成;配制Golgi Cox液1000ml的步骤:5%重铬酸钾A和5%氯化汞B边混合边搅拌于500ml的烧杯中;5%铬酸钾C和400ml去离子水在1000ml的烧杯中混合,再加入5%重铬酸钾A和5%氯化汞B的混合液于烧杯中;加去离子水定容至1000毫升,避光保存备用;

CXA溶液配制:1:1:1的比例混合氯仿,二甲苯,100%乙醇成为CXA溶液;载玻片用加清洁剂洗净,然后煮沸30min去脂去蛋白,流水反复冲洗后烘干,然后浓硫酸浸泡24小时,流水反复冲洗后烘干,最后浸泡于去离子水24h,烘箱烘干玻片备用;0.5%铬钒明胶配方:明胶5.0g+去离子水500ml,60℃搅拌溶解;再加去离子水定容至1000ml,放入铬钒0.5g使溶液变成蓝色,加热至70℃,使溶质全部溶解;将载玻片浸没于烧杯1min,取出载玻片,滤纸贴在边缘小心吸干多余液体,60℃烘箱烘干备用;

颈椎离断处死动物,固定好四肢后,用镊子提起皮肤,注意不要夹住腹腔脏器,用剪刀横着剪开腹部致两侧肋弓下,然后沿着腹部中线向上纵行剪开胸部皮肤,暴露胸骨;镊子提起剑突,用剪子沿着胸骨正中剪开胸腔直至剪开胸锁关节,注意不能伤及纵隔内大血管,然后沿着两侧肋弓下缘剪开膈肌致两侧,将两侧肋骨拉开充分暴露心脏,撕开心包膜辨识心房心室,然后迅速右心房剪口然后剪开左心室,用灌胃针将4℃预冷的PBS由左心室快速推入,PBS经血液循环由右心房流出,小鼠口鼻皮肤变白,四肢远端抽搐为灌注完全;然后迅速剪开颅骨,取出整个大脑,4℃预冷PBS浸洗后,吸水纸蘸干后迅速浸入试剂盒中固定液中,放在黑暗避光的地方4℃浸泡14天,并每三天更换混匀瓶中液体;第15天取出脑组织块浸入30%蔗糖3天;蔗糖用0.1M PB配制;用切片机将脑块切成50μm厚度贴片与载玻片上;按照蒸馏水1min;30%氨水30min;蒸馏水1min;显影液2min;定影剂40~60min;蒸馏水1min;50%酒精5min;70%酒精5min;80%酒精5min~90%酒精5min~95%酒精5min;100%酒精5min;100%酒精5min;100%酒精5min;CXA5min;CXA10min;中性树脂封片的顺序做好染色,60倍油镜下观察计数树突棘的数目,计算方法:在二级或三级树突上选择长度为20mm的树突状段,在60X油镜下计算单位长度的棘数,至少观察到三个次级树突节段,每个神经元的树突观察长度至少为60mm,计算树突棘数目;

#### 步骤7 免疫组织化学染色

颈椎离断处死动物,固定好四肢后,用镊子提起皮肤,注意不要夹住腹腔脏器,用剪刀横着剪开腹部致两侧肋弓下,然后沿着腹部中线向上纵行剪开胸部皮肤,暴露胸骨;镊子提起剑突,用剪子沿着胸骨正中剪开胸腔直至剪开胸锁关节,注意不能伤及纵隔内大血管,然后沿着两侧肋弓下缘剪开膈肌致两侧,将两侧肋骨拉开充分暴露心脏,撕开心包膜辨识心房心室,然后迅速右心房剪口然后剪开左心室,用灌胃针将4℃预冷4%多聚甲醛由左心室快速灌注,经脑循环由右心房流出,小鼠口鼻皮肤变白,四肢远端抽搐为灌注完全;然后迅速两眼间剪一刀,小脑后剪一刀,在纵行剪开颅顶取出整个大脑,纸蘸干后迅速放入4%多聚甲醛缓冲液中,避光4℃固定24h,然后和常规方法一样脱水、浸蜡、包埋、连续石蜡切片4~5um厚,贴片后进行免疫组化检测大脑皮层组织中LC3-II蛋白的表达,步骤如下:二甲苯I 15min;二甲苯II 15min;95%酒精15min;95%酒精II 5min;3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>室温20~37℃10~15min,消除内源性过氧化物酶活性,双蒸水ddH<sub>2</sub>O洗3次×3min;我们采用枸橼酸钠溶液先进行修

复抗原，微波炉子高火3min，解冻8min，自然冷却后用无菌PBS清洗3次每次3min；然后用4%胎牛的血清室温孵育封闭15min以减少非特异性抗原染色，滤纸小心边缘蘸干多余液体，不用洗；胎牛血清配置的抗体工作液含兔抗鼠LC3多克隆一抗抗体，1:100工作浓度小心覆盖于玻片表面，在湿盒内4℃过夜；第二天无菌PBS沾洗3次，滤纸边缘蘸干液体后，加辣根过氧化物酶标记羊抗兔IgG二抗，室温避光静置2h，然后PBS浸洗3次每次2min；边缘利用张力蘸干多余液体后，常规使用葡萄糖氧化酶二氨基联苯胺显色，中性树胶封片；免疫组织化学染色切片于200倍视野显微镜下分析和评估反映LC3-II蛋白质表达水平；

#### 步骤8 免疫印迹检测法测定蛋白表达

#### 步骤9 细胞爬片免疫荧光

用洗洁精去除油脂和杂蛋白后，彻底清洗圆形盖玻片，硫酸浸泡24h，取出后流水冲洗30min，酒精灯火烤干，置于灭菌炉中高温灭菌，取出后置于烘箱60℃过夜烘干；将处理好的圆形盖玻片小心置于无菌24孔培养板底部，然后10mg/mL的多聚赖氨酸300μL铺板，最后将分离好的神经元原液以0.18M个/ml的密度种在孔中正常培养；成熟后药物作用以后去除培养基置于冰上，吸引器贴边吸干，用预冷的4℃PBS浸洗2次乘以3分钟；然后将3.7%的多聚甲醛300μL加到细胞培养孔中，固定15min，吸引器贴边小心吸干，再次用预冷4℃的PBS浸洗3次乘以3分钟，吸引器贴边小心吸干后再往孔里面加0.1%的Triton X-100 150μL，细胞膜打孔10min；吸引器贴边小心吸干液体，用预冷4℃的PBS浸洗3次每次3分钟；吸引器贴边小心吸干后将爬片用5%BSA封闭液进行封闭，室温1小时；使用5%BSA封闭液稀释一抗，小心的在每个圆形盖玻片上滴加1:200浓度的一抗，4℃孵育过夜；24h后小心贴边吸去一抗，再用预冷的4℃的PBS浸洗爬片，3次乘以3min；二抗用5%BSA的PBS稀释后，小心的在每个圆形盖玻片上滴加浓度1:1000的二抗，室温孵育2小时，小心贴边吸去二抗，用PBS浸洗爬片，3次乘以3min；然后小心将爬片取出24孔板，注意不要将爬片的细胞面搞反，去脂去杂蛋白和酸泡灭菌烘干的载玻片上滴加5μL含DAPI的防荧光淬灭的封片剂，然后将爬片“倒扣”在上面，一个片子扣两个，避光阴凉干透，指甲油封闭盖玻片周边，在荧光显微镜下观察测定荧光；

#### 步骤10 细胞MTT测定

细胞胞浆内的线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴还原甲瓒，为水不溶性的蓝紫色结晶并在细胞中沉积，而如果是死细胞则没有此功能，然后用二甲基亚砜溶解细胞中的甲瓒，再根据蓝色溶液在490nm波长的吸光度测定OD值一反应存活的细胞数量；我们使用的MTT浓度为5mg/ml，PBS溶解；溶解混匀后，用0.22的滤膜过滤除菌，-20℃避光保存备用；细胞计数然后接种于96孔培养板，给药实验后，吸引器贴壁小心吸除培养基，预冷4℃PBS浸洗2次每次3min，然后每孔加10ul配置好的MTT，重新放入培养箱孵育4小时，取出后每孔加入DMSO 150μL摇床震动10min溶解结晶，最后酶标仪490nm波长检测OD值；

#### 步骤11 细胞LDH测定

乳酸脱氢酶存在于活的细胞组织中；正常情况下在细胞内部发挥作用，不能自由进出细胞膜，所以胞外培养基中基本不含LDH，担当细胞受损、死亡细胞膜通透性增大的时候，LDH漏出到细胞外培养基中，催化胞外溶液中的乳酸为丙酮酸，其氧化型辅酶I变成还原型辅酶I，胞外溶液中还原碘硝基氯化氮唑蓝和/或硝基氯化四氮唑蓝变成蓝色的甲簪，利用酶标仪在490nm波长测定吸光度即OD值，反应细胞活性；实验操作按照试剂盒说明进行，最

后室温放置5分钟后,酶标仪波长490nm读取吸光度;

#### 步骤12 统计分析

统计学软件SPSS19.0统计分析处理数据,结果都用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用t检验,p<0.05被认为差异有统计学意义。

2.根据权利要求1所述的学习记忆功能保护机制的研究方法,其特征在于,研究方法的研究结果显示:ICR小鼠在进行Morris水迷宫实验中,大脑皮层突触体自噬蛋白LC3-II表达增加,且比不训练的小鼠大脑皮层突触体增多,水迷宫各个学习记忆阶段自噬表达逐渐升高,在第三天训练后24小时内各时间点自噬蛋白表达均升高,但与第二天、第四天相比无差异,而第三天不同时间点进行水迷宫实验也显示自噬增加超过不训练组,且午后训练的小鼠皮层突触体自噬表达显著;Bicuculline侧脑室注射小鼠条件恐惧实验僵直时间延长,注射后小鼠Morris水迷宫实验各个学习记忆阶段找到平台潜伏期缩短,给与3-MA侧脑室注射抑制自噬后Morris水迷宫小鼠找到平台潜伏期延长;提取小鼠大脑皮层检测显示Bicuculline使自噬蛋白LC3-II表达明显增加,PSD结构蛋白shank3减少而PSD95增多,自噬抑制剂3-MA明显抑制小鼠大脑皮层自噬蛋白的表达,PSD结构蛋白shank3增加而PSD95降低;脑组织切片免疫组织化学染色显示Bicuculline注射后皮层神经元内自噬蛋白LC3-II表达增多,而自噬抑制剂3-MA明显降低小鼠大脑皮层神经元内自噬蛋白LC3-II的表达;脑组织切片Golgi染色显示Bicuculline注射后皮层神经元树突脊增加,自噬抑制剂3-MA抑制小鼠皮层神经元树突脊的增加;小鼠原代神经元细胞培养18天给与Bicuculline,24小时后自噬相关蛋白Beclin-1,Atg5,LC3-II增加,而PSD蛋白shank3,NR1,NR2B降低,AMPAR,PSD95增高,若同时给与自噬抑制剂3-MA则抑制上述蛋白变化,细胞免疫荧光也显示Bicuculline使原代神经元内自噬增加,3-MA则抑制自噬的表达;NMDA受体抑制剂MK801降低Bicuculline引起的原代神经元内自噬增加,进一步单独使用NMDA受体亚型NR2B抑制剂ifenprodil以降低Bicuculline引起的原代神经元内自噬增加,而单独使用NR1抑制剂NVP-AAM077并不能减少原代神经元内自噬的增加;有意思的是泛素化抑制剂MG-132亦能降低原代神经元内自噬的增加;ICR新生鼠给与STZ腹腔注射,不需要结合高脂高糖饮食,引起小鼠成年后体重下降,血糖升高,引起小鼠学习记忆受损,皮层神经元PSD结构蛋白shank3和PSD95降低,海马神经元PSD结构蛋白PSD95降低但shank3变化不明显;成年ICR小鼠侧脑室注射STZ在不引起血糖升高的情况下直接快速的诱导出小鼠学习记忆受损,皮层和海马神经元PSD结构蛋白shank3和PSD95均降低;虽然此两种方法均引起小鼠Morris水迷宫实验找到平台潜伏期延长,但是条件恐惧实验腹腔注射小鼠僵直时间延长,而侧脑室注射组的僵直时间缩短,结果分别与单纯转基因动物条件恐惧实验的结果相一致。

3.根据权利要求1所述的学习记忆功能保护机制的研究方法,其特征在于,步骤3具体为:

#### 3.1,准备裂解液

(1) 溶PMSF,将PMSF晶体溶到PMSF溶剂中,即配成10ml,100mM的PMSF溶液;

#### (2) 裂解液的制备

组成:PIRA裂解液+PMSF溶剂+蛋白酶抑制剂=10mlPIRA+100ulPMSF+1片蛋白酶抑制剂

#### 3.2,研磨组织

(1) 取出玻璃研磨器,1mm<sup>3</sup>组织加1ul裂解液

(2) 研磨后置于冰上,15min;

3.3,离心提取蛋白上清液

(1) 提前30min预冷离心机4℃;

(2) 配平,离心12000rpm,10min;

(4) 取上清液,储存在-20℃备用;

3.4,BCA法测蛋白浓度

采用BCA法测定蛋白浓度;参照说明书方法将A液、B液按照50:1配制工作液;取标准蛋白溶液0.5mg/ml,按0、1、2、4、8、12、16、20ul体积依次加到96孔板内,再用双蒸水依次相应补足至20ul/孔;待测样品每孔加5ul,再用双蒸水依次相应补足至20ul/孔,每孔再加工作液200ul,在37℃烘箱孵育30min,酶标仪低频震荡2s后在562nm下测定吸光度;做出标准曲线,加入趋势线与公式,根据公式计算蛋白含量;在蛋白样品中加5X loading buffer,在恒温反应器上95℃加热8分钟,使细胞蛋白变性,放在-20℃冰箱保存。

4. 根据权利要求1所述的学习记忆功能保护机制的研究方法,其特征在于,步骤4具体为:4.1突触体的制备参照本实验既往试验方法,所有操作在4℃条件下进行;小鼠大脑皮层加1毫升0.32M浓度的葡萄糖缓冲液,葡萄糖缓冲液的成分为:0.32M蔗糖溶液,5mM HEPES pH 7.4,1mM MgCl<sub>2</sub>,0.5mM CaCl<sub>2</sub>,蛋白酶抑制剂,200μg/ml PMSF,2μg/ml胃蛋白酶制剂A,4μg/ml亮抑酶肽,800rpm上下机械研磨12个往复;

4.2研磨后的混匀夜称重配平,4℃1782g离心10分钟;

4.3弃去沉淀,上清液中补足0.32M葡萄糖缓冲液至1mL,然后用滴管小心悬浮于1mL1.2M葡萄糖缓冲液上面,称重配平后4℃171369g超速离心15分钟;

4.4小心吸留上下液面分界处的悬浮液,补足0.32M的葡萄糖缓冲液至1mL,然后用滴管小心悬浮于1mL0.8M葡萄糖缓冲液上,称重配平后4℃171369g超速离心15分钟;离心后底部沉淀即为突触体,-80℃保存。

5. 根据权利要求1所述的学习记忆功能保护机制的研究方法,其特征在于,步骤5具体为:

5.1眼科剪、眼科镊小鼠解剖手术器械及相应试管、枪头121℃灭菌30分钟,取出后烘箱干燥备用;

5.2用无菌的PBS溶液配置多聚赖氨酸成浓度为10mg/mL的储存液备用,1.5mL的离心管分装,4℃备用;用无菌的PBS将10mg/mL的储存液500倍稀释为浓度0.02mg/mL,无菌过滤后待用;铺板时12孔培养板的每个小孔加多聚赖氨酸溶液600uL,水平轻微震荡使其均匀铺满整个孔板底部,静置3h备用;

5.3Neurobasal培养基:马血清:Gultamax按照90:10:1的比例配置Plating溶液待用;Neurobasal培养基:B27复温溶解后按照50:1的比例配好备用;

5.420mg木瓜蛋白酶加10ml Hibernate-E,37℃水浴锅1h保持酶活性配置消化液浓度为2mg/ml;

5.575%酒精消毒的冰袋放入超净台,10cm的无菌培养皿,加8ml Hibernate-E备用,取出手术剪、眼科镊、弯镊解剖器械待用;

5.6孕18天的孕鼠在细胞房缓冲间快速脱颈椎处死,腹部朝上置于尿垫上;75%酒精消毒孕鼠腹部,拎起孕鼠腹部皮肤,小心剖开孕鼠腹部皮肤及腹膜,由小鼠腹部两侧轻轻拉出

子宫,分离取出子宫置于100mm培养皿中,盖上盖子,75%酒精整体喷洒消毒后置于超净台中;

5.7小心的剪开子宫和胎膜,镊子拉出胎鼠;小鼠头部眼睛上方和小脑后用眼科剪横向各剪一刀,再沿脑矢状缝纵剪一刀;两边尽量撕开脑壳,尽量将大脑暴露在视野之中,用弯镊小心从颅底部取出整个大脑,放在事先准备好的Hibernate-E得100mm培养皿中;

5.8去除大脑顶部的嗅球,小心剥去大脑皮层脉络膜,拨开两侧大脑皮层,去除大脑皮层内丘脑脑干部分;将处理好的大脑皮层组织移至另外一个含有Hibernate-E溶液的100mm培养皿中;

5.9剪碎所有胎鼠的大脑皮层组织,放入过滤后的木瓜蛋白酶消化液中置于37℃的水浴锅中震荡消化20分钟;

5.10皮层组织充分消化后,加入离心管并配平,妥善放置于4℃离心机中,以4000rpm转速离心5min;弃上清,加入2-3mL Plating溶液在含有组织沉淀的离心管中,用灼烧过尖端而变得圆润的5mL枪头轻轻吹打8-10次,力度适中无泡沫产生,然后取细胞原液1mL加1.5mLPlating溶液冰上备用;用灼烧过尖端而变得圆润的5mL枪头上再套一个1mL枪头反复轻轻吹打8-10次,力度适中无泡沫产生,取1.5ml作为细胞原液,冰上置于备用;

5.11取细胞原液100ul置于1.5ml无菌EP管中;取另一1.5ml无菌EP管,加入90ul台盼蓝染液,再加入10ul细胞原液,轻轻吹打混匀;在10ul含有细胞的台盼蓝染液中吸取一滴,滴加于细胞计数器上的盖膜边缘,靠虹吸作用铺面计数格,在显微镜下观察计数;计数完毕后,弃去孔板内的多聚赖氨酸溶液,用Plating溶液将细胞稀释成0.3M个/ml的细胞悬液,种在孔板中,1.5h后,细胞附着在孔板底部,将Plating溶液换成Neurobasal加B27的培养液;每隔两天换三分之一培养液。

6.根据权利要求1所述的学习记忆功能保护机制的研究方法,其特征在于,步骤8具体为:

#### 8.1SDS—PAGE电泳

聚丙烯酰胺凝胶的配置:仔细对好电泳所用的长短玻璃板,玻璃板事先去胶去脂去蛋白仔细清洗至流水无水痕,烘箱干燥,固定在玻璃夹板中,反复检查两玻璃板底部是否对齐,否则加胶一定会漏出;准备好超纯水、30%Acr-Bis29:1、1M Tris Ph8.8、1M Tris Ph6.8、10%SDS、10%过硫酸铵、TEMED,按表中比例依次加入相应体积的试剂,混匀;首先灌注分离胶,灌好后立即沿玻璃板左侧缓慢加入超纯水,应尽量不要产生气泡;在室温下静置30-40分钟后,分离胶凝固;再灌浓缩胶,立马从玻璃板左侧倾斜着插入梳子,避免产生气泡,在室温下静置30-40分钟后,浓缩胶凝固;制备完成后,封闭保存于4℃冰箱;分别将10X的电泳缓冲液、10X转膜缓冲液和、20X TBS,稀释至1X备用;将配置好的聚丙烯酰胺凝胶玻璃板与U行电极固定,防止漏液;倒入1X电泳缓冲液,轻轻拔下梳子,准备上样;蛋白样品解冻,上样前将其混匀,每孔加入30ug蛋白样品;浓缩胶电泳条件为90伏电压,35分钟;分离胶电泳条件为120伏电压,60分钟,电泳观察溴酚兰位置,达到蛋白预期位置即能停止,取出凝胶进行转膜;

#### 8.2转膜

转膜:倒入1X转膜缓冲液,将白黑色双面夹、海绵、滤纸、NC膜按由上往下黑、海绵、滤纸、凝胶、滤纸、海绵、白顺序依次在托盘内放好,小心对齐,轻轻用小滚轮排除气泡,夹好;

注意：凝胶是近黑色面的；将转移槽置于冰水中，放入三明治夹，注意：黑对黑，红对红；缓慢加入1X转移缓冲液，避免产生气泡，插上电极，条件为250–300毫安，65分钟；

立春红染色：转膜步骤完成后，将带有蛋白的NC膜裁剪成合适大小，放入丽春红染液中，在摇床上振摇3分钟，将立春红染液倒入瓶中回收，能重复利用；用纯水轻轻漂洗条带2–3次，每次2分钟，观察细胞蛋白是否成功转到膜上；

### 8.3 免疫反应

5%脱脂奶粉TBST封闭，室温摇床1h，移除并蘸干封闭液，一抗孵育，5%脱脂奶粉TBST稀释相应一抗1:2000，4℃缓慢摇动孵育过夜；第二天小心剪开封闭膜，将一抗回收–20℃，TBST室温摇床清洗4次每次8分钟，然后5%脱脂奶粉TBST稀释相应二抗1:4000（辣根过氧化酶标记），室温下摇床孵育2h，小心剪除包膜，TBST室温摇床清洗4次每次8分钟，进行化学发光反应；

### 8.4 化学发光显色法显色

ECL显色试剂盒reagent 1和reagent2以1:1混合置于暗盒内，将裁剪好的待曝光的NC膜放入暗盒，震荡反应1分钟，提前打开凝胶成像系统，让CCD预冷至–20℃，温度显示由红变绿，迅速取出待曝光膜放进成像系统曝光；条带用ImageJ软件分析。

## 一种学习记忆功能保护机制的研究方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于医学研究技术领域,具体地说,涉及一种学习记忆功能保护机制的研究方法。

### 背景技术

[0002] 近年来,随着寿命的增加,与年龄相关的疾病的数量日益增多,尤其是老年痴呆患者。流行病学调查研究显示,阿尔茨海默症(Alzheimer's disease,AD)是老年痴呆最常见的致病原因,而且直至本世纪中期AD病例将进一步增多,成为影响人类生存质量的重大社会和个人问题。AD影响到全世界大约4700万人,这个数字预计在未来20年内还会增加一倍。防治总成本2010估计超过8000亿美元,预计到2018将在全球范围内达到一万亿美元。

[0003] AD是一种复杂的疾病,主要表现为进行性认知障碍。然而,随着疾病的发展,还会出现其他非认知症状,包括睡眠和食欲受损,以及神经精神障碍,脑电的改变(例如,抑郁和冷漠)等。此外,越来越多的流行病学研究支持代谢紊乱和AD之间的联系,虽然目前AD被认为是一种世界范围的疾病,但对AD发病机制的研究主要集中在记忆和认知功能障碍的发展上,而与物质代谢相关的致病机理在很大程度上仍被忽视。毋容置疑的是目前国际上仍然缺乏该疾病的早期诊断方法,而AD的病理生理学改变可能认知障碍症状出现之前就开始发生发展,远远早于临床治疗阶段。此外,尽管过去几十年来动物和临床研究的进展提高了我们对AD病理生理过程的认识,但即使是成功的临床前评估药物有所进展,但在大型临床试验中,并没有有效逆转或减缓AD进展。这些限制可能是由于目前实验主要集中在基于抗淀粉酶的治疗上,这是因为淀粉样物质级联假说已经被置于防治AD疾病发生发展的中心,而涉及到物质代谢紊乱的机制尚未得到明确的研究结果。

[0004] 神经纤维由轴突和树突组成,轴突轴突、轴突树突以及神经胞体之间形成的突触是神经纤维联系,发挥正常功用的基础。但是在许多神经变性性疾病的早期,神经突起变性损伤失活,其表现为突触丢失、轴突变性和(或)神经纤维末梢萎缩。突触结构在认知记忆过程中的重构是脑内信息存储和处理的基本机制。大部分重塑发生在突触后膜致密区(PSD),这是一种特殊的生化物质。PSD蛋白结构含有谷氨酸受体和相关的支架蛋白,它们在突触后膜上组织信号转导通路。在突触成熟的过程中PSD经历了明显的结构变化,包括生长、络合和穿孔、动态翻转。这种结构可塑性被认为是伴随和可修正的,受到PSD分子组成和信号特性变化的影响。事实上,已经有研究提议稳定或去除PSD中的谷氨酸受体和信号蛋白用于加固突触构建强度的长期改变,时间范围从学习记忆过程的数分钟到数天不等。然而,除了少数例外,PSD中特定的(而且可能有很多)蛋白分子变化对突触活动的反应仍不清楚。突触分子含量的长期变化可能是由于新蛋白的加入或现有突触蛋白的选择性稳定或去除而引起的。目前,大量研究认为突触功能和结构持续变化是依赖刺激因素引起的基因表达和蛋白质合成。事实上,大量的证据表明依赖于神经元活动兴奋的突触可塑性至关重要,但是,主要研究支持树突棘mRNAs的局部翻译在组织长期形式的学习记忆相关系统中的作用,与基因转录和蛋白质合成相比,蛋白质代谢对突触PSD结构和功能变化的研究关注要少得多。

[0005] 细胞内的蛋白质有也两种类型,其中寿命较短的蛋白一般经过泛素化-蛋白酶体途径降解代谢。而寿命较长,相对较为稳定的蛋白大多数经自噬途径降解代谢。自噬降解代谢的蛋白质成为氨基酸,可以提供给细胞从新合成新的蛋白质,也可以为糖异生或者酮体生成提供原料。错误和受损的蛋白被分子伴侣结合,特异性连接蛋白P62引导蛋白致自噬小泡,然后自噬小泡与溶酶体形成的自噬溶酶体将错误或受损的蛋白降解。自噬作为蛋白代谢的重要途径,在相对稳定的长寿命蛋白,如某些结构或骨架蛋白的降解代谢中发挥重要作用,如果其进程受到阻碍或者中断,就会引起一系列蛋白质代谢障碍疾病。神经退行性疾病共同病理特征是大脑特定区域神经元中因突变而聚集大量错误折叠的蛋白。阿尔茨海默症就是基因突变造成的 $\beta$ -淀粉样蛋白的异常聚集。帕金森综合症 (Parkinson's disease, PD) 患者脑中 $\alpha$ -突触核蛋白 ( $\alpha$ -synuclein) 的点突变使得突变蛋白更倾向形成聚集体,研究发现,这些疾病细胞自噬进程严重受阻,多是因为p62蛋白突变或者自噬途径异常,错误蛋白不能通过自噬降解,造成细胞内聚集引起细胞功能紊乱寿命缩短。自噬缺陷动物模型脑内神经元中错误蛋白聚集越发严重神经细胞毒性越重。而自噬的增强可以加快亨廷顿蛋白,淀粉样蛋白的清除,减少错误蛋白的数量而降低神经细胞毒性。

[0006] 自噬进程为细胞内物质代谢的重要途径,在生理条件下起到维持神经元的稳态和保持存活方面起着至关重要的作用,而在环境恶劣的情况下细胞则可以通过自噬途径降解蛋白质,重新获得可利用的生物大分子,如氨基酸,然后根据细胞内的需要将底物运送到相应部位参与重建,生物学上将自噬一般分为三种类型:巨型自噬、微型自噬型和伴侣型自噬,而我们研究通常提到的自噬即巨型自噬。在一定条件刺激下,细胞内逐渐形成自噬小泡,小泡膜持续延展,在包绕特定的蛋白质、细胞质成分或者细胞器后,双层小泡膜闭合,形成自噬小体呈典型的双层膜结构,然后自噬小体与含有水解酶的溶酶体相互融合,就变成具有单层膜结构的自噬溶酶体,降解小体内的底物。在自噬形成和成熟过程中,需要大量的蛋白质和蛋白质复合物参与。很多神经退行性疾病,包括一些我们熟知的阿尔茨海默氏症(AD)、帕金森(PD)、亨廷顿病(HD) 和脊髓侧索硬化肌萎缩症,其特征性的病理改变都是错误折叠的蛋白质和突变的蛋白质异常聚集的结果]。神经元轴突和树突功能的正常发挥对蛋白质代谢紊乱尤其敏感。因此,这些细胞容易损伤和死亡。观察到AD、PD、HD患者脑内退行性神经突起内存在自噬现象。自噬体数量大幅增加在体内动物模型和体外细胞模型中都与神经元变性有关。对于自噬现象有多种解释。一方面,自噬是由内部和外部因素激活的,这表现在自噬小体数量的增加。另一方面,自噬溶酶体降解功能受限将导致大量自噬小体的异常聚集。目前,有两个假设解释细胞内双层脂质膜自噬小泡的起源,一种假设是,自噬膜是通过在细胞质中重新合成而积累的;另一个假设是自噬膜来源于现有的细胞器,如内质网、线粒体、质膜等,这些胞浆内的膜性细胞器结构延展最终形成自噬小泡。

[0007] 细胞在兴奋与应激刺激中,物质代谢增强,胞内自噬进程增加,除了为适应兴奋或应激而提高底物供应,清除影响细胞功能发挥的错误折叠的蛋白和受损的细胞器之外,作为蛋白质代谢的重要途径,是否还在蛋白结构的调整与重塑发挥某些重要的功能?最近的研究有报道称,大脑神经元网络因接收到外界刺激而同步兴奋激活时会产生震荡波样的放电,被称为 $\gamma$  震荡,这种震荡放电被认为是高级别认知功能建立重要条件,以前的研究曾经发现, $\gamma$  震荡可因阿尔茨海默症等多种神经退行性疾病中被打断, $\gamma$  震荡下降后, $\beta$ -淀粉样蛋白沉聚形成斑块,动物的认知能力衰退。所以现在有研究对阿尔茨海默症模型小鼠使用

光遗传学技术直接刺激海马区内的神经元,产生的 $\gamma$ 震荡显著减少了 $\beta$ -淀粉样蛋白的形成,不但使直接接受刺激的视觉皮层内 $\beta$ -淀粉样蛋白含量水平降低了一半,同时也可以逐渐减少小鼠视觉皮层淀粉样蛋白斑块的形成。但是 $\beta$ -淀粉样蛋白斑块在神经元兴奋时是如何减少的机制并未见报道,目前的研究认为自噬可以清除 $\beta$ -淀粉样蛋白或者tau纤维缠结而起到改善AD的作用,而对于自噬的其他功用研究尚少。在其他可兴奋细胞中如果出现运动兴奋也可以促进自噬增加,而且也有报道显示自噬对于神经轴突树突末端的生长具有促进作用,所以根据这样的思路我们假设:视觉刺激只是代表一种刺激类型,但如果视觉刺激或者运动刺激可引起神经细胞兴奋而出现上述功能改变,那么认知记忆过程引起的大脑皮层兴奋是不是也可以同样在脑内产生上述变化,而自噬的蛋白质代谢功能在此过程中除了清除和维稳的功效外,对于神经突触特别是突触后致密区蛋白构建的调控发挥何种作用及其调节机制成为本发明的研究重点。

## 发明内容

[0008] 本发明的目的在于提出了一种学习记忆功能保护机制的研究方法。主要通过研究自噬在突触体构建以调节神经元认知功能中的作用,特别是对神经突触后膜致密区(postsynaptic density, PSD)蛋白构建的影响,试图揭示AD疾病认知功能障碍的保护机制。

[0009] 其技术方案如下:

[0010] 一种学习记忆功能保护机制的研究方法,包括以下步骤:

[0011] 步骤1 Morris水迷宫实验

[0012] 实验总时间为完整的5天,训练前4天,第5天进行空间记忆测试,训练阶段每天固定时间按顺序从4个象限标志处,将小鼠面向池壁(避免看到水中站台)分别放入水中,1分钟或者90秒内记录其寻找到隐藏在水面下站台并且保持10-15秒的逃离潜伏期,如果在规定时间内没有找到水面下的站台则需人工引导至站台并同样保持10-15秒。完成的小鼠移出水池,迅速擦干体毛(可用电热取暖器烤干)放回笼内,每只小鼠每天每个象限训练一次,连续4天,第五天在相同时间将小鼠由除了站台所在象限的其他三个任意象限面朝池壁放入水中,记录小鼠找到水下站台时间并保持的时间为逃离潜伏期(escape latency)作为评价小鼠空间学习记忆建立快慢的指标。

[0013] 步骤2条件恐惧实验

[0014] 实验开始先给与实验对象声音作为条件刺激信号,然后给予电击刺激作为非条件信号,这种条件反射训练结束后在进行单纯条件刺激讯号的训练,最后在检测只有单纯条件信号情况下小鼠恐惧记忆消退的情况。训练成功的小鼠在相同的环境或不同环境下,对同样的声音信号都会做出明显的恐惧不动姿态。实验方案简述如下:条件恐惧系统是由数据采集分析盒、弱刺激器(声音、光线)、强刺激器(电击)、摄像头、测试箱等部分组成。实验期间要保证实验室内除受训小鼠外,无其他组别小鼠,因为本实验采用的是声音和电击两个刺激器,期间会产生分贝较高的声响。系统可以自动检测和记录僵直时间等相关实验数据:总的僵直时间,僵直出现次数和百分比等。整个实验分为三个阶段,分三天进行。第一阶段为训练期。实验前,先设置好测试条件:开启指示灯,小鼠放入箱中首先适应3分钟,然后开启声音刺激器(2.5赫兹,85分贝)保持30秒后停止,开启电刺激器(0.75毫安)保持2秒后

停止,间歇2分钟(无声音刺激、无电刺激)。从声音刺激开始实验,重复6次上述过程,重复7次,总时间1244秒。打开条件恐惧系统软件,确保摄像头正常开启,画面均匀度一致。将小鼠轻轻放入恐惧箱中,关好恐惧箱,点击开始按钮,进行实验,软件会自动采集和记录小鼠活动度数据。实验结束后,取出小鼠,会发现小鼠会因为收到刺激而排泄粪便和尿液,所以在进行下一只小鼠测试前将恐惧箱内的小鼠粪便和尿液用酒精擦拭干净,否则会因为气味改变,影响实验。第二阶段为Contextual期,既不给予声音刺激也不给予电刺激,让其自由活动,时间为1200秒,每只小鼠实验结束后都要清理恐惧箱。第三阶段为记忆期,即:改变恐惧箱内在环境,在恐惧箱内铺上纸板,对角线也加上纸板。设置测试条件为:打开恐惧箱内室灯,刚入小鼠,适应3分钟,首先开启声音刺激器(2.5赫兹,85分贝)保持30秒后停止,再间歇2分钟(无声音刺激、无电刺激),从声音刺激开始实验,重复9次上述过程,重复10次,总时间1680秒。

- [0015] 步骤3制备组织蛋白样本
- [0016] 步骤4小鼠神经元突触体制备
- [0017] 步骤5原代小鼠大脑皮层神经元分离培养
- [0018] 步骤6大脑皮层神经元Golgi染色
- [0019] 4%多聚甲醛的配制:取适量的PBS+多聚甲醛粉,40℃烘箱中隔夜溶解。也可购买配好的多聚甲醛溶液来用。14%氨水500ml配制:25%氨水336ml+264ml去离子水混匀。95%乙醇500ml配制:取475ml 100%乙醇,向其中加入25ml去离子水。90%乙醇500ml配制:取450ml 100%乙醇,向其中加入50ml去离子水。80%乙醇500ml配制:取400ml 100%乙醇,向其中加入100ml去离子水。75%乙醇500ml配制:取375ml 100%乙醇,向其中加入125ml去离子水。50%乙醇500ml配制:取250ml 100%乙醇,向其中加入250ml去离子水。70ml去离子水+30g蔗糖,搅拌充分,完全溶解成30%蔗糖溶液100ml。Golgi Cox液:由A液(5%重铬酸钾),B液(5%氯化汞)和C液(5%铬酸钾)组成。配制Golgi Cox液1000ml的步骤:5%重铬酸钾(A)和5%氯化汞(B)边混合边搅拌于500ml的烧杯中。5%铬酸钾(C)和400ml去离子水在1000ml的烧杯中混合,再加入5%重铬酸钾(A)和5%氯化汞(B)的混合液于烧杯中。加去离子水定容至1000毫升,避光保存备用。
- [0020] CXA溶液配制:1:1:1的比例混合氯仿,二甲苯,100%乙醇成为CXA溶液。载玻片用加清洁剂洗净,然后煮沸30min去脂去蛋白,流水反复冲洗后烘干,然后浓硫酸浸泡24小时,流水反复冲洗后烘干,最后浸泡于去离子水24h,烘箱烘干玻片备用。0.5%铬钒明胶配方:明胶5.0g+去离子水500ml,60℃搅拌溶解。再加去离子水定容至1000ml,放入铬钒0.5g使溶液变成蓝色,加热至70℃,使溶质全部溶解。将载玻片浸没于烧杯1min,取出载玻片,滤纸贴在边缘小心吸干多余液体(手和滤纸均不可以触碰玻璃面),60℃烘箱烘干备用。
- [0021] 颈椎离断处死动物,固定好四肢后,用镊子提起皮肤,注意不要夹住腹腔脏器,用剪刀横着剪开腹部致两侧肋弓下,然后沿着腹部中线向上纵行剪开胸部皮肤,暴露胸骨。镊子提起剑突,用剪子沿着胸骨正中剪开胸腔直至剪开胸锁关节,注意不可伤及纵膈内大血管,然后沿着两侧肋弓下缘剪开膈肌致两侧,将两侧肋骨拉开充分暴露心脏,撕开心包膜辨识左右心房心室,然后迅速右心房剪口然后剪开左心室,用灌胃针将4℃预冷的PBS由左心室快速推入,PBS经血液循环由右心房流出,小鼠口鼻皮肤变白,四肢远端抽搐为灌注完全。然后迅速剪开颅骨,取出整个大脑,4℃预冷PBS浸洗后,吸水纸蘸干后迅速浸入试剂盒中固

定液中,放在黑暗避光的地方4℃浸泡14天,并每三天更换混匀瓶中液体。第15天取出脑组织块浸入30%蔗糖3天。蔗糖用0.1M PB配制。用切片机将脑块切成50μm厚度贴片与载玻片上。按照蒸馏水1min;30%氨水30min;蒸馏水1min;显影液2min;定影剂40-60min;蒸馏水1min;50%酒精5min;70%酒精5min;80%酒精5min-90%酒精5min-95%酒精5min;100%酒精5min;100%酒精5min;100%酒精5min;CXA5min;CXA10min;中性树脂封片的顺序做好染色,60倍油镜下观察计数树突棘的数目,计算方法:在二级或三级树突上选择长度为20mm的树突状段,在60X油镜下计算单位长度的棘数,至少观察到三个次级树突节段,每个神经元的树突观察长度至少为60mm,计算树突棘数目。

[0022] 步骤7免疫组织化学染色

[0023] 颈椎离断处死动物,固定好四肢后,用镊子提起皮肤,注意不要夹住腹腔脏器,用剪刀横着剪开腹部致两侧肋弓下,然后沿着腹部中线向上纵行剪开胸部皮肤,暴露胸骨。镊子提起剑突,用剪子沿着胸骨正中剪开胸腔直至剪开胸锁关节,注意不可伤及纵膈内大血管,然后沿着两侧肋弓下缘剪开膈肌致两侧,将两侧肋骨拉开充分暴露心脏,撕开心包膜辨识左右心房心室,然后迅速右心房剪口然后剪开左心室,用灌胃针将4℃预冷4%多聚甲醛由左心室快速灌注,经脑循环由右心房流出,小鼠口鼻皮肤变白,四肢远端抽搐为灌注完全。然后迅速两眼间剪一刀,小脑后剪一刀,在纵行剪开颅顶取出整个大脑,纸蘸干后迅速放入4%多聚甲醛缓冲液中,避光4℃固定24h,然后和常规方法一样脱水、浸蜡、包埋、连续石蜡切片4~5um厚,贴片后进行免疫组化检测大脑皮层组织中LC3-II蛋白的表达,步骤如下:二甲苯I15min;二甲苯II15min;95%酒精I5min;95%酒精II5min;3%H2O2室温(20~37℃)10~15min,消除内源性过氧化物酶活性,双蒸水(ddH2O)洗3次×3min;我们采用枸橼酸钠溶液先进行修复抗原,微波炉子高火3min,解冻8min,自然冷却后用无菌PBS清洗3次每次3min;然后用4%胎牛的血清室温孵育封闭15min以减少非特异性抗原染色,滤纸小心边缘蘸干多余液体,不用洗;胎牛血清配置的抗体工作液含兔抗鼠LC3多克隆一抗抗体,1:100工作浓度小心覆盖于玻片表面,在湿盒内4℃过夜;第二天无菌PBS沾洗3次,滤纸边缘蘸干液体后,加辣根过氧化物酶标记羊抗兔IgG二抗,室温避光静置2h,然后PBS浸洗3次每次2min;边缘利用张力蘸干多余液体后,常规使用葡萄糖氧化酶二氨基联苯胺(DAB)显色,中性树胶封片。免疫组织化学染色切片于200倍视野显微镜下分析和评估反映LC3-II蛋白质表达水平。

[0024] 步骤8免疫印迹检测法(western blot)测定蛋白表达

[0025] 步骤9细胞爬片免疫荧光

[0026] 用洗洁精去除油脂和杂蛋白后,彻底清洗圆形盖玻片,硫酸浸泡24h,取出后流水冲洗30min,酒精灯火烤干,置于灭菌炉中高温灭菌,取出后置于烘箱60℃过夜烘干。将处理好的圆形盖玻片小心置于无菌24孔培养板底部,然后10mg/mL的多聚赖氨酸300μL铺板,最后将分离好的神经元原液以0.18M个/ml的密度种在孔中正常培养。成熟后药物作用以后去除培养基置于冰上,吸引器贴边吸干,用预冷的4℃PBS浸洗2次乘以3分钟;然后将3.7%的多聚甲醛300μL加到细胞培养孔中,固定15min,吸引器贴边小心吸干,再次用预冷4℃的PBS浸洗3次乘以3分钟,吸引器贴边小心吸干后再往孔里面加0.1%的Triton X-100 150μL,细胞膜打孔10min;吸引器贴边小心吸干液体,用预冷4℃的PBS浸洗3次每次3分钟。吸引器贴边小心吸干后将爬片用5%BSA封闭液进行封闭,室温1小时。使用5%BSA封闭液稀释一抗,

小心的在每个圆形盖玻片上滴加1:200浓度的一抗,4℃孵育过夜。24h后小心贴边吸去一抗,再用预冷的4℃的PBS浸洗爬片,3次乘以3min;二抗用5%BSA的PBS稀释后,小心的在每个圆形盖玻片上滴加浓度1:1000的二抗,室温孵育2小时,小心贴边吸去二抗,用PBS浸洗爬片,3次乘以3min。然后小心将爬片取出24孔板,注意不要将爬片的细胞面搞反,去脂去杂蛋白和酸泡灭菌烘干的载玻片上滴加5μL含DAPI的防荧光淬灭的封片剂,然后将爬片“倒扣”在上面,一个片子可以扣两个,避光阴凉干透,指甲油封闭盖玻片周边,在荧光显微镜下观察测定荧光。

[0027] 步骤10细胞MTT测定

[0028] 细胞胞浆内的线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴(3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide, MTT)还原甲瓒(Formazan),为水不溶性的蓝紫色结晶并在细胞中沉积,而如果是死细胞则没有此功能,然后用二甲基亚砜(DMSO)溶解细胞中的甲瓒,再根据蓝色溶液在490nm波长的吸光度测定OD值一反应存活的细胞数量。我们使用的MTT浓度为5mg/ml,PBS溶解。溶解混匀后,用0.22的滤膜过滤除菌,-20℃避光保存备用。细胞计数然后接种于96孔培养板,给药实验后,吸引器贴壁小心吸除培养基,预冷4℃PBS浸洗2次每次3min,然后每孔加10ul配置好的MTT,重新放入培养箱孵育4小时,取出后每孔加入DMSO150μL摇床震动10min溶解结晶,最后酶标仪490nm波长检测OD值。

[0029] 步骤11细胞LDH测定

[0030] 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)存在于活的细胞组织中。正常情况下在细胞内部发挥功用,不能自由进出细胞膜,所以胞外培养基中基本不含LDH,担当细胞受损、死亡等细胞膜通透性增大的时候,LDH漏出到细胞外培养基中,可以催化胞外溶液中的乳酸为丙酮酸,其氧化型辅酶I变成还原型辅酶I,胞外溶液中还原碘硝基氯化氮唑蓝(INT)和(或)硝基氯化四氮唑蓝(NBT)变成蓝色的甲瓒,利用酶标仪在490nm波长测定吸光度即OD值,反应细胞活性。实验操作按照试剂盒说明进行,最后室温放置5分钟后,酶标仪波长490nm读取吸光度。

[0031] 步骤12统计分析

[0032] 统计学软件SPSS19.0统计分析处理数据,结果都用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用t检验,p<0.05被认为差异有统计学意义。

[0033] 进一步,研究方法的研究结果显示:ICR小鼠在进行Morris水迷宫实验中,大脑皮层突触体自噬蛋白LC3-II表达增加,且比不训练的小鼠大脑皮层突触体增多,水迷宫各个学习记忆阶段自噬表达逐渐升高,在第三天训练后24小时内各时间点自噬蛋白表达均升高,但与第二天、第四天相比无差异,而第三天不同时间点进行水迷宫实验也显示自噬增加超过不训练组,且午后训练的小鼠皮层突触体自噬表达显著;Bicuculline侧脑室注射小鼠条件恐惧实验僵直时间延长,注射后小鼠Morris水迷宫实验各个学习记忆阶段找到平台潜伏期缩短,给与3-MA侧脑室注射抑制自噬后Morris水迷宫小鼠找到平台潜伏期延长;提取小鼠大脑皮层检测显示Bicuculline可使自噬蛋白LC3-II表达明显增加,PSD结构蛋白shank3减少而PSD95增多,自噬抑制剂3-MA明显抑制小鼠大脑皮层自噬蛋白的表达,PSD结构蛋白shank3增加而PSD95降低。脑组织切片免疫组织化学染色显示Bicuculline注射后皮层神经元内自噬蛋白LC3-II表达增多,而自噬抑制剂3-MA明显降低小鼠大脑皮层神经元内

自噬蛋白LC3-II的表达;脑组织切片Golgi染色显示Bicuculline注射后皮层神经元树突脊增加,自噬抑制剂3-MA抑制小鼠皮层神经元树突脊的增加;小鼠原代神经元细胞培养18天给与Bicuculline,24小时后自噬相关蛋白Beclin-1,Atg5,LC3-II增加,而PSD蛋白shank3,NR1,NR2B降低,AMPAR,PSD95增高,若同时给与自噬抑制剂3-MA则可抑制上述蛋白变化,细胞免疫荧光也显示Bicuculline可使原代神经元内自噬增加,3-MA则可抑制自噬的表达;NMDA受体抑制剂MK801可降低Bicuculline引起的原代神经元内自噬增加,进一步单独使用NMDA受体亚型NR2B抑制剂ifenprodil可以降低Bicuculline引起的原代神经元内自噬增加,而单独使用NR1抑制剂NVP-AAM077并不能减少原代神经元内自噬的增加;有意思的是泛素化抑制剂MG-132亦可以降低原代神经元内自噬的增加。ICR新生鼠给与STZ腹腔注射,不需要结合高脂高糖饮食,可引起小鼠成年后体重下降,血糖升高,引起小鼠学习记忆受损,皮层神经元PSD结构蛋白shank3和PSD95降低,海马神经元PSD结构蛋白PSD95降低但shank3变化不明显;成年ICR小鼠侧脑室注射STZ可在不引起血糖升高的情况下直接快速的诱导出小鼠学习记忆受损,皮层和海马神经元PSD结构蛋白shank3和PSD95均降低;虽然此两种方法均可引起小鼠Morris水迷宫实验找到平台潜伏期延长,但是条件恐惧实验腹腔注射小鼠僵直时间延长,而侧脑室注射组的僵直时间缩短,结果分别与单纯转基因动物条件恐惧实验的结果相一致。

[0034] 进一步,步骤3具体为:

[0035] 3.1,准备裂解液

[0036] (1) 溶PMSF (将PMSF晶体溶到PMSF溶剂中,即配成10ml,100mM的PMSF溶液)

[0037] (2) 裂解液的制备

[0038] 组成:PIRA裂解液+PMSF溶剂+蛋白酶抑制剂=10mlPIRA+100u1PMSF+1片蛋白酶抑制剂

[0039] 3.2,研磨组织

[0040] (1) 取出玻璃研磨器,1mm<sup>3</sup>组织加1u1裂解液

[0041] (2) 研磨后置于冰上,15min。

[0042] 3.3,离心提取蛋白上清液

[0043] (1) 提前30min预冷离心机(4℃)。

[0044] (2) 配平,离心(12000rpm,10min)。

[0045] (4) 取上清液,储存在-20℃备用。(提前将1.5ml的离心管编号)。

[0046] 3.4,BCA法测蛋白浓度

[0047] 采用BCA法测定蛋白浓度。参照说明书方法将A液、B液按照50:1配制工作液。取标准蛋白溶液0.5mg/ml,按0、1、2、4、8、12、16、20u1体积依次加到96孔板内,再用双蒸水依次相应补足至20u1/孔。待测样品每孔加5u1,再用双蒸水依次相应补足至20u1/孔,每孔再加工作液200u1,在37℃烘箱孵育30min,酶标仪低频震荡2s后在562nm下测定吸光度。做出标准曲线,加入趋势线与公式,根据公式计算蛋白含量(蛋白含量要X4)。在蛋白样品中加5X loading buffer,在恒温反应器上95℃加热8分钟,使细胞蛋白变性,放在-20℃冰箱保存。

[0048] 进一步,步骤4具体为:4.1突触体的制备参照本实验既往试验方法,所有操作在4℃条件下进行。小鼠大脑皮层(约0.25cm<sup>3</sup>)加1毫升0.32M浓度的葡萄糖缓冲液(0.32M蔗糖溶液,5mM HEPES pH 7.4,1mM MgCl<sub>2</sub>,0.5mM CaCl<sub>2</sub>,蛋白酶抑制剂,200μg/ml PMSF,2μg/ml

胃蛋白酶制剂A,4 $\mu$ g/ml亮抑酶肽),800rpm上下机械研磨12个往复;

[0049] 4.2研磨后的混匀液称重配平,4℃1782g离心10分钟;

[0050] 4.3弃去沉淀,上清液中补足0.32M葡萄糖缓冲液至1mL,然后用滴管小心悬浮于1mL1.2M葡萄糖缓冲液上面,称重配平后4℃171369g超速离心15分钟;

[0051] 4.4小心吸留上下液面分界处的悬浮液(呈乳白色),补足0.32M的葡萄糖缓冲液至1mL,然后用滴管小心悬浮于1mL0.8M葡萄糖缓冲液上,称重配平后4℃171369g超速离心15分钟;离心后底部沉淀即为突触体,-80℃保存。

[0052] 进一步,步骤5具体为:

[0053] 5.1眼科剪、眼科镊等小鼠解剖手术器械及相应试管、枪头121℃灭菌30分钟,取出后烘箱干燥备用;

[0054] 5.2用无菌的PBS溶液配置多聚赖氨酸成浓度为10mg/mL的储存液备用,1.5mL的离心管分装,4℃备用。用无菌的PBS将10mg/mL的储存液500倍稀释为浓度0.02mg/mL,无菌过滤后待用。铺板时12孔培养板的每个小孔加多聚赖氨酸溶液600 $\mu$ L,水平轻微震荡使其均匀铺满整个孔板底部,静置3h备用;

[0055] 5.3 Neurobasal培养基:马血清:Gultamax按照90:10:1的比例配置Plating溶液待用。Neurobasal培养基:B27复温溶解后按照50:1的比例配好备用。

[0056] 5.4 20mg木瓜蛋白酶加10ml Hibernate-E,37℃水浴锅1h保持酶活性配置消化液浓度为2mg/ml。

[0057] 5.5 75%酒精消毒的冰袋放入超净台,10cm的无菌培养皿,加8ml Hibernate-E备用,取出手术剪、眼科镊、弯镊等解剖器械待用。

[0058] 5.6孕18天的孕鼠在细胞房缓冲间快速脱颈椎处死,腹部朝上置于尿垫上。75%酒精消毒孕鼠腹部,拎起孕鼠腹部皮肤,小心剖开孕鼠腹部皮肤及腹膜,由小鼠腹部两侧轻轻拉出子宫,分离取出子宫置于100mm培养皿中,盖上盖子,75%酒精整体喷洒消毒后置于超净台中。

[0059] 5.7小心的剪开子宫和胎膜,镊子拉出胎鼠。小鼠头部眼睛上方和小脑后用眼科剪横向各剪一刀,再沿脑矢状缝纵剪一刀。左右两边尽量撕开脑壳,尽量将大脑暴露在视野之中,用弯镊小心从颅底部取出整个大脑,放在事先准备好的Hibernate-E得100mm培养皿中。

[0060] 5.8去除大脑顶部的嗅球,小心剥去大脑皮层脉络膜,拨开左右两侧大脑皮层,去除大脑皮层内丘脑脑干部分。将处理好的大脑皮层组织移至另外一个含有Hibernate-E溶液的100mm培养皿中。

[0061] 5.9剪碎所有胎鼠的大脑皮层组织,放入过滤后的木瓜蛋白酶消化液中置于37℃的水浴锅中震荡消化20分钟。

[0062] 5.10皮层组织充分消化后,加入离心管并配平,妥善放置于4℃离心机中,以4000rpm转速离心5min。弃上清,加入2-3mL Plating溶液在含有组织沉淀的离心管中,用灼烧过尖端而变得圆润的5mL枪头轻轻吹打8-10次,力度适中无泡沫产生,然后取细胞原液1mL加1.5mLPlating溶液冰上备用。用灼烧过尖端而变得圆润的5mL枪头上再套一个1mL枪头反复轻轻吹打8-10次,力度适中无泡沫产生,取1.5mL作为细胞原液,冰上置于备用。

[0063] 5.11取细胞原液约100 $\mu$ l置于1.5mL无菌EP管中。取另一1.5mL无菌EP管,加入90 $\mu$ l台盼蓝染液,再加入10 $\mu$ l细胞原液,轻轻吹打混匀。在10 $\mu$ l含有细胞的台盼蓝染液中吸取一

滴,滴加于细胞计数器上的盖膜边缘,靠虹吸作用铺面计数格,在显微镜下观察计数。计数完毕后,弃去孔板内的多聚赖氨酸溶液,用Plating溶液将细胞稀释成0.3M个/ml的细胞悬液,种在孔板中,1.5h后,细胞附着在孔板底部,将Plating溶液换成Neurobasal加B27的培养液。每隔两天换三分之一培养液。

[0064] 进一步,步骤8具体为:

[0065] .8.1SDS—PAGE电泳

[0066] 聚丙烯酰胺凝胶的配置:仔细对好电泳所用的长短玻璃板,玻璃板事先去胶去脂去蛋白仔细清洗至流水无水痕,烘箱干燥,固定在玻璃夹板中,反复检查两玻璃板底部是否对齐,否则加胶一定会漏出。准备好超纯水、30% Acr-Bis29:1、1M Tris Ph8.8、1M Tris Ph6.8、10% SDS、10% 过硫酸铵、TEMED,按表中比例依次加入相应体积的试剂,混匀。首先灌注分离胶,灌好后立即沿玻璃板左侧缓慢加入超纯水,应尽量不要产生气泡。在室温下静置30-40分钟后,分离胶凝固。再灌浓缩胶,立马从玻璃板左侧倾斜着插入梳子,避免产生气泡,在室温下静置30-40分钟后,浓缩胶凝固。制备完成后,封闭保存于4℃冰箱。分别将10X的电泳缓冲液、10X转膜缓冲液和、20X TBS,稀释至1X备用。将配置好的聚丙烯酰胺凝胶玻璃板与U行电极固定,防止漏液。倒入1X电泳缓冲液,轻轻拔下梳子,准备上样。蛋白样品解冻,上样前将其混匀,每孔加入30ug蛋白样品。浓缩胶电泳条件为90伏电压,35分钟;分离胶电泳条件为120伏电压,60分钟,电泳观察溴酚兰位置,达到蛋白预期位置即可停止,取出凝胶进行转膜。

[0067] 8.2转膜

[0068] 转膜(湿转法):倒入1X转膜缓冲液,将白黑色双面夹、海绵、滤纸、NC膜按由上往下黑、海绵、滤纸、凝胶、滤纸、海绵、白顺序依次在托盘内放好,小心对齐“三明治”,轻轻用小滚轮排除气泡,夹好。注意:凝胶是近黑色面的。将转移槽置于冰水中,放入三明治夹,注意:黑对黑,红对红。缓慢加入1X转移缓冲液,避免产生气泡,插上电极,条件为250-300毫安,65分钟。

[0069] 立春红染色:转膜步骤完成后,将带有蛋白的NC膜裁剪成合适大小,放入丽春红染液中,在摇床上振摇3分钟,将立春红染液倒入瓶中回收,可重复利用。用纯水轻轻漂洗条带2-3次,每次2分钟,观察细胞蛋白是否成功转到膜上。

[0070] 8.3免疫反应

[0071] 5%脱脂奶粉TBST封闭,室温摇床1h,移除并蘸干封闭液,一抗孵育,5%脱脂奶粉TBST稀释相应一抗1:2000,4℃缓慢摇动孵育过夜。第二天小心剪开封闭膜,将一抗回收-20℃,TBST室温摇床清洗4次每次8分钟,然后5%脱脂奶粉TBST稀释相应二抗1:4000(辣根过氧化酶标记),室温下摇床孵育2h,小心剪除包膜,TBST室温摇床清洗4次每次8分钟,进行化学发光反应。

[0072] 8.4化学发光显色法显色

[0073] ECL显色试剂盒(Thermos,USA) reagent 1和reagent2以1:1混合置于暗盒内,将裁剪好的待曝光的NC膜放入暗盒,震荡反应1分钟,提前打开凝胶成像系统,让CCD预冷至-20℃左右,温度显示由红变绿,迅速取出待曝光膜放进成像系统曝光。条带用ImageJ软件分析。

[0074] 本发明的有益效果为:

[0075] 本发明主要通过研究自噬在突触体构建以调节神经元认知功能中的作用,特别是对神经突触后膜致密区 (postsynaptic density, PSD) 蛋白构建的影响,试图揭示AD疾病认知功能障碍的保护机制。本发明对于自噬这种蛋白代谢进程在认知记忆过程神经突触后膜致密区重塑中的构建调节机制,得到了一些实验证据,在AD疾病认知记忆减退的防护研究中起到推动作用,从根本上防止疾病的发展。

## 附图说明

[0076] 图1是小鼠Morris水迷宫实验;\*p<0.05;\*\*p<0.01vs.1;n=10;

[0077] 图2是小鼠大脑皮层自噬的表达;A.Morris水迷宫实验与相应天数未训练小鼠大脑皮层自噬蛋白的表达;C.Morris水迷宫实验与相应天数未训练小鼠皮层突触体自噬蛋白的表达;E.Morris水迷宫实验与相应天数未训练小鼠海马自噬蛋白的表达;B.D.F.相应蛋白印记灰度分析;\*p<0.05;\*\*p<0.01vs.S;n=10;

[0078] 图3是小鼠大脑皮层自噬的表达;A.Morris水迷宫实验中第2天训练,和第3天训练后24小时内每间隔6小时小鼠皮层突触体自噬蛋白表达;C.Morris水迷宫实验第3天每间隔6小时训练后和未训练小鼠皮层突触体自噬蛋白表达;B.D.相应蛋白印记灰度分析;\*p<0.05;\*\*p<0.01vs.C;n=10;

[0079] 图4是小鼠行为学实验;A.侧脑室不同剂量荷包牡丹碱1小时后条件恐惧实验结果;B.侧脑室注射0.1 $\mu$ g/mouse荷包牡丹碱1小时后Morris水迷宫实验结果;\*p<0.05;\*\*p<0.01vs.CON;n=16;

[0080] 图5是自噬在小鼠大脑皮层中的表达;A.小鼠侧脑室注射荷包牡丹碱、自噬抑制剂3-MA,1小时后Morris水迷宫实验结果;B.小鼠大脑皮层自噬蛋白表达;C.免疫印迹灰度分析;\*p<0.05;\*\*p<0.01vs.CON;D.小鼠大脑皮层自噬蛋白LC3-II免疫组织化学染色,20X10;n=10;

[0081] 图6是小鼠大脑皮层蛋白表达及Golgi染色;A.小鼠大脑皮层PSD蛋白表达;B.C.免疫印迹灰度分析;D.小鼠侧脑室注射荷包牡丹碱、自噬抑制剂3-MA,Morris水迷宫实验后皮层组织Golgi染色,60X10;E.树突棘统计分析\*p<0.05;\*\*p<0.01vs.CON;n=10;

[0082] 图7是原代神经元细胞给药后的蛋白表达;A.不同浓度的荷包牡丹碱作用24小时后细胞LDH测定;B.不同浓度的荷包牡丹碱作用24小时后细胞MTT测定;C.荷包牡丹碱40 $\mu$ M浓度作用于细胞不同时间点LC3-II的表达;D.免疫印迹灰度分析;E-I.不同浓度的荷包牡丹碱作用24小时后细胞蛋白表达;J-N.相应的免疫印迹灰度分析;\*p<0.05;\*\*p<0.01vs.CON or 0;;

[0083] 图8是原代神经元细胞PSD蛋白表达;A.40 $\mu$ M浓度荷包牡丹碱和2mM浓度3-MA作用于原代神经元,24小时后PSD蛋白表达;B-G.相应免疫印迹灰度分析;H.LC3-II细胞免疫荧光染色;\*p<0.05;\*\*p<0.01vs.CON;

[0084] 图9是原代神经元自噬蛋白LC3-II的表达;A.在40 $\mu$ M浓度荷包牡丹碱作用于原代神经元的基础上,分别加入不同浓度的NMDA受体抑制剂MK801,24小时后LC3-II的表达;B.40 $\mu$ M浓度荷包牡丹碱,2mM浓度3-MA,40 $\mu$ M浓度MK801,3 $\mu$ M浓度Ifenprodil和0.4 $\mu$ M浓度NVP-AAM077作用于原代神经元24小时后LC3-II的表达;B.D.条带灰度分析\*p<0.05;\*\*p<0.01vs.CON;

[0085] 图10是原代神经元自噬蛋白LC3-II的表达;A.在40μM浓度荷包牡丹碱作用于原代神经元的基础上,分别加入不同浓度的蛋白酶体抑制剂MG-302,24小时后检测LC3-II的表达;B.免疫印迹灰度分析;\*\*p<0.01vs.CON。

## 具体实施方式

[0086] 下面结合附图和具体实施方式对本发明的技术方案作进一步详细地说明。

[0087] 1.材料与方法

[0088] 1.1材料

[0089] 1.1.1实验动物

[0090] 野生型清洁级雄性ICR小鼠、孕18天(E18)ICR小鼠、db/db糖尿病和app/ps1双转基因小鼠均由南京大学模式动物研究所提供,许可证号:SCXK(苏)2014-001、SCXK(苏)2015-001。SPF条件饲养,房间恒温恒湿,12h/12h明/暗周期交替和自由获取食物和水。

[0091] 1.1.2主要实验试剂

[0092] Tris base;(B0016K011000,biosharp)

[0093] 30%Acr-Bis(29:1);(KGR0004-500,凯基生物,江苏)

[0094] 1mol/L Tris,PH8.8;(KGB009CS,凯基生物,江苏)

[0095] 1mol/L Tris,PH6.8;(KGB005,凯基生物,江苏)

[0096] 十二烷基硫酸钠SDS;(EC0227,恩晶生物,南京)

[0097] 过硫酸铵;(EC0486,恩晶生物,南京)

[0098] TEMED;(EC0716,恩晶生物,南京)

[0099] NaCl;(10019318,分析纯,国药集团化学试剂有限公司)

[0100] PBS粉末;(恩晶生物,南京)

[0101] 95%乙醇;(分析纯,南京大光明器化玻经营部)

[0102] 无水乙醇;(分析纯,南京大光明器化玻经营部)

[0103] Glycine;(B0016K082000,biosharp)

[0104] 细胞裂解液;(碧云天生物,上海)

[0105] PMSF;(ST505,碧云天生物,,上海)

[0106] 磷酸化酶抑制剂;(碧云天生物,上海)

[0107] 5x loading buffer;(P0015,碧云天生物,上海)

[0108] 预染蛋白Marker(索莱宝生物,北京,批号:PR1920);

[0109] ECL发光液;(天能科技,上海)

[0110] Tween 20;(恩晶生物,南京)

[0111] BCA试剂盒;(P0010,碧云天生物,上海)

[0112] 脱脂奶粉;(雀巢,美国)

[0113] 牛血清白蛋白(BSA)(biosharp);

[0114] 3.7%多聚甲醛;(谷敏生物,武汉)

[0115] Neurobasal;(21103-049,美国life公司)

[0116] Poly-L-LYSINE;(7-15万,美国sigma公司)

[0117] 木瓜蛋白酶;(LS003119,worthington)

- [0118] 马血清; (26050070, 美国life公司)
- [0119] Hibernate-E; (A12476-01, 美国life公司);
- [0120] Glutamax 100× (35050-061, 美国life公司);
- [0121] 细胞营养添加剂B27; (17504044, 美国life公司)
- [0122] 台盼蓝染料; (C0040, 索莱宝生物, 北京)
- [0123] DMSO二甲基亚砜 (D8371, 索莱宝生物, 北京)
- [0124] PIB (B7688, 美国sigma公司)
- [0125] Ham's F-12培养液 (HFL05, CSlSSON)
- [0126] Santa Cruz Biotechnology抗体:
- [0127] Shank3(多克隆兔抗); β-actin(多克隆鼠抗); 二抗(羊抗鼠, 羊抗兔: 博士德); 荧光二抗(Amersham Pharmacia Biosciences)
- [0128] Cell Signaling Technology抗体:
- [0129] LC3-II; NR1; NR2B; AMPAR; Atg5; Beclin-1; PSD95(多克隆兔抗);
- [0130] Triton X-100 (P0096, 碧云天生物, 上海)
- [0131] (-)-Bicuculline methochloride (美国ABcam公司)
- [0132] MK801; 3-MA; Ifenprodil; NVP-AAM077; MG132 (美国CST公司)
- [0133] MTT; LDH试剂盒 (南京建成)
- [0134] 1.1.3主要实验仪器
- [0135] 分析天平 (BSA-124S型, 北京赛多利斯仪器有限公司)
- [0136] 电子称 (MP12001, 天津市天平仪器有限公司)
- [0137] 纯水超纯水系统 (Elix ESSENTIAL 3/SYNERGY, 赛飞有限公司)
- [0138] 干燥箱 (GZX-GF101-2-BS-II)
- [0139] 摆床 (SK-0180-E, 赛洛捷克)
- [0140] 电泳仪 (HE-120; EPS-300; 转移电泳槽, 天能VE-186; 垂直电泳槽, 天能VE-180B)
- [0141] 超声波破碎仪 (Biosafe900-92, 赛飞有限公司)
- [0142] 凝胶成像系统 (Tanon 5200Multi, 天能科技, 上海)
- [0143] 荧光倒置显微镜 (1X73, 日本Olympus)
- [0144] 低温高速冷冻离心机 (Microfuge 20R, Beckman)
- [0145] 封口机 (SEALER FS-300, 永特力)
- [0146] 酶标仪 (Infinite F50, Tecan)
- [0147] 制冰机 (Scotsman AF103)
- [0148] 恒温反应器 (Genius干浴器) (HB120-S, 赛洛捷克)
- [0149] 液氮罐 (Locator JR, Thermo)
- [0150] 1.2方法
- [0151] 1.2.1 Morris水迷宫实验
- [0152] 经典Morris水迷宫是由英国心理学家Morris设计, 并于1981年应用于脑科学的研究, 目前是大多数脑功能研究采用动物空间学习记忆能力的检测手段, 尤其是广泛用在AD研究中评价啮齿类动物的视觉相关的空间学习记忆能力。较为经典的Morris水迷宫采用内壁涂黑的恒温水池, 水温22-26℃, 直径160厘米, 高50厘米左右, 池壁四周均匀分配成四个

象限，每个象限 $90^{\circ}$ ，并且每个象限的水池内壁贴上直径大约5cm的不同形状的图形作为标记，再选择其中一个象限中间放一个直径10厘米的圆形黑色站台，站台面要没于水面下1cm。设置上方摄像机记录视野，精确记录小鼠寻找站台游泳轨迹并传入电脑进行统计分析。调节光线，以保持小鼠与水池底存在较大视觉反差。实验方案简要介绍：实验总时间为完整的5天，训练前4天，第5天进行空间记忆测试，训练阶段每天固定时间按顺序从4个象限标志处，将小鼠面向池壁（避免看到水中站台）分别放入水中，1分钟或者90秒内记录其寻找到隐藏在水面下站台并且保持10–15秒的逃离潜伏期，如果在规定时间内没有找到水面下的站台则需人工引导至站台并同样保持10–15秒。完成的小鼠移出水池，迅速擦干体毛（可用电热取暖器烤干）放回笼内，每只小鼠每天每个象限训练一次，连续4天，第五天在相同时间将小鼠由除了站台所在象限的其他三个任意象限面朝池壁放入水中，记录小鼠找到水下站台时间并保持的时间为逃离潜伏期（escape latency）作为评价小鼠空间学习记忆建立快慢的指标。

[0153] 1.2.2 条件恐惧实验

[0154] 哺乳类动物遭受伤害性刺激会表现出惶恐不动的防御状态（Freezing）。实验开始先给与实验对象声音作为条件刺激信号，然后给予电击刺激作为非条件信号，这种条件反射训练结束后在进行单纯条件刺激讯号的训练，最后在检测只有单纯条件信号情况下小鼠恐惧记忆消退的情况。训练成功的小鼠在相同的环境或不同环境下，对同样的声音信号都会做出明显的恐惧不动姿态。实验方案简述如下：条件恐惧系统是由数据采集分析盒、弱刺激器（声音、光线）、强刺激器（电击）、摄像头、测试箱等部分组成。实验期间要保证实验室内外除受训小鼠外，无其他组别小鼠，因为本实验采用的是声音和电击两个刺激器，期间会产生分贝较高的声响。系统可以自动检测和记录僵直时间等相关实验数据：总的僵直时间，僵直出现次数和百分比等。整个实验分为三个阶段，分三天进行。第一阶段为训练期。实验前，先设置好测试条件：开启指示灯，小鼠放入箱中首先适应3分钟，然后开启声音刺激器（2.5赫兹，85分贝）保持30秒后停止，开启电刺激器（0.75毫安）保持2秒后停止，间歇2分钟（无声音刺激、无电刺激）。从声音刺激开始实验，重复6次上述过程，重复7次，总时间1244秒。打开条件恐惧系统软件，确保摄像头正常开启，画面均匀度一致。将小鼠轻轻放入恐惧箱中，关好恐惧箱，点击开始按钮，进行实验，软件会自动采集和记录小鼠活动度数据。实验结束后，取出小鼠，会发现小鼠会因为收到刺激而排泄粪便和尿液，所以在进行下一只小鼠测试前将恐惧箱内的小鼠粪便和尿液用酒精擦拭干净，否则会因为气味改变，影响实验。第二阶段为Contextual期，既不给予声音刺激也不给予电刺激，让其自由活动，时间为1200秒，每只小鼠实验结束后都要清理恐惧箱。第三阶段为记忆期，即：改变恐惧箱内在环境，在恐惧箱内铺上纸板，对角线也加上纸板。设置测试条件为：打开恐惧箱内室灯，刚入小鼠，适应3分钟，首先开启声音刺激器（2.5赫兹，85分贝）保持30秒后停止，再间歇2分钟（无声音刺激、无电刺激），从声音刺激开始实验，重复9次上述过程，重复10次，总时间1680秒。

[0155] 1.2.3 制备组织蛋白样本

[0156] 1.2.3.1, 准备裂解液

[0157] (1) 溶PMSF (将PMSF晶体溶到PMSF溶剂中，即配成10ml, 100mM的PMSF溶液)

[0158] (2) 裂解液的制备

[0159] 组成：PIRA裂解液+PMSF溶剂+蛋白酶抑制剂=10mlPIRA+100u1PMSF+1片蛋白酶抑

## 制剂

- [0160] 1.2.3.2,研磨组织  
[0161] (1) 取出玻璃研磨器,1mm<sup>3</sup>组织加1u1裂解液  
[0162] (2) 研磨后置于冰上,15min。  
[0163] 1.2.3.3,离心提取蛋白上清液  
[0164] (1) 提前30min预冷离心机(4℃)。  
[0165] (2) 配平,离心(12000rpm,10min)。  
[0166] (4) 取上清液,储存在-20℃备用。(提前将1.5ml的离心管编号)。  
[0167] 1.2.3.4,BCA法测蛋白浓度  
[0168] 采用BCA法测定蛋白浓度。参照说明书方法将A液、B液按照50:1配制工作液。取标准蛋白溶液0.5mg/ml,按0、1、2、4、8、12、16、20u1体积依次加到96孔板内,再用双蒸水依次相应补足至20u1/孔。待测样品每孔加5u1,再用双蒸水依次相应补足至20u1/孔,每孔再加工作液200u1,在37℃烘箱孵育30min,酶标仪低频震荡2s后在562nm下测定吸光度。做出标准曲线,加入趋势线与公式,根据公式计算蛋白含量(蛋白含量要X4)。在蛋白样品中加5X loading buffer,在恒温反应器上95℃加热8分钟,使细胞蛋白变性,放在-20℃冰箱保存。  
[0169] 1.2.4小鼠神经元突触体制备  
[0170] 1.2.4.1突触体的制备参照本实验既往试验方法,所有操作在4℃条件下进行。小鼠大脑皮层(约0.25cm<sup>3</sup>)加1毫升0.32M浓度的葡萄糖缓冲液(0.32M蔗糖溶液,5mM HEPES pH 7.4,1mM MgCl<sub>2</sub>,0.5mM CaCl<sub>2</sub>,蛋白酶抑制剂,200μg/ml PMSF,2μg/ml胃蛋白酶制剂A,4μg/ml亮抑酶肽),800rpm上下机械研磨12个往复;  
[0171] 1.2.4.2研磨后的混匀夜称重配平,4℃1782g离心10分钟;  
[0172] 1.2.4.3弃去沉淀,上清液中补足0.32M葡萄糖缓冲液至1mL,然后用滴管小心悬浮于1mL1.2M葡萄糖缓冲液上面,称重配平后4℃171369g超速离心15分钟;  
[0173] 1.2.4.4小心吸留上下液面分界处的悬浮液(呈乳白色),补足0.32M的葡萄糖缓冲液至1mL,然后用滴管小心悬浮于1mL0.8M葡萄糖缓冲液上,称重配平后4℃171369g超速离心15分钟;离心后底部沉淀即为突触体,-80℃保存。  
[0174] 1.2.5原代小鼠大脑皮层神经元分离培养  
[0175] 1.2.5.1眼科剪、眼科镊等小鼠解剖手术器械及相应试管、枪头121℃灭菌30分钟,取出后烘箱干燥备用;  
[0176] 1.2.5.2用无菌的PBS溶液配置多聚赖氨酸成浓度为10mg/mL的储存液备用,1.5mL的离心管分装,4℃备用。用无菌的PBS将10mg/mL的储存液500倍稀释为浓度0.02mg/mL,无菌过滤后待用。铺板时12孔培养板的每个小孔加多聚赖氨酸溶液600uL,水平轻微震荡使其均匀铺满整个孔板底部,静置3h备用;  
[0177] 1.2.5.3 Neurobasal培养基:马血清:Gultamax按照90:10:1的比例配置Plating溶液待用。Neurobasal培养基:B27复温溶解后按照50:1的比例配好备用。  
[0178] 1.2.5.4 20mg木瓜蛋白酶加10ml Hibernate-E,37℃水浴锅1h保持酶活性配置消化液浓度为2mg/ml。  
[0179] 1.2.5.5 75%酒精消毒的冰袋放入超净台,10cm的无菌培养皿,加8ml Hibernate-E备用,取出手术剪、眼科镊、弯镊等解剖器械待用。

[0180] 1.2.5.6孕18天的孕鼠在细胞房缓冲间快速脱颈椎处死，腹部朝上置于尿垫上。75%酒精消毒孕鼠腹部，拎起孕鼠腹部皮肤，小心剖开孕鼠腹部皮肤及腹膜，由小鼠腹部两侧轻轻拉出子宫，分离取出子宫置于100mm培养皿中，盖上盖子，75%酒精整体喷洒消毒后置于超净台中。

[0181] 1.2.5.7小心的剪开子宫和胎膜，镊子拉出胎鼠。小鼠头部眼睛上方和小脑后用眼科剪横向各剪一刀，再沿脑矢状缝纵剪一刀。左右两边尽量撕开脑壳，尽量将大脑暴露在视野之中，用弯镊小心从颅底部取出整个大脑，放在事先准备好的Hibernate-E得100mm培养皿中。

[0182] 1.2.5.8去除大脑顶部的嗅球，小心剥去大脑皮层脉络膜，拨开左右两侧大脑皮层，去除大脑皮层内丘脑脑干部分。将处理好的大脑皮层组织移至另外一个含有Hibernate-E溶液的100mm培养皿中。

[0183] 1.2.5.9剪碎所有胎鼠的大脑皮层组织，放入过滤后的木瓜蛋白酶消化液中置于37℃的水浴锅中震荡消化20分钟。

[0184] 1.2.5.10皮层组织充分消化后，加入离心管并配平，妥善放置于4℃离心机中，以4000rpm转速离心5min。弃上清，加入2-3mL Plating溶液在含有组织沉淀的离心管中，用灼烧过尖端而变得圆润的5mL枪头轻轻吹打8-10次，力度适中无泡沫产生，然后取细胞原液1mL加1.5mLPlating溶液冰上备用。用灼烧过尖端而变得圆润的5mL枪头上再套一个1mL枪头反复轻轻吹打8-10次，力度适中无泡沫产生，取1.5ml作为细胞原液，冰上置于备用。

[0185] 1.2.5.11取细胞原液约100ul置于1.5ml无菌EP管中。取另一1.5ml无菌EP管，加入90ul台盼蓝染液，再加入10ul细胞原液，轻轻吹打混匀。在10ul含有细胞的台盼蓝染液中吸取一滴，滴加于细胞计数器上的盖膜边缘，靠虹吸作用铺面计数格，在显微镜下观察计数。计数完毕后，弃去孔板内的多聚赖氨酸溶液，用Plating溶液将细胞稀释成0.3M个/ml的细胞悬液，种在孔板中，1.5h后，细胞附着在孔板底部，将Plating溶液换成Neurobasal加B27的培养液。每隔两天换三分之一培养液。

[0186] 1.2.6大脑皮层神经元Golgi染色

[0187] 4%多聚甲醛的配制：取适量的PBS+多聚甲醛粉，40℃烘箱中隔夜溶解。也可购买配好的多聚甲醛溶液来用。14%氨水500ml配制：25%氨水336ml+264ml去离子水混匀。95%乙醇500ml配制：取475ml 100%乙醇，向其中加入25ml去离子水。90%乙醇500ml配制：取450ml 100%乙醇，向其中加入50ml去离子水。80%乙醇500ml配制：取400ml 100%乙醇，向其中加入100ml去离子水。75%乙醇500ml配制：取375ml 100%乙醇，向其中加入125ml去离子水。50%乙醇500ml配制：取250ml 100%乙醇，向其中加入250ml去离子水。70ml去离子水+30g蔗糖，搅拌充分，完全溶解成30%蔗糖溶液100ml。Golgi Cox液：由A液(5%重铬酸钾)，B液(5%氯化汞)和C液(5%铬酸钾)组成。配制Golgi Cox液1000ml的步骤：5%重铬酸钾(A)和5%氯化汞(B)边混合边搅拌于500ml的烧杯中。5%铬酸钾(C)和400ml去离子水在1000ml的烧杯中混合，再加入5%重铬酸钾(A)和5%氯化汞(B)的混合液于烧杯中。加去离子水定容至1000毫升，避光保存备用。

[0188] CXA溶液配制：1:1:1的比例混合氯仿，二甲苯，100%乙醇成为CXA溶液。载玻片用加清洁剂洗净，然后煮沸30min去脂去蛋白，流水反复冲洗后烘干，然后浓硫酸浸泡24小时，流水反复冲洗后烘干，最后浸泡于去离子水24h，烘箱烘干玻片备用。0.5%铬钒明胶配方：

明胶5.0g+去离子水500ml,60℃搅拌溶解。再加去离子水定容至1000ml,放入铬钒0.5g使溶液变成蓝色,加热至70℃,使溶质全部溶解。将载玻片浸没于烧杯1min,取出载玻片,滤纸贴在边缘小心吸干多余液体(手和滤纸均不可以触碰玻璃面),60℃烘箱烘干备用。

[0189] 颈椎离断处死动物,固定好四肢后,用镊子提起皮肤,注意不要夹住腹腔脏器,用剪刀横着剪开腹部致两侧肋弓下,然后沿着腹部中线向上纵行剪开胸部皮肤,暴露胸骨。镊子提起剑突,用剪子沿着胸骨正中剪开胸腔直至剪开胸锁关节,注意不可伤及纵膈内大血管,然后沿着两侧肋弓下缘剪开膈肌致两侧,将两侧肋骨拉开充分暴露心脏,撕开心包膜辨识左右心房心室,然后迅速右心房剪口然后剪开左心室,用灌胃针将4℃预冷的PBS由左心室快速推入,PBS经血液循环由右心房流出,小鼠口鼻皮肤变白,四肢远端抽搐为灌注完全。然后迅速剪开颅骨,取出整个大脑,4℃预冷PBS浸洗后,吸水纸蘸干后迅速浸入试剂盒中固定液中,放在黑暗避光的地方4℃浸泡14天,并每三天更换混匀瓶中液体。第15天取出脑组织块浸入30%蔗糖3天。蔗糖用0.1M PB配制。用切片机将脑块切成50μm厚度贴片与载玻片上。按照蒸馏水1min;30%氨水30min;蒸馏水1min;显影液2min;定影剂40-60min;蒸馏水1min;50%酒精5min;70%酒精5min;80%酒精5min-90%酒精5min-95%酒精5min;100%酒精5min;100%酒精5min;100%酒精5min;CXA5min;CXA10min;中性树脂封片的顺序做好染色,60倍油镜下观察计数树突棘的数目,计算方法:在二级或三级树突上选择长度为20mm的树突状段,在60X油镜下计算单位长度的棘数,至少观察到三个次级树突节段,每个神经元的树突观察长度至少为60mm,计算树突棘数目。

[0190] 1.2.7 免疫组织化学染色

[0191] 颈椎离断处死动物,固定好四肢后,用镊子提起皮肤,注意不要夹住腹腔脏器,用剪刀横着剪开腹部致两侧肋弓下,然后沿着腹部中线向上纵行剪开胸部皮肤,暴露胸骨。镊子提起剑突,用剪子沿着胸骨正中剪开胸腔直至剪开胸锁关节,注意不可伤及纵膈内大血管,然后沿着两侧肋弓下缘剪开膈肌致两侧,将两侧肋骨拉开充分暴露心脏,撕开心包膜辨识左右心房心室,然后迅速右心房剪口然后剪开左心室,用灌胃针将4℃预冷4%多聚甲醛由左心室快速灌注,经脑循环由右心房流出,小鼠口鼻皮肤变白,四肢远端抽搐为灌注完全。然后迅速两眼间剪一刀,小脑后剪一刀,在纵行剪开颅顶取出整个大脑,纸蘸干后迅速放入4%多聚甲醛缓冲液中,避光4℃固定24h,然后和常规方法一样脱水、浸蜡、包埋、连续石蜡切片4~5um厚,贴片后进行免疫组化检测大脑皮层组织中LC3-II蛋白的表达,步骤如下:二甲苯I15min;二甲苯II15min;95%酒精I5min;95%酒精II5min;3%H2O2室温(20~37℃)10~15min,消除内源性过氧化物酶活性,双蒸水(ddH2O)洗3次×3min;我们采用枸橼酸钠溶液先进行修复抗原,微波炉子高火3min,解冻8min,自然冷却后用无菌PBS清洗3次每次3min;然后用4%胎牛的血清室温孵育封闭15min以减少非特异性抗原染色,滤纸小心边缘蘸干多余液体,不用洗;胎牛血清配置的抗体工作液含兔抗鼠LC3多克隆一抗抗体,1:100工作浓度小心覆盖于玻片表面,在湿盒内4℃过夜;第二天无菌PBS沾洗3次,滤纸边缘蘸干液体后,加辣根过氧化物酶标记羊抗兔IgG二抗,室温避光静置2h,然后PBS浸洗3次每次2min;边缘利用张力蘸干多余液体后,常规使用葡萄糖氧化酶二氨基联苯胺(DAB)显色,中性树胶封片。免疫组织化学染色切片于200倍视野显微镜下分析和评估反映LC3-II蛋白质表达水平。

[0192] 1.2.8 免疫印迹检测法(western blot) 测定蛋白表达

[0193] 1.2.8.1SDS-PAGE电泳

[0194] 聚丙烯酰胺凝胶的配置:仔细对好电泳所用的长短玻璃板,玻璃板事先去胶去脂去蛋白仔细清洗至流水无水痕,烘箱干燥,固定在玻璃夹板中,反复检查两玻璃板底部是否对齐,否则加胶一定会漏出。准备好超纯水、30%Acr-Bis29:1、1M Tris Ph8.8、1M Tris Ph6.8、10%SDS、10%过硫酸铵、TEMED,按表中比例依次加入相应体积的试剂,混匀。首先灌注分离胶,灌好后立即沿玻璃板左侧缓慢加入超纯水,应尽量不要产生气泡。在室温下静置30-40分钟后,分离胶凝固。再灌浓缩胶,立马从玻璃板左侧倾斜着插入梳子,避免产生气泡,在室温下静置30-40分钟后,浓缩胶凝固。制备完成后,封闭保存于4℃冰箱。分别将10X的电泳缓冲液、10X转膜缓冲液和、20X TBS,稀释至1X备用。将配置好的聚丙烯酰胺凝胶玻璃板与U行电极固定,防止漏液。倒入1X电泳缓冲液,轻轻拔下梳子,准备上样。蛋白样品解冻,上样前将其混匀,每孔加入30ug蛋白样品。浓缩胶电泳条件为90伏电压,35分钟;分离胶电泳条件为120伏电压,60分钟,电泳观察溴酚兰位置,达到蛋白预期位置即可停止,取出凝胶进行转膜。

[0195] 1.2.8.2转膜

[0196] 转膜(湿转法):倒入1X转膜缓冲液,将白黑色双面夹、海绵、滤纸、NC膜按由上往下黑、海绵、滤纸、凝胶、滤纸、海绵、白顺序依次在托盘内放好,小心对齐“三明治”,轻轻用小滚轮排除气泡,夹好。注意:凝胶是近黑色面的。将转移槽置于冰水中,放入三明治夹,注意:黑对黑,红对红。缓慢加入1X转移缓冲液,避免产生气泡,插上电极,条件为250-300毫安,65分钟。

[0197] 立春红染色:转膜步骤完成后,将带有蛋白的NC膜裁剪成合适大小,放入丽春红染液中,在摇床上振摇3分钟,将立春红染液倒入瓶中回收,可重复利用。用纯水轻轻漂洗条带2-3次,每次2分钟,观察细胞蛋白是否成功转到膜上。

[0198] 1.2.8.3免疫反应

[0199] 5%脱脂奶粉TBST封闭,室温摇床1h,移除并蘸干封闭液,一抗孵育,5%脱脂奶粉TBST稀释相应一抗1:2000,4℃缓慢摇动孵育过夜。第二天小心剪开封闭膜,将一抗回收-20℃,TBST室温摇床清洗4次每次8分钟,然后5%脱脂奶粉TBST稀释相应二抗1:4000(辣根过氧化酶标记),室温下摇床孵育2h,小心剪除包膜,TBST室温摇床清洗4次每次8分钟,进行化学发光反应。

[0200] 1.2.8.4化学发光显色法显色

[0201] ECL显色试剂盒(Thermos,USA) reagent 1和reagent2以1:1混合置于暗盒内,将裁剪好的待曝光的NC膜放入暗盒,震荡反应1分钟,提前打开凝胶成像系统,让CCD预冷至-20℃左右,温度显示由红变绿,迅速取出待曝光膜放进成像系统曝光。条带用ImageJ软件分析。

[0202] 1.2.9细胞爬片免疫荧光

[0203] 用洗洁精去除油脂和杂蛋白后,彻底清洗圆形盖玻片,硫酸浸泡24h,取出后流水冲洗30min,酒精灯火烤干,置于灭菌炉中高温灭菌,取出后置于烘箱60℃过夜烘干。将处理好的圆形盖玻片小心置于无菌24孔培养板底部,然后10mg/mL的多聚赖氨酸300μL铺板,最后将分离好的神经元原液以0.18M个/ml的密度种在孔中正常培养。成熟后药物作用以后去除培养基置于冰上,吸引器贴边吸干,用预冷的4℃PBS浸洗2次乘以3分钟;然后将3.7%的

多聚甲醛300 $\mu$ L加到细胞培养孔中,固定15min,吸引器贴边小心吸干,再次用预冷4℃的PBS浸洗3次乘以3分钟,吸引器贴边小心吸干后再往孔里面加0.1%的Triton X-100150 $\mu$ L,细胞膜打孔10min;吸引器贴边小心吸干液体,用预冷4℃的PBS浸洗3次每次3分钟。吸引器贴边小心吸干后将爬片用5%BSA封闭液进行封闭,室温1小时。使用5%BSA封闭液稀释一抗,小心的在每个圆形盖玻片上滴加1:200浓度的一抗,4℃孵育过夜。24h后小心贴边吸去一抗,再用预冷的4℃的PBS浸洗爬片,3次乘以3min;二抗用5%BSA的PBS稀释后,小心的在每个圆形盖玻片上滴加浓度1:1000的二抗,室温孵育2小时,小心贴边吸去二抗,用PBS浸洗爬片,3次乘以3min。然后小心将爬片取出24孔板,注意不要将爬片的细胞面搞反,去脂去杂蛋白和酸泡灭菌烘干的载玻片上滴加5 $\mu$ L含DAPI的防荧光淬灭的封片剂,然后将爬片“倒扣”在上面,一个片子可以扣两个,避光阴凉干透,指甲油封闭盖玻片周边,在荧光显微镜下观察测定荧光。

[0204] 1.2.10 细胞MTT测定

[0205] 细胞胞浆内的线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴(3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide, MTT)还原甲瓒(Formazan),为水不溶性的蓝紫色结晶并在细胞中沉积,而如果是死细胞则没有此功能,然后用二甲基亚砜(DMSO)溶解细胞中的甲瓒,再根据蓝色溶液在490nm波长的吸光度测定OD值一反应存活的细胞数量。我们使用的MTT浓度为5mg/ml,PBS溶解。溶解混匀后,用0.22的滤膜过滤除菌,-20℃避光保存备用。细胞计数然后接种于96孔培养板,给药实验后,吸引器贴壁小心吸除培养基,预冷4℃PBS浸洗2次每次3min,然后每孔加10ul配置好的MTT,重新放入培养箱孵育4小时,取出后每孔加入DMSO150 $\mu$ L摇床震动10min溶解结晶,最后酶标仪490nm波长检测OD值。

[0206] 1.2.11 细胞LDH测定

[0207] 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)存在于活的细胞组织中。正常情况下在细胞内部发挥功用,不能自由进出细胞膜,所以胞外培养基中基本不含LDH,担当细胞受损、死亡等细胞膜通透性增大的时候,LDH漏出到细胞外培养基中,可以催化胞外溶液中的乳酸为丙酮酸,其氧化型辅酶I变成还原型辅酶I,胞外溶液中还原碘硝基氯化氮唑蓝(INT)和(或)硝基氯化四氮唑蓝(NBT)变成蓝色的甲簪,利用酶标仪在490nm波长测定吸光度即OD值,反应细胞活性。实验操作按照试剂盒说明进行,最后室温放置5分钟后,酶标仪波长490nm读取吸光度。

[0208] 1.2.12 统计分析

[0209] 统计学软件SPSS19.0统计分析处理数据,结果都用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用t检验,p<0.05被认为差异有统计学意义。

[0210] 2. 结果

[0211] 2.1 小鼠认知记忆过程中大脑皮层自噬表达增多;

[0212] Morris水迷宫是目前脑科学的研究特别是学习记忆研究的一种经典实验方法,这种方法可以快速建立起实验动物对于空间位置的学习与记忆,各国研究者们都常规使用此方法检测动物的空间学习记忆能力,尤其在AD疾病认知记忆研究中广泛用于啮齿类动物模型的空间记忆检测。我们认为,小鼠在学习记忆过程中,大脑皮层兴奋性增加,神经元细胞间活跃度升高,势必会引起神经元细胞代谢增强,有助于认知记忆,对于AD疾病认知记忆减退

的症状具有一定的保护作用。所以我们首先随机选择10只30-35g成年ICR小鼠进行Morris水迷宫实验,结果发现开始训练的十只小鼠逃离潜伏期的时间长短不一,随着每天的训练进行,小鼠的逃离潜伏期均逐渐缩短,训练第三天开始统计学出现明显差异(Fig.1A),说明小鼠经过训练可以正常建立空间认知记忆,而且从第三天开始训练效果明显。随后为探明机制,我们又随机分配11组30-35g成年ICR小鼠,每组10只对照实验分析进行空间学习记忆与未进行空间学习记忆的小鼠的差别:常规饲养未进行实验的正常空白对照组(C组),训练1天(M1组),2天(M2组),3天(M3组),4天(M4组)直至第5天检测(M5组)以及相对应天数去除水面下平台单纯游泳而第1天未训练(S1组),第2天未训练(S2组),第3天未训练(S3组),第4天未训练(S4组)和第5天未训练(S5组),当天实验结束后立即颈椎离断处死取脑,分离大脑皮层、海马组织并超速梯度离心提取神经突触体,经蛋白免疫印迹法western blot检测发现,与空白对照组和其相应天数只游泳而未进行训练的小鼠相比,大脑皮层自噬标志蛋白LC3-II表达逐渐增多(Fig.2A),神经突触体内LC3-II表达增多尤为明显(Fig.2C),经过灰度分析发现自训练第三天起自噬标志蛋白LC3-II开始明显增高,差异具有统计学意义(Fig.2B,D)。海马组织也发现自噬标志蛋白LC3-II表达增多(Fig.2E),统计分析发现差别具有统计学意义(Fig.2F)。这个发现提示自噬不仅仅作为细胞内清除错误蛋白或受损细胞器的清除机制,同样也作为蛋白代谢的一种重要途径参与神经元兴奋的学习记忆过程。虽然有文献报道细胞兴奋如运动、应激均可引起细胞自噬增加,这与我们的结果发现不进行空间学习记忆训练而单纯游泳的小鼠神经元自噬也增加相一致,但以第一天下水最为明显,随后几天适应后自噬表达出现降低,尤其以大脑皮层明显。而每天进行空间认知记忆训练引起的皮层兴奋则保持着自噬蛋白的逐渐增加,说明自噬进程可能在认知记忆过程中起到某种调节作用。

[0213] 2.2 自噬在小鼠认知记忆过程中的形成特征;

[0214] 由于我们的实验发现小鼠在进行Morris水迷宫认知记忆实验中大脑皮层自噬进程增加,尤其以训练第三天开始明显增加,这与小鼠第三天的学习效果显著变强的行为学表现是一样的,所以,继续观察自噬的形成与学习记忆变强之间的关系究竟如何,尤其在第三天行为学效果明显的情况下自噬进程的形成特征是怎样,可以更好的解释自噬与认知记忆的关系。我们随机分配8组30-35g成年ICR小鼠,每组10只进行Morris水迷宫实验后间隔6小时取脑测定自噬蛋白,以观察开始出现明显学习记忆行为学效果的第三天24小时内及前后时间点自噬的形成与消退特征,除空白对照组(C组)外,另有:只训练2天即刻处死取脑组(2nd组),只训练2天但是同第3天训练后即刻同时处死取脑组(3rd-0组),第3天训练后即刻处死取脑组(3rd-1组),第3天训练后6小时处死取脑组(3rd-2组),第3天训练后12小时处死取脑组(3rd-3组),第3天训练后18小时处死取脑组(3rd-4组),第3天训练后24小时处死取脑组(3rd-5组)。在相应时间段颈椎离断处死取脑,分离大脑皮层组织并提取突触体,经western blot蛋白免疫印迹法检测发现,与空白对照组相比,神经突触体的自噬标志蛋白LC3-II表达明显增多(Fig.3A),统计分析的差别具有统计学意义(Fig.3B),但是各时间点之间没有太大的差别( $p>0.05$ )。提示我们在学习记忆建立过程中,自噬是此起彼伏稳定存在。随后我们又随机分配了9组30-35g成年ICR小鼠,每组10只间隔6小时进行Morris水迷宫实验,以观察第三天24小时内的不同时间点Morris水迷宫训练引发自噬形成的时间特征,除空白对照组(C组)外,另有:上午8点水迷宫训练组(M1组)和去除水下站台游泳无训练组

(S1组),下午14点水迷宫训练组(M2组)和去除水下站台游泳无训练组(S2组),晚上20点水迷宫训练组(M3组)和去除水下站台游泳无训练组(S3组),第四天凌晨2点钟的水迷宫训练组(M4组)和去除水下站台游泳无训练组(S4组)。在相同时间段训练或者游泳后立即颈椎离断处死取脑,分离大脑皮层组织并提取突触体,经蛋白检测发现,与未进行训练的游泳组相比,神经突触体的自噬标志蛋白LC3-II表达有大幅增多(Fig.3C),统计分析发现差异具有统计学意义(Fig.3D),下午14点水迷宫训练组自噬表达较高,但是各训练时间点之间没有统计学差别。说明同一天的不同时间训练均可引起自噬表达增多,午后稍强但无明显差异。所以我们认为在Morris水迷宫学习记忆建立过程中,自噬的表达与行为学增强具有直接相关性,而且自噬的形成参与到整个学习记忆过程中,即便训练间歇或者不同时间训练均不会消退,其特征与学习记忆的整个过程相吻合,提示二者密切相关。

#### [0215] 2.3 皮层兴奋促进认知记忆

[0216] 由上述实验研究发现,随着认知记忆过程的进行,大脑皮层突触的兴奋度增加势必引起神经元代谢增强,可使自噬进程增加,二者密切相关,所以我们猜想如果适度增加皮层兴奋能否增强认知记忆?GABA受体拮抗剂荷包牡丹碱一种苯酞异喹啉类化合物,竞争拮抗GABAA受体使抑制性突触后电位降低,因而导致神经元突触兴奋性增高。我们选用30-35g成年ICR小鼠,随机分为5组,每组16只。小鼠体表定位侧脑室注射,注射位点两眼连线中点向后2mm,中线旁开1.5mm,垂直颅骨进针2.5mm。分为:空白对照组(CON组),假手术对照组(Sham组)2 $\mu$ PBS侧脑室注射,荷包牡丹碱组分别每只小鼠侧脑室注射(-)-Bicuculline methochloride 0.05 $\mu$ g(0.05组),0.1 $\mu$ g(0.1组),0.2 $\mu$ g(0.2组),注射容积2 $\mu$ L,1小时后进行条件恐惧实验检测,实验方法如前述(见材料与方法)。结果统计分析发现,与对照组相比侧脑室注射荷包牡丹碱可使小鼠条件恐惧实验僵直时间百分比增加,而且剂量增加僵直时间延长,统计学差异具有意义(Fig.4A),但0.2 $\mu$ g组僵直百分比有下降趋势。说明荷包牡丹碱侧脑室注射引起的大脑皮层兴奋性增加可以提高小鼠认知记忆能力。然后我们又随机分配2组30-35g成年ICR小鼠,每组10只,一组进行Morris水迷宫实验作为对照,另一组侧脑室注射每只小鼠0.1 $\mu$ g(-)-Bicuculline methochloride 2 $\mu$ L,1小时后进行Morris水迷宫实验,统计分析每天训练结果发现,与相应的对照组相比侧脑室注射荷包牡丹碱可使小鼠逃离潜伏期缩短,而且从第三天开始逃离潜伏期缩短差别明显,统计学具有意义(Fig.4B)。这些结果显示在一定程度上提高大脑皮层兴奋性可以促进认知记忆进程。

#### [0217] 2.4 自噬参与调节皮层兴奋引起的认知记忆增强

[0218] 有研究显示,兴奋与应激可以增加细胞自噬表达,这与我们的研究结果相一致。但是我们观察到学习记忆过程中自噬进程进一步增加,提示自噬机制可能参与动物认知记忆形成,如果调节皮层突触的兴奋度是否可调控皮层神经元自噬表达从而影响小鼠认知记忆?3-MA是选择性的PI3K抑制剂,可以抑制自噬小体的形成,阻断自噬进程。我们随机分配5组30-35g成年ICR小鼠,每组16只:空白对照组(CON组),手术对照组(Sham组)侧脑室注射PBS 2 $\mu$ L,(3MA组)每只小鼠侧脑室注射3-MA 0.06mg,(Bicuc组)每只小鼠侧脑室注射(-)-Bicuculline methochloride 0.1 $\mu$ g,(Bicuc+3MA组)每只小鼠侧脑室先注射3-MA 0.06mg,30分钟后再注射(-)-Bicuculline methochloride 0.1 $\mu$ g,注射容积均为2 $\mu$ L。1小时后进行Morris水迷宫实验,结果统计分析发现,与对照组相比,Bicuc组逃离潜伏期缩短,自噬抑制剂3-MA可以抑制此行为学改变,差异具有统计学意义(Fig.5A),结果说明荷包牡丹碱刺激

皮层兴奋增加可引起学习记忆增强,而3-MA可以此增强作用减弱。小鼠实验后立即颈椎离断处死取脑,分离大脑皮层western blot检测自噬标志蛋白LC3-II发现,Bicuc组小鼠皮层LC3-II增多,自噬抑制剂3-MA降低LC3-II表达(Fig.5B),差异具有统计学意义(Fig.5C)。大脑皮层免疫组织化学染色结果也发现,Bicuc组小鼠皮层神经元胞体内LC3-II增多,而使用自噬抑制剂3-MA后,LC3-II的表达明显降低(Fig.5D)。提示皮层兴奋增加造成的学习记忆增强可能是由于自噬表达的增多而引起的,抑制自噬进程则可减弱学习记忆能力。

[0219] 2.5自噬影响突触构建从而使树突棘数量增加

[0220] 突触是神经元信息整合与传递的重要机构,其数量与结构完整使其功能发挥的基本保证,而突触重构是脑内信息存储和处理的基本机制。大部分重塑发生在突触后致密区(PSD),这是近突触后膜内侧的一层特殊的分子结构,含有谷氨酸受体(NMDAR、AMPAR等)和相关的支架蛋白(PSD95、Shank等),它们在突触后膜上组织信号转导通路。在突触成熟及活性发挥的过程中,PSD经历了明显的结构变化,包括生长、络合和穿孔、动态翻转,虽然PSD分子组成的长期变化可能是由于新蛋白的加入或现有突触蛋白的选择性稳定或去除而引起的,但是这种结构的构建也被认为是功能伴随和随时修正的,受到神经元信号刺激与细胞代谢因素的影响。研究证明,引发突触功能和结构变化的PSD中的谷氨酸受体和信号蛋白构建是依赖刺激的基因表达和蛋白质合成。Shank蛋白是附着在突触后致密物上的脚手架蛋白,Shank蛋白家族成员有Shank1、Shank2和Shank3。Shank3编码兴奋性突触后致密物折叠蛋白,可促进兴奋性突触的形成和树突棘的发育,维持谷氨酸受体功能。PSD95是突触后致密物的支架蛋白,也是标志性蛋白,可与多数神经递质和骨架蛋白相联系,PSD95与Shank蛋白经鸟酸激酶蛋白联系在一起。经蛋白组学分析显示阿尔茨海默症病人大脑皮质突触后膜上的谷氨酸受体、PSD95和Shank3发生了明显的变化,提示这些蛋白可能在分子水平直接影响了突触的功能。上述小鼠侧脑室注射(-)-Bicuculline methochloride及自噬抑制剂3-MA,Morris水迷宫实验后提取小鼠脑组织检测自噬蛋白LC3-II表达发现与小鼠学习记忆密切相关,我们继续检测小鼠大脑皮层脑组织PSD结构蛋白Shank3和PSD95的含量变化,结果发现增加皮层兴奋性后(Bicuc组)shank3蛋白降低,而PSD95蛋白增高,3-MA抑制自噬后(Bicuc+3MA组)shank3蛋白升高,PSD95蛋白降低(Fig.6A),与对照组相比统计学差异具有意义(Fig.6B,C)。皮层脑组织Golgi染色切片观察发现,增加皮层兴奋性后(Bicuc组)树突棘数量增加,而3-MA抑制自噬后(Bicuc+3MA组)树突棘数量降低(Fig.6D),与对照组相比统计学差别具有意义(Fig.6E)。结果提示适度的增加皮层兴奋性可激发皮层神经元内自噬增加,从而使PSD结构蛋白Shank3,PSD95改变,引起突触重塑而使树突棘数量增加,提高小鼠学习记忆能力,抑制自噬则削弱此作用。

[0221] 2.6神经元原代细胞兴奋引起突触蛋白改变

[0222] 有研究发现神经元原代细胞突触兴奋可引起PSD重塑,其机制可能为另一种蛋白代谢途径、泛素化,提示我们兴奋可引起神经元突触蛋白代谢增加,从而使PSD蛋白的分子构象以及含量发生改变,从而介导一系列生物信号级联反应,或者引发突触数量和形态功能的改变。而除了泛素化外,自噬仍是一种不可忽视的蛋白代谢途径,其在本研究发现中起到何种调剂机制,尚不得而知。所以我们利用分离培养的皮层原代神经元细胞,探索神经突触兴奋后PSD蛋白重塑的机制。首先检测荷包牡丹碱是否影响原代神经元细胞的存活情况,皮层神经元细胞培养致18天,完全成熟,神经网络结构发达,建立起完整的突触联系体制,

参考既往研究细胞给药浓度分别给与(-)-Bicuculline methochloride (Bicuc) 10, 20, 40, 80 $\mu$ M, 测定MTT和LDH灰度值显示各组之间没有显著性差异 (Fig. 7A, B), 即此浓度下的Bicuc不会显著的影响原代神经元细胞存活。接着我们选取40 $\mu$ M浓度给与皮层神经元细胞Bicuc, 分别作用1, 6, 12, 24, 48小时提取细胞总蛋白检测自噬标志蛋白LC3-II, 结果发现随着作用时间延长, 兴奋的神经元细胞自噬表达增多 (Fig. 7C), 差异就有统计学意义 (Fig. 7D)。再18天成熟神经元细胞分别给与10, 20, 40, 80 $\mu$ M梯度浓度Bicuc, 24小时后免疫印迹分析细胞总蛋白发现, 除蛋白LC3-II随着浓度梯度增高而增加外 (Fig. 7G), 自噬流启动蛋白Beclin-1以及自噬小体双层膜延展形成复合因子Atg5也相应增高 (Fig. 7E, F), 结果与对照组比较分析统计学差别有意义 (Fig. 7J-L), 而且细胞总蛋白检测分析也发现, 随着Bicuc浓度梯度的作用增加, 不但自噬相关蛋白表达增加, 而且PSD结构蛋白shank3逐渐降低 (Fig. 7H), PSD95逐渐升高 (Fig. 7I), 与对照组相比差异也具有统计学意义 (Fig. 7M, N)。所以, 我们的研究结果显示, 在一定程度内, 随着皮层兴奋的增加, PSD构建也发生改变, 结构蛋白shank3和PSD95出现特征性变化, 其机制可能为蛋白代谢的自噬进程参与了皮层突触PSD结构的重塑, 因此可能影响了皮层神经突触的结构与数量。

[0223] 2.7 自噬调节神经元突触PSD蛋白构建

[0224] 上述实验发现皮层神经元细胞兴奋后其突触PSD结构蛋白shank3和PSD95随着自噬表达的增加而出现相应变化, 提示自噬有可能参与调节兴奋引起的神经突触重塑, 为证明此假设我们选用培养18天成熟皮层原代神经元细胞分别给与(-)-Bicuculline methochloride 40 $\mu$ M (Bicuc组) 和(-)-Bicuculline methochloride 40 $\mu$ M+3-MA 2mM (Bicuc+3MA组), 以及空白对照 (CON组) 和药物对照 (3MA组), 24小时后提取细胞总蛋白免疫印迹分析检测发现, 随着Bicuc兴奋神经元细胞LC3-II表达增多, PSD蛋白shank3、NR2B、NR1表达降低, 而PSD95和AMPAR表达增多; 3-MA抑制自噬后, LC3-II表达降低, 而PSD蛋白shank3、NR2B、NR1表达回升, PSD95和AMPAR表达回落 (Fig. 8A), ImageJ软件灰度分析结果, 与对照组相比显示差异具有统计学意义 (Fig. 8B-G)。皮层神经元细胞爬片免疫荧光染色结果显示Bicuc兴奋细胞后, 神经胞体及轴突出现明显的LC3-II蛋白荧光染色点, 3-MA抑制自噬后, LC3-II蛋白荧光染色明显减退 (Fig. 8H)。所以, 我们以上观察到的结果显示, 自噬进程可能作为一条重要的蛋白代谢途径, 在皮层神经元适度兴奋时起到调节神经突触PSD结构中相应蛋白的构建的关键作用, 其在特定条件下的增强与减弱会使PSD蛋白含量与构象发生变化, 最终导致神经突触功能的增强或减弱, 或者决定神经突触数量的增减, 从而影响学习记忆的形成。

[0225] 2.8 NMDA受体调节兴奋引起的神经元自噬

[0226] 自噬在神经突触PSD构建中发挥关键作用, 但作为蛋白代谢途径其功能的发挥必须精确调节。神经退行性疾病中细胞膜受体研究, NMDA受体一直以来都得到很多重视。NMDA受体是位于突触后膜中的谷氨酸和电压双门控离子通道的配体, 为PSD重要组成结构, 其对于钙离子具有高通过性。NMDA受体能够调节许多生理水平下的神经元功能。它与学习和记忆, 神经元生长, 神经可塑性以及AD和其他退行性疾病密切相关。它是许多形式的突触可塑性的必要介质, 并且还调节神经元的生长和突触的传递功能。在几乎所有中枢突触中, NMDA受体与AMPA受体紧密相连以形成功能突触单位, 因此突触前释放的谷氨酸通常共激活两种受体。在正常的生理条件下, NMDA受体通道被Mg<sup>2+</sup>阻断。谷氨酸靶向结合AMPA受体导致Na<sup>+</sup>的

流入,  $Mg^{2+}$ 从NMDA受体通道分离, 谷氨酸靶向结合NMDA受体, 突触后膜去极化兴奋, 有助于学习记忆的形成。但在病理条件下, 谷氨酸过度激活NMDA受体导致钙稳态的异常。促进许多神经退行性疾病中的神经元功能障碍并产生兴奋性毒性, 导致神经细胞中的钙超载和神经细胞的死亡。功能性NMDA受体是由两个糖基结合的NR1亚基所组成的专性的异质四聚体, 它由两种不同形式的谷氨酯NR2 (A、B、C或D亚型) 结合而成, NMDA受体的生物物理特性依赖于它们的亚单位组成。虽然NMDAR亚单位成分在不同的突触和神经元之间有很大的差异, 其表达、组成、转运和定位对适当的神经元功能至关重要, 但是有助于认知记忆功能的大脑区域主要依赖于NR2A和NR2B亚单位。有研究显示, 对NR2B活性加强可以改善突触的可塑性和记忆的形成。以此提示我们适度兴奋引起的皮层神经元自噬增加而改善小鼠学习记忆过程是否与NMDA受体相关呢? NR2A, NR2B哪个亚单位起调节的主要作用? 所以我们首先在培养18天成熟原代皮层神经元细胞均给与Bicuc (40 $\mu$ M) 刺激下, 分别给与NMDA受体抑制剂MK801 (非竞争性NMDA受体拮抗剂, NMDA受体离子通道开放阻滞剂) 5, 10, 20, 40 $\mu$ M, 24小时后提取细胞总蛋白免疫印迹分析结果显示Bicuc引起皮层神经元自噬蛋白LC3-II表达增加, 在给与NMDA受体抑制剂MK801后, 随着抑制剂量的增加, 自噬蛋白LC3-II逐渐减少 (Fig.9A), 与对照组结果相比, 统计学差别具有意义 (Fig.9B)。此结果说明在细胞兴奋时自噬增多调节神经突触PSD蛋白构建过程中, NMDA受体对自噬进程发挥了重要的调节作用。为确切探知何种NR2功能亚单位在此关键机制中的作用, 我们随后利用培养18天成熟原代皮层神经元细胞分别给与: (-)-Bicuculline methochloride (40 $\mu$ M, Bicuc组), 3-MA (2mM, 3MA组), MK801 (40 $\mu$ M, MK801组), 特异性NR2B亚单位受体阻滞剂Ifenprodil (3 $\mu$ M, Ifen组) 和特异性NR2A亚单位受体阻滞剂NVP-AAM077 (0.4 $\mu$ M, NVP组), 以及 (-)-Bicuculline methochloride (40 $\mu$ M) + 3-MA (2mM) (Bicuc+3MA组), (-)-Bicuculline methochloride (40 $\mu$ M) + MK801 (40 $\mu$ M) (Bicuc+MK801组), (-)-Bicuculline methochloride (40 $\mu$ M) + Ifenprodil (3 $\mu$ M) (Bicuc+Ifen组), (-)-Bicuculline methochloride (40 $\mu$ M) + NVP-AAM077 (0.4 $\mu$ M) (Bicuc+NVP组)。24小时后提取细胞总蛋白免疫印迹分析结果显示Bicuc引起皮层神经元自噬蛋白LC3-II表达增加, 自噬抑制剂3-MA减少LC3-II蛋白表达, NMDA受体阻断剂MK801也减少其表达, 有趣的是, NR2B亚单位阻滞剂Ifenprodil同样可以引起自噬蛋白LC3-II的表达减少, 而NR2A阻滞剂NVP-AAM077则没有产生上述同样的效应 (Fig.9C), 分别与对照组相比, 结果的统计学差别具有意义 (Fig.9D)。此实验结果提示在兴奋引起的神经元自噬增多而调节突触PSD蛋白构建的作用中, NMDA受体亚单位NR2B发挥重要作用。精确调控NR2B影响自噬进程, 可能是皮层神经元兴奋诱发突触PSD蛋白构建重塑, 进而改善突触结构与数量, 促进学习记忆的形成的重要机制。

[0227] 2.9突触PSD构建中蛋白泛素化与自噬的关系

[0228] 最近, 人们发现泛素加工酶可以调节两种无脊椎动物的突触生长和发育、突触传递和可塑性, 提示泛素依赖机制在组织突触结构和信号复合物中的潜在作用。有研究显示, 作为调控蛋白质降解的主要细胞机制之一—泛素化过程中泛素激活酶(E1)、泛素结合酶(E2)等可与蛋白质赖氨酸残基共价连接, 进入泛素-蛋白酶体系统降解是许多细胞功能的关键, 包括细胞周期调控、细胞寿命和成长, 以及细胞信号的传递。而也有文章显示, 神经元细胞兴奋后可引起突触PSD蛋白泛素化从而影响PSD构建, 但是其对突触功能发挥, 对认知记忆的影响尚未见研究。而我们研究发现同为蛋白质降解的另一重要机制—自噬在上述作

用中发挥调控机制,那么二者在此之中的关系尚不得而知。所以我们利用培养18天成熟原代皮层神经元细胞,在(-)-Bicuculline methochloride (40 $\mu$ M,Bicuc组)刺激条件下,分别给与泛素化蛋白酶体抑制剂MG-132,10,20 $\mu$ M,24小时后提取细胞总蛋白免疫印迹分析结果显示Bicuc引起皮层神经元自噬蛋白LC3-II表达增加,而随着蛋白酶体抑制剂MG-132浓度的增加,蛋白LC3-II表达减少(Fig.10A),与相应回对照组相比,统计学差别具有意义(Fig.10B)。虽然也有研究报道,抑制蛋白酶体阻断蛋白泛素化可使自噬流增加,但我们的研究猜测如果过度抑制蛋白泛素化进程会使细胞活力下降,死亡增加,而自噬作为保护机制必然会增强以维持细胞正常生存。因此根据我们的研究结果分析,可能在正常条件下,适度兴奋引起的PSD蛋白降解激活(如shank3)中泛素化和自噬存在某种循环调控,级联反应机制,特别对于认知记忆过程中的皮层神经元突触的兴奋,可以刺激循环中任一点而激活此调节机制,迅速拆解重组PSD蛋白构象,改变突触数量与结构,完成认知记忆所需要的分子或细胞生物学改变。

[0229] 以上所述,仅为本发明较佳的具体实施方式,本发明的保护范围不限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明披露的技术范围内,可显而易见地得到的技术方案的简单变化或等效替换均落入本发明的保护范围内。

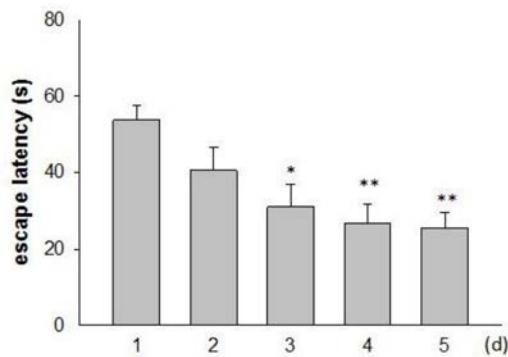
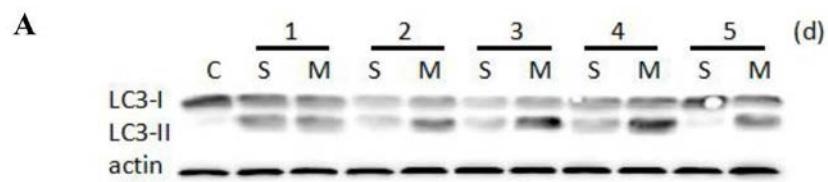
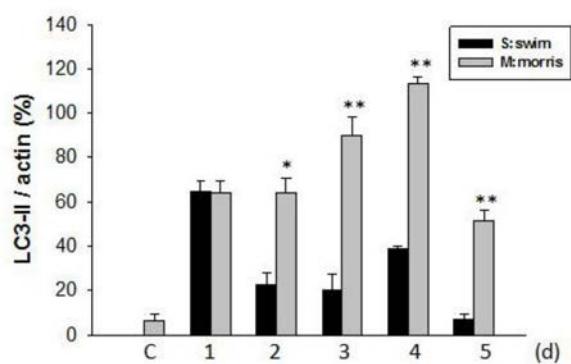


图1

**B**

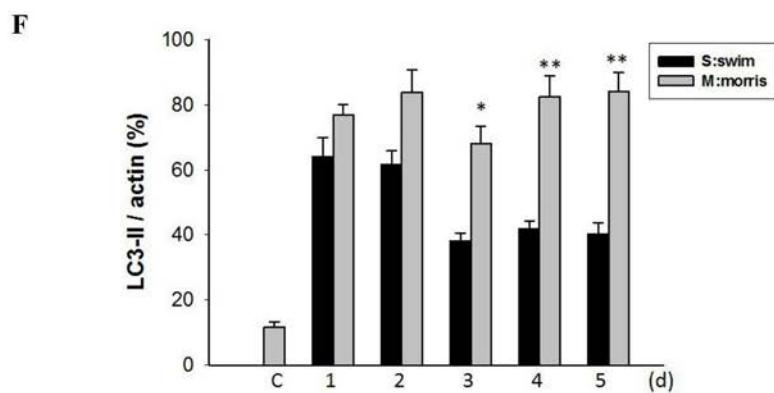
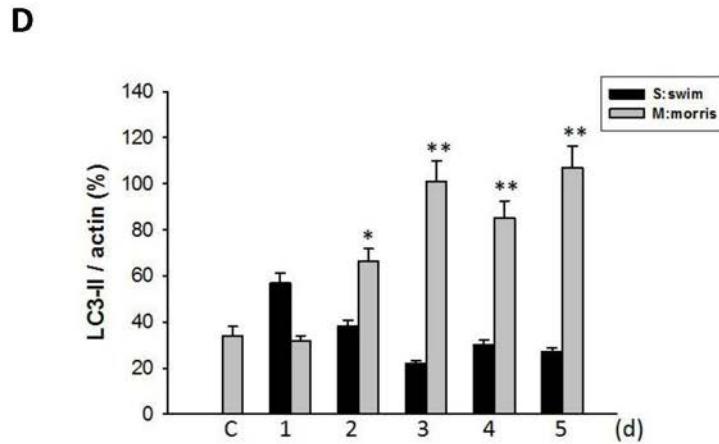


图2

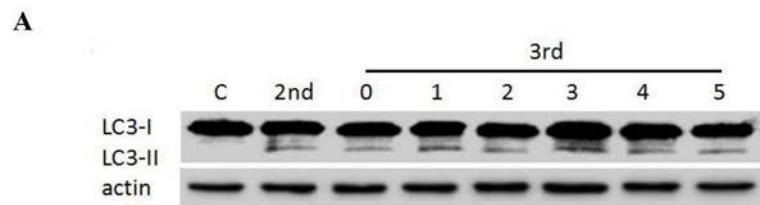
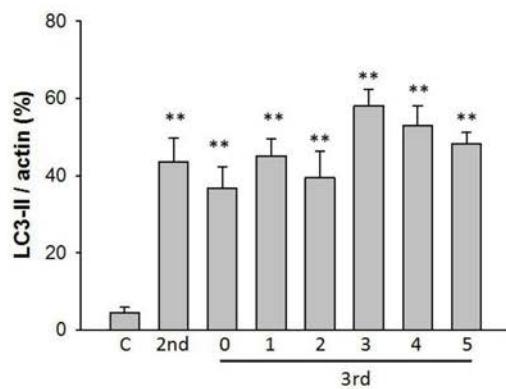
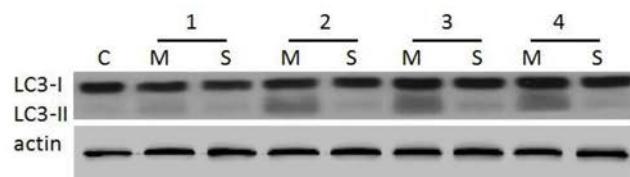
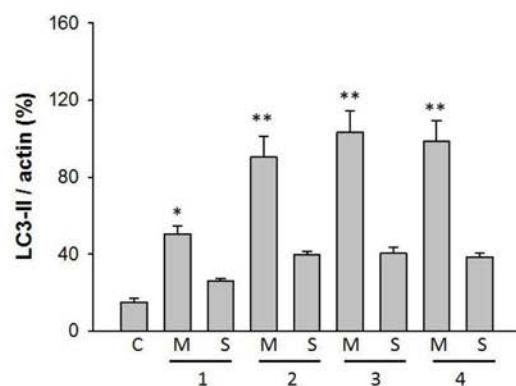
**B****C****D**

图3

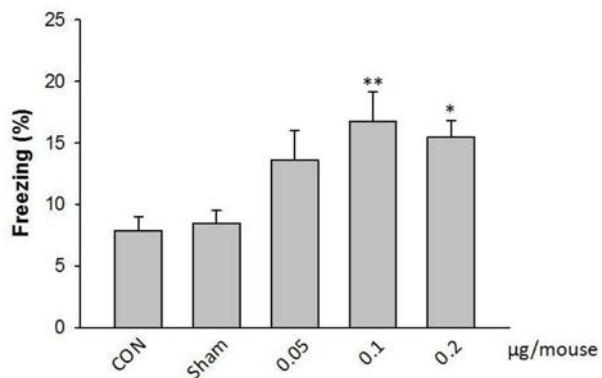
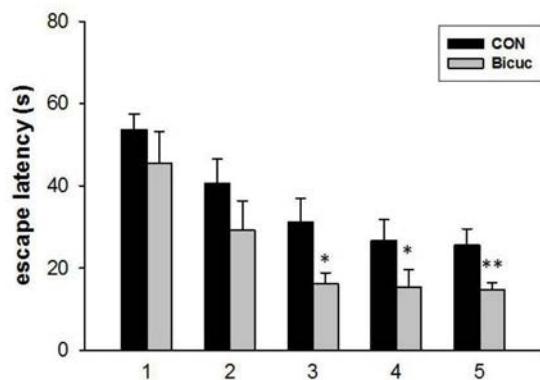
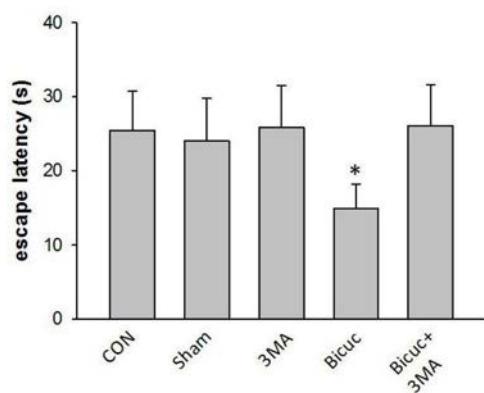
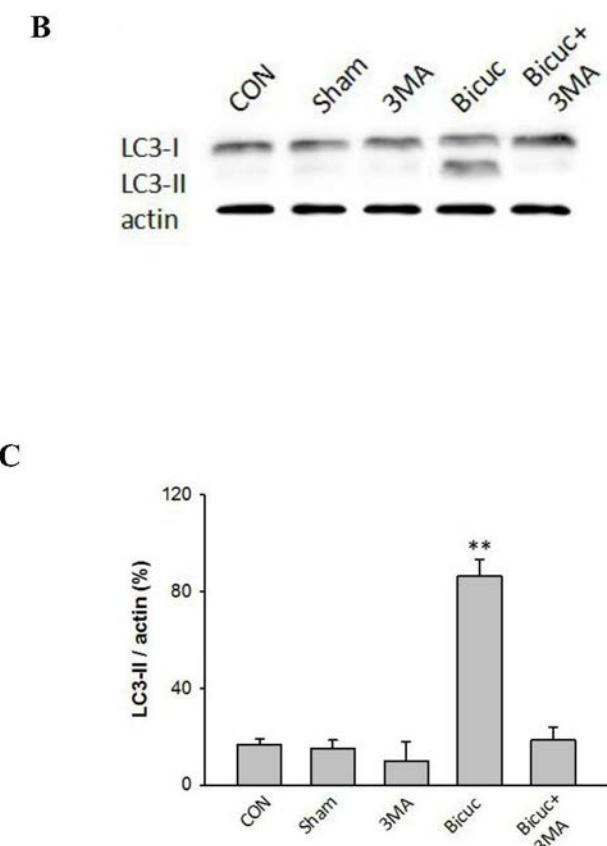
**A****B**

图4

**A**



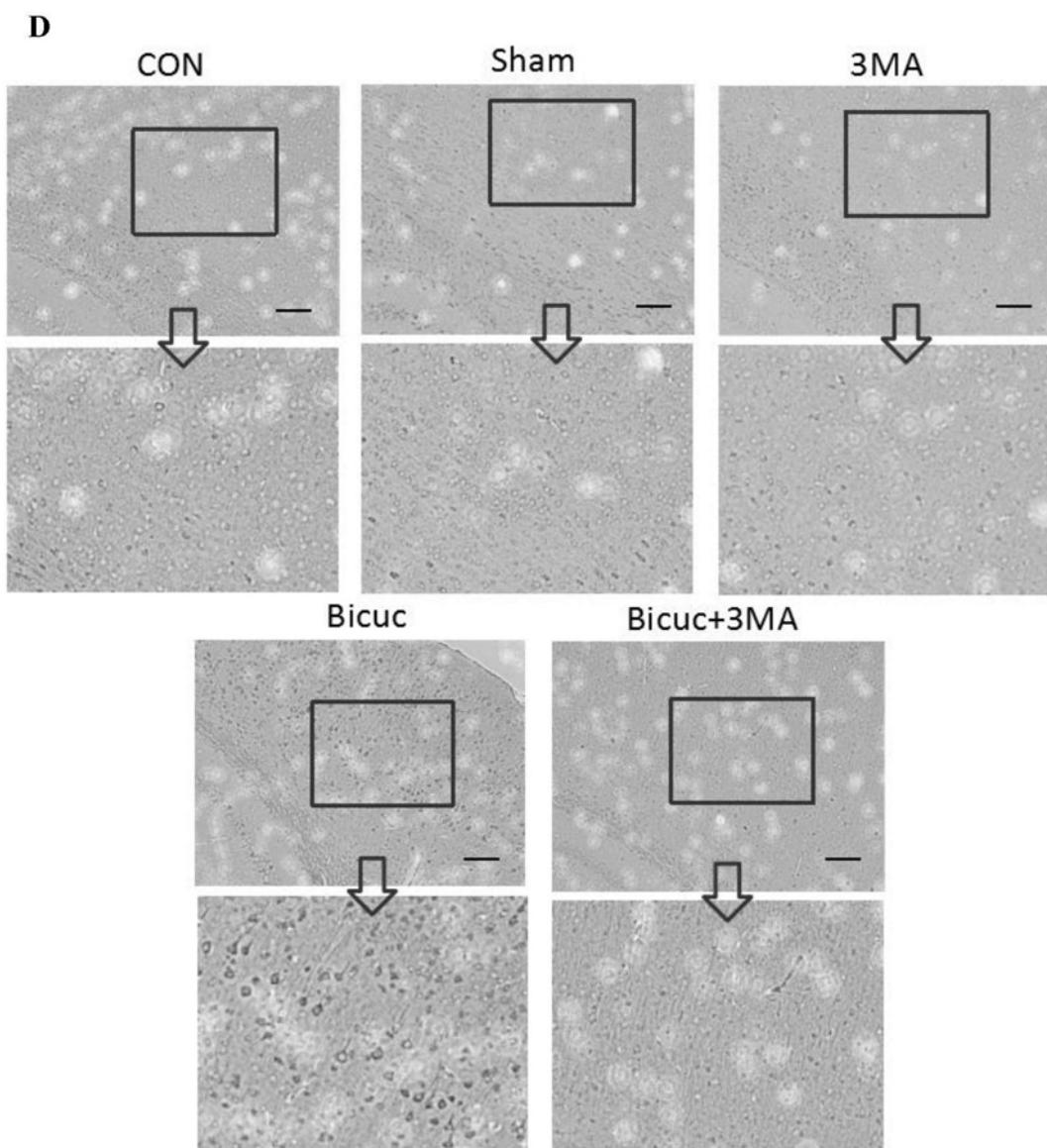
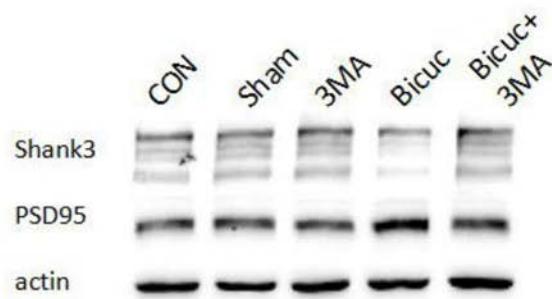
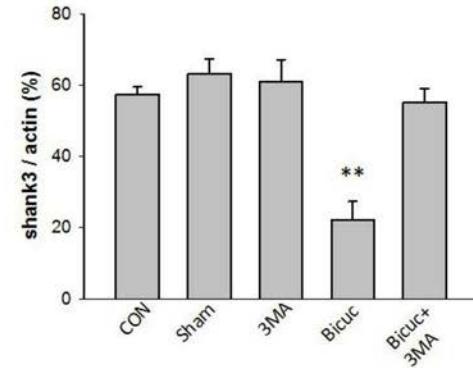
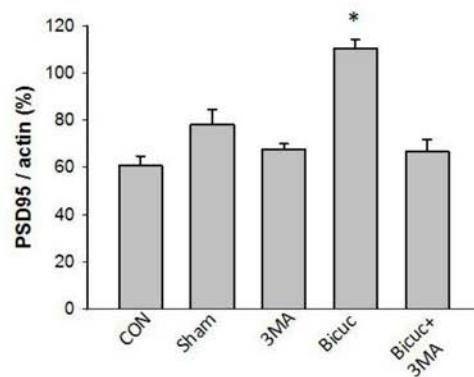


图5

**A****B****C**

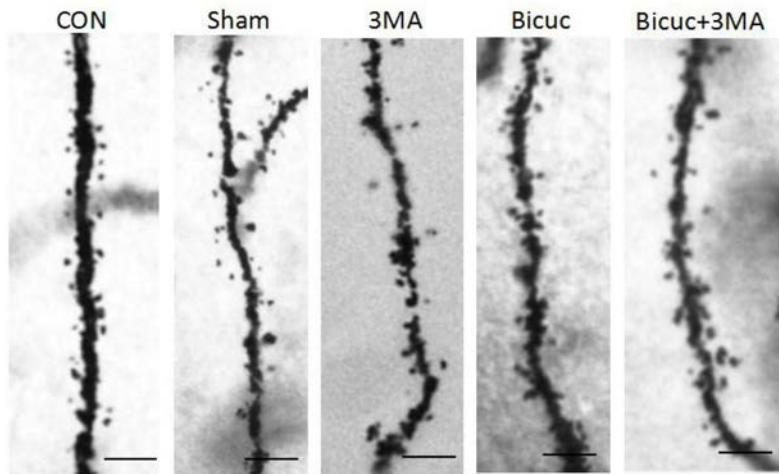
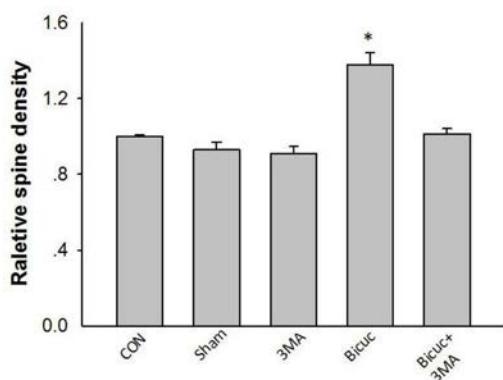
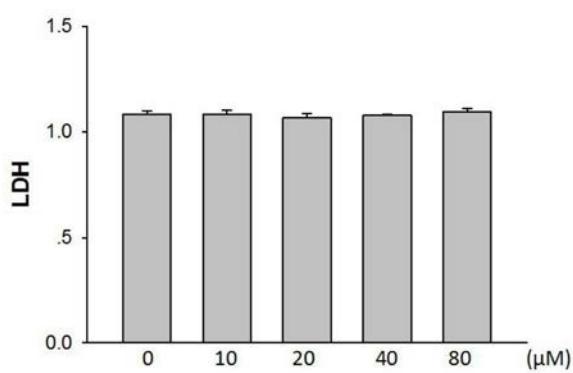
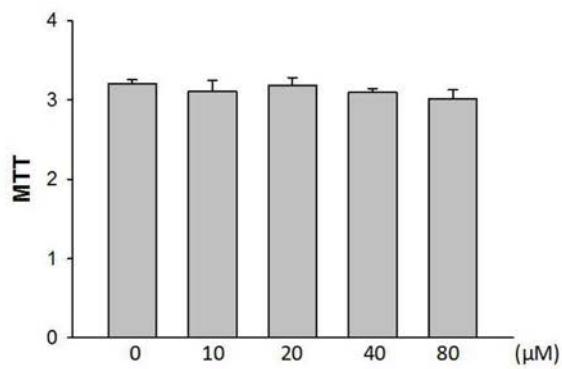
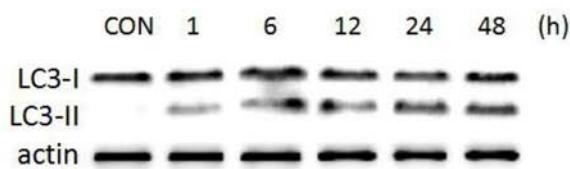
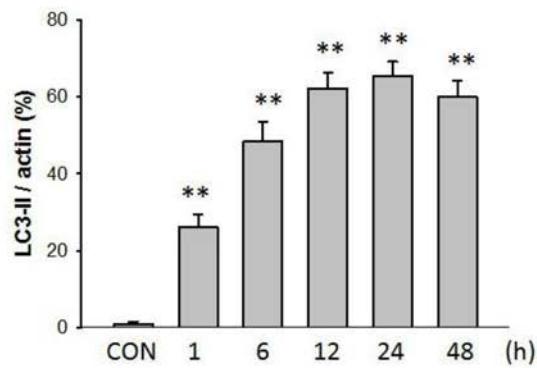
**D****E**

图6

**A**

**B****C****D**

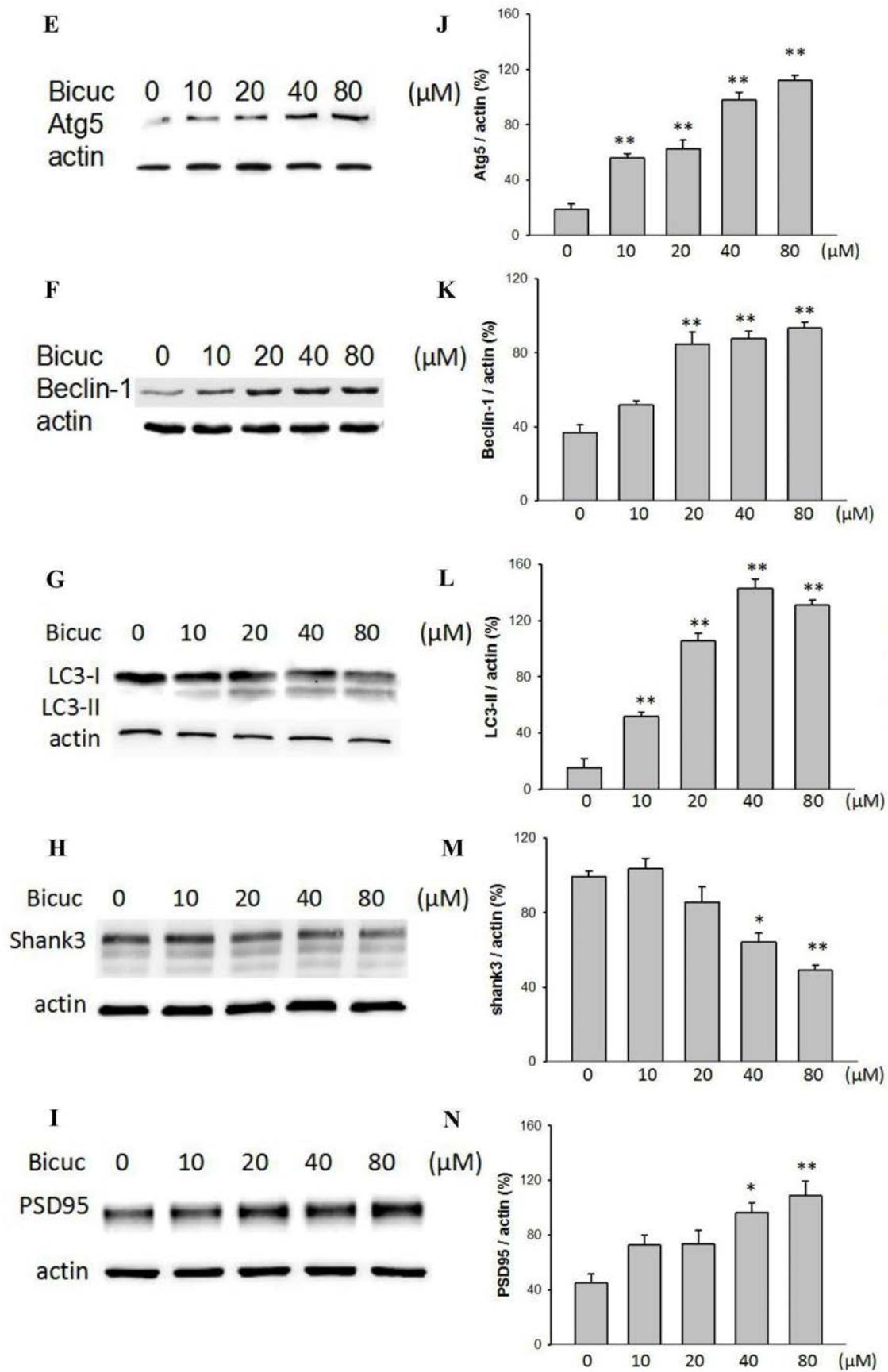
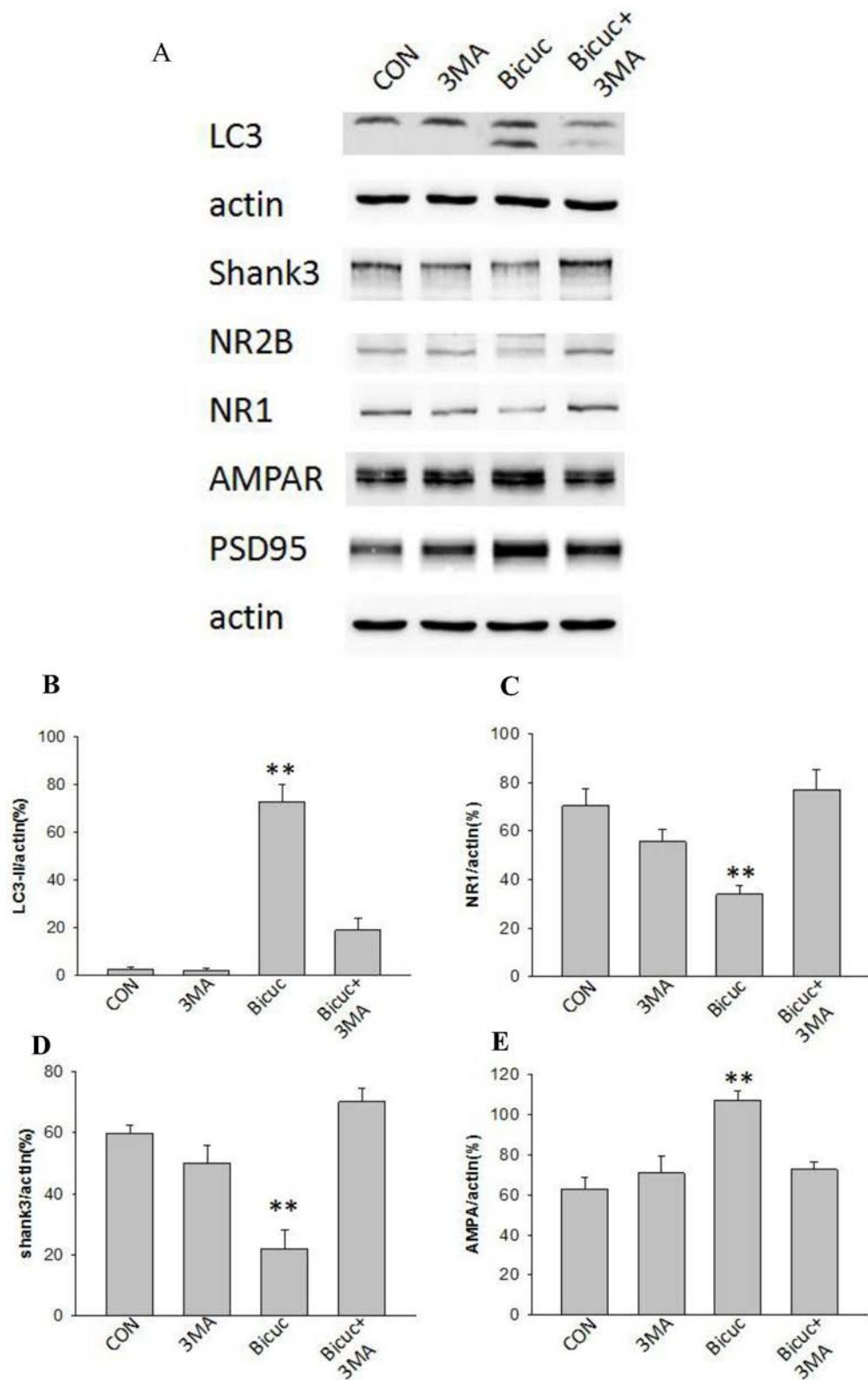


图7



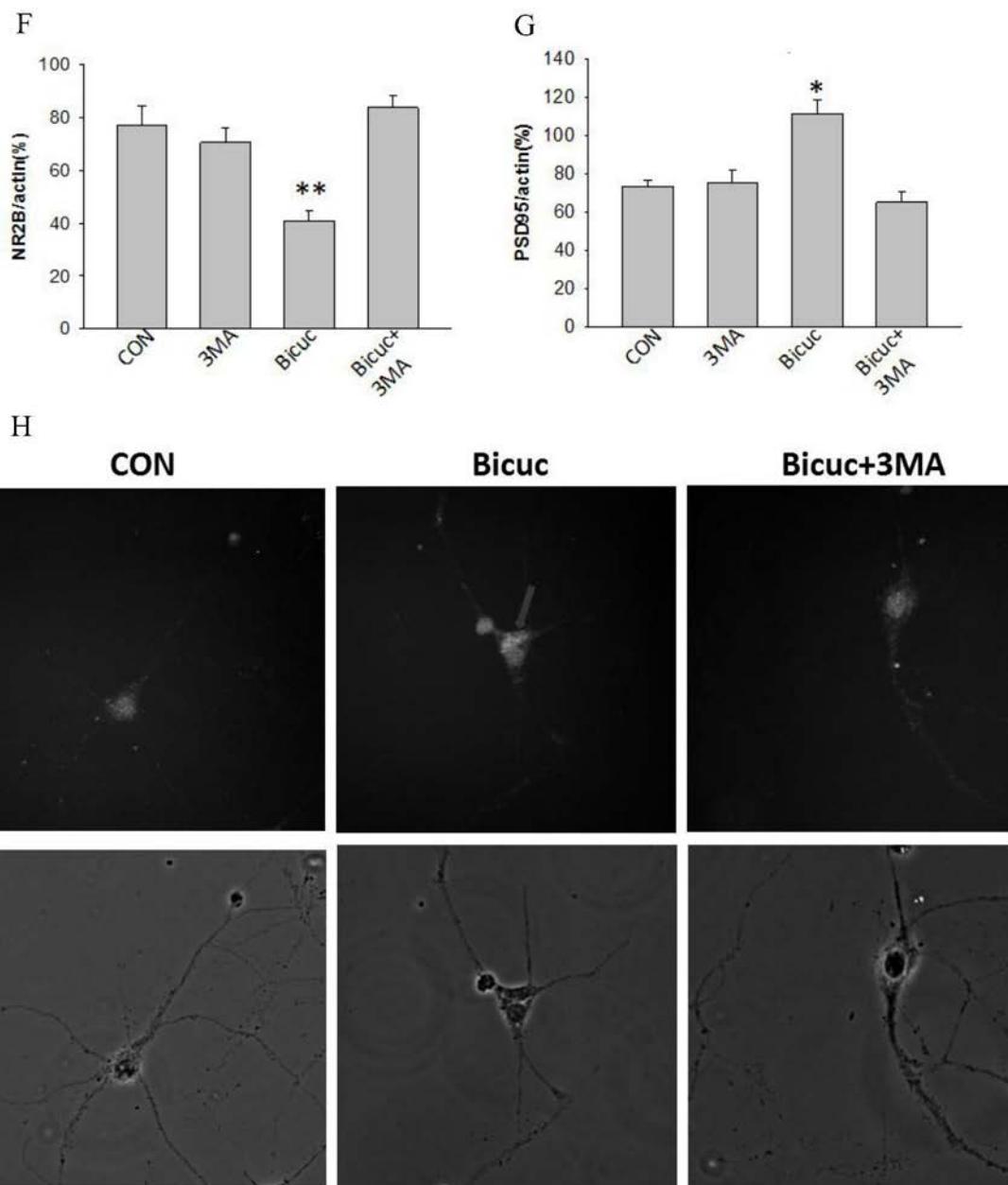


图8

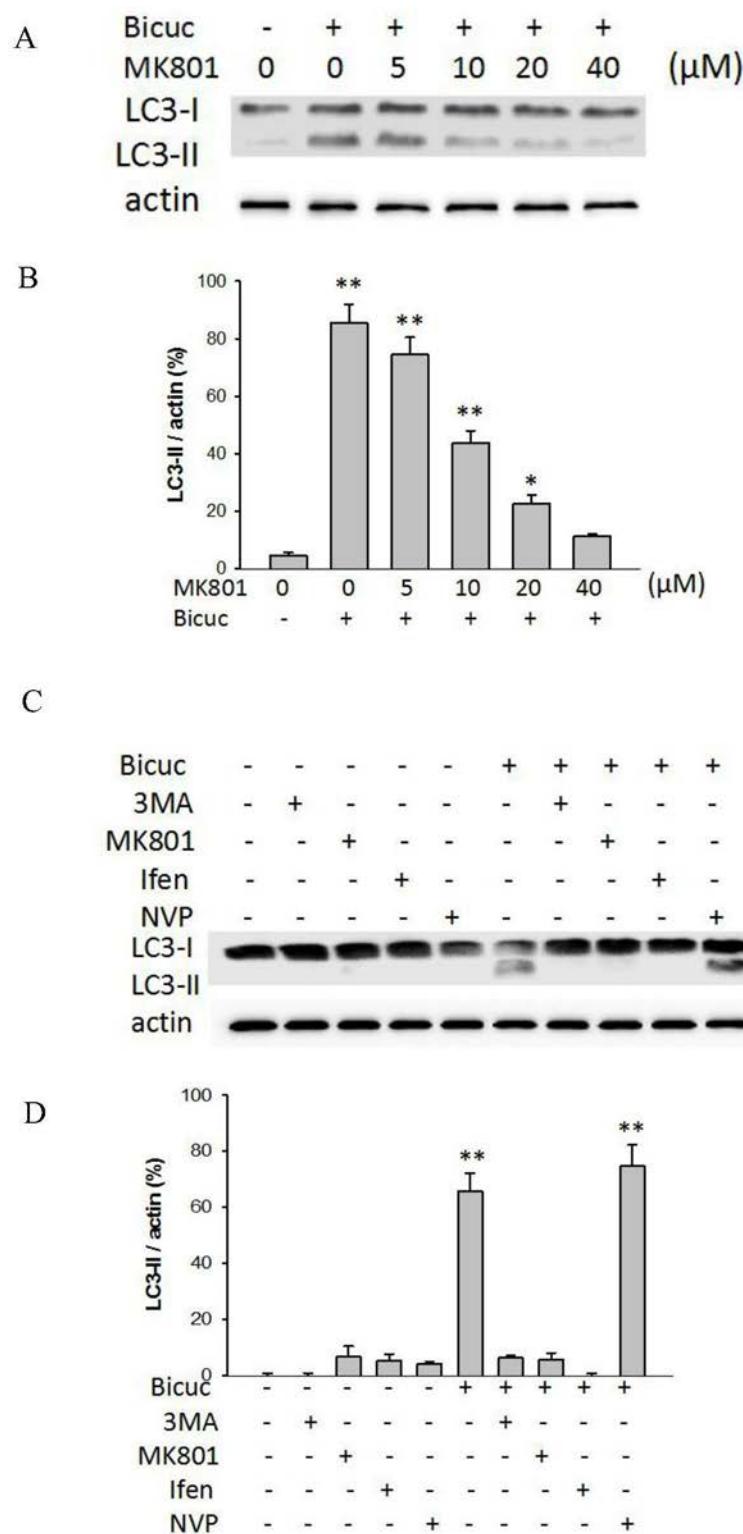
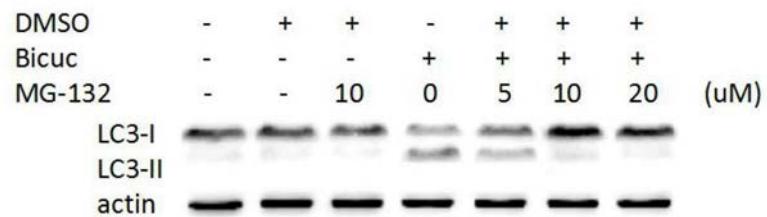


图9

A



B

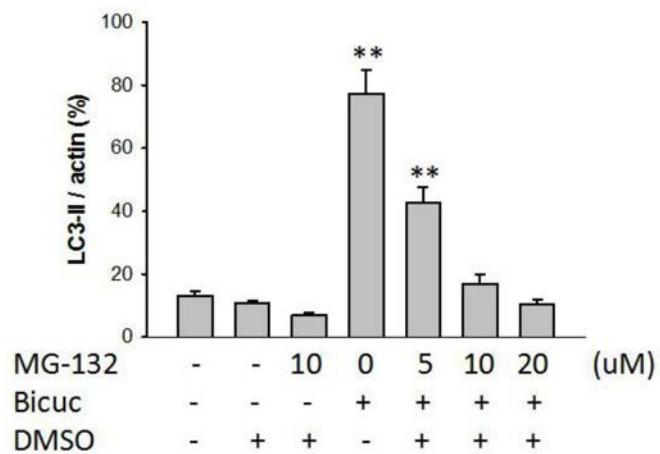


图10

专利名称(译)	一种学习记忆功能保护机制的研究方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN109430166A</a>	公开(公告)日	2019-03-08
申请号	CN201811519705.9	申请日	2018-12-12
[标]申请(专利权)人(译)	徐州医科大学		
申请(专利权)人(译)	徐州医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	徐州医科大学		
[标]发明人	张洋 武煜		
发明人	张洋 武煜		
IPC分类号	A01K67/02 C12N5/0793 C12Q1/32 G01N33/533		
CPC分类号	A01K67/02 C12N5/0619 C12Q1/32 G01N33/533 G01N2333/904		
代理人(译)	杨凤娟		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>	<a href="#">Sipo</a>	

**摘要(译)**

本发明公开了一种学习记忆功能保护机制的研究方法，采用ICR雄性小鼠随机分组，检测小鼠在经典空间认知记忆实验，学习记忆的不同阶段，不同时间的效果，并检测小鼠脑内皮层神经突触体的自噬表达情况；然后利用γ-氨基丁酸受体抑制剂荷包牡丹碱和自噬抑制剂6-氨基-3-甲基嘌呤分别用于分离培养的ICR小鼠原代神经元和侧脑室注射ICR小鼠，Morris水迷宫和条件恐惧实验检测小鼠学习记忆情况，免疫组织化学，检测小鼠大脑皮层自噬蛋白与PSD蛋白的表达以及神经突触体形态学的改变，再观察NMDA受体亚型与自噬进程之间的调节机制。

