

CRM-2102 对小鼠海马和皮层 PP2A 的影响

摘 要

目的 研究 CRM-2102 对小鼠海马、皮层 PP2A 的影响。**方法** 通过向小鼠侧脑室注射 $A\beta_{1-42}$ 建立小鼠记忆损害模型，以剂量 1.5 mg/kg、4.5 mg/kg、13.5 mg/kg CRM-2102 连续灌胃给药两周，Western Blot 检测海马和皮层中 PP2A 表达水平。**结果** 与模型组相比，剂量为 13.5 mg/kg CRM-2102 给药组小鼠海马中 PP2A 表达显著增加，有统计学差异 ($P<0.05$)，剂量为 1.5 mg/kg、4.5 mg/kg CRM-2102 给药组小鼠海马中 PP2A 表达增加，但无统计学差异 ($P>0.05$)。各组小鼠皮层中 PP2A 表达水平均无统计学差异 ($P>0.05$)。**结论** 剂量为 13.5 mg/kg CRM-2102 能显著增加 $A\beta_{1-42}$ 小鼠记忆损害模型海马中 PP2A 表达。

一、试验目的

检测不同剂量的 CRM-2102 对小鼠海马、皮层中 PP2A 的影响。

二、受试药物

试药名称：CRM-2102（由南京中瑞药业有限公司提供）。

试药编码：假手术组为安慰剂。模型组分为安慰剂组（0mg/kg）、低剂量组（1.5mg/kg）、中剂量组（4.5mg/kg）和高剂量组（13.5mg/kg）。各组又分 3 组，计 12 组。随机编码 Y1~Y12。同一笼小鼠按照下表灌胃相应编码的试药。

分组	组别代号	数量	造模（侧脑室注射）	药物代号
假手术组 (3 组)	C1	5	PBS	A1
	C2	5	PBS	A2
	C3	5	PBS	A3
模型组 (12 组)	M1	5	$A\beta_{1-42}$	Y6
	M2	5	$A\beta_{1-42}$	Y3
	M3	5	$A\beta_{1-42}$	Y4
	M4	5	$A\beta_{1-42}$	Y1
	M5	5	$A\beta_{1-42}$	Y10
	M6	5	$A\beta_{1-42}$	Y11
	M7	5	$A\beta_{1-42}$	Y2

	M8	5	A β ₁₋₄₂	Y12
	M9	5	A β ₁₋₄₂	Y9
	M10	5	A β ₁₋₄₂	Y7
	M11	5	A β ₁₋₄₂	Y5
	M12	5	A β ₁₋₄₂	Y8

三、实验动物

1. 来源、种属、品系：C57BL/6J，SPF 级，由浙江省维通利华实验动物技术有限公司提供。

2. 体重：23-25g

3. 性别：雄性

4. 小鼠按照体重随机分为 15 笼，5 只/笼。笼子随机编号 C1、C2、C3、M1、M2、M3、M4、M5、M6、M7、M8、M9、M10、M11、M12，笼编号 C1、C2、C3 为假手术组，笼编号 M1~M12 为模型组。适应性饲养 3 天。

四、主要试剂与仪器

主要试剂：BCA 蛋白定量试剂盒（碧云天生物科技有限公司）；Prestained Protein Marker（碧云天生物科技有限公司）；Tubulin Mouse mAb（爱必信）；Rabbit polyclonal to PP2A（华安生物）；HRP Conj. Goat Anti-Rabbit IgG（华安生物科技有限公司）；全蛋白提取试剂盒（Solarbio）；ECL（天能科技有限公司）；PVDF 膜（红荣微再生物工程技术有限公司）；丙烯酰胺（生工生物工程股份有限公司）；十二烷基硫酸钠（生工生物工程股份有限公司）；过硫酸胺（生工生物工程股份有限公司）；四甲基乙二胺（南京化学试剂股份有限公司）；甘氨酸（生工生物工程股份有限公司）；三羟甲基氨基甲烷（生工生物工程股份有限公司）； β -巯基乙醇（ β -Mereaptoethanol, β -ME）；吐温 20（南京化学试剂股份有限公司）；脱脂奶粉（翌圣生物科技股份有限公司）。

主要仪器：Multiskan FC 型酶标仪（赛默飞世尔仪器有限公司）；Tanon4200 型化学发光成像分析系统（天能科技有限公司）；TGL-16 低温高速离心机（湖南湘仪实验室仪器开发有限公司）；DYY-6C 型电泳仪电源、DYCP-40A 型转移电泳槽、DYCP-28D 夹芯垂直槽（北京市六一仪器公司）。

五、建立小鼠记忆损害模型

假手术组侧脑室注射 PBS (5 μ l)；模型组侧脑室注射 A β ₁₋₄₂ 溶液 (4 μ g/mouse, 5 μ l)。

六、给药

造模后第一天开始给药，每笼（5 只）取按编码表相对应的受试药。

模型组：受试药加 0.1%吐温和 0.5%羧甲基纤维素钠混合水溶液 3.5ml，充分混匀后，每只小鼠灌胃给予 0.5ml，1 次/天，连续 2 周。

假手术组：安慰剂加 0.1%吐温和 0.5%羧甲基纤维素钠混合水溶液 3.5ml，充分混匀后，每只小鼠灌胃给予 0.5ml，1 次/天，连续 2 周。

七、Western Blot 检测海马、皮层 PP2A 水平

（1）取样情况

每组 10 只小鼠，取脑分离海马、皮层组织，2 只小鼠的组织合为一个样本，每组共 5 个样本。每个样品管加入细胞裂解液与研磨珠，于冷冻研磨机上研磨 10 min，置于冰中裂解 30 min。低温离心（4℃，12000 r /min）15 min，收集上清移至 Eppendorf 管中，保存于-80℃。

	剂量	取样代码
假手术组	0 mg/kg	A1、A3
造模组	0 mg/kg	Y4、Y11
CRM-2102 组	1.5 mg/kg	Y2、Y7
	4.5 mg/kg	Y5、Y12
	13.5 mg/kg	Y3、Y10

（2）BCA 蛋白定量：将蛋白标准液（BSA，50 mg/ml）稀释成 0.25~5 μg/μL 系列浓度标准溶液（C₁~C₆），加入 BCA 工作液，37℃放置 30 分钟，于波长 562 nm 处测定 OD 值，绘制标准曲线（OD = 0.2479C+0.1722，R²=0.9846）。

（3）Western Blot

制备电泳凝胶，上样（10 μl，25 μg），电泳（80 V，40 min；120 V，60 min），转膜（100 V，90 min），封闭（5%脱脂牛奶，摇荡 2 h），一抗孵育液（PP2A 抗体 1:1000，Tubulin 抗体 1:5000），二抗孵育（1:5000），显色。

八、统计学处理

采用 Image J 软件采集目标蛋白与内参蛋白灰度值。采用 GraphPad Prism 9 软件进行分析，所有数据均用均值±标准误（ $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ）表示。数据比较采用单因素方差（One Way ANOVA）分析。 $P < 0.05$ 表示有显著性差异， $P > 0.05$ 表示无显著性差异。

九、实验结果

1、CRM-2102 对小鼠海马 PP2A 表达的影响

与模型组相比，剂量为 13.5 mg/kg CRM-2102 给药组小鼠海马中 PP2A 的表达显著增加，有统计学差异 ($P<0.05$)，剂量为 1.5、4.5 mg/kg CRM-2102 给药组小鼠海马中 PP2A 的表达增加，但无统计学差异 ($P>0.05$)，结果见图 1、表 1。

图 1. Western Blot 检测各组小鼠海马 PP2A 的代表图

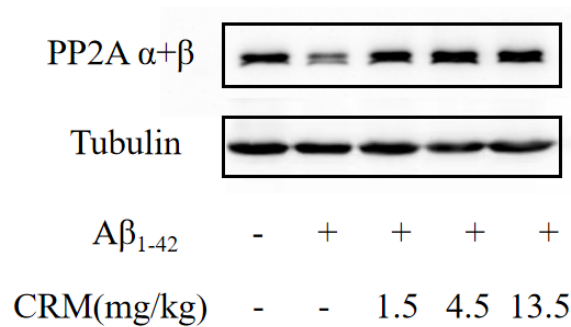


表1. 各组小鼠海马中PP2A表达 ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, n=5)

Drug	Groups	PP2A levels(%)
CRM-2102	假手术组	1.132±0.074*
	模型组	0.576±0.045
	1.5 mg/kg	0.904±0.039
	4.5 mg/kg	0.918±0.054
	13.5 mg/kg	1.202±0.077*

* $P<0.05$, 与模型组相比

2、CRM-2102 小鼠皮层 PP2A 表达的影响

与模型组相比，假手术组和剂量为 1.5、4.5、13.5 mg/kg CRM-2102 给药组小鼠皮层中 PP2A 的表达均无统计学差异 ($P>0.05$)，结果见图 2、表 2。

图 2. Western Blot 检测各组小鼠皮层 PP2A 的代表图

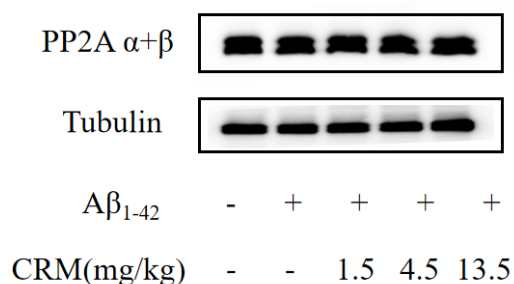
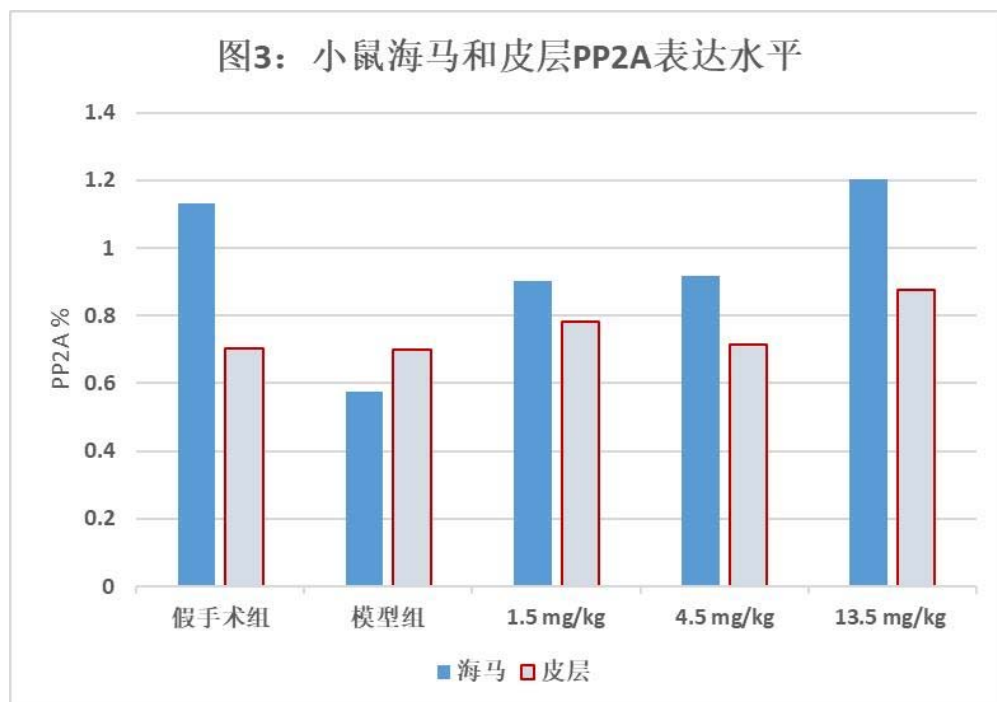


表2. 各组小鼠皮层中PP2A表达($\bar{x} \pm \text{SEM}$, n=5)

Drug	Groups	PP2A levels(%)
CRM-2102	假手术组	0.704 $\pm$ 0.058
	模型组	0.699 $\pm$ 0.085
	1.5 mg/kg	0.782 $\pm$ 0.058
	4.5 mg/kg	0.715 $\pm$ 0.047
	13.5 mg/kg	0.877 $\pm$ 0.057



十、结论

与模型组相比, 1.5、4.5 mg/kg CRM-2102 剂量组小鼠海马中 PP2A 的表达有一定的增加, 但无统计学差异 ($P>0.05$); 13.5 mg/kg CRM-2102 剂量组小鼠海马中 PP2A 的表达有显著增加, 具有统计学差异 ($P<0.05$)。CRM-2102 各剂量组对小鼠皮层 PP2A 的表达水平没有影响。