

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.46.016

[http://www.crter.org]

董贤慧, 柴锡庆. 阿尔茨海默病转基因动物模型: 如何更接近病理特征? [J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(46):8075-8082.

阿尔茨海默病转基因动物模型: 如何更接近病理特征? ***☆

董贤慧¹, 柴锡庆^{1,2} (¹河北医科大学第一附属医院神经内科, 河北省石家庄市 050000; ²河北化工医药职业技术学院, 河北省石家庄市 050000)

文章亮点:

1 此问题的已知信息: 关于阿尔茨海默病的病因、发病机制还不十分清楚, 很大程度上制约了阿尔茨海默病治疗药物的筛选, 而主要障碍之一是缺少合适的动物模型。

2 文章增加的新信息: 人们已经设计了各种动物模型诸如胆碱能系统损伤模型、铝模型、tau 蛋白模型、β-淀粉样蛋白模型等, 目前日趋成熟的转基因动物技术可以在活体上研究某一特定致病基因的作用, 已成为阿尔茨海默病较为理想的动物模型。文章归纳总结近几年国内外阿尔茨海默病转基因动物模型的种类及表型特征, 认识到各种动物模型都有其优点, 但也存在着缺点。

3 临床应用的意义: 进一步建立更为完善的阿尔茨海默病转基因动物模型, 可以更准确、完整地再现阿尔茨海默病的病理特征。合格的动物模型可以模拟临床疾病的病理变化及病理过程, 为临床选择有效的治疗和预防药物提供实验基础和理论指导。

关键词:

组织构建; 组织构建综述; 阿尔茨海默病; 痴呆; 动物模型; 转基因动物; 病因; 遗传因素; 国家自然科学基金

主题词:

阿尔茨海默病; 痴呆; 模型; 动物; 遗传; 基因顺序

基金资助:

国家自然科学基金资助项目(81273983)*; 河北省自然科学基金资助项目(C2010001471)*; 河北省高等学校科学技术研究青年基金资助项目(Q2012036)*

摘要

背景: 目前阿尔茨海默病的病因、发病机制还不是十分清楚, 很大程度上制约了阿尔茨海默病治疗药物的筛选, 而主要障碍之一是缺少合适的动物模型。日趋成熟的转基因动物技术可以在活体上研究某一特定致病基因的作用, 已成为阿尔茨海默病较为理想的动物模型。

目的: 综述近几年国内外阿尔茨海默病转基因动物模型的研究进展。

方法: 第一作者应用计算机检索 2013 年 7 月以前 PubMed 数据库、中国期刊全文数据库有关阿尔茨海默病转基因动物模型的文章, 英文检索词为“Alzheimer's disease, transgenic mouse, Animal model, dementia”, 中文检索词为“阿尔茨海默病, 转基因动物, 动物模型, 痴呆”。最终选择 41 篇文献进行综述。

结果与结论: 阿尔茨海默病的病因是多元性的, 遗传因素是其中的一个重要因素。现有的阿尔茨海默病转基因动物模型, 包括单转基因模型、双转基因模型以及多重转基因模型。单转基因动物模型是通过重组 DNA 技术, 将某一种突变的外源性基因片段整合到动物的基因组中, 该模型只能研究阿尔茨海默病某一特定的病理变化; 双转基因动物模型是通过重组 DNA 技术将两种外源性突变基因同时转染动物, 相比单转基因模型, 其病理变化与阿尔茨海默病更加吻合, 但是仍然不能完全模拟疾病; 多重转基因模型是利用不同的转基因鼠杂交或多个基因同时转入等方法, 得到的多重转基因模型, 该模型能更好的模拟临床阿尔茨海默病的发病过程和病理特征, 但存在近亲衰退等缺点。各种动物模型都有其优点, 但也存在着缺点, 还需进一步建立更为完善的阿尔茨海默病转基因动物模型, 更准确、完整地再现阿尔茨海默病的病理特征。

Alzheimer's disease transgenic animal models: How to get more similar pathological characteristics?

Dong Xian-hui¹, Chai Xi-qing^{1,2} (¹Department of Neurology, the First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China; ²Hebei Chemical and Pharmaceutical Vocational Technology College, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Alzheimer's disease causes and pathogenesis remain unclear, which greatly restrict the screening of drugs. And the main reason is lack of suitable animal models. The developing transgenic animal technology allows studying the role of certain pathogenic gene *in vivo*, and has regarded the ideal animal models for Alzheimer's disease.

OBJECTIVE: To summarize the research advance of Alzheimer's disease transgenic animal models.

董贤慧☆, 女, 1983 年生, 天津市人, 汉族, 河北医科大学在读博士, 主要从事老年痴呆的发病机制及其干预研究。
dongxianhui@126.com

通讯作者: 柴锡庆, 博士, 教授, 主任医师, 河北化工医药职业技术学院, 河北省石家庄市 050000
xqchai@163.com

中图分类号: R318

文献标识码: A

文章编号: 2095-4344
(2013)46-08075-08

修回日期: 2013-09-13
(201307156/G·Y)

Dong Xian-hui☆, Studying for doctorate, Department of Neurology, the First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China
dongxianhui@126.com

Corresponding author: Chai Xi-qing, M.D., Professor, Chief physician, Department of Neurology, the First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China; Hebei Chemical and Pharmaceutical Vocational Technology College, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China
xqchai@163.com

Accepted: 2013-09-13

METHODS: Using “Alzheimer’s disease, transgenic mouse, animal model, dementia” in Chinese and English as the key words, the first author retrieved PubMed and CNKI databases published before July 2013. Finally, 41 articles were included in result analysis.

RESULTS AND CONCLUSION: The etiology of Alzheimer’s disease is diverse, and genetic factor is one important factor. The existing transgenic animal models of Alzheimer’s disease include single genetically modified models, double genetically modified models and multiple transgenic models. Single transgenic animal models can make a kind of mutated exogenous gene integrate into the genomes of animals by using recombinant DNA technology. This kind of models can be applied to only study one specific pathological change of Alzheimer’s disease. Double transgenic animal models can make two kinds of mutated exogenous gene integrate into the genomes of animals and simultaneously transfect animals by using recombinant DNA technology. This kind of models is closer to the pathological changes of Alzheimer’s disease than single transgenic animal models, but still cannot simulate Alzheimer’s disease. Multiple genetically modified models are obtained with different transgenic mice hybridization or several genes transfection, which are most similar to clinical process and pathological features of Alzheimer’s disease. However, this kind of models may develop a decline in consanguinity. Each kind of animal model has their advantages and shortcomings, and a better transgenic animal model is urgently needed to completely simulate pathological characteristics of Alzheimer’s disease.

Subject headings: Alzheimer’s disease; dementia; models, animal; heredity; gene sequence

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81273983*; Natural Science Foundation of Hebei Province, No. C2010001471*; Science and Technology Research Funds for Youth in Colleges and Universities of Hebei Province, No. Q2012036*.

Dong XH, Chai XQ. Alzheimer’s disease transgenic animal models: How to get more similar pathological characteristics? Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2013;17(46):8075-8082.

0 引言 Introduction

阿尔茨海默病是常见的老年人慢性退行性神经系统疾病, 目前其病因、发病机制还不是十分清楚, 很大程度上制约了阿尔茨海默病治疗药物的筛选, 而主要障碍之一是缺少合适的动物模型, 人们已经设计了各种动物模型诸如胆碱能系统损伤模型^[1]、铝模型^[2]、tau蛋白模型^[3]、 β -淀粉样蛋白模型等^[4], 这些模型尽管可以存在部分特征性病理改变, 但是因不能模拟人类疾病渐进性的退行性改变, 均不太理想。目前日趋成熟的转基因动物技术可以在活体上研究某一特定致病基因的作用, 已成为阿尔茨海默病较为理想的动物模型。

阿尔茨海默病的病因是多元性的, 遗传因素是其中的一个重要因素。研究发现, 1号、14号、19号及21号染色体等与均阿尔茨海默病发病密切相关^[5]。其中包括淀粉样蛋白前体(APP)基因、早老蛋白(Presenilin, PS)基因^[6]、载脂蛋白E(Apolipoprotein E, ApoE)基因^[7]、Tau蛋白基因^[8]、UBQLN1(ubiquilin-1)蛋白基因^[9]、 α 2巨球蛋白基因(α 2M)^[10]、脂蛋白受体相关蛋白基因(LRP基因)、组织蛋白酶D基因(CTSD基因)、血管紧张素转换酶基因(ACE基因)、丁酰胆碱酯酶基因(BCHE基因)、超氧化物歧化酶基因、 α 1-抗糜蛋白酶基因、突触核蛋白基因及二氢脂酰琥珀酰转移酶基因以及其他许多不直接生成蛋白质的调节元素, 这些为转基因动物模型的建立提供了可能。现综述几种重要的阿尔茨海默病转基因动物模型, 包括单转基因、双转基因及多重转基因动物模型等的基

因类型及表型特征。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 资料来源 由第一作者检索至2013年7月为止PubMed数据(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>)及CNKI中国期刊全文数据库(<http://www.cnki.net/>), 以“Alzheimer’s disease, transgenic mouse, Animal model, dementia”为英文检索词, “阿尔茨海默病, 转基因动物, 动物模型, 痴呆”为中文检索词, 检索摘要内同时包含上述检索词的文献。

1.2 纳入标准 ①文章所述内容需为阿尔茨海默病转基因动物模型的相关研究, 或者应用转基因动物模型进行相关研究的报道。②同一领域选择近期发表或在权威杂志上发表的文章。

1.3 排除标准 排除内容陈旧及重复研究。

1.4 数据的提取 计算机初检得到133篇文献, 阅读标题和摘要进行初筛, 排除陈旧及重复研究, 最终选择41篇文献进行综述。

1.5 质量评估 符合纳入标准的41篇文献中, 文献[1-10]是关于阿尔茨海默病常用动物模型及相关致病基因的报道, 文献[11-23]是有关阿尔茨海默病单转基因动物模型的报道, 文献[24-36]是有关阿尔茨海默病双转基因动物模型的报道, 文献[37-41]是有关阿尔茨海默病多重转基因动物模型的报道。

2 结果 Results

2.1 单转基因动物 通过重组DNA技术, 将某一种突

变的外源性基因片段整合到动物的基因组中, 从而复制某种疾病的症状和(或)病理变化, 这种动物称为单转基因动物, 是研究阿尔茨海默病病理机制和探索治疗方法的重要工具。

2.1.1 APP单转基因小鼠 人的淀粉样蛋白前体基因位于 21 号染色体, 是单跨膜糖蛋白, 其N-端较长, 位于细胞外; C-端尾部较短, 位于胞质部。人类表达 4 种淀粉样蛋白前体的重组异构体: 分别由 695, 714, 751 或 770 个氨基酸残基组成。神经系统中主要表达淀粉样蛋白前体 695, 而淀粉样蛋白前体 770 和淀粉样蛋白前体 751 既在神经元又在非神经元表达^[11]。3 种人类淀粉样蛋白前体被应用于转基因, 分别由 695, 751 和 770 个氨基酸残基组成。最常使用的淀粉样蛋白前体基因的突变根据它们被发现的地点命名为: Swedish(由 2 个相邻的突变组成: K670N&M671L), London (V717I) 和 Indiana (V717F)。人类淀粉样蛋白前体基因可以在不同的启动子: 血小板源性生长因子、Thy-1 或 Thy-112(神经元特异性)和 hamsterPrP(非神经元特异)的控制下, 使得人类淀粉样蛋白前体基因可以仅在或主要在中枢神经系统表达。

多项研究证实, 淀粉样蛋白前体基因突变可以通过不同途径促进 β -淀粉样蛋白产生, 使突变动物脑内出现与阿尔茨海默病患者类似的神经病理学改变^[12]。淀粉样蛋白前体转基因小鼠模型出现明显的学习记忆障碍, 并能模拟阿尔茨海默病脑内 β -淀粉样蛋白的沉积和老年斑形成。

PDAPP 转基因小鼠模型: PDAPP 小鼠是由 C57BL/6 鼠与 DBA/2F1 鼠交配产生, 其突变启动子为人类血小板衍生生长因子 β ^[13]。这类小鼠的脑内淀粉样蛋白前体含量显著增高, 达正常鼠的数倍以上; β -淀粉样蛋白水平在皮质和海马明显增加, 在 4-18 个月时可达正常鼠的 500 倍^[14]。

纯合子 PDAPP 小鼠的皮质和海马中产生的 β -淀粉样蛋白水平最高, β -淀粉样蛋白的沉积也发生在这些区域。在小鼠 3 个月时可以观察到明显的海马萎缩, 对高频刺激反应紊乱, 长时程增强效应损害。

杂合子 PDAPP 小鼠在 4-6 个月时没有明显病理学改变, 而到 6-9 个月时 β -淀粉样蛋白开始沉积在海马、胼胝体 and 大脑皮质。沉积随着鼠龄的增加而增加, 9 个月以后, β -淀粉样蛋白沉积的密度增加类似于阿尔茨海默病患者脑中的变化。18 个月时出现神经炎症性改变和神经胶质增生, 没有发现广泛神经元死亡。

Tg2576 转基因小鼠模型: 由淀粉样蛋白前体 695 异构物组成, 包纳 K670N/671L 瑞典型突变位点, 由 朊病毒蛋白(PrP)启动子保证高表达。它存在 2 个位

点突变: 670 位赖氨酸突变成天门冬酰胺和 671 位蛋氨酸突变成亮氨酸。将人类淀粉样蛋白前体 695 基因通过仓鼠朊病毒蛋白载体注射入 B6SJL 小鼠的胚胎干细胞, 在第 2 代(F2)中筛选出含淀粉样蛋白前体 695 基因的 B6SJL 雌性小鼠并将其与雄性 C57BL/6 小鼠交配, 得到 Tg2576 小鼠^[15]。

该小鼠 β -淀粉样蛋白量的增加最早出现在 2 个月时, 随着鼠龄的增加不断增加, 在四至五个月时可被明显检测到, 到 11-13 个月时 β -淀粉样蛋白 1-42/43 的量是 2-8 个月时小鼠的 14 倍。SP 出现在 9-12 个月时。随着 β -淀粉样蛋白量的增多, β -淀粉样蛋白沉积逐渐出现在额叶、颞叶、内嗅皮质、海马、海马回钩前部、海马回和小脑。部分小鼠还出现阿尔茨海默病患者典型的病理变化/马尔他十字(Maltese cross)。

Tg2576 小鼠行为学改变有学习和记忆损伤出现在 6 个月时、Y 迷宫及 MWM 检测结果示记忆缺失出现在 9-10 个月时。这些行为学改变伴随着海马 CA1 区及齿状回 β -淀粉样蛋白沉积, 长时程增强效应受损、小神经胶质细胞数量、区域上的反应性增生。在 Tg2576 小鼠中随着 β -淀粉样蛋白沉积的加剧神经生长因子减少。

β -淀粉样蛋白二聚体在脂质体的形成最早出现在 6 个月时, 在 24-28 个月时达青年小鼠的 500 倍。这种大量 β -淀粉样蛋白聚集与阿尔茨海默病患者脑中的病理改变相似。与细胞外 β -淀粉样蛋白纤维不溶性相反, 所有脂质体中的 β -淀粉样蛋白都是可溶的。最近的研究显示合成的和自然形成的 β -淀粉样蛋白低聚物能抑制海马长时程增强效应, 在体内脂质体形成的年龄依赖性可溶的 β -淀粉样蛋白二聚体出现的时间与小鼠记忆损害出现的时间相同, 证明 β -淀粉样蛋白低聚物导致小鼠记忆功能损害。在 Tg2576 小鼠脑中, β -淀粉样蛋白二聚体开始形成之后, 6-8 个月时会出现 ApoE 和磷酸化 tau 聚集, 相似的病理变化出现在阿尔茨海默病患者脑中^[16]。这些都证明脂质体是 β -淀粉样蛋白二聚体、ApoE、tau 三者相互作用的一个重要场所。有报道称丙戊茶碱可减轻 Tg2576 小鼠中 tau 蛋白的过度磷酸化。

APP23 转基因小鼠模型: 重组体采用人淀粉样蛋白前体 751 结构含 K670N/M671L 突变位点, 由 Thy1 启动子控制保证高表达^[17]。这些鼠的病理表现较为广泛, 包括了 PDAPP 鼠和 Tg2576 鼠的许多特征。

APP23 小鼠, 它是由转人类淀粉样蛋白前体 695 鼠和淀粉样蛋白前体 V717I 鼠交配得来^[18]。淀粉样蛋白前体 751 小鼠比正常小鼠脑内多 7 倍的淀粉样蛋白前体, 并且在 6 个月时已有 β -淀粉样蛋白沉积。 β -淀粉样蛋白沉积随着年龄的增长出现数量和体积的

增多, 最后到 24 个月时大量出现在皮质和海马, 同时出现炎症反应: 神经炎、突触损伤及tau过度磷酸化。

除此以外, 还有 J20 和 TgAPP(Sw, V717F)等淀粉样蛋白前体转基因小鼠模型, 此类转基因模型小鼠在许多方面模仿了阿尔茨海默病病理中的淀粉样改变, 只引起家族性阿尔茨海默病中很小一部分病例。

2.1.2 PS转基因小鼠 PS基因突变是大部分显性遗传性早发型家族性阿尔茨海默病的原因^[19]。PS基因有 2 种, 分别是定位于 14 号染色体的PS1 和 1 号染色体的PS2 基因。突变的PS基因表达产物可通过C末端蛋白水解酶的影响而作用于淀粉样蛋白前体的水解过程, 使 β -淀粉样蛋白增加。PS是高度保守的蛋白, 有 8 个跨膜区域。PS1 和PS2 在生理状态下被剪切成 2 个多肽, 与细胞凋亡有关^[20]。在有突变PS基因的成纤维细胞内容易产生较多的聚集性 β -淀粉样蛋白, 且能协助 β -淀粉样蛋白升高细胞内钙, 加重氧自由基产生和促进线粒体电位下降, 从而引发细胞凋亡, 导致阿尔茨海默病。

PS-21 突变小鼠: 将以血小板源性生长因子和人类PS-21 突变基因导入小鼠受精卵中, 在新生小鼠体内, 可见 β -淀粉样蛋白生成增多, 但并无 β -淀粉样蛋白沉积。此种模型仅适用于抑制 β -淀粉样蛋白产生方面的研究。

2.1.3 JNPL3(tau)转基因小鼠 具有代表性的tau为基础的转基因鼠是Lewis报道的JNPL3 小鼠模型^[21], 它采用突变型tauP30LI(FTDP-17), 由鼠阮病毒启动子控制。杂合子的JNPL3 鼠表达与内源性tau等量的水平, 而纯合子表达 2 倍的量^[22]。六至七个月时杂合子开始出现翻正反射延迟, 行动迟缓, 肌肉无力等病理表现。与淀粉样蛋白前体转基因鼠不同, 随着年龄增加, 脑和脊髓有不溶性的tau聚集, 经免疫印迹, 银染色和电子显微镜证实JNPL3 鼠可展示神经纤维缠结现象, 在神经纤维缠结区域也明显可见星型神经胶质增生现象^[23]。

2.2 双转基因小鼠 通过重组 DNA 技术将两种外源性突变基因同时转染动物, 这 2 种突变基因将整合入动物的基因组中, 所得到的动物称作双转基因动物。

2.2.1 APP/PS1 双转基因小鼠 APP/PS1 双转基因小鼠主要包括APP_{swE}/PS1_{dE9}、APP_{swE}/PS1_{M146L}、APP_{swE}/PS1_{L166P}、APP_{SL}/PS1_{M146L}双转基因小鼠等。双转基因小鼠与单淀粉样蛋白前体转基因小鼠相比, 无一例外地加快了淀粉样沉积的速度, 使形成老年斑的年龄显著降低。

APP_{swE}/PS1_{dE9}双转基因小鼠: 目前, APP_{swE}/PS1_{dE9}双转基因小鼠模型广泛用于阿尔茨海默病相关的研究^[24-25], 是国际公认的阿尔茨海默病转基因动物模

型^[26-27]。该模型PS1 基因E9 缺失, 不是灭活作用, 而是促使功能加强, 两至三个月皮质(运动皮质, 扣带区和感觉皮质)和海马发生胆碱能轴突肿胀, 呈胆碱乙酰基转移酶和胆碱酯酶阳性反应, 五至六个月出现在纹状体, 胆碱能异常轴突肿胀主要形成成簇的玫瑰花结(rosette)或葡萄样结构, 与 β -淀粉样蛋白-ir(immunoreactive)斑块紧紧相邻, 并在在这些结构中出现的 β -淀粉样蛋白在时间上一致, 且随着皮质、海马和纹状体的斑块负荷增加而增加。该模型相比Tg2576, PDAPP, TgAPP23 等, 老年斑形成较早, 属于早期斑块模型^[28]。斑块呈硫磺素-S染色阳性, 提示为致密性斑块^[29]。四至五个月时开始在杏仁体和海马出现一些嗜刚果红的斑块, 从 6 个月开始在大脑皮质、海马和杏仁体形成大量淀粉样斑块^[30]。淀粉样斑块负荷随年龄迅速增加至 12-15 个月。15 个月时, 斑块密度明显增加, 有显著的基因型效果, 无性别差异。

在杏仁体和海马可见GFAP-免疫阳性星形细胞。通过神经影像和组织切片, 海马和整个脑的体积无变化。未发现脑区单胺水平变化。前脑的胆碱能神经元和胆碱乙酰基转移酶数量不随年龄发生变化。中年转基因小鼠(10-16 个月)比年轻的(2-6 个月)转基因小鼠皮质和海马中胆碱乙酰基转移酶的活性明显下降(分别降低 15%和 30%)。纹状体胆碱乙酰基转移酶活性与年龄无关, 转基因小鼠与非转基因小鼠相比无差异。16 个月转基因小鼠胆碱乙酰基转移酶免疫染色或胆碱酯酶组化染色显示密度下降, 提示酶活动下调。从功能上说, 皮质和海马胆碱乙酰基转移酶活性丧失与痴呆的严重程度相关。在含有胆碱能基底核神经元的区域, 偶见 β -淀粉样蛋白-ir斑块和胆碱能异常轴突, 且主要见于年老的小鼠^[31]。未发现在阿尔茨海默病脑中见到的纹状体胆碱能神经元丢失。未发现基底核胆碱能神经元丢失。12-16 个月的转基因小鼠基底核的ChAT-ir神经元与同龄的非转基因小鼠比明显增大, 提示细胞骨架和(或)轴突运输缺陷。皮质和纹状体的胆碱能神经元未出现细胞大小的变化。16 个月时, 由基底核发出的胆碱能轴突曲张较对照组非转基因小鼠明显。在海马, β -淀粉样蛋白沉积对胆碱乙酰基转移酶纤维网络和酶的活性与年龄相关, 但不影响胆碱能内在的(intrinsic)或长距离投射的前脑神经元的存活。15 个月时, 在杏仁体和海马相比年龄相当的WT对照组有大量的星形细胞(astrocytosis), 在杏仁体尤其显著, 无性别差异。相比年龄和性别相当的WT对照组, 相同脑区的星形细胞总数大于 2 倍。也曾报道过 15 个月大时, 蓝斑的NA神经元显著变性^[32]。

APP_{swE}/PS1_{M146L}双转基因小鼠: 该模型可导致 β -淀粉

样蛋白 42/ β -淀粉样蛋白 40 比率升高, 在 6 个月出现淀粉样斑块。海马和额叶皮质细胞丢失不明显。行为学研究提示在 3 个月时 Y 迷宫表现受损并且发生在淀粉样沉积之前。早在三至四个月表现出受损的长时程增强, 五至六个月出现基础突触传递和空间参照记忆缺陷。3 个月时, 突触可塑性的损害开始出现, 七八个月表现出突触强度(strength)降低, 8 个月时出现选择性空间记忆损害。22 个月时, β -淀粉样蛋白负荷大量增加。

APP_{swe}/PS1_{L166P}双转基因小鼠:该模型携带 Swedish 突变的淀粉样蛋白前体和 PS1_{L166P} 在神经元特异性的 Thy1 启动子控制下同时表达。最早发生病变的年龄显著降低: 3 个月时见肿胀的球茎状异常轴突(bulbous dystrophic neuritis), 但和淀粉样斑块不相关。脑淀粉样变于 6-8 周在海马开始出现, 小胶质细胞的数量在 1-8 个月增加了 3 倍, 神经元丢失很少。 β -淀粉样蛋白 42 比 β -淀粉样蛋白 40 多几倍。绝大多数小鼠主要在脑实质生成致密的淀粉样沉积。8 个月时与年龄相当的 WT 对照组小鼠(大多数为同窝仔)发现神经发生(neurogenesis)减少且没有性别差异。

APP_{SL}/PS1_{M146L}双转基因小鼠:包含在 Thy-1 启动子控制下的携带 Swedish 和 London 突变的淀粉样蛋白前体 751 基因, 和在 HMG-CoA 还原酶启动子控制下的人 PS1_{M146L}。

该模型细胞内 β -淀粉样蛋白堆积在 2 个月可见, 3 个月在皮质、下托和海马产生细胞内和细胞外 β -淀粉样蛋白聚集。应用抗 β -淀粉样蛋白肽抗体显示细胞外沉积物, 细胞外 β -淀粉样蛋白聚集随年龄升高而增加, 5 个月龄时, 在新皮质和海马有很多 β -淀粉样蛋白沉积, 还有一些在丘脑, 在脑干未见。9 个月龄时, 在脑干出现 β -淀粉样蛋白沉积, 并且在新皮质, 海马和丘脑的密度不断增加。

APP_{SL}/PS1_{KI}双转基因小鼠:KI 突变位于 PS1 基因编码区密码子 M233T 和 L235P 及其周围内含子。其病变严重且发展迅速, 除了意料之中的细胞外 β -淀粉样蛋白迅速沉积, 在海马 CA1 区出现年龄依赖性的大量神经元丢失。10 个月大时无论雄鼠还是雌鼠在 CA1P2 亚区都有广泛的神经元丢失, 最早在 6 个月龄的雌鼠就可观察到。CA1P2 神经元丢失均匀延伸到锥体层并且与细胞外 β -淀粉样蛋白肽沉积位置邻近与否无关, 因此这和有些转基因模型观察到的神经元丢失局限在 β -淀粉样蛋白沉积附近有很大不同。随着年龄增长, 神经元丢失似乎扩展到更广泛的部位, 尤其是下托和皮质区。在老年小鼠可能检测到内嗅区皮质神经元丢失。神经元丢失的分布与细胞内 β -淀粉样蛋白免疫染色和细胞内硫磺素-S 阳性聚集非常一致, 但与细

胞外沉积无关。细胞内 β -淀粉样蛋白免疫染色和细胞内硫磺素-S 阳性早于神经元丢失。 β -淀粉样蛋白 42 是此模型产生的主要 β -淀粉样蛋白, 而且 β -淀粉样蛋白寡聚体含量非常丰富, 可能与 CA1P2 神经元丢失有关。

2.2.2 APP_{KM670/671NL}/APP_{V717F}双转基因小鼠(CRND8 转基因小鼠模型) TgCRND8 转基因小鼠模型,用 PrP 启动子启动高表达淀粉样蛋白前体 695 基因的双突变形式(KM670/671NL+V717F), 该模型在 3 月龄时, 新皮质中开始出现 β -淀粉样蛋白沉积, 以 β -淀粉样蛋白 42 增加明显, β -淀粉样蛋白 42/ β -淀粉样蛋白 40 比值升高, 有神经炎性斑产生, 且 3 个月即出现水迷宫行为测试异常, 但无 NFT 形成^[33]。

TGCRND8 小鼠这类小鼠和 PDAPP 小鼠相似, 也是由转人类淀粉样蛋白前体 695 鼠和淀粉样蛋白前体 V717F 鼠交配得来, 不同的是其启动子是叙利亚地鼠的蛋白酶传染性因子, 由 C3H/He 小鼠和 C57BL/6 小鼠杂交而来。TGCRND8 小鼠也表达 2 个突变人类家族性阿尔茨海默病 PS1(M146L 和 L286V) 基因。硫磺素 S 染色发现 β -淀粉样蛋白沉积出现在 3 个月时, 神经炎相关病理变化出现在 5 个月时。神经胶质细胞出现在斑块周围, 有活性的小胶质细胞与斑块并存。在 6 个月时每克脑组织有 3 200-4 600 pmol β -淀粉样蛋白 42, 远多于 β -淀粉样蛋白 40 的量。 β -淀粉样蛋白沉积加速, 最早见于 1 个月时。随着 β -淀粉样蛋白肽免疫的注射, SP 和行为学损害有所减轻。空间保留记忆损害出现在 11 周时; 听力惊愕出现在六至七周时, 且进行性加重^[34]。

该模型能较好的克服早期的致死性变化, 大约 50% 的 CRND8 鼠存活到 12 个月。这一致死性可能由与高 β -淀粉样蛋白水平相关联的不断增加的癫痫发作引起。

2.2.3 APP/apoE 双转基因小鼠 apoE4 为阿尔茨海默病的危险因素之一,由于 apoE 与 β -淀粉样蛋白沉积关系密切, 因此常在淀粉样蛋白前体转基因小鼠中同时表达 apoE 基因, 从而研究 apoE 对老年斑、神经纤维缠结形成的影响。

利用 APP_{swe} 转基因小鼠与 apoE 基因敲除小鼠产生了带 2, 1, 0 个正常鼠 apoE 基因拷贝的 APP_{swe} 小鼠。当小鼠 12 月龄时, 所有 APP_{swe}/apoE^{+/+} 小鼠皮质、海马及脑血管中均出现显著的 β -淀粉样蛋白沉积及神经炎性变性, 而 APP_{swe}/apoE^{-/-} 小鼠虽然出现 β -淀粉样蛋白沉积, 但仅局限于皮质和海马, 且无神经炎性变性; 当小鼠 15 月龄时, 表达 apoE4 的 APP_{swe} 小鼠的 β -淀粉样蛋白纤维状沉积是其他小鼠的 10 倍以上, APoE 在淀粉样蛋白前体 v7171 的淀粉样斑块的形成中起着重要的作用^[35]。

2.2.4 APP/ACT(A1 抗糜蛋白酶基因)双转基因小鼠 将 GFAP-ACT 转基因小鼠与血小板源性生长因子-hAPP/V717F 转基因小鼠杂交后获得的双转鼠, 经刚果红双光折射计算淀粉样斑的数目, 发现与单转 APP 鼠相比, 在早期 3 月龄双转鼠的海马中 β -淀粉样蛋白的水平明显增加。表明抗糜蛋白酶促进淀粉样斑沉积, 通过炎症及继发的上调星型细胞的抗糜蛋白酶表达, 为阿尔茨海默病病理进程提供一特异的机制。

2.2.6 TAPP 转基因小鼠模型 JNPL3 鼠和 Tg2576 杂交系的情况。其产生的双重转基因鼠命名为 TAPP 小鼠模型, 它能同时展示淀粉样斑块和神经纤维缠结现象, 文中揭示了 β -淀粉样蛋白与 tau 之间存在交互作用。TAPP 是同时展示阿尔茨海默病病理两大主要特征的第一个小鼠模型, 这一模型为研究同时针对老年斑神经纤维缠结及突触丢失的药物提供了可能。目前 TAPP 模型是最接近于阿尔茨海默病病理特征的模型^[36]。

2.3 多重转基因小鼠 阿尔茨海默病发病为多因素共同致病, 所以利用不同的转基因鼠杂交或多个基因同时转入等方法, 得到的多重转基因模型能更好的模拟临床阿尔茨海默病的发病过程和病理特征。

2.3.1 APP/PS1/tau 三重转基因小鼠 尽管 APP/tau 突变基因共转染已可基本再现阿尔茨海默病的神经病理特征, 但更多基因的多重转染则更有利于动物模型的完善和应用。

Oddo 等^[37-38]应用 APP_{Swe}、PS1_{M146V}、tau_{P301L3} 个突变基因系建立三重转基因阿尔茨海默病小鼠模型 (3xTg-AD), 更多的模仿了人阿尔茨海默病脑中区域性、特异的病理改变, 他们发现 β -淀粉样蛋白最初沉积在皮质, 年老时沉积于海马; 而 tau 的病变则与之相反, 且 β -淀粉样蛋白沉积早于神经纤维缠结的出现^[39-40]。这一模型将对临床前期干预非常有帮助。

2.3.2 Cdk5/P35/tau 三重转基因小鼠 有人设想将 tau 及其激酶共转染是否会有典型神经纤维缠结出现, Vander Haute 等以 thy-1 基因为启动子, 将人 cdk5 的 cDNA 与 P35cDNA 构建载体后建立双转 cdk5/p35 基因鼠; 以同样的启动子构建转人 tau40 转基因小鼠, 将上述 2 种转基因小鼠杂交后即获得三重转基因小鼠。

对 20 月龄三转基因鼠行银染免疫组化分析, 证明神经丝蛋白在皮质神经元树突棘中重新分布, 但无其他明显的阿尔茨海默病病理改变。这一模型未复制出阿尔茨海默病的典型病理特征, 但论证了阿尔茨海默病机制中的一个方面。

2.3.3 5/FAD 模型 5/FAD 模型, 即 APP/PS1 双转基因小鼠同时表达 5 种 FAD 突变

[APP_{K670NPM671L}(Swedish)+_{I716V}(Florida)+_{V717I}(London) 和 PS1_{M146L&L286V}]^[41]。此型表现出 β -淀粉样蛋白 42 非常快速的沉积。在 1.5 个月可见细胞内 β -淀粉样蛋白 42 聚集, 2 个月开始出现淀粉样沉积, 大约 4 个月出现记忆损害, 9 个月时在大脑皮质和下托出现大量的大锥体神经元丢失, 与淀粉样蛋白沉积出现的区域相同。

3 讨论 Discussion

建立动物模型的目的是在实验动物身上复制出人类疾病的模型, 用于研究人类疾病的病因、发病、病理变化以及疾病的预防和治疗。阿尔茨海默病动物模型应满足 3 个条件: 具有阿尔茨海默病的主要神经病理学特征-老年斑和神经纤维缠结, 出现脑神经元突触丢失、死亡和反应性胶质细胞增生等阿尔茨海默病的其他重要病理变化, 出现认知和记忆功能障碍。转基因动物模型种类复杂繁多, 制作方法不一。常用方法有以下几种: ①显微注射法。②胚胎干细胞法。③反转录病毒载体法。④精子载体技术。⑤体细胞核移植法。

转基因动物模型特有的遗传学优势, 是一种基于病因的模型, 使其成为研究阿尔茨海默病发病机理的理想模型。有助于了解阿尔茨海默病的发病机制, 为开展阿尔茨海默病的病因治疗提供了载体, 有助于进一步研究针对病因治疗的药物。

转基因动物模型是如今阿尔茨海默病动物模型的研究热点, 但相比阿尔茨海默病错综复杂的病理过程来说有一定的距离。最大的缺憾在于缺乏神经纤维缠结淀粉样蛋白级联假说所设想的淀粉样蛋白前体代谢改变和 tau 聚集之间的联系还未能再现。其次, 目前发现的与阿尔茨海默病有关的基因位点很有限, 发现新位点, 明确更多与阿尔茨海默病相关的基因, 将有利于研制新的阿尔茨海默病模型。除此以外, 转基因的数量和插入的位置难以控制, 蛋白表达的位置和时程主要依赖于启动子。遗传背景对病理有很大影响, 为了得到准确的结果, 必要时应使用近交系转基因小鼠, 因此容易引起近交衰退, 很难保证转基因动物的繁殖率和生存率。

虽然转基因动物模型在技术上仍有许多困难, 但阿尔茨海默病的多重转基因模型日趋完善, 由于阿尔茨海默病受遗传及环境共同影响, 因此在转基因模型的基础上, 再施加中枢胆碱能损害、自身免疫损伤等其他致病因素, 将产生更接近人类阿尔茨海默病病理及发病过程的模型, 从而将对阿尔茨海默病治疗及药物的开发起到推动作用。随着与阿尔茨海默病相关新的遗传因素地发现, 基因构建也将更加完善, 转基因动物模型也将更加接近阿尔茨海默病的全部特征。今后可以采用交互繁殖的策略来建立多重转基因模型,

也可以考虑基因的进一步复杂构建来尽可能表达与阿尔茨海默病相关的多个突变基因。

总之, 未来继续推出具备所有人阿尔茨海默病病理特征的理想转基因动物模型对于开发新的治疗药物, 准确地检验治疗方法和预测治疗效果是至关重要的。

作者贡献: 第一作者和通讯作者构思并设计综述, 分析并解析数据, 2 位作者共同起草, 经通讯作者审校, 第一作者对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 无涉及伦理冲突的内容。

学术术语: 单转基因动物-通过重组 DNA 技术, 将某一种突变的外源性基因片段整合到动物的基因组中, 从而复制某种疾病的症状和(或)病理变化, 这种动物称为单转基因动物, 是研究阿尔茨海默病的病理机制和探索治疗方法的重要工具。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Kuznetsova E, Schliebs R. β -Amyloid, Cholinergic Transmission, And Cerebrovascular System-A Developmental Study In A Mouse Model Of Alzheimer's Disease. *Curr Pharm Des.* 2013. [Epub ahead of print]
- [2] Nivsarkar M, Banerjee A. Establishing the probable mechanism of L-DOPA in Alzheimer's disease management. *Acta Pol Pharm.* 2009; 66(5):483-486.
- [3] Lagoja I, Pannecouque C, Griffioen G, et al. Substituted 2-aminothiazoles are exceptional inhibitors of neuronal degeneration in tau-driven models of Alzheimer's disease. *Eur J Pharm Sci.* 2011; 43(5):386-392.
- [4] Prakash A, Medhi B, Chopra K. Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) improves memory and neurobehavior in an amyloid- β induced experimental model of Alzheimer's disease. *Pharmacol Biochem Behav.* 2013; 110C:46-57.
- [5] Masoodi TA, Al Shammari SA, Al-Muammar MN, et al. Exploration of deleterious single nucleotide polymorphisms in late-onset Alzheimer disease susceptibility genes. *Gene.* 2013; 512(2):429-437.
- [6] Nizzari M, Thellung S, Corsaro A, et al. Neurodegeneration in Alzheimer disease: role of amyloid precursor protein and presenilin 1 intracellular signaling. *J Toxicol.* 2012; 2012: 187297.
- [7] Reiman EM, Chen K, Liu X, et al. Fibrillar amyloid-beta burden in cognitively normal people at 3 levels of genetic risk for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106(16):6820-6825.
- [8] Revett TJ, Baker GB, Jhamandas J, et al. Glutamate system, amyloid β peptides and tau protein: functional interrelationships and relevance to Alzheimer disease pathology. *J Psychiatry Neurosci.* 2012; 37(5):110190.
- [9] Viswanathan J, Haapasalo A, Böttcher C, et al. Alzheimer's disease-associated ubiquitin-1 regulates presenilin-1 accumulation and aggresome formation. *Traffic.* 2011; 12(3):330-348.
- [10] Depboylu C, Lohmüller F, Du Y, et al. Alpha2-macroglobulin, lipoprotein receptor-related protein and lipoprotein receptor-associated protein and the genetic risk for developing Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2006; 400(3):187-190.
- [11] Nicoll AJ, Panico S, Freir DB, et al. Amyloid- β nanotubes are associated with prion protein-dependent synaptotoxicity. *Nat Commun.* 2013; 4(1):2416.
- [12] Jonsson T, Atwal JK, Steinberg S, et al. A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature.* 2012; 488(7409):96-99.
- [13] Lee JE, Han PL. An update of animal models of Alzheimer disease with a reevaluation of plaque depositions. *Exp Neurobiol.* 2013; 22(2):84-95.
- [14] Beauquis J, Pavia P, Pomilio C, et al. Environmental enrichment prevents astroglial pathological changes in the hippocampus of APP transgenic mice, model of Alzheimer's disease. *Exp Neurol.* 2013 ;239:28-37.
- [15] IAbdalla S, Langer A, Fu X, et al. ACE Inhibition with Captopril Retards the Development of Signs of Neurodegeneration in an Animal Model of Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* 2013; 14(8):16917-16942.
- [16] Eketjäll S, Janson J, Jeppsson F, et al. AZ-4217: A High Potency BACE Inhibitor Displaying Acute Central Efficacy in Different In Vivo Models and Reduced Amyloid Deposition in Tg2576 Mice. *J Neurosci.* 2013; 33(24):10075-10084.
- [17] Nilsen LH, Melø TM, Saether O, et al. Altered neurochemical profile in the McGill-R-Thy1-APP rat model of Alzheimer's disease: a longitudinal in vivo 1 H MRS study. *J Neurochem.* 2012; 123(4):532-541.
- [18] Katsouri L, Vizcaychipi MP, McArthur S, et al. Prazosin, an $\alpha(1)$ -adrenoceptor antagonist, prevents memory deterioration in the APP23transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2013; 34(4):1105-1115.
- [19] Nizzari M, Thellung S, Corsaro A, et al. Neurodegeneration in Alzheimer disease: role of amyloid precursor protein and presenilin 1 intracellular signaling. *J Toxicol.* 2012; 2012: 187297.
- [20] Toda T, Noda Y, Ito G, et al. Presenilin-2 mutation causes early amyloid accumulation and memory impairment in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Biomed Biotechnol.* 2011; 2011:617974.
- [21] Lewis J, McGowan E, Rockwood J, et al. Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nat Genet.* 2000; 25:402-405.
- [22] Lewis J, Dickson DW, Lin WL, et al. Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science.* 2001; 293:1487-1491.
- [23] Bhaskar K, Hobbs GA, Yen SH, et al. Tyrosine phosphorylation of tau accompanies disease progression in transgenic mouse models of tauopathy. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2010; 36(6):462-477.

- [24] 赵晓燕,王丹丹,单焯,等. APP/PS1转基因鼠脑内小泛素化修饰物-1上调可能参与阿尔茨海默病老年斑形成和神经突起变性的调节[J].生理学报, 2013, 65(3): 253-262.
- [25] 邱昕, 陈国华, 汪弢, 等. 黄连解毒汤对APP/PS1双转基因阿尔茨海默病小鼠自由基代谢及海马区病理形态学影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2011,31(10): 1379-1382.
- [26] Yao ZG, Zhang L, Liang L, et al. The effect of PN-1, a Traditional Chinese Prescription, on the Learning and Memory in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013; 2013:518421.
- [27] Neumeister KL, Riepe MW. Bupropion and Citalopram in the APP23 Mouse Model of Alzheimer's Disease: A Study in a Dry-Land Maze. *Int J Alzheimers Dis.* 2012; 2012:673584.
- [28] Lee JE, Han PL. An update of animal models of Alzheimer disease with a reevaluation of plaque depositions. *Exp Neurobiol.* 2013; 22(2):84-95.
- [29] Rantamäki T, Kempainen S, Autio H, et al. The Impact of Bdnf Gene Deficiency to the Memory Impairment and Brain Pathology of APPswe/PS1dE9 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *PLoS One.* 2013; 8(7):e68722.
- [30] Li L, Zhang S, Zhang X, et al. Autophagy enhancer carbamazepine alleviates memory deficits and cerebral amyloid- β pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 2013; 10(4):433-441.
- [31] Saadipour K, Yang M, Lim Y, et al. Amyloid beta1-42 (A β 42) up-regulates the expression of sortilin via the p75NTR /RhoA signaling pathway. *J Neurochem.* 2013. [Epub ahead of print]
- [32] Kim TK, Lee JE, Park SK, et al. Analysis of differential plaque depositions in the brains of Tg2576 and Tg-APPswe/PS1dE9 transgenic mouse models of Alzheimer disease. *Exp Mol Med.* 2012;44:492-502.
- [33] McLean D, Cooke MJ, Albay R 3rd, et al. Positron emission tomography imaging of fibrillar parenchymal and vascular amyloid- β in TgCRND8 mice. *ACS Chem Neurosci.* 2013; 4(4):613-623.
- [34] Nilsson LN, Bales KR, DiCarlo G, et al. Alpha-1-antichymotrypsin promotes beta-sheet amyloid plaque deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2001;21(5):1444-1451.
- [35] Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A, et al. Impaired autophagy and APP processing in Alzheimer's disease: The potential role of Beclin 1 interactome. *Prog Neurobiol.* 2013; 106-107:33-54.
- [36] Sahara N, Vega IE, Ishizawa T, et al. Phosphorylated p38MAPK specific antibodies cross-react with sarkosyl-insoluble hyperphosphorylated tau proteins. *J Neurochem.* 2004;90(4):829-838.
- [37] Olabarria M, Noristani HN, Verkhratsky A, et al. Concomitant astroglial atrophy and astrogliosis in a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease. *Glia.* 2010;58:831-838.
- [38] Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, et al. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron.* 2003; 39:409-421.
- [39] Overk CR, Perez SE, Ma C, et al. Sex steroid levels and AD-like pathology in 3xTgAD mice. *J Neuroendocrinol.* 2013; 25(2):131-144.
- [40] Marques SC, Lemos R, Ferreira E, et al. Epigenetic regulation of BACE1 in Alzheimer's disease patients and in transgenic mice. *Neuroscience.* 2012; 220:256-266.
- [41] Peters OM, Shelkownikova T, Tarasova T, et al. Chronic Administration of Dimebon does not Ameliorate Amyloid- β Pathology in 5xFAD Transgenic Mice. *J Alzheimers Dis.* 2013;36(3):589-596.