老年性痴呆症脑内老年斑三维重构及其结构特征分析

叶 伟 刘建武 周江宁 胡祥友 唐孝威 *

(浙江大学理学院物理系交叉学科实验室, 杭州 310027; 浙江医学高等专科学校, 杭州 310053; 中国科学技术大学生命科学学院, 合肥 230026. * 联系人, E-mail: tangxw@zju.edu.cn)

摘要 脑内老年斑是老年性痴呆症的主要病理特征之一, 其主要成分为 $A\beta$ 多肽. 异常分泌和积聚的 $A\beta$ 多肽是老年性痴呆症发病的核心环节. 减少 $A\beta$ 多肽产生、抑制其积聚形成老年斑, 是预防和治疗老年性痴呆症的途径之一. 用 2 种染色方法对老年性痴呆症患者海马部位老年斑进行染色, Matlab 软件处理和 AVS 软件重构了老年斑三维结构, 并进一步用两点相关函数和分形维数研究其结构特征, 观察到两类老年斑, 即弥散斑和经典斑. 弥散斑无明显的核心结构, 经典斑具有致密的核心结构; 两者均为多孔状结构, 但孔的平均大小不同; 弥散斑和经典斑具有不同大小的分形维数, 不同染色方法之间差别不大. 弥散斑和经典斑结构诸多的不同提示两者具有不同的积聚机制. 老年斑重构技术及其结构特征分析方法的建立有助于对老年斑积聚机制的进一步研究.

关键词 老年性痴呆症 老年斑 三维重构 结构特征 积聚动力学

老年性痴呆症(Alzheimer's disease, AD)是一种以痴呆为主要特征的神经退行性疾病. 基本病理学特征为老年斑(senile plaques, SP)、神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFTs)和神经元丢失等^[1,2]. 其中, SP的主要成分为纤维化和非纤维化的 β 淀粉样多肽(β Amyloid Peptide, $A\beta$). 目前许多研究表明, SP内的 $A\beta$ 在AD的发病过程中起核心作用, 发生积聚的 $A\beta$ 多肽具有较高的神经毒性^[3-5]. 因此, 研究 $A\beta$ 的积聚机制, 抑制 $A\beta$ 积聚形成SP或促进其解聚, 具有潜在的治疗和预防AD的意义.

由于SP体积较小、AD病程较长, 人体内分子水平直接观察SP的积聚过程尚不能实现. 目前主要借助于三维重构技术在体外对老年性痴呆症患者脑内的SP进行观察, 或者结合凝聚态物理理论和计算机模拟的手段对SP积聚动力学过程进行研究^[6,7]. 本研究采用2种SP染色方法, 重构了SP三维结构, 并对SP的结构特征进行了分析, 本文还对经典斑的积聚机制进行了推测.

1 材料和方法

() 实验材料. 实验用AD患者海马6例, 男性3例(病期分别为5, 7和9年), 女性3例(病期分别为4, 6和9年), 年龄范围60~81岁, 死亡耽搁时间小于8 h. 根据NINCDS-ADRDA标准, 结合病史和实验室检查, 排除其他原因的痴呆病, 诊断为“很可能是AD病”. 神经病理学诊断按照CERAD标准进行^[8]. 海马和颞叶皮质都显示广泛的SP和NFTs. Braak分级 级.

() 定标孔的设置和连续石蜡切片. 将针灸(直径 295 μ m)针垂直标本表面缓慢捻入海马部位石蜡标本并达足够深度作为定标孔; 定标孔之间间隔小于显微镜40倍下所观察的视野. 采用Leica(2135)切片机对石蜡块进行连续切片, 共50片, 切片厚度为6 μ m, 用于染色.

() 改良 Bieschowsky 银染法. 切片梯度脱蜡并水化; 双蒸水清洗3次; 2%~4%硝酸银37 $^{\circ}$ C避光浸银30 min; 倾去硝酸银水溶液, 清洗3次; 10%甲醛溶液还原5 min到切片呈棕黄色; 双蒸水清洗3次; 滴加氨银乙醇液5 min, 每片200 μ L; 8%甲醛水溶液浸泡1 min; 双蒸水清洗3次; 硫代硫酸钠固定5 min; 双蒸水清洗5 min; 脱水及透明; 封片.

() 免疫组织化学ABC法. 组织切片脱蜡并水化; 双蒸水清洗2次, TBS清洗2次; 用各含0.3% H_2O_2 及Triton X-100的TBS液处理切片30 min, 避光保存; TBS清洗2次; 加入柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, 抗原修复2 $\times$ 10 min; TBS清洗2次; 羊血清37 $^{\circ}$ C孵育20 min; 抗 $A\beta_{17-24}$ 抗体(克隆号: 4G8, 鼠抗人单克隆抗体, Chemicon公司)37 $^{\circ}$ C孵育2 h, 4 $^{\circ}$ C冰箱过夜; 倾去抗体, TBS清洗2次; 加入二抗(马抗鼠, IgG抗体)孵育1 h; TBS清洗2次; ABC孵育1 h; TBS清洗2次; 加入DAB, 显色5~10 min; 先用TBS清洗, 再用双蒸水清洗2次; Mayer's苏木素复染; 双蒸水清洗2次; 脱水并透明; 封片.

() 图像摄取和处理. 选取染色较一致并且无

间断的 SP 切片, NikonE800 显微镜连接 CCD(spots) 摄像装置进行拍摄. 用 Matlab 软件测量每个图片 2 个相同定标孔之间的水平夹角, 以此矫正角度误差; 根据相邻切片组织结构相似性以配准 SP 高倍镜图像, 矫正位置误差. 经配准后的图像, 应用 AVS 软件进行重构.

() 斑块结构特征的测量. 将图片转成灰度图像后, 采用经典的 Otsu's 算法识别斑块边界, 并将其转换为二值图像^[9,10]. 然后, 根据 2 点相关函数的原理计算 SP 大小($2r_0$)和 SP 孔的平均大小($2R$)^[11,12].

$$S_2(x,y) = \sum_{i=1}^{M-x} \sum_{j=1}^{N-y} \frac{f(i,j)f(i+x,j+y)}{(M-x)(N-y)}; \quad (1)$$

$$\varphi = \exp\left(-\rho \frac{4\pi R^3}{3}\right); \quad (2)$$

$$S_2(r) = \exp\left[-\rho \frac{4\pi}{3} \left(R^3 + \frac{4rR^2}{3} - \frac{r^3}{16}\right)\right], \quad r < 2R; \quad (3)$$

$$S_2(r) = \exp\left(-\rho \frac{4\pi}{3} R^3\right), \quad r \geq 2R. \quad (4)$$

公式(1)为图像 2 点相关函数计算公式, (2)~(4)为计算 SP 孔的平均大小的经验公式. S_2 为 2 点相关函数, (x, y) 为图像中任意一点坐标, M 和 N 为图像的长和宽, $f(i, j) = 1$ 表示二值图像白点, $f(i, j) = 0$ 表示二值图像黑点; φ 为二值图像白点占图像总像素点比率, ρ 为表征图像中孔的分布的参数, $2R$ 为孔的平均大小, r 为图像中 2 点的距离. 计算斑块最大径($2r_0$)时, 取包含整个斑块的图像, 由公式(1)求得 S_2 的两点相关函数曲线; 当 $S_2 = 0$ 时 X 轴上最小的 r 值即为 $2r_0$. 计算斑块孔径时, 取斑块内部图像, 并将其拼接为 4×4 图像以保证图像平移不变, 且 r 取值范围为原始图像最大径; 先由式(1)求得 S_2 和 r 的相关函数, 再由式(2)~(4)解得 R 值.

SP 分形维数根据分形维数的计算原理用盒维数法计算得到:

$$D = \frac{-\log N(\delta)}{\log(\delta)}, \quad (\delta \rightarrow 0). \quad (5)$$

公式(5)为分形维数计算公式, D 为分形维数, δ 代表测量的盒子大小, $N(\delta)$ 为一定的 δ 下覆盖整个斑块所需要的盒子数. 所获得的每个斑块的 $N(\delta)$ 值的对数和 δ 值的对数标绘后, 都可以用一条直线进行拟合, 拟合所得的直线斜率即为斑块的的分形维数.

2 实验结果

2.1 老年斑银染法和免疫组织化学法染色结果

依据形态特点, 将银染法和免疫组织化学染色法中 SP 分为弥散斑和经典斑(图 1). 从图 1 可见, 弥散斑边界相对模糊, 无致密的核心结构; 经典斑边界清晰, 具有致密的核心结构, 核心结构周围为晕状结构, 而最外周为环状结构.

2.2 老年斑三维结构的特点

AVS 重构显示 SP 具有以下特征: () 两类斑块表面都有较多突起, 但相对比较光滑, 而非树枝状尖锐突起(图 2); () 两类斑块内部为多孔状结构, 而非实心结构(图 2); () 弥散斑密度由中心向周围减低, 三维断面经可视化处理后, 显示为山峰样结构(图 3 和 4); 而经典斑具有致密的核心结构, 核心周围密度较低, 最外周结构密度介于两者之间. 三维断面经可视化处理后, 经典斑中心为高密度的山峰结构, 峰外周为低密度的山谷结构, 而山谷结构外侧为高度低于核心的环状次峰(图 3 和 4)^[13].

2.3 老年斑结构特征分析

实验观察到 SP 形状是分形的, 它们具有自相似性, 弥散斑和经典斑具有不同的分形维数, 且银染和免疫组织化学染色法结果相近. 银染法中经典斑和弥散斑的分形维数分别为 1.72 ± 0.03 和 1.64 ± 0.03 ($P < 0.05$), 免疫组织化学法中经典斑和弥散斑的分形维数分别为 1.73 ± 0.04 和 1.62 ± 0.03 ($P < 0.05$), 斑块分形维数和 Nakayama 等人^[14]的报道比较接近(表 1).

两点相关函数分析显示, 银染法中经典斑和弥散斑孔的平均大小为 8.34 ± 2.23 和 $5.23 \pm 0.64 \mu\text{m}$ ($P < 0.05$), 免疫组织化学法中经典斑和弥散斑孔的平均大小为 7.83 ± 1.46 和 $5.62 \pm 0.87 \mu\text{m}$ ($P < 0.05$)(表 1). 2 种染色中弥散斑孔的平均大小和 Cruz 等人^[6]的报道比较接近, 而经典斑孔的平均大小目前尚无报道. 在银染法和免疫组织化学法中, 斑块内孔的平均大小均和斑块本身的大小不具相关性(相关系数 $r = 0.06$, $P > 0.05$; 相关系数 $r = 0.17$, $P > 0.05$). 和实际图像相比, SP 三维结构断面图像的特征性分形维数和孔的平均大小与实际图像的结构特征数据比较一致 (P 均大于 0.05)(表 1, 图 5 和 6).

图 1 老年斑 2 种染色方法染色结果

(a)和(b)分别为银染法和免疫组织化学法弥散斑图像; (c)和(d)分别为银染法和免疫组织化学法经典斑图像

图 2 老年斑三维重构图像

(a)和(b)分别为银染法和免疫组织化学法弥散斑三维重构图像; (c)和(d)分别为银染法和免疫组织化学法经典斑三维重构图像

图 3 老年斑三维结构断面图像

(a)和(b)分别为银染法和免疫组织化学法弥散斑三维重构断面图像; (c)和(d)分别为银染法和免疫组织化学法经典斑三维重构断面图像

图 4 老年斑三维结构断面三维可视化图像

(a)和(b)分别为银染法和免疫组织化学法弥散斑三维重构断面三维可视化图像; (c)和(d)分别为银染法和免疫组织化学法经典斑三维重构断面三维可视化图像

表 1 实际图像和三维重构断面图像中老年斑的结构特征分析参数

图像类别		银染法 (M±SD)		免疫组织化学法 (M±SD)	
		经典斑(n=36)	弥散斑(n=43)	经典斑(n=41)	弥散斑(n=38)
SP 的平均大小/ μm	实际图像	77.51 ± 27.52	45.37 ± 12.77	78.08 ± 31.23	44.34 ± 13.41
	三维图像断面	74.33 ± 25.13	47.72 ± 13.49	79.35 ± 29.45	43.23 ± 15.7
SP 孔的平均大小/ μm	实际图像	8.34 ± 2.23	5.23 ± 0.64	7.83 ± 1.46	5.62 ± 0.87
	三维图像断面	7.96 ± 2.75	5.72 ± 0.87	8.07 ± 1.32	6.05 ± 0.87
分形维数	实际图像	1.72 ± 0.03	1.64 ± 0.03	1.73 ± 0.04	1.62 ± 0.03
	三维图像断面	1.72 ± 0.06	1.61 ± 0.04	1.75 ± 0.05	1.63 ± 0.06

图5 银染法老年斑最大径和孔的平均大小的两点相关函数计算

(a)~(d)和(e)~(h)分别为银染法中的弥散斑和经典斑(图中每条曲线均代表一个斑块, $r/2r_0$ 为作图时 r 值与所测得每个斑块最大径的值之比), 其中(a), (c), (e)和(g)分别为老年斑实际图像和三维断面图像的最大径两点相关函数计算, (b), (d), (f)和(h)分别为与(a), (c), (e)和(g)对应的老年斑内局部实际图像和老年斑内局部三维断面图像孔的平均大小两点相关函数计算

3 讨论

重构 SP 三维结构并对其进行分析存在以下难点:

() 如何设定坐标点并对所获得的相应图像进行配准; () 如何判别三维重构图像的重构效果; () 如何对实际图像和三维重构图像中 SP 的结构特征进行

分析. 本研究用极细的针灸针垂直捻入海马部位石蜡块设立坐标点, 然后用 Matlab 软件测量同一 SP 在相邻图像中相似结构内对应点的坐标, 并以此为依据配准图像. 为了评价 SP 三维重构效果并进一步分析其结构特征, 根据分形维数和两点相关函数的数学原理编写程序, 对 SP 的分形维数、最大径和孔的

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2005-50-8-777>

图 6 免疫组织化学法老年斑最大径和孔的平均大小的两点相关函数计算

(a)~(d)和(e)~(h)分别为免疫组织化学法中的弥散斑和经典斑(图中每条曲线均代表一个斑块, $r/2r_0$ 为作图时 r 值与所测得每个斑块最大径的值之比), 其中(a), (c), (e)和(g)分别为老年斑实际和三维断面图像的最大径两点相关函数计算, (b), (d), (f)和(h)分别为与(a), (c), (e)和(g)对应的老年斑内局部实际图像和老年斑内局部三维断面图像孔径两点相关函数计算。

平均大小进行了分析。

$A\beta$ 异常分泌和积聚是AD发病的核心环节, 如何抑制 $A\beta$ 积聚形成SP或促进其解聚是治疗和预防AD的方向之一^[15,16]。对于SP的形成机制, 有报道认为, 在人类中弥散斑是经典斑的前体形式, 两者具有相似的积聚机制^[17], 但也有人认为, 弥散斑和经典斑是各自独立的形成的, 两者的积聚机制完全不同^[18]。2001年, Christie等人^[6]采用激光共聚焦显微镜体内观察了SP的积聚过程, 证实弥散斑的积聚可能为扩散置限聚集模型, 其机理和Cruz等人^[7]推测的结果比较一致。但由于其研究未对斑块进行分类以及弥散斑和经典斑结构的明显差异, 扩散置限聚集模型是否适用于经典斑有待进一步研究。

实验结果显示, 2种染色法中两类斑块表面都有相对比较光滑的突起, 内部均有一定大小的孔, 并且

在银染法和免疫组织化学法中, 2类斑块孔的平均大小与斑块本身大小均不具有相关性。这提示两类斑块在积聚过程中都应涉及Cruz等人^[7]提出的扩散置限聚集模型中的“扩散机制”, 因而斑块才可能具有表面相对比较光滑的突起和内部有一定大小的孔的结构特征。

本研究还分析了斑块的分形维数, 发现在银染法和免疫组织化学法中弥散斑和经典斑的分形维数不同。银染法中经典斑和弥散斑的特征性分形维数分别为 1.72 和 1.64, 免疫组织化学法中经典斑和弥散斑的特征性分形维数分别为 1.73 和 1.62。并且 2种染色法中, 同类型斑块之间分形维数均无显著差别。斑块三维结构及其断面三维可视化图像显示, 弥散斑密度由中心向周围逐渐降低, 但经典斑具有明显的核心结构, 密度分布和弥散斑明显不同。根据这

些结果,我们认为虽然弥散斑和经典斑积聚过程中都涉及“扩散机制”,但它们结构的诸多不同提示,两类斑块的积聚过程和机制应有较大的不同。

我们推测弥散斑和经典斑积聚过程和机制的不同,很重要的原因可能在于两类斑块所涉及的 $A\beta$ 种类、这些 $A\beta$ 多肽代谢速度以及斑块形成时局部的微环境的不同的。据报道,弥散斑主要由 $A\beta_{1-42}$ 组成,并且 $A\beta_{1-42}$ 水平在AD发病早期即上升,但浓度不高^[19,20]。因此,弥散斑很可能主要在发病早期,按照扩散置限聚集模型机制积聚形成,而由于此时 $A\beta_{1-42}$ 水平较低,故而积聚较为疏松且分形维数较低;而对于经典斑, Fukumoto等人^[21]的研究表明,其核心主要由 $A\beta_{1-42}$ 组成,而外周主要为 $A\beta_{1-40}$ 。其形成主要发生在疾病中、晚期,此时 $A\beta_{1-42}$ 分泌加快, $A\beta_{1-42}$ 绝对水平和 $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ 比例迅速增高^[19,20]。我们推测,经典斑积聚开始时,先由 $A\beta_{1-42}$ 按照和弥散斑相似的积聚机制形成致密的核心结构,但由于积聚时 $A\beta_{1-42}$ 浓度较高和/或其在积聚后 $A\beta_{1-42}$ 之间尚有其他作用力,故核心结构比较致密;而后由于 $A\beta_{1-42}$ 在开始阶段发生积聚已大量消耗,浓度大大降低,因此主要由浓度和积聚能力较低的 $A\beta_{1-40}$ 形成较为疏松的外周结构。但这种推论以及经典斑核心结构和外周沉积之间的晕状结构形成时涉及何种机制,尚有待计算机模拟和实验观察予以研究。

本研究重构了2种染色法中SP的三维结构,并用两点相关函数和分形维数分析和对比了实际和重构后图像中SP的结构特征。两类斑块结构特征的诸多不同,提示弥散斑和经典斑具有不同的积聚机制;斑块形成时所涉及的 $A\beta$ 种类、这些 $A\beta$ 多肽的代谢以及局部微环境的不同很可能是造成两者积聚机制的不同的原因。相信SP三维重构技术和其结构分析方法的建立将有助于进一步研究SP的积聚机制。

致谢 在斑块结构特征分析过程中,本实验室程邦胜博士提供了许多帮助,特此深表感谢。本工作受国家自然科学基金(批准号:30271434)和教育部科学技术研究重点项目(批准号:02046)资助。

参 考 文 献

- Armbrustmacher V W. Pathology of dementia. Pathol Annu, 1979, 14: 145~173
- Hyman B T. New neuropathological criteria for Alzheimer disease. Arch Neurol, 1998, 55: 1174~1176[DOI]
- Wisniewsky H M, Robe A, Zigman W, et al. Neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. J Neuropathol Exp Neurol, 1989, 48: 606~609
- Liu Q K. Recent advance in research of Alzheimer's disease. Mod Diagn treat, 2001, 12: 65~67
- Selkoe D J. Alzheimer's disease: A central role for amyloid. J Neuropathol Exp Neurol, 1994, 53: 438~447
- Christie R H, Bacskai B J, Zipfel W R, et al. Growth arrest of individual senile plaques in a model of Alzheimer's disease observed by *in vivo* multiphoton Microscope. J Neurosci, 2001, 21(3): 858~864
- Cruz L, Urbanc B, Buldyrev S V, et al. Aggregation and disaggregation of senile plaques in Alzheimer disease. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 7612~7616[DOI]
- Kachaturian Z S. Diagnosis of Alzheimer's disease. Arch Neurol, 1985, 42(11): 1097~1105
- Otsu N. A threshold selection method form gray-level histograms. IEEE Transactions on SMC, 1979, 9 (1): 62~66
- 侯格贤, 毕笃彦, 吴成柯. 图象分割质量评价方法研究. 中国图象图形学报, 2000, 5(1): 38~43
- Coker D A, Torquato S. Extraction of morphological quantities from a digitized medlum. J Appl Phys, 1995, 77(12): 6087~6099[DOI]
- Berryman J G, Blair S C. Use of digital image analysis to estimate fluid permeability of porous materials: Application of two-point correlation functions. J Appl Phys, 1986, 60(6): 1930~1938[DOI]
- Ye W, Zhou J N, Hu X Y, et al. Reconstruction of the three-dimensional structure of senile plaques in Alzheimer's disease. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2003, 35(5): 449~453.
- Nakayama H, Kiatipattanasakul W, Nakamura S, et al. Fractal analysis of senile plaque observed in various animal specials. Neurosci Lett, 2001: 195~198
- Hardy J, Selkoe D J. The Amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. Science, 2002, 297: 353~356[DOI]
- Mattson M P. Pathway towards and away from Alzheimer's disease. Nature, 2004, 430: 631~639[DOI]
- Teraï K, Iwaib A, Kawabata S, et al. Apolipoprotein E deposition and astrogliosis are associated with maturation of β -amyloid plaques in β APPswe transgenic mouse: Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. Brain Research, 2001, 900(1): 48~56[DOI]
- Dickson, D W. The pathogenesis of senile plaques. J Neuropathol Exp Neurol, 1997, 56: 321~339
- Armstrong R A. β -Amyloid plaques: Stages in life history or independent origin? Dement Geriatr Cogn Disord. 1998, 9: 227~238[DOI]
- Walker L C, Pahnke J, Madauss M, et al. Apolipoprotein E4 promotes the early deposition of $A\beta_{42}$ and then $A\beta_{40}$ in the elderly. Acta Neuropathol, 2000, 100(1): 36~42[DOI]
- Fukumoto H, Asami-Odaka A, Suzuki N, et al. Amyloid beta protein deposition in normal aging has the same characteristics as that in Alzheimer's disease. Predominance of A beta 42(43) and association of A beta 40 with cored plaques. Amer J Path, 1996, 148(1): 259~265
- Armbrustmacher V W. Pathology of dementia. Pathol Annu, 1979, 14: 145~173
- Hyman B T. New neuropathological criteria for Alzheimer disease. Arch Neurol, 1998, 55: 1174~1176[DOI]
- Wisniewsky H M, Robe A, Zigman W, et al. Neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. J Neuropathol Exp Neurol, 1989, 48: 606~609