

李明学,王文广,李娜,等. 树鼩 *PSEN1* 全长编码序列的克隆及分子特征分析[J]. 中国实验动物学报, 2019,27(4):456 - 465.  
Li MX,Wang WG,Li N, et al. Cloning and characterization of presenilin 1 in the Chinese tree shrew [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(4):456 - 465.  
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.04.006

# 树鼩 *PSEN1* 全长编码序列的克隆及分子特征分析

李明学<sup>1</sup>,王文广<sup>1</sup>,李娜<sup>1</sup>,匡德宣<sup>1</sup>,仝品芬<sup>1</sup>,黄鑫<sup>1,2</sup>,黎晓慧<sup>1</sup>,孙晓梅<sup>1\*</sup>,  
陆彩霞<sup>1\*</sup>

(1. 中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心,昆明 650118;  
2. 昆明医科大学,昆明 650500)

**【摘要】** 目的 获取树鼩早老素蛋白-1(*PSEN1*)的全长编码序列并进行分子特征分析。方法 以树鼩脑组织总RNA为材料,通过RT-PCR、RACE-PCR扩增和序列拼接获得*PSEN1*基因全长编码序列,进而通过DNAMAN、MEGA等生物信息学软件对其序列和分子特征进行分析。qRT-PCR和Western Blot进一步分析*PSEN1*在树鼩各个组织的表达模式。结果 克隆鉴定了树鼩*PSEN1*基因,其cDNA的开放阅读框全长1128 bp,编码375个氨基酸。通过系统发育谱系树、氨基酸序列对比分析,发现树鼩*PSEN1*与小鼠、大鼠等相比更接近人类和非人灵长类动物。qRT-PCR和Western Blot的结果表明,树鼩*PSEN1*在脑组织的表达量明显高于其他脏器组织。结论 通过克隆树鼩*PSEN1*基因序列并进行分析,为今后进一步深入研究该基因功能和建立相关疾病动物模型提供理论基础。

**【关键词】** 树鼩;*PSEN1*;分子克隆;系统发育分析

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019)04-0456-010

## Cloning and characterization of presenilin 1 in the Chinese tree shrew

LI Mingxue<sup>1</sup>, WANG Wenguang<sup>1</sup>, LI Na<sup>1</sup>, KUANG Dexuan<sup>1</sup>, TONG Pinfen<sup>1</sup>, HUANG Xin<sup>1,2</sup>, LI Xiaohui<sup>1</sup>,  
SUN Xiaomei<sup>1\*</sup>, LU Caixia<sup>1\*</sup>

(1. Tree Shrew Germplasm Resource Center, Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) & Peking Union Medical College(PUMC), Kunming 650118, China. 2. Kunming Medical University, Kunming 650500)  
Corresponding author: LU Caixia. E-mail: lcx@imbcams.com.cn; SUN Xiaomei. E-mail: sxm@imbcams.com.cn

**【Abstract】** **Objective** To get the full-length presenilin-1 (*PSEN1*) cDNA encoding sequence and analyze its molecular characteristics. **Methods** Full-length *PSEN1* cDNA was cloned from total RNA from brain tissue of tree shrew by RT-PCR and RACE-PCR. The molecular characteristics were compared with *PSEN1* in other mammals and evaluated using biology softwares such as DNAMAN, MEGA and others. Quantitative reverse transcription PCR and western blot assays were used to examine the mRNA and protein expression pattern of *PSEN1* in various tissues of tree shrew. **Results** The open reading frame sequence of *PSEN1* was 1128 bp and encoded 375 amino acids. We constructed a phylogenetic family tree and compared their *PSEN1* amino acid sequences. Tree shrew *PSEN1* was closer to humans and non-human primates than mouse and rat. The expression of *PSEN1* mRNA and protein was obviously higher in the brain than that of other organ tissues. **Conclusions** We successfully cloned the *PSEN1* gene in tree shrew and provided comparative analysis

**【基金项目】** 国家自然科学基金(31601907);云南省科技人才和平台计划项目(2017HC019、2018HB071);云南省重大科技专项(2017ZF007)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(31601907);Yunnan Science and Technology Talent and Platform Program(2017HC019, 2018HB071);Yunnan Province Major Science and Technology Project(2017ZF007).

**【作者简介】**李明学(1995—),男,在读硕士研究生,研究方向:实验动物学。Email:18687520819@163.com

**【通信作者】**陆彩霞(1979—),女,博士,研究生导师。Email:lcx@imbcams.com.cn;孙晓梅(1963—),女,主任技师,研究生导师。Email:sxm@imbcams.com.cn。

\* 共同通信作者

with other species. These findings provide a theoretical basis for further study on the function of this gene and the establishment of animal models of Alzheimer's disease (AD).

**【Keywords】** tree shrew; *PSEN1*; cloning; phylogenetic analysis

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

早老素-1 (presenilin 1, *PSEN1*) 是一种早老素蛋白,在人类中由位于染色体 14q24.2 的 *PSEN1* 基因编码,属于进化保守基因家族成员<sup>[1-2]</sup>。随着研究的不断深入,人们发现 *PSEN1* 是构成  $\gamma$ -分泌酶中四种核心蛋白之一<sup>[3]</sup>, $\gamma$ -分泌酶与  $\beta$ -分泌酶二者共同作用连续分解淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 产生  $\beta$ -淀粉样蛋白 ( $A\beta$ )<sup>[4-5]</sup>。 $\beta$ -淀粉样蛋白 ( $A\beta$ ) 累积是阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 一个重要病理特征<sup>[6-7]</sup>。相关的研究结果已明确表明 *PSEN1*、*PSEN2* 和 *APP* 是 AD 的致病基因<sup>[1]</sup>。*PSEN1* 作为构成  $\gamma$ -分泌酶的核心蛋白之一不仅在 AD 发病中起重要作用,而且在信号通路中亦起着关键作用。据文献<sup>[8]</sup>报道 *PSEN1* 蛋白可以影响 Wnt 信号通路,能与  $\beta$ -连环蛋白结合形成复合物,使其不被降解。而在 Notch 信号通路中,由于 *PSEN1* 在蛋白水解过程中起重要作用,从而影响 Notch 受体的成熟和活化<sup>[9]</sup>。

树鼩 (*Tupaia belangeri chinensis*) 是一种新型的实验动物,其生理、生化、解剖结构以及基因组等生物学特性比啮齿类更接近于非人灵长类,已被广泛应用于生物医学研究中。Yamashita 等<sup>[10]</sup>在正常年老的树鼩大脑中检测到  $A\beta$  累积这一重要的病理特征。Fan 等<sup>[6]</sup>分析树鼩脑组织中与 AD 相关 131 个基因,并与人、猕猴和小鼠进行同源性比对,发现树鼩与人类 AD 基因的序列同源性高于小鼠,而且树鼩脑组织中  $A\beta$  累积与 NFTs 的表达模式与人类脑组织相似,具有类似的年龄依赖效应。这些研究提示树鼩可以作为一个潜在的 AD 动物模型。

本研究以确定树鼩 *PSEN1* 完整编码序列为目的,对其进行分子特征和组织表达量分析,为今后制备树鼩 *PSEN1* 单克隆抗体、研究其在树鼩 AD 模型中  $A\beta$  累积机理及癌症研究中奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

采用本实验室繁育的普通级中缅树鼩 3 只,体重 160~200 g,2~3 岁,由中国医学科学院医学生物

学研究所树鼩种质资源中心提供【SCXK(滇)K2018-0002】。实验操作在本中心实验设施内进行【SYXK(滇)K2018-0002】,并遵循实验动物使用的 3R 和福利伦理原则。

采用过量戊巴比妥钠给予树鼩安乐死后,迅速解剖树鼩,并取心脏、肝、脾、肺、肾、胰、脑和肌肉等组织,立即放入  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱,冷冻储存。

#### 1.1.2 试剂与仪器

柱式 TRIzol 总 RNA 提取试剂盒 (B511321, 生工, 中国); M-MuLV First Strand cDNA Synthesis Kit M-MuLV 试剂盒 (B532435, 生工, 中国); Ex Taq<sup>®</sup> Hot Start Version 试剂盒 (RR006 A, TaKaRa, 日本); One Step TB Green<sup>™</sup> PrimeScript<sup>™</sup> PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (RR096 A, TaKaRa, 日本); 柱式胶回收试剂盒 (B518131, 生工, 中国); PMSF (ST506, 碧云天, 中国); 蛋白裂解液 (P0013, 碧云天, 中国); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (增强型) (P0010, 碧云天, 中国); 丙烯酰胺快速电泳预混液 (1610183, Bio-Rad, 美国); 0.2  $\mu\text{m}$  PVDF 膜 (162-0177, Bio-Rad, 美国); *PSEN1* (GTX101028, GeneTex, 美国);  $\beta$ -actin (8H10D10, Abgent, 美国); TBST (T1081-500, 索莱宝, 美国); Goat Anti-Rabbit IgG (S0001, Affinity, 美国); Goat Anti-Mouse IgG (S0001, Affinity, 美国); Immobilon Western Chemilum HRP Substrate (WBKLS0100, Merck, 美国); 超速离心机 (L8-80 M, Hermle, 德国); 梯度 PCR 仪 (TP600, TaKaRa, 日本); 实时荧光定量 RCR (CFX-96, Bio-Rad, 美国); 凝胶成像系统 (GelDoc 2000, Bio-Rad, 美国)

### 1.2 方法

#### 1.2.1 树鼩 *PSEN1* cDNA 的分子克隆

##### (1) *PSEN1* 引物设计

根据 Genbank 已经注册登记的人 *PSEN1* (NM 000021.3)、小鼠 *PSEN1* (NM 001362271.1) 和黑猩猩 *PSEN1* (NM 001132655.1) 的保守序列,设计表 1 中的 4 组引物,该 4 组引物分别覆盖了树鼩 *PSEN1* mRNA 的整个编码区(表 1)。

表 1 树鼩 *PSEN1* 和内参 *GAPDH* 的引物设计Table 1 Primer design of the tree shrew *PSEN1* and *GAPDH*

名称 Primers	序列(5' to 3') Sequence(5' to 3')	组别 Groups
5' adaptor	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTGCCCCCCCCCCCCC	接头引物
3' adaptor	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTGTTTTTTTTTTTTTTTTTT	Adaptor primer
5. 3' outer	GCTGTCAACGATACGCTACGTAAC	外围引物 Outer primer
5. 3' inner	GCTACGTAACGGCATGACAGTG	内围引物 Inner primer
<i>PSEN1</i> -F <i>PSEN1</i> -R	GCCAAACATGTGATCATGCTTT ACTGGCTGTTGCTGAGGCTT	中间序列扩增引物 Intermediate sequence amplification primer
<i>PSEN1</i> -F1 <i>PSEN1</i> -F2	AGATGCTGTTGCAGAGAATGATGACGGT GTGGGAAGCCCAGAGGGACAGTCAT	3' RACE 特异性引物 3' RACE specific primer
<i>PSEN1</i> -R1 <i>PSEN1</i> -R2 <i>PSEN1</i> -RT1 <i>PSEN1</i> -RT2	TTTATACAGAACCACCAGGAGGATGGTCAT GACAATGACACTTATCATGATGGCAGCA AAACAGCCACTAAATCATATACT TTGTTGAGGAATAAATGAGGGCT	5' RACE 特异性引物 5' RACE specific primer
<i>PSEN1</i> -F3 <i>PSEN1</i> -R3 <i>GAPDH</i> - F <i>GAPDH</i> - R	AGAGTGGGAAGCCCAGAGGG CACTGGCTGTTGCTGAGGCT CTTCAACTCTGGCAAGGT AAGATGGTGATGGACTTCC	qRT-PCR 特异性引物 qRT-PCR specific primer

## (2) RNA 与 cDNA 制备

取脑组织放入 1.5 mL 离心管,采用柱式 Trizol 总 RNA 提取试剂盒提取组织总 RNA,并采用 3' adaptor 引物和 M-MuLV First Strand cDNA Synthesis Kit M-MuLV 试剂盒一步法逆转录成 cDNA,并去除基因组 DNA 污染。

## (3) 普通 PCR

以 3' adaptor 为反转录引物的 cDNA 为模版,采用表 1 中 *PSEN1*-F 和 *PSEN1*-R 中间序列扩增引物和 TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version 试剂盒进行普通 PCR,进行基因调取。循环参数:95℃ 3min;94℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 1 min,33 个循环;72℃ 7 min。PCR 产物电泳后回收测序。

## (4) 3' RACE 巢式 PCR

以 3' adaptor 为反转录引物的 cDNA 为模版,采用 3' RACE 特异性引物和接头引物进行巢式 PCR。

采用 *PSEN1*-F1 和 5. 3' outer 引物进行第一轮 PCR,循环参数:95℃ 3 min;94℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 1 min,33 个循环;72℃ 7 min。以第一轮 PCR 产物为模版,采用 *PSEN1*-F2 和 5. 3' inner 引物进行第二轮 PCR,循环参数:95℃ 3 min;94℃ 30 s,58℃ 58 s,72℃ 1 min,33 个循环;72℃ 7 min。PCR 产物电泳后回收测序。

## (5) 5' RACE 巢式 PCR

以特异性引物 *PSEN1*-RT1、*PSEN1*-RT2 进行反转录,得到 cDNA,经 RNase H 和 TdT 处理后,采用 5' RACE 特异性引物和接头引物进行巢式 PCR。以 5' adaptor 和 *PSEN1*-R1 为引物进行第一轮 PCR,循环参数:95℃ 3 min;94℃ 30 s,68℃ 30 s,72℃ 1 min,33 个循环;72℃ 7 min。以第一轮 PCR 产物为模版,采用 5. 3' outer 和 *PSEN1*-R2 引物进行第二轮 PCR,循环参数:95℃ 3 min;94℃ 30 s,68℃ 68 s,72℃ 1 min,33 个循环;72℃ 7 min,PCR 产物电泳后回收测序。

## (6) 测序

PCR 产物交由公司(生工生物工程股份有限公司)(上海)测序。将 PCR 纯化产物插入 pMD-18T 载体后,转化大肠杆菌感受态细胞,提取质粒进行双酶切鉴定,最终进行双向测序。进行序列拼接得到全长编码序列,拼接时要求序列间碱基重合大于 40 bp,一致性大于 90%。

### 1. 2. 2 分子特征分析

本文用于参考的核酸及氨基酸序列均来源于 GenBank,以 NCBI、DNAMAN 5. 0 和 MEGA 6. 0 分别进行核酸序列、氨基酸序列、物种间亲缘关系分析。

### 1. 2. 3 *PSEN1* 的表达模式分析

### (1) RNA 相对表达定量

从树鼩的 13 个组织(其中脑组织分别取材顶叶、额叶、颞叶、枕叶、海马体和小脑)中提取总 RNA。在 MyIQ2 双色实时 PCR 检测系统上,使用 One Step TB Green™ PrimeScript™ PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time) 和表 1 中的 *PSEN1* 特异性引物 (*PSEN1-F3* 和 *PSEN1-R3*) 与内参 *GAPDH* 特异性引物 (*GAPDH-F* 和 *GAPDH-R*) 进行 qRT-PCR。

### (2) Western Blot

对收集的 13 个组织提取蛋白,超声波破碎仪破碎组织,并用含 PMSF 的裂解液裂解细胞。蛋白浓度测定按照碧云天(增强型)BCA 试剂盒说明书操作进行。采用 Western Blot 标准方法,25 mg 总蛋白的上样量进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。采用 0.2 μm 的 PVDF 膜进行转膜,分别用抗 *PSEN1* 和  $\beta$ -actin 抗体(稀释浓度 1:1000)4℃ 过夜孵育, TBST 清洗 3 次,每次 10 min。摇床常温孵育 goat anti-rabbit IgG 与 goat anti-mouse IgG 二抗(HRP 标记,稀释浓度 1:5000)60 min, TBST 清洗 3 次,每次 10 min。最后采用 ECL 底物化学发光法进行显色, Bio-Rad 凝胶成像系统进行成像。使用 Image J 软件对 *PSEN1* 蛋白条带测定灰度值。

## 2 结果

### 2.1 树鼩 *PSEN1* 全长编码序列扩增

以树鼩脑组织总 RNA 为材料,反转录后进行 PCR 扩增测序。将中间序列及 5' 和 3' RACE 实验得到的序列进行拼接,得到 1680 bp 的核酸片段。将树鼩 *PSEN1* PCR 产物经 T/A 克隆并双向测序,得到树鼩 *PSEN1* 基因全长编码序列(GenBank 登录号:MK135065),开放阅读框长度为 1128 bp,编码 375 个氨基酸(图 1)。

### 2.2 树鼩 *PSEN1* 系统发育树构建及氨基酸序列比对分析

利用 MEGA 6.0 软件对树鼩与人(NM 000021.4、NM 007318.2)、黑猩猩(NM 001132655.1)、猕猴(NM 001266480.1)、小鼠(NM 001362271.1)、大鼠(NM 019163.3)等 13 个物种的 *PSEN1* 基因进行亲缘关系分析并构建进化树,结果发现,如图 2 所示,可观察到树鼩与人、黑猩猩及恒河猴的遗传距离较近,而与大鼠、小鼠距离较远,说明树鼩 *PSEN1* 基因在进化关系上更接近于人、黑猩猩和猕猴。

利用 Protein BLAST 及 Clustal W 2.0 对树鼩与人(NM 000021.4、NM 007318.2)、黑猩猩(NM 001132655.1)、猕猴(NM 001266480.1)、小鼠(NM 001362271.1)及大鼠(NM 019163.3)等哺乳动物的 *PSEN1* 氨基酸序列进行比较分析,同样发现树鼩 *PSEN1* 氨基酸序列与人、黑猩猩及猕猴同源性较高(分别为 97.6%、97.07%及 96.58%),而与小鼠、大鼠的同源性较低(分别为 95.47%及 94.95%),比对结果如图 3 所示。

### 2.3 树鼩 *PSEN1* 基因在各组织的表达分析

为进一步研究树鼩 *PSEN1* 的表达模式,我们采用相对 qRT-PCR 法测定 *PSEN1* 在树鼩不同组织中 mRNA 表达水平。如图 4A 所示,*PSEN1* 在脑组织表达较高,尤其在顶叶和额叶中,在其他脏器组织中的表达水平较低,脾脏和肌肉组织 *PSEN1* 表达水平中等,而胰腺组织 *PSEN1* 表达水平最低。我们进一步检索了人、小鼠和大鼠 *PSEN1* 表达信息(www.biogps.org),并与树鼩 *PSEN1* 在各个组织中的表达量进行对比,绘制了聚类热图,结果发现 *PSEN1* 在树鼩额叶表达最高,在大鼠、小鼠的海马表达最高,在人的枕叶表达最高,*PSEN1* 在外周组织的表达量均较低(图 4B)。

### 2.4 树鼩 *PSEN1* 蛋白的表达模式分析

为了评估 *PSEN1* 蛋白的表达,我们使用人类的抗 *PSEN1* 抗体对树鼩的 13 个组织进行 Western Blot 检测 *PSEN1* 的表达水平。在所有检测组织中除了心脏和肌肉,其他均表达了 *PSEN1* 蛋白(图 5A)。为了进一步确认树鼩 13 个组织 *PSEN1* 蛋白的表达量,使用 Image J 软件对 *PSEN1* 蛋白条带测定灰度值。通过计算 *PSEN1* 蛋白灰度值和  $\beta$ -Actin 蛋白灰度值的比值(图 5B),结果表明 *PSEN1* 在脑组织高表达,其中表达最高的部位为小脑。外周组织表达较低,其中在肝表达量最低。

## 3 讨论

在本研究中,我们对树鼩 *PSEN1* 基因克隆并测序,得到了全长序列。以树鼩和其他 13 类物种的 *PSEN1* 序列,采用邻接法、最大似然法和最小简约法三种构建法进行系统发育分析,发现三种系统发育树的结点、进化分支和分支长度都极为相似,说明构建 *PSEN1* 基因的系统发育树是准确的。以邻接法构建的系统发育树分析结果表明,树鼩 *PSEN1* 比小鼠、大鼠更接近人类和非人灵长类动物(图 2)。

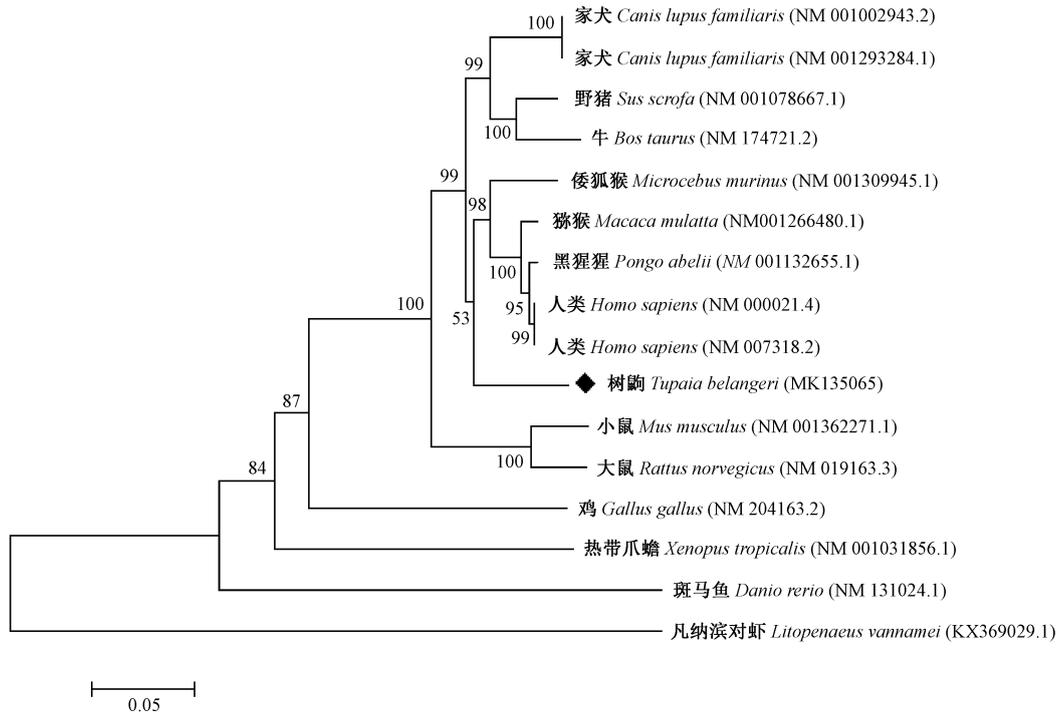
ATG GTG GTG GTT GTG GCT ACC ATC AAA TCG GTC AGC TTT TAT ACC CGG AAG GAT GGG CAG  
 M V V V V A T I K S V S F Y T R K D G Q  
 CTA ATC TAT ACT CCA TTC ACA GAA GAC ACC GAG ACT GTG GGC CAG AGA GCC CTG AAC TCA  
 L I Y T P F T E D T E T V G Q R A L N S  
 ATT CTG AAT GCT GCC ATC ATG ATA AGT GTC ATT GTC GTC ATG ACC ATC CTC CTG GTG GTT  
 I L N A A I M I S V I V V M T I L L V V  
 CTG TAT AAA TAC AGG TGC TAT AAG GTC ATC CAT GCC TGG CTT ATT ATC TCA TCT CTA TTG  
 L Y K Y R C Y K V I H A W L I I S S L L  
 TTG CTG TTC TTT TTT TCA TTC ATT TAC TTG GGG GAA GTA TTT AAA ACC TAT AAT GTT GCT  
 L L F F F S F I Y L G E V F K T Y N V A  
 GTG GAC TAC ATT ACT GTC GCA CTG CTG ATC TGG AAT TTT GGG GTA GTG GGG ATG ATT TCC  
 V D Y I T V A L L I W N F G V V G M I S  
 ATT CAC TGG AAA GGC CCC CTG CGA CTC CAG CAG GCG TAT CTC ATA ATG ATC AGT GCC CTC  
 I H W K G P L R L Q Q A Y L I M I S A L  
 ATG GCC TTG GTG TTT ATC AAG TAC CTC CCT GAG TGG ACG GCA TGG CTC ATC TTG GCT GTG  
 M A L V F I K Y L P E W T A W L I L A V  
 ATT TCA GTA TAT GAT TTA GTG GCT GTT TTG TGT CCA AAA GGT CCA CTT CGT ATG TTG GTT  
 I S V Y D L V A V L C P K G P L R M L V  
 GAA ACA GCA CAG GAG AGA AAT GAA ACT CTC TTT CCA GCC CTC ATT TAT TCC TCA ACA ATG  
 E T A Q E R N E T L F P A L I Y S S T M  
 GTG TGG TTG GTG AAT ATG GCA GAA GGA GAC CCA GAA GCC CAA AGA AGA GTA TCC AAA AGC  
 V W L V N M A E G D P E A Q R R V S K S  
 TCC AAG TAT AAT ACA CAA AGC ACA GAA AGG GAG CCA CAA GAT GCT GTT GCA GAG AAT GAT  
 S K Y N T O S T E R E P O D A V A E N D  
 GAC GGT GGC TTC AGT GAA GAG TGG GAA GCC CAG AGG GAC AGT CAT CTA GGG CCC CAT CGC  
 D G G F S E E W E A Q R D S H L G P H R  
 TCT ACA GCT GAG TCA CGA GCT GCT GTC CAG GAA CTT TCC AGC AGC ATC CTA GCC AGT GAA  
 S T A E S R A A V Q E L S S S I L A S E  
 GAT CCA GAG GAA AGG GGA GTA AAA CTT GGC TTG GGA GAT TTC ATC TTC TAC AGT GTT CTA  
 D P E E R G V K L G L G D F I F Y S V L  
 GTT GGA AAA GCC TCA GCA ACA GCC AGT GGA GAC TGG AAC ACT ACC ATC GCC TGT TTC GTA  
 V G K A S A T A S G D W N T T I A C F V  
 GCC ATA TTA ATT GGT TTG TGC CTT ACA CTG TTA CTC CTC GCT ATT TTC AAG AAA GCG TTG  
 A I L I G L C L T L L L L A I F K K A L  
 CCG GCA CTT CCC ATC TCC ATC ACC TTT GGG CTC GTT TTC TAC TTT GCC ACA GAT TAT CTT  
 P A L P I S I T F G L V F Y F A T D Y L  
 GTG CAG CCC TTT ATG GAC CAG TTA GCG TTT CAT CAG TTT TAT ATC TAG  
 V Q P F M D Q L A F H Q F Y I \*

图 1 树鼩 *PSEN1* 核苷酸序列及对应氨基酸

Figure 1 Nucleotide sequences and corresponding amino acids of the tree shrew *PSEN1*

将树鼩 *PSEN1* 与人类、非人灵长类及大小鼠等 5 类物种进行氨基酸序列比对分析,发现树鼩 *PSEN1* 氨基酸序列与人类的同源性接近 97.6%(图 3)。

我们采用 qRT-PCR 技术对树鼩 13 个组织中 *PSEN1* 基因进行相对定量分析,发现树鼩 *PSEN1* 在脑组织的表达量明显高于外周组织。将树鼩



注:自展值:1000次。方法:邻接法。

图2 树鼩 *PSEN1* 系统发育树分析

Note. Bootstrap: 1000 replicates. Method: Neighbor-joining method.

Figure 2 Phylogenetic tree of the tree shrew *PSEN1*

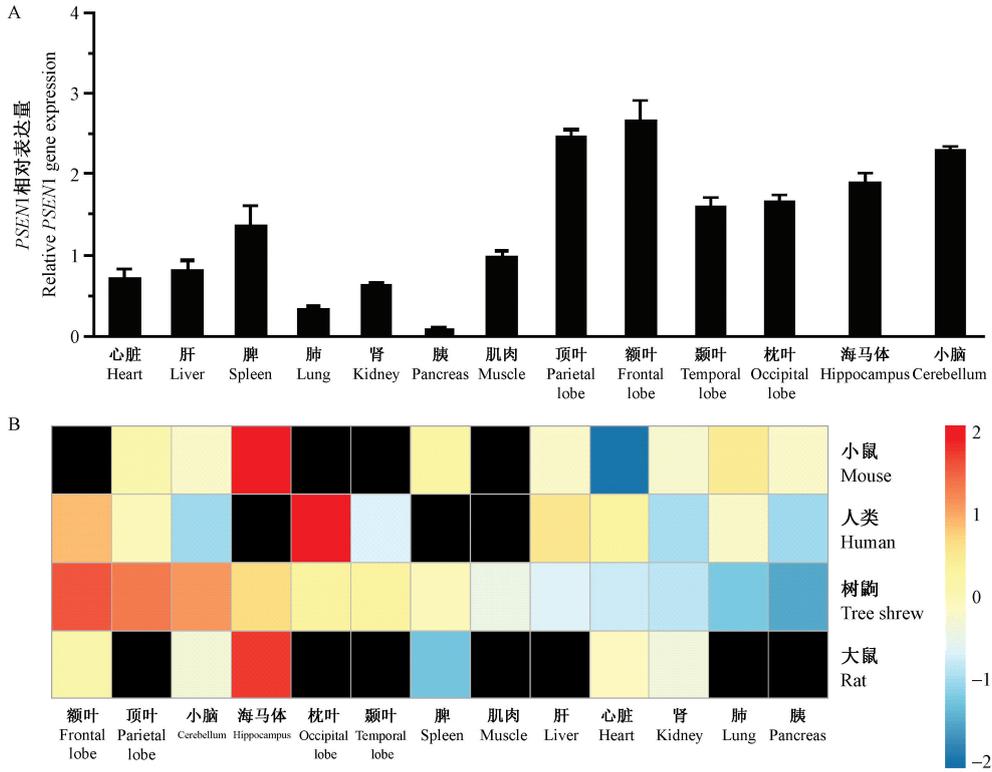
*PSEN1* 表达量与在 BioGPS 上获得的 *PSEN1* 在人类、小鼠和大鼠部分组织表达量绘制聚类热图进行分析,发现 *PSEN1* 在树鼩额叶表达最高,在大小鼠的海马表达最高,在人的枕叶表达最高,而在外周组织的表达量均较低。同时从图 4B 中也反映出,树鼩 *PSEN1* 的表达水平比小鼠、大鼠的表达较高,这更有利于对 *PSEN1* 的功能研究。树鼩 *PSEN1* 的氨基酸序列与人类的同源性高达 97.6%,因此利用人 *PSEN1* 抗体来鉴定树鼩 *PSEN1* 蛋白是可行的。在对树鼩 13 个组织的 *PSEN1* 蛋白的表达进行 Western Blot 分析时发现树鼩小脑组织的 *PSEN1* 表达要远高于其他组织(图 5B)。通过上述对 *PSEN1* 基因和蛋白的表达分析,两者之间的表达结果存在一定的差距,推测 *PSEN1* 在大脑的表达有自分泌和旁分泌模式<sup>[11]</sup>,也说明树鼩 *PSEN1* 具有较为复杂的转录水平调控模式,因此树鼩可能是开展 *PSEN1* 基因表达机制研究的良好动物模型。

Western Blot 分析结果显示,*PSEN1* 在树鼩大脑中的颞叶、海马体与小脑中表达水平较高。研究显示:颞叶负责处理听觉信息,并与记忆和情感有关<sup>[12]</sup>;海马体主要负责记忆存储、信息处理和定向等功能<sup>[13]</sup>;小脑不仅负责运动功能还负责处理与知

觉、语言及认知等功能外的非运动功能<sup>[14]</sup>。此前,大量早期研究表明,阿尔茨海默病(AD)患者或 AD 模型鼠的大脑皮层颞叶和海马体内有大量  $A\beta$  沉积<sup>[15]</sup>。但后续随着临床研究的不断发现,AD 病人小脑内会出现与大脑皮层和海马体相似的形态变化,并且小脑后叶的萎缩伴随着的是更加严重的认知行为的损害<sup>[14]</sup>。*PSEN1* 作为  $\gamma$ -分泌酶的核心部分,与  $\beta$ -分泌酶共同作用,将淀粉样前体蛋白(APP)水解产生与 AD 直接相关的  $A\beta_{40}$  和  $A\beta_{42}$ <sup>[3-4,16]</sup>。*PSEN1* 基因突变后并不损害  $\gamma$ -分泌酶的酶切功能,仅 *PSEN1* 构像发生异构变化<sup>[17-18]</sup>,使  $\gamma$ -分泌酶改变酶切位点,导致  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$  比值增大。据此我们推测,脑组织中 *PSEN1* 高表达的三个区域(颞叶、海马体和小脑)可能会出现大量淀粉样斑块累积,进而影响其功能,从而能引起个体产生符合 AD 部分临床表现(如记忆障碍、失语、认知功能减退、视空间定向和执行功能障碍等)<sup>[12,19]</sup>。Fan 等<sup>[6]</sup>也证实,老年树鼩与人类因  $A\beta$  累积而受累部位是一致的,主要是海马体与大脑皮质组织。这些证据都有力的表明树鼩可以作为一个潜在的 AD 研究模型。

近年来的研究表明,*PSEN1* 除了在 AD 中的作



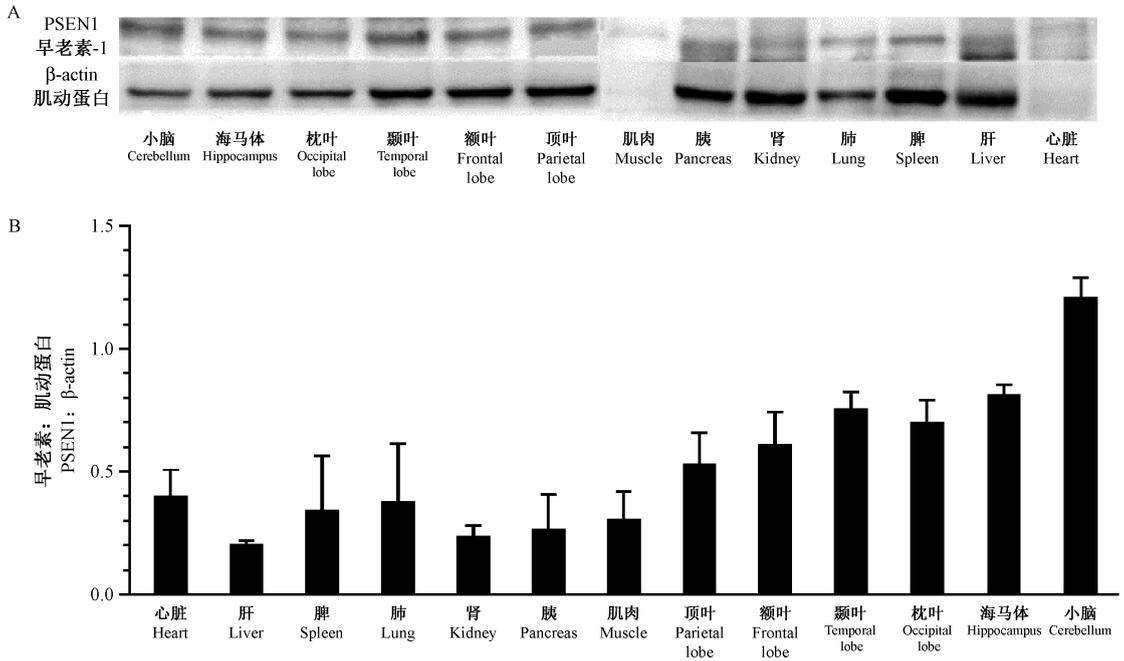


注:A:树鼩 13 种组织中 *PSEN1* mRNA 的相对表达量分析。B:树鼩与人类、小鼠和大鼠 13 个组织中 *PSEN1* 的表达量聚类热图。黑框表示缺失该信息。

图 4 树鼩 *PSEN1* mRNA 表达谱

Note. A, Quantitative real-time PCR analysis of *PSEN1* mRNA expression in 13 organ tissues of tree shrew. B, Heat map of *PSEN1* gene expression in 13 organ tissues of tree shrew, human, mouse and rat. Black boxes indicated missing information.

Figure 4 Expression profile of *PSEN1* mRNA in the tree shrew



注:A:树鼩 13 种组织中 PSEN1 蛋白的表达分析;B:树鼩 13 种组织的 PSEN1 蛋白定量分析。

图 5 树鼩 PSEN1 蛋白表达

Note. A, Expression of PSEN1 protein in 13 organ tissues of tree shrew. B, Quantitative analysis of PSEN1 protein in 13 organ tissues of tree shrew.

Figure 5 Expressions of PSEN1 protein in the tree shrew

用,还发现在癌症中也扮演重要角色。PSEN1 参与 Wnt<sup>[7]</sup>、Notch<sup>[8,20]</sup> 信号通路的调控,并与 PI3K-AKT-mTOR 通路、Ras-Raf-MEK 通路相互影响,影响黑色素瘤<sup>[21]</sup>、脑胶质细胞瘤、乳腺癌等多种恶性肿瘤的细胞增殖、侵袭、转移及新生血管生成等进程<sup>[22-23]</sup>。但由于所影响的信号通路较多,导致 PSEN1 在不同细胞环境和组织中扮演着不同的角色,即可以表达出促癌的功能,也能表达可以抑癌的功能。

PSEN1 基因是目前国内外研究的热点之一,该基因与 AD、肿瘤等多种疾病相关。对于 AD 的药物治疗,现阶段效果最卓越的药物靶点就是  $\gamma$ -分泌酶,因此针对 PSEN1 深入研究将有助于研制有效的抗 AD 药物。另外,目前以 AD 所建立的成熟动物模型只有转基因小鼠<sup>[24]</sup>,但由于物种差异,治疗策略和药物并不能成功地转化到人类身上。现阶段已有研究者证明,树鼩可以作为一个可行的、理想的实验动物用于 AD 研究<sup>[6,25]</sup>。随着 PSEN1 基因和树鼩动物模型研究的不断深入,相信它会在 AD 的治疗和药物研究等方面起到愈来愈大的作用。

综上,本研究通过调取树鼩 PSEN1 基因,获得其全长编码序列,通过系列比对、系统进化等分析发现树鼩 PSEN1 基因比小鼠、大鼠更接近人类和非人灵长类动物,有助于了解 PSEN1 在 A $\beta$  发生、AD 发展中的作用,有利于树鼩 PSEN1 单克隆抗体的合成与制备,并为进一步研究其作用机制奠定基础。

### 参 考 文 献(References)

- [ 1 ] 金范莹,张宝荣.老年痴呆的遗传机制研究进展[J].生命科学,2014,26(1):15-26.  
Jin FY, Zhang BR. The genetics of Alzheimer's disease: a review of recent progress [J]. Chin Bull Life Sci, 2014, 26(1): 15-26.
- [ 2 ] Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease [J]. Nature, 1995, 375(6534): 754-760.
- [ 3 ] Selkoe DJ. Cell biology of the amyloid beta-protein precursor and the mechanism of Alzheimer's disease [J]. Annu Rev Cell Biol, 1994, 10: 373-403.
- [ 4 ] Delabio R, Rasmussen L, Mizumoto I, et al. PSEN1 and PSEN2 gene expression in Alzheimer's disease brain: a new approach [J]. J Alzheimers Dis, 2014, 42(3): 757-760.
- [ 5 ] Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics [J]. Science, 2002, 297(5580): 353-356.
- [ 6 ] Fan Y, Luo R, Su LY, et al. Does the genetic feature of the Chinese tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) support its potential as a viable model for Alzheimer's disease research? [J]. J Alzheimers Dis, 2018, 61(3): 1015-1028.
- [ 7 ] Zhang C, Wu B, Beglopoulos V, et al. Presenilins are essential for regulating neurotransmitter release [J]. Nature, 2009, 460(7255): 632-636.
- [ 8 ] Edler MK, Sherwood CC, Meindl RS, et al. Aged chimpanzees exhibit pathologic hallmarks of Alzheimer's disease [J]. Neurobiol Aging, 2017, 59: 107-120.
- [ 9 ] De Strooper B, Annaert W, Cupers P, et al. A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain [J]. Nature, 1999, 398(6727): 518-522.
- [ 10 ] Yamashita A, Fuchs E, Taira M, et al. Somatostatin-immunoreactive senile plaque-like structures in the frontal cortex and nucleus accumbens of aged tree shrews and Japanese macaques [J]. J Med Primato, 2012, 41(3): 147-157.
- [ 11 ] 郑红,牛世伟,李进涛,等.成年中缅树鼩大脑 BDNF、trkB、ChAT mRNA 与蛋白的表达 [J]. 中国比较医学杂志,2015,25(12): 21-25.  
Zheng H, Niu SW, Li JT, et al. Expression levels of BDNF, trkB and ChAT in the brain of adult tree shrew (*Tupaia belangeri*) [J]. Chin J Comp Med, 2015, 25(12): 21-25.
- [ 12 ] 赵娟,张彦妹,郑乃智.癫痫和阿尔茨海默病共病机制的研究进展 [J]. 中国医药导报,2017,14(21): 53-56.  
Zhao J, Zhang YM, Zheng NZ. Research progress on mechanism of comorbidity of epilepsy and Alzheimer disease [J]. Chin Med Herald, 2017, 14(21): 53-56.
- [ 13 ] 白桂芹,刘尚清,邓世山,等.基于人脑海马结构的断层影像学 [J]. 解剖学杂志,2015,38(4): 458-461.  
Bai GQ, Liu SQ, Deng SS, et al. Tomographic imaging study based on hippocampus formation of the human brain [J]. Chin J Anat, 2015, 38(4): 458-461.
- [ 14 ] 董雪帆. AD 转基因小鼠小脑内突触相关蛋白及超微结构变化的实验研究 [D]. 山西医科大学,2017.  
Dong XF. Experimental study on the expression of synapse-associated proteins and ultrastructural changes in cerebellum of transgenic mice [D]. Shanxi Medical University, 2017.
- [ 15 ] Yakushev I, Landvogt C, Buchholz HG, et al. Choice of reference area in studies of Alzheimer's disease using positron emission tomography with fluorodeoxyglucose-F18 [J]. Psychiatry Res, 2008, 164(2): 143-153.
- [ 16 ] Uemura K, Lill CM, Li X, et al. Allosteric modulation of PS1/gamma-secretase on formation correlates with amyloid beta (42/40) ratio [J]. PLoS One, 2009, 4(11): e7893.
- [ 17 ] 谭媛,潘一龙,李心如.早老素 1 基因多态性与阿尔茨海默病关系研究的进展 [J]. 医学信息,2011,24(6): 3630-3631.  
Tan Y, Pan YL, Li XR. Progress in the relationship between presenilin 1 gene polymorphism and Alzheimer's disease [J]. Med Inform, 2011, 24(6): 3630-3631.
- [ 18 ] Berezovska O, Lleo A, Herl LD, et al. Familial Alzheimer's disease presenilin 1 mutations cause alterations in the

- conformation of presenilin and interactions with amyloid precursor protein [J]. *J Neurosci*, 2005, 25(11): 3009-3017.
- [19] 王倩, 范文娟, 孙仪征, 等. 淀粉样蛋白前体/早老素 1 转基因小鼠大脑皮质内 kinesin1 介导的神经元轴浆运输障碍 [J]. *解剖学报*, 2018, 49(2): 158-165.  
Wang Q, Fan WJ, Sun YZ, et al. Kinesin1-mediated neuronal axoplasmic transport disorder in cerebral cortex of amyloid precursor protein /presenilin-1 transgenic mice [J]. *Acta Anat Sin*, 2018, 49(2): 158-165.
- [20] Ranganathan P, Weaver KL, Capobianco AJ. Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time [J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(5): 338-351.
- [21] 黄斐超. 早老素 1 在胃癌中的表达及其临床意义 [D]. 福建医科大学, 2013.  
Huang FC. The expression of PSEN1 in the gastric cancer and its clinical significance [D]. Fujian Medical University, 2013.
- [22] Su DM, Zhang Q, Wang X, et al. Two types of human malignant melanoma cell lines revealed by expression patterns of mitochondrial and survival-apoptosis genes: implications for malignant melanoma therapy [J]. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8(5): 1292-1304.
- [23] Raurell I, Codina M, Casagolda D, et al. Gamma-secretase-dependent and -independent effects of presenilin1 on beta-catenin. Tcf-4 transcriptional activity [J]. *PLoS One*, 2008, 3:e4080.
- [24] Gotz J, Streffer JR, David D, et al. Transgenic animal models of Alzheimer's disease and related disorders: histopathology, behavior and therapy [J]. *Mol Psychiatry*, 2004, 9(7): 664-683.
- [25] Ni RJ, Luo PH, Shu YM, et al. Whole brain mapping of afferent projections to the bed nucleus of the stria terminalis in tree shrews [J]. *Neuroscience*, 2016, 333: 162-180.

[收稿日期] 2019-04-12