

# 雷帕霉素改善 APOE4/5xFAD 转基因小鼠早期认知障碍的作用机制研究

福建医科大学附属协和医院（福州 350001） 崔晓丽<sup>1</sup> 魏 振<sup>2</sup> 沈 辉<sup>3</sup> 张 静<sup>4</sup> 戴晓曼<sup>4</sup> 张 健<sup>5</sup>  
曾育琦<sup>5,6</sup>

**【摘 要】 目的** 观察表达不同人载脂蛋白 E（APOE）的 5 个家族性 AD 基因突变（5xFAD）的转基因小鼠（EFAD）在 2.5 月龄时认知、自噬功能是否存在差异，探讨雷帕霉素能否提高 EFAD 小鼠早期学习记忆能力及其可能的作用机制。**方法** 1.5 月龄表达人载脂蛋白 E3 的 5xFAD 鼠（E3FAD）和表达人载脂蛋白 E4 的 5xFAD 鼠（E4FAD）给予雷帕霉素灌胃，给药 30 d 后通过 Y 迷宫检测小鼠的学习记忆能力，透射电镜观察不同组自噬体超微结构特点，酶联免疫吸附试验（ELISA）测定海马可溶性  $\beta$  淀粉样蛋白（A $\beta$ ）水平。**结果** 与 E3FAD 小鼠相比，E4FAD 小鼠新奇目标识别能力下降，进入新通道比率和滞留时间减少，可溶性 A $\beta$  和自噬体内电子致密物增多。雷帕霉素干预可提高小鼠新奇目标识别能力，显著减少 E4FAD 可溶性 A $\beta$ 1-42 水平和自噬体内致密物的沉积。**结论** 雷帕霉素可能通过增强 E4FAD 小鼠脑内自噬功能，减少淀粉样蛋白水平，改善 APOE4/5xFAD 小鼠早期认知障碍。

**【关键词】** 雷帕霉素；自噬；载脂蛋白 E4 基因； $\beta$  淀粉样蛋白；阿尔茨海默病

**【中图分类号】** R741.02 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2020)05-0137-03

载脂蛋白 E4（APOE 4）是阿尔茨海默病（AD）的主要遗传风险因子，促进  $\beta$  淀粉样蛋白（A $\beta$ ）生成<sup>[1]</sup>。APOE4 影响自噬功能，加速 AD 神经病理进程<sup>[2]</sup>。雷帕霉素增强自噬改善痴呆鼠认知<sup>[6]</sup>。前期研究发现 6 月龄表达人载脂蛋白 E3（APOE3）、APOE4 的家族性痴呆（FAD）鼠出现认知障碍。但是低月龄的表达人 APOE3 的 FAD（E3FAD）与表达人 APOE4 的 FAD（E4FAD）鼠认知水平及雷帕霉素对其早期认知功能的影响未见报道。本研究观察雷帕霉素对早期 E3FAD、E4FAD 鼠行为学、自噬体及 A $\beta$  水平的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 材料：**雷帕霉素购自 LC Laboratories，蛋白酶抑制剂购自 Sigma 公司，基因型鉴定 DNA Ladder 购自 Fermentas 公司，2XGo-Taq Green Master Mix 购自 Promega 公司，hAPP695 引物购自 Sangon Biotech 公司，BCA 试剂盒购自 Beyotime 公司。A $\beta$ 1-42 酶联免疫吸附试验（ELISA）试剂盒购自 Invitrogen 公司。置换人 E3 和 E4 基因的 C57/B6 小鼠及 5 个家族性 AD 基因突变（5xFAD）小鼠由 Ladu 教授（美国伊利诺伊大学芝加哥分校）赠送，在福建医科大学 SPF 级实验动物中心建系、

1 福建中医药大学附属人民医院老年病科；2 福建省立医院神经内科；3 干部病房；4 福建省老年医学研究所；5 神经内科；6 通信作者，Email：13774574240@139.com

饲养、繁殖, 动物实验设施许可证号: SYXK (闽) 2008-0001。5xFAD 小鼠与置换人 E3 和 E4 基因的小鼠杂交, 经过基因型鉴定后筛选出 APOE3/5xFAD、APOE4/5xFAD 小鼠。

## 1.2 方法:

1.2.1 实验分组: 16 只 E3FAD 和 16 只 E4FAD 小鼠, 随机分为溶媒对照组和雷帕霉素治疗组, 每组 8 只, 1.5 月龄时灌胃雷帕霉素 (1 mg/kg), 1 次/d, 共 30 d。给药结束检测行为学后收集标本。

1.2.2 Y 迷宫行为学检测: Y 迷宫试验是一种经典的检测学习记忆功能的行为学方法, 由 3 个相互夹角为 120° 的等臂连接组成。通过摄像跟踪记录小鼠运动轨迹, 应用 SMART 2.0 软件 (PanLab, Barcelona, Spain) 进行数据采集和分析。

1.2.3 透射电镜制样和观察: 行为学检测完成后, 试验鼠腹腔内注射水合氯醛麻醉, 剥离脑组织, 将海马 CA1 区切割成大小约 2 mm×1 mm×1 mm 的组织块, 经脱水、两次固定、浸透、包埋、聚合等处理后, 切片机切 100 nm 的切片, 再经染色、水洗后, 在透射电镜下观察拍照。

1.2.4  $\beta$  淀粉样蛋白 1-42 (A $\beta$ 1-42) 浓度测定: 通过 ELISA 检测海马可溶性 A $\beta$ 1-42 水平。行为学实验完成后, 试验鼠予水合氯醛腹腔内注射麻醉, 左心室灌注 4 °C 预冷的 PBS 液, 冰上迅速取脑并分离海马, 液氮冷冻后储存于 -80 °C 冰箱, 用于蛋白分析。使用前经蛋白浓度测定后, 按照 A $\beta$ 1-42 ELISA 试剂盒操作说明测定 A $\beta$ 1-42 浓度。

1.3 统计学方法: 实验数据经过 SPSS 16.0 统计分析及 GraphPad Prism 5.0 作图, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 通过方差分析进行比较。P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 雷帕霉素对 EFAD 小鼠学习记忆功能的影响: Y 迷宫用于检测啮齿类动物与海马相关的空间工作记忆和视觉识别记忆。各个组进入各臂总次数及自发交替无明显差异, 而 E4FAD 溶媒对照组进入新奇臂的百分比和停留时间较 E3FAD 溶媒对照明显下降。雷帕霉素可增加 E4FAD 小鼠进入新奇臂的比率, 并延长其新奇臂驻留时间 (P<0.05, 表 1), 而对 E3FAD 小鼠无影响。

表 1 Y 迷宫检测 EFAD 小鼠学习记忆能力 ( $\bar{x} \pm s$ )

项目	E3FAD 对照组	E3FAD 雷帕霉素组	E4FAD 对照组	E4FAD 雷帕霉素组
进入各个臂总次数	26.29±1.85	26.17±3.30	26.83±2.30	27.89±1.90
自发交替率/%	53.91±4.82	63.03±4.18	63.03±4.18	60.70±3.67
进入新奇臂的百分比/%	39.86±1.81	36.28±1.56	31.68±1.67*	40.1±1.42#
新奇臂停留时间/s	31.11±2.65	28.13±2.01	20.45±1.18 $\Delta$	30.39±2.44*

注: E4FAD 对照组与 E3FAD 对照组比较, \* P<0.01,  $\Delta$  P<0.01; E4FAD 雷帕霉素组与 E4FAD 对照组比较, # P<0.01, \* P<0.05。

2.2 雷帕霉素减少 EFAD 小鼠自噬体内电子致密物含量: 电镜下正常的自噬体结构表现为完整的双层膜结构, 内含待降解物质少, 镜下表现为电子致密物低。与 E3FAD 溶媒组 (图 1A) 相比, E4FAD 溶媒组自噬体 (图 1C) 缺乏双层膜结构, 且自噬体内电子致密物增加 (白色箭头)。雷帕霉素治疗后 EFAD 小鼠海马自噬体完整双层膜数量增加, 电子致密物减少 (图 1B、1D) (黑色箭头), 以 E4FAD 组改善更为明显, 提示雷帕霉素诱导自噬可减少自噬体内未降解的异常物质的聚集。

2.3 雷帕霉素对 EFAD 小鼠海马可溶性 A $\beta$ 1-42 水平的影响: 溶媒对照组 E4FAD 小鼠可溶性 A $\beta$ 1-42 较 E3FAD 组升高 (0.054±0.003 vs 0.041±0.003, P<0.01), 雷帕霉素可明显降低 E4FAD 小鼠 A $\beta$ 1-42 水平 (0.041±0.001 vs 0.054±

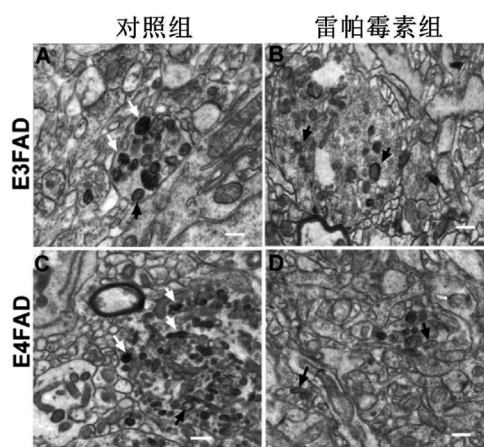


图 1 电镜观察 EFAD 小鼠海马 CA1 区自噬体形态 (标尺=300 nm)

0.003,  $P < 0.01$ ), 而对 E3FAD 小鼠无影响 ( $0.043 \pm 0.004$  vs  $0.041 \pm 0.003$ ,  $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

AD 发病机制复杂, 目前仍缺乏有效治疗药物。研究表明在出现临床症状前数年甚至数十年, AD 患者脑内已存在  $A\beta$  沉积等病理改变, 因此早期诊断早期干预是其治疗的关键。APOE 4 是 AD 的主要遗传风险因子, 可促进  $A\beta$  生成, 加速认知功能障碍。本研究旨在观察表达人 apoE3 和 apoE4 的 AD 小鼠早期认知功能是否存在差异以及雷帕霉素早期干预后的疗效。

在 2.5 月龄时, EFAD 小鼠自发活动不受 APOE 基因型和雷帕霉素的影响, 而 E4FAD 小鼠新奇事物探索能力较 E3FAD 小鼠差, 提示 APOE4 加剧 AD 小鼠早期认知功能损害。既往研究提示雷帕霉素改善 6 月龄 TgCRND8 鼠认知功能<sup>[8]</sup>, 但其是否能改善年轻的 E4FAD 小鼠早期认知功能损害未见报道。本文结果提示, 雷帕霉素给药后提高 E4FAD 小鼠新奇事物的识别能力, 逆转早期 E4FAD 小鼠记忆障碍, 提示雷帕霉素具有早期应用价值, 尤其是对 APOE4 基因携带者。

脑内  $A\beta$  水平与认知测试分数及日常生活能力相关<sup>[9]</sup>。本研究结果提示 E4FAD 小鼠早期即存在自噬功能障碍, 雷帕霉素可能通过诱导自噬减少自噬体内异常物质的聚集, 促进 E4FAD 错误折叠蛋白  $A\beta$  的降解, 从而改善认知功能。APOE4 加剧认知功能损害的机制复杂, 除与自噬清除机制相关外, 还可能与钙调蛋白-CREB 介导突触功能障碍<sup>[10]</sup>、神经炎症<sup>[11]</sup>以及脑血流障碍<sup>[12]</sup>等有关。

综上所述, 雷帕霉素可通过增强 E4FAD 小鼠脑内自噬, 增加自噬体内异常蛋白的降解, 减少  $A\beta$  沉积, 从而改善 E4FAD 转基因小鼠的认知功

能, 有望成为 AD 早期治疗的候选药物, 尤其对 APOE4 基因携带者。

### 参考文献

- [1] Tachibana M, Holm M L, Liu C C, et al. APOE4-mediated amyloid- $\beta$  pathology depends on its neuronal receptor LRP1 [J]. J Clin Invest, 2019, 129 (3): 1272-1277.
- [2] Simonovitch S, Schmukler E, Bepalko A, et al. Impaired autophagy in APOE4 astrocytes [J]. J Alzheimers Dis, 2016, 51 (3): 915-927.
- [3] Ozcelik S, Fraser G, Castets P, et al. Rapamycin attenuates the progression of tau pathology in P301S tau transgenic mice [J]. PLoS One, 2013, 8 (5): e62459.
- [4] Zeng Y Q, Zhang J, Zhu Y G, et al. Triphenylolide improves cognitive deficits by reducing amyloid  $\beta$  and upregulating synapse-related proteins in a transgenic model of Alzheimer's Diseases [J]. J Neurochem, 2015, 133 (1): 38-52.
- [5] Yang D S, Stavrides P, Mohan P S, et al. Reversal of autophagy dysfunction in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease ameliorates amyloid pathologies and memory deficits [J]. Brain, 2011, 134 (Pt 1): 258-277.
- [6] Sperling R A, Donohue M C, Raman R, et al. Association of factors with elevated amyloid burden in clinically normal older individuals [J]. JAMA Neurol, 2020, 77 (6): 1-11.
- [7] Liu D S, Pan X D, Zhang J, et al. APOE4 enhances age-dependent decline in cognitive function by down-regulating an NMDA receptor pathway in EFAD-Tg mice [J]. Mol Neurodegener, 2015, 10: 7.
- [8] Zhang P, Kishimoto Y, Grammatikakis I, et al. Senolytic therapy alleviates  $A\beta$ -associated oligodendrocyte progenitor cell senescence and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model [J]. Nat Neurosci, 2019, 22 (5): 719-728.
- [9] Lin A L, Jahrling J B, Zhang W, et al. Rapamycin rescues vascular, metabolic and learning deficits in apolipoprotein E4 transgenic mice with pre-symptomatic Alzheimer's disease [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2017, 37 (1): 217-226.