

# 阿尔茨海默病转基因小鼠模型特点和应用进展

魏 枫, 程维维, 尹雅芙

(上海交通大学医学院附属新华医院核医学科, 上海 200092)

**[摘要]** 阿尔茨海默病是一种常见的神经退行性疾病, 临床主要表现为进行性记忆能力丧失和整体认知能力下降。两种典型的病理特征为在脑内检测到的老年斑和神经纤维缠结, 分别由大量沉淀的淀粉样蛋白肽和过度磷酸化的 Tau 蛋白组成。除此之外还有神经炎性反应以及神经元广泛丢失等其他病理特征。在过去的几十年间虽然人们已经对阿尔茨海默病进行了大量的研究, 但是其病因和发病机制仍不明确, 至今也没有理想的治疗药物和根治方法。本综述介绍在临床前研究中使用的各种转基因动物模型的各自特点, 及其目前在临床前研究中的应用情况, 为未来的实验研究提供理论依据。

**[关键词]** 阿尔茨海默病; 转基因小鼠; 动物模型;  $\beta$ 淀粉样蛋白; Tau 蛋白

**[中图分类号]** Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)05-0432-08

## Characteristics and Application of Transgenic Mouse Models in Alzheimer's Disease

WEI Feng, CHENG Weiwei, YIN Yafu

(Department of Nuclear Medicine, Xinhua Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China)

Correspondence to: YIN Yafu (ORCID: 0000000248186655), E-mail: Yinyf-2001@163.com

**[ABSTRACT]** Alzheimer's disease is a common neurodegenerative disease characterized by progressive memory loss and overall cognitive decline. Two typical pathological features are senile plaques and neurofibrillary tangles detected in the brain, which consist of large amounts of precipitated amyloid peptide and hyperphosphorylated Tau protein, respectively. In addition, there are other pathological features such as neuroinflammatory response and extensive loss of neurons. In the past decades, a lot of research has been done on Alzheimer's disease, but its etiology and pathogenesis are still unclear, and there is no ideal treatment or radical cure. This review introduced the characteristics of various transgenic animal models and their current application in preclinical studies, in order to provide theoretical basis for future experimental studies.

**[Key words]** Alzheimer's disease; Transgenic mouse; Animal models;  $\beta$ -amyloid protein; Tau protein

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 目前影响全球约 4 000 万人, 是引起认知障碍的第一位原因。中国近 2.5 亿 60 岁及以上的成年人中痴呆和轻度认知障碍 (mild cognitive impairment, MCI) 的患病率分别为 6.04% 和 15.54%。其中 AD 患者近 3.9%, 患病人数约 983 万<sup>[1]</sup>。过往研究表明 2020 年 60 岁以上的痴呆症

患者预计是 2015 年的 2.13 倍<sup>[2]</sup>, 全国人口老龄化程度进一步加深。60 岁及以上老年人中老年痴呆患者约有 1 507 万。日前, 中国老龄协会发布《认知症老年人照护服务现状与发展报告》和《认知症老年人照护服务指南》, 中老年痴呆患者预计 2030 年将达 2 220 万, 2050 年将达 2 898 万<sup>[3]</sup>。AD 占有痴呆病例的 60% ~

**[基金项目]** 国家自然科学基金“基于多靶点分子影像技术的小胶质细胞自噬和极化调控在阿尔茨海默病细胞期治疗机制的研究”(81994290); 上海市浦江人才计划“星形胶质细胞衰老和自噬在阿尔茨海默病发生发展中作用机制的分子靶向研究”(2019PJD032)

**[第一作者]** 魏 枫(1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 核医学(脑/脊神经)。E-mail: 514179650@qq.com

**[通信作者]** 尹雅芙(1975—), 女, 博士生导师, 主任医师, 研究方向: 核医学(脑/脊神经)。E-mail: Yinyf-2001@163.com。ORCID: 0000000248186655

70%，其影响人群广泛，造成的社会支持看护及经济负担极大<sup>[4]</sup>。但目前对AD的病因和发病机制的了解仍不够全面深入，临床也没有根治的方法。AD一直是医学界亟待攻关的难关。

AD相关的动物模型对疾病机制研究和相关药物研发十分重要<sup>[5]</sup>。动物模型要求能最大程度地复制人类AD病脑中的重要病理生理表现，即具有 $\beta$ 淀粉样前体蛋白( $\beta$ -amyloid precursor protein, APP)聚集形成的胞外 $\beta$ 淀粉样蛋白( $\beta$ -amyloid, A $\beta$ )和磷酸化微管相关蛋白Tau异常形成的胞内神经纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFTs)。这两大典型的病理表现以及神经元丢失、记忆障碍和认知功能进行性下降等是重要临床及病理表现<sup>[6]</sup>。虽然目前没有动物模型能够完全重复人类AD的病理表现，但是转基因动物模型在活体实验、针对特定基因、病理进行性发展及药物应用等方面具有显著优势。理解特定动物模型的特点和局限性对于以后开展针对性研究十分重要。

以下介绍现已建立并且应用于实验研究的转基因动物模型。

## 1 A $\beta$ 转基因小鼠模型

### 1.1 APP单转基因小鼠模型

目前，A $\beta$ 被普遍认为是AD重要的病理表现之一<sup>[7]</sup>。APP是一种广泛存在于组织细胞表面的单次跨膜蛋白，病理条件下降解。长度为42个氨基酸或更长的A $\beta$ 肽具有极强的疏水性，易于聚集，病理条件下细胞外A $\beta_{42}$ 的水平增加。A $\beta_{42}$ 肽被认为是最具毒性的类型。既往研究认为，淀粉样蛋白单体聚集沉淀形成的A $\beta$ 斑块即老年斑，是AD发病的主要原因。随着研究的深入，淀粉样蛋白级联假说不断地被质疑修正，A $\beta$ 与AD相关的其他病理表现之间的联系也不断地被证实<sup>[8]</sup>。

具有APP转基因的小鼠模型大多是在人血小板衍生生长因子 $\beta$ (platelet derived growth factor  $\beta$ , PDGF $\beta$ )、朊病毒蛋白(prion protein, PrP)和胸腺细胞分化抗原1(thymocyte differentiation antigen 1, Thy-1)的控制下在中枢神经系统特异性表达人类APP突变型的转基因小鼠<sup>[9]</sup>。这些转基因动物模型脑内有A $\beta$ 聚集或斑块形成，并且促使转基因小鼠模型出现明显的认知和行为学障碍，从而模拟人类AD的脑病理改变和行为异常。因此可以用于探索AD的潜在发病机制并作为早期AD生物标志物。

### 1.1.1 PDAPP转基因小鼠模型

该型小鼠遗传背景为C57BL/6 $\times$ DBA/2，启动子为人PDGF- $\beta$ ， $\gamma$ 分泌酶切割位点V717F突变，表达人APP695/751/770。该型小鼠在血小板衍生生长因子启动子(PDAPP minigene)的控制下，使得突变的人淀粉样前体蛋白(hAPP717V $\rightarrow$ F)的过表达从而导致类似于AD的神经退行性变化，因此命名为PDAPP<sup>[10]</sup>。

免疫印迹实验表明，PDAPP纯合子小鼠4月龄时可见皮质、海马区A $\beta$ 含量明显升高。而杂合子小鼠6月龄之后可见APP表达水平提高，免疫组织化学染色也观察到小鼠脑中开始有弥漫性和致密A $\beta$ 斑块沉积，并且随年龄增加而增加<sup>[11]</sup>。小鼠脑中老年斑密度最大的区域最开始见于齿状回的外分子层和海马体。18月龄时硫黄素S染色可见在这些A $\beta$ 斑块周围有活跃的星形胶质细胞和神经炎性改变；此外，这些小鼠随着年龄的增长出现了显著的突触丢失<sup>[12]</sup>。

4月龄时，通过水迷宫(Morris water maze)和其他行为检测，PDAPP小鼠表现出空间、工作方面记忆障碍，并伴随小鼠的整个生命周期<sup>[12]</sup>。6月龄时，新物体识别实验(novel object recognition)测试显示有认知功能障碍，但并不像空间记忆障碍一样明显。

### 1.1.2 Tg2576转基因小鼠

该型小鼠遗传背景为C57BL6 $\times$ SJL，启动子为鼠PrP，转入APP<sub>SWE</sub>基因形成 $\beta$ 分泌酶切割位点瑞典双突变K670N/M671L，表达人APP695。

免疫印迹实验发现，最早在2月龄时小鼠脑内A $\beta$ 含量增高，到4~5月龄时增高更为明显。9月龄后小鼠大脑切片刚果红染色见斑块沉积<sup>[13]</sup>。随着A $\beta$ 量的增多，其沉积范围也逐渐增大。有报告称该模型小鼠中约95%的致密斑块出现在血管周围，因此能引发淀粉样脑血管病<sup>[14]</sup>。该转基因小鼠10月龄时出现神经炎症，同时可见突触的丢失和小胶质细胞增生。

在6月龄时水迷宫实验中小鼠表现出空间记忆障碍。此时虽然没有明显的脑区神经元丢失，但已出现树突棘稳定性受损和突触可塑性降低。9月龄时Y迷宫即可显示空间相关的学习记忆能力受损，但直到12月龄时Tg2576小鼠才通过新物体识别实验表现出认知障碍。

### 1.1.3 APP23转基因小鼠

该型小鼠遗传背景为C57BL/6J，启动子为鼠Thy-1， $\beta$ -分泌酶切割位点瑞典双突变K670N/M671L，表达人APP751。

免疫组织化检测发现, 6月龄时APP23小鼠大脑学可见淀粉样蛋白沉淀, 并且随月龄增加逐渐加重, 24月龄时在皮质和海马区大量出现A $\beta$ 斑块<sup>[15]</sup>。研究发现APP23小鼠脑内的A $\beta$ 沉淀以血管周围表现明显, 12月龄时可导致血管血流减少和血管形态改变, 并可引起淀粉样血管病。此后通过胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 免疫组织化学染色检测到反应性星形胶质细胞增生, 伴有神经炎和突触变性<sup>[16]</sup>。在12月龄时还表现出突触丢失, 甚至海马CA1区神经元丢失<sup>[17]</sup>。6月龄时APP23小鼠脑中Tau蛋白的磷酸化增加, 即Tau蛋白磷酸化似乎与A $\beta$ 肽沉积平行发生。

在水迷宫实验、新物体识别实验中, 3月龄开始表现出空间记忆、空间工作记忆受损, 并且随年龄增长逐渐加重。12月龄时, 通过巴恩斯迷宫 (Barnes maze) 实验也可检测出认知功能缺陷。该模型在疾病进展晚期约19月龄时, 出现非空间工作记忆缺陷。

## 1.2 APP/PS1转基因小鼠

目前已有研究证明早老素 (presenilin, PS) 基因突变和家族性阿尔茨海默病 (familial Alzheimer's disease, FAD) 病理改变相关, 但仅携带FAD突变型PS基因的转基因小鼠脑内不会形成A $\beta$ 斑块<sup>[18]</sup>。携带PS突变型可导致A $\beta$ <sub>42</sub>水平明显升高, 增加脑中A $\beta$ <sub>42</sub>:A $\beta$ <sub>40</sub>的比例。通过将人APP和PS转基因小鼠品系杂交, 获得同时包含两种突变型的双转基因小鼠, 使表达FAD突变APP和PS1的转基因鼠过度产生A $\beta$ <sub>42</sub>并展现类似AD淀粉样斑块病理状态, 可观察到更早更广泛的斑块沉积病理表型。这些APP/PS1转基因小鼠目前也已经广泛用于研究。

### 1.2.1 APP<sub>SWE</sub>/PS1<sub>M146L</sub>转基因小鼠

启动子为鼠PrP和人PDGF $\beta$ ,  $\beta$ 分泌酶切割位点瑞典突变K670N/M671L和PS1基因M146L突变, 表达人APP695。

APP<sub>SWE</sub>/PS1<sub>M146L</sub>小鼠脑内A $\beta$ <sub>42</sub>/A $\beta$ <sub>40</sub>出现早, 在2月龄时细胞内可见A $\beta$ 沉积。3月龄时在皮质、海马细胞的内、外出现A $\beta$ 聚集。细胞外A $\beta$ 聚集随年龄升高而增加, 6月龄时出现淀粉样蛋白斑块。

1~2月龄模型小鼠即出现场景恐惧记忆障碍。实验中观察到的工作记忆损伤比大多数模型进展缓慢, 3月龄时Y迷宫检测出空间工作记忆受损, 6月龄时可以通过水迷宫和放射臂水迷宫 (radial arm water maze) 检测到空间记忆、奖赏相关的空间记忆受损。15月龄时空间工作记忆受损更加明显, 并持续整个生命周期。

### 1.2.2 APP<sub>SWE</sub>/PS1<sub>dE9</sub>转基因小鼠

该型小鼠遗传背景为C57BL6 $\times$ C3H, 启动子为鼠PrP,  $\beta$ 分泌酶切割位点瑞典突变K670N/M671L和PS1 dE9基因位点缺失, 表达人APP695。

PS1 dE9位点缺失并不会使PS1基因失活, 反而起增强促进作用。这种模型的特点是2~3月龄时小鼠脑中的皮质和海马区域发生胆碱能轴突肿胀, 以及淀粉样蛋白含量增加。4~5月龄时刚果红染色见A $\beta$ 开始在大脑和海马体中沉积形成斑块<sup>[19]</sup>。6月龄时可以在小鼠大脑皮质、海马体和杏仁核检测到大量淀粉样斑块。到8月龄出现斑块沉积和行为缺陷时, 小鼠并没有出现神经网络缺损或神经元丢失<sup>[20]</sup>。但有研究认为: 在15月龄以上老年组的海马、基底核、杏仁体可见有大量星形胶质细胞增生和神经元变性<sup>[21]</sup>。

在3月龄时通过放射臂水迷宫检测, 该转基因小鼠表现有空间相关的奖赏和逃避相关能力受损, 6月龄时水迷宫实验可检测到空间学习记忆受损。

## 1.3 5xFAD转基因小鼠

大多数转基因小鼠模型的斑块发展慢于预期。为了加快斑块发展速度和研究脑内A $\beta$ <sub>42</sub>高水平带来的不良影响, 出现了共表达5个FAD突变 (A $\beta$ PP<sub>Swe, Lnd, Flo, PS1<sub>M146L, L286V</sub></sub>) 的APP/PS1双转基因小鼠模型, 达到了迅速增加A $\beta$ <sub>42</sub>含量的目的<sup>[12]</sup>。

5xFAD (C57BL/6 $\times$ SJL, 启动子为Thy-1基因, 高表达人淀粉样蛋白前体695) 转基因鼠几乎只产生A $\beta$ <sub>42</sub>。通过蛋白印迹实验发现, 1.5月龄时5xFAD转基因小鼠脑内A $\beta$ <sub>42</sub>开始在神经元细胞和神经突触中累积和聚集。而淀粉样蛋白自小鼠2月龄时开始大量沉积, 特别是在深皮质层和海马下托, 与此同时免疫荧光染色显示有胶质细胞增生。大约4月龄时经Y迷宫实验发现有工作记忆受损<sup>[22]</sup>。9月龄时皮质层和海马下托锥体神经元丢失, 出现显著神经退行性变。并且5xFAD转基因小鼠在不表达Tau蛋白的情况下, 大量毒性的A $\beta$ 改变神经突触的结构和密度, 并导致进行性神经元死亡和萎缩, 而大多数AD小鼠模型缺乏这种特征<sup>[23]</sup>。

5xFAD转基因小鼠能快速再现AD淀粉样病变的主要病理特征, 目前已成为A $\beta$ <sub>42</sub>介导神经退行性变和淀粉样斑块形成的常用模型。

## 1.4 A $\beta$ 转基因小鼠的应用

多年来, A $\beta$ 小鼠模型广泛应用于实验研究。研究者最早通过这些A $\beta$ 转基因小鼠模型实验验证了过度表达人类APP基因亚型的转基因小鼠可获得认知行为缺

陷,其大脑皮层中也可检测到淀粉样沉淀<sup>[24]</sup>。这些转基因小鼠的行为、生化和病理异常与AD患者相似,为人类研究AD提供了新的路径。目前应用最为广泛的A $\beta$ 小鼠模型是APP<sub>SWE</sub>/PS1<sub>M146L</sub>及APP<sub>SWE</sub>/PS1<sub>DE9</sub>以及5xFAD转基因小鼠。自证实携带PS1的转基因小鼠模型可更好更早呈现A $\beta$ 病理表现后,研究人员更多使用APP/PS1转基因小鼠模型进行针对A $\beta$ 的形成机制、分解过程及靶向治疗的实验研究。

然而鉴于大多数AD病例晚发性和偶发性的特点,美国加州大学记忆与神经障碍研究所的David Baglietto-Vargas教授更是通过敲入技术将小鼠A $\beta$ 序列中的3个氨基酸改变为野生型的人类对应氨基酸,从而导致认知能力和突触可塑性的年龄依赖性损伤、脑内炎症改变,建立相关野生型AD小鼠,为建立迟发性AD生物模型开发与评估建立了重要基础<sup>[26]</sup>。

最初针对A $\beta$ 的研究多聚焦在A $\beta$ 的清除上,而在A $\beta$ 靶向治疗效果欠佳的当下,研究人员开始关注神经炎症的影响。美国加州大学的研究团队在2016年4月发表的一项研究中对10月龄的5xFAD小鼠使用了选择性集落刺激因子1受体抑制剂治疗,消除了脑内80%的小胶质细胞后挽救了小鼠的树突棘丢失。研究认为在不改变A $\beta$ 或斑块水平的情况下,改善了小鼠记忆并减轻了整体的神经炎症<sup>[25]</sup>。纪念斯隆·凯瑟琳癌症研究中心的李月明教授团队2020年9月在*Nature*杂志上发表的文章中也使用了5xFAD转基因小鼠<sup>[27]</sup>,他们认为神经炎症调节 $\gamma$ -分泌酶活性并以此影响A $\beta$ 产生,通过小分子 $\gamma$ -分泌酶调节剂特异地抑制A $\beta_{42}$ 的产生但不影响其他位点和底物切割,这种特殊机制或有望成为未来AD药物开发的方向。

目前也有更多的研究人员使用不同表型的A $\beta$ 转基因小鼠模型研究与A $\beta$ 各种可能相关因素的影响,如通过APP/ApoE小鼠模型观察A $\beta$ 过表达对脑淀粉样血管病(cerebral amyloid angiopathy, CAA)和实质性斑块的不同作用<sup>[28]</sup>。研究发现APOE4与A $\beta$ 诱导的胰岛素信号传导缺陷增强有关,实验支持使用抗h-apoE4抗体来减少斑块形成。

## 2 Tau转基因小鼠模型

Tau的异常磷酸化导致大脑中出现NFTs,这是AD的另一个显著病理特征<sup>[14]</sup>。微管蛋白正确组装维持微管稳定,神经元从而发挥正常功能<sup>[29]</sup>。Tau过度磷酸化被认为是影响微管组装和诱导Tau聚集的关键因素。

在过度磷酸化过程中Tau发生构象变化,从而导致NFTs的形成<sup>[8]</sup>。由于长期以来针对A $\beta$ 的临床试验未见成效,并且淀粉样蛋白沉积最明显的区域和受NFTs影响导致突触和神经元损失最大的区域并不重合<sup>[30]</sup>,也有研究认为Tau病理和认知功能障碍下降呈正相关,强调Tau病理性改变和神经退行性变间可能有直接联系<sup>[31]</sup>。在AD病因学中Tau病理不可忽视,因而有研究人员建立了Tau转基因小鼠模型用以研究Tau病理性表达与相关疾病的关系。

### 2.1 JNPL3转基因小鼠

常用的Tau转基因JNPL3小鼠遗传背景为C57BL/6 $\times$ DBA/2 $\times$ SW,启动子为鼠PrP,人Tau蛋白P301L突变,过表达人Tau蛋白。

Lewis团队报告的JNPL3小鼠表达人Tau最为常见的P301L突变,这也是最早利用P301L突变构建的Tau转基因小鼠模型。该突变与17号染色体相关,除了AD外该突变也与人类的额颞叶痴呆和帕金森病相关<sup>[32]</sup>。JNPL3小鼠可在脑和脊髓中产生NFTs,并且在脊髓尤其是前角中明显地出现神经元丢失,因而会出现类帕金森病的症状。转基因小鼠引入的Tau突变目前认为与AD的发病没有直接关联,且其大多会表现出运动功能障碍的特性影响其在行为学检测中的表现,包括该类模型缺乏A $\beta$ 聚集和斑块沉积,无法全面模拟AD的病理改变,因而JNPL3主要用于靶向Tau药物的非临床研究。

研究显示杂合子JNPL3小鼠Tau病理性表达水平与人类患者相当,而纯合子小鼠Tau病理表达水平可翻倍。4月龄时,免疫组织化学证实纯合子JNPL3小鼠出现异常磷酸化Tau和不溶性的Tau病理改变<sup>[33]</sup>,而杂合子动物在6月龄时发现Tau免疫阳性,即NFTs的表达量与突变基因数量以及小鼠年龄相关。6月龄时JNPL3小鼠出现进行性运动障碍,通过悬挂实验表现为行动迟缓和肌无力<sup>[34]</sup>。在NFTs区域,也可发现星形胶质细胞增生及神经元丢失等现象<sup>[35]</sup>。

### 2.2 TauV337M转基因小鼠

该型小鼠遗传背景为B6SJL,启动子为鼠Thy-1,人TauV337M突变,高表达Tau蛋白。

通过6月龄TauV337M小鼠矢状面脑切片获得的原位杂交数据,研究认为人类Tau在大脑皮层、海马和脑桥中有高水平的表达,而在纹状体或小脑中几乎没有表达<sup>[36]</sup>。用磷酸化非依赖性人特异性T14 Tau抗体对6月龄小鼠进行免疫组织化学分析,发现人Tau蛋白

的空间分布基本上遵循人AD病脑中的表达模式,额叶、海马和脑桥神经元染色明显,纹状体染色很少。在11月龄时小鼠可发生NFTs和海马神经元丢失<sup>[37]</sup>。

### 2.3 Tau转基因小鼠的应用

通过对人AD病脑中特征性病理表现的长期研究,研究人员意识到Tau对AD的形成有着不可忽视的作用。后续将利用Tau转基因小鼠,对仅Tau蛋白形成时是否有AD病理表现,其存在时与A $\beta$ 形成之间的关系,及其对AD疾病进展等问题展开研究。2020年7月,德国萨尔兰德大学Laura团队的研究表明p38 $\alpha$ -丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)可作为AD治疗的新靶点。Laura团队利用Tau转基因小鼠模型,发现P38 $\alpha$ -MAPK在AD损伤部位被特异性激活<sup>[38]</sup>。虽然P38 $\alpha$ -MAPK对AD发病机制的影响,特别是对p-Tau相关脑病理的影响以及潜在的分子机制尚不清楚,但是实验中发现神经元内p38 $\alpha$ -MAPK的缺失可以改善9月龄的转基因AD小鼠的认知功能,这与大脑中A $\beta$ 和p-Tau负荷的降低有关。之后对AD致病机制的系统研究也表明,神经元p38 $\alpha$ -MAPK的缺失可以减弱AD相关的脑病理改变,并保护AD发病中的神经元。

## 3 A $\beta$ +Tau多转基因小鼠模型

AD的特征性病理改变包括淀粉样蛋白斑块和NFTs。之前的研究认为一种典型的病理改变并不能引发另一种典型病理的产生。为了明确A $\beta$ 斑块和Tau蛋白之间是否存在相互作用以及它们对神经突触的影响,根据实验需要建立了能够同时表达这两种典型病理表现的小鼠模型。

### 3.1 TAPP双转基因小鼠模型

该型小鼠遗传背景为C57BL/6,启动子为鼠PrP,高表达人APP695和Tau。

TAPP是JNPL3小鼠和Tg2576小鼠杂交产生的双转基因鼠,它同时表达淀粉样斑块和NFTs,可用于研究揭示A $\beta$ 与Tau之间存在交互作用<sup>[39]</sup>。这是第一个同时展示AD两大主要病理特征的小鼠模型。

作为杂交产生的双突变体(Tau/APP)子代,TAPP小鼠与亲代Tg2576小鼠在相同年龄发生分布和密度相似的A $\beta$ 沉积。原位杂交分析表明,TAPP小鼠和JNPL3小鼠之间的Tau转基因表达模式没有差异,但3月龄时蛋白质印迹可在脊髓和脑桥中见Tau蛋白病理性表达。此时Gallyas银染脑切片中也偶尔可见NFTs,

均早于JNPL3小鼠。6~7月龄时,TAPP小鼠的边缘脑区具有NFTs,此时JNPL3小鼠大部分局限于脊髓和脑桥。Tau/APP双突变体小鼠要比JNPL3亲代小鼠在大脑边缘区域和嗅觉皮层的NFTs病理表达增强,有研究者认为A $\beta$ 表达量增加可促进Tau病理的进展<sup>[34]</sup>。而在NFTs最多的边缘区域,GFAP的免疫染色显示星形胶质细胞也随之增加。TAPP小鼠的行为学变化与发病时间也和其亲代JNPL3小鼠相似。

### 3.2 3xTg-AD三转基因小鼠

Oddo教授等<sup>[40]</sup>建立了一个包含A $\beta$ PP<sub>Swe</sub>、Tau<sub>P301L</sub>、PS1<sub>M146V</sub>三种基因突变型的小鼠模型3xTg-AD。该小鼠模型的基因型背景为C57BL/6/129S,启动子为Thy1.2,高表达APP695。这是第一个同时在AD相关脑区发生两种主要病理表现的转基因模型。并且它在产生斑块和NFTs之前就表现出了年龄相关的突触功能障碍和认知功能受损。

免疫沉淀法检测3~4月龄时3xTg-AD小鼠,可在新皮质区检测到神经元细胞内A $\beta$ 免疫反应,6月龄时则发展至海马CA1亚区。同时6月龄的3xTg-AD小鼠最先在额叶皮层细胞内表现淀粉样蛋白沉淀,之后出现在其他皮质区和海马,12月龄时细胞外可见A $\beta$ ,即3xTg-AD小鼠表现出年龄区域相关性的A $\beta$ 沉淀趋势。与之相反,12月龄时Tau蛋白病理首先出现在海马CA1区,随后发展至皮质区<sup>[41]</sup>。尽管总体浓度低,p-Tau与认知能力下降的相关性最强,能够更直接、定量相关疾病进展<sup>[42]</sup>。pS422免疫反应性是AD中Tau病理进展的早期标志物。而突触功能障碍出现在标志性病理性累积之前,最早的突触功能障碍和认知受损出现于3~5月龄的3xTg-AD小鼠,6月龄时在水迷宫实验中表现明显,12月龄时通过巴恩斯迷宫实验确认有记忆损伤。实验研究认为这与A $\beta$ 在海马体和杏仁核中的神经元内积累有关。在病理发展后期进行免疫组织化学染色可见星形胶质细胞反应性增生<sup>[43]</sup>。

但目前也有研究认为,因长期广泛使用3xTg-AD小鼠,已形成了多种相关亚系,较过往研究其病理发生及行为学变化出现轻微的时间延迟<sup>[44]</sup>。如小胶质细胞活化(第一次检测到是6个月)先于星形胶质细胞增生(第一次检测到是12个月)。但该研究只分析了雌性小鼠,因为在实验室保有的纯合子体系中,雄性3xTg AD小鼠显示出相当大的神经病理学变异,即使是在同窝的小鼠之间。

和人类AD患者脑内状况一致的是,在3xTg-AD小

鼠脑内 A $\beta$  沉积早于 Tau 的改变。A $\beta$  病理的首先出现表示它可能会影响 Tau 神经病理学进展<sup>[40]</sup>。和只表现 Tau 蛋白病理改变的转基因小鼠相比, 3xTg-AD 小鼠 Tau 病理改变形成时间明显提前, 并且认知功能显著受损。这提示细胞内 A $\beta$  积累是 3xTg-AD 小鼠发生突触功能障碍的原因之一。3xTg-AD 小鼠斑块和 NFTs 病理以年龄和区域依赖性的方式进行性发展, 更接近人类 AD 患者大脑的神经病理变化。这有助于确定针对其中一种标志性病理改变的诊疗干预方法是否能影响另一种病理改变的进展。该动物模型可以同时评估潜在的药物或治疗手段对两种病理改变的影响。

### 3.3 A $\beta$ +Tau 转基因小鼠的应用

虽然 3xTg-AD 小鼠的病理发生与过去的报告相比出现轻微的时间延迟<sup>[44]</sup>, 但是 3xTg-AD 小鼠仍然是目前最常使用的转基因小鼠模型之一。

巴黎萨克雷大学的研究团队在他们 2020 年 3 月发表的文章中使用了 3xTg-AD 小鼠<sup>[45]</sup>。在 AD 的早期阶段经常能观察到病人脑内糖酵解改变, 但不清楚这种代谢失调是否影响 AD 进展以及其如何导致 AD 的突触可塑性改变和行为缺陷。该团队发现星形胶质细胞中糖酵解衍生的 L-丝氨酸遭破坏可导致 AD 的认知缺陷。研究人员发现在早期 AD 小鼠和 AD 患者中, 其星形细胞中丝氨酸生物合成途径受损, 而该途径是糖酵解的分支。D-丝氨酸是突触可塑性所必需突触离子型谷氨酰胺受体的协同激活剂, 而 L-丝氨酸是 D-丝氨酸的前体。因此, AD 小鼠突触离子型谷氨酰胺受体协同激活剂位点占有率较低, 同时伴随突触和行为缺陷。在海马星形胶质细胞中 L-丝氨酸合成途径失活后, 也观察到类似的缺陷。该研究结果表明, 星形胶质细胞糖酵解途径调节认知功能, 并提示左旋丝氨酸可用于 AD 的治疗。针对神经炎症方向的研究及治疗对策也是目前研究的热点和重点难题。

## 4 总结和展望

从医学伦理和临床表现多样性的角度考虑, 临床研究人类 AD 发病机制具有相当的挑战性。考虑到转基因小鼠模型在海马和皮质的结构和功能方面与人类脑区系统发育高度相似, 虽然不能完全复制整个 AD 病脑的病理生理学, 但是以其高度类似人类的形态学、病理学和遗传学表现, 通过转基因小鼠模型研究 AD 病理过程已经是一种有效替代。

通过转基因小鼠特定病理表现深入理解人类 AD 潜

在发病机制, 寻找可靠的早期诊断生物标志物, 评估治疗药物是否安全和有效, 这些是我们利用转基因动物模型想要达到的目的。动物模型的优势在于允许我们在动物身上探索不同生长时期的不同病理表现, 从而进行更为深入准确的研究, 更好地理解疾病的进展。利用在实验中成功模拟 AD 发病机制的小鼠模型, 可以长期多次试用潜在的治疗药物, 从而验证药物是否有治疗效果、药物联用是否更佳等等, 这在疾病研究中已经是一个可行、成熟的选择。

虽然目前利用动物模型进行的临床前研究已经取得了一定进展, 但是它们的临床转化价值仍不明确, 临床转化结果不甚理想的情况也很多。目前认为可能是对于 AD 神经生物学基础和发病机制的理解仍然不足, 基础研究亟待加强。研究常用的转基因动物模型尚不能模拟人类 AD 病脑的全部病理过程, 因此通过临床前动物研究获得的成果在临床阶段的人体实验中不一定适用, 还需要进一步的临床研究验证。AD 作为一种长期慢性神经退行性疾病, 实验用小鼠的寿命时限不能达到人类需要的长时程的药物治疗观察和定期监测的要求。除此之外, 转基因动物模型的月龄大小、性别差异、遗传背景以及不同实验室的实验条件都对研究结果有很大的影响。

鉴于 AD 的神经病理基础仍不明确, 实验研究人员应综合考虑不同动物模型的优势和局限性, 选择最合适的动物模型进行针对性研究。

### [作者贡献 Author Contribution]

魏枫收集资料并参与论文写作; 程维维指导并协助完成论文内容; 尹雅芙负责课题及本论文审核及把关。

### [利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

### [参考文献 References]

- [1] JIA L F, DU Y F, CHU L, et al. Prevalence, risk factors, and management of dementia and mild cognitive impairment in adults aged 60 years or older in China: a cross-sectional study [J]. *Lancet Public Health*, 2020, 5(12): e661-e671. DOI:10.1016/S2468-2667(20)30185-7.
- [2] WANG Y Q, JIA R X, LIANG J H, et al. Dementia in China (2015-2050) estimated using the 1% population sampling survey in 2015[J]. *Geriatr Gerontol Int*, 2019, 19(11): 1096-1100. DOI: 10.1111/ggi.13778.
- [3] 中国老龄协会. 认知症老年人照护服务现状与发展报告[EB/OL]. (2021-05-12) [2021-05-13]. <http://www.cncaprc.gov.cn/llxw/192282.jhtml>.
- [4] BALLARD C, GAUTHIER S, CORBETT A, et al. Alzheimer's

- disease[J]. *Lancet*, 2011, 377(9770): 1019-1031. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)61349-9.
- [5] WELLER J, BUDSON A. Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment[J]. *F1000Res*, 2018, 7: F1000 Faculty Rev-F1000 Faculty1161. DOI:10.12688/f1000research.14506.1.
- [6] HANE F T, LEE B Y, LEONENKO Z. Recent progress in Alzheimer's disease research, part 1: pathology[J]. *J Alzheimers Dis*, 2017, 57(1):1-28. DOI:10.3233/JAD-160882.
- [7] JONSSON T, ATWAL J K, STEINBERG S, et al. A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline[J]. *Nature*, 2012, 488(7409): 96-99. DOI: 10.1038/nature11283.
- [8] CHONG F P, NG K Y, KOH R Y, et al. Tau proteins and tauopathies in Alzheimer's disease[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2018, 38(5):965-980. DOI:10.1007/s10571-017-0574-1.
- [9] SAITO T, MATSUBA Y, MIHIRA N, et al. Single App knock-in mouse models of Alzheimer's disease[J]. *Nat Neurosci*, 2014, 17(5):661-663. DOI:10.1038/nn.3697.
- [10] Masliah E, Sisk A, Mallory M, et al. Comparison of neurodegenerative pathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein and Alzheimer's disease [J]. *J Neurosci*, 1996, 16(18): 5795-5811.
- [11] CHEN G Q, CHEN K S, KNOX J, et al. A learning deficit related to age and  $\beta$ -amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Nature*, 2000, 408(6815):975-979. DOI: 10.1038/35050103.
- [12] BEGLOPOULOS V, TULLOCH J, ROE A D, et al. Early detection of cryptic memory and glucose uptake deficits in pre-pathological APP mice[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 11761. DOI:10.1038/ncomms11761.
- [13] SCOPA C, MARROCCO F, LATINA V, et al. Impaired adult neurogenesis is an early event in Alzheimer's disease neurodegeneration, mediated by intracellular  $A\beta$  oligomers [J]. *Cell Death Differ*, 2020, 27(3):934-948. DOI:10.1038/s41418-019-0409-3.
- [14] KAWARABAYASHI T, YOUNKIN L H, SAIDO T C, et al. Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease[J]. *J Neurosci*, 2001, 21(2): 372-381. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.21-02-00372.2001.
- [15] DAM D V, VLOEBERGHES E, ABRAMOWSKI D, et al. APP23 mice as a model of Alzheimer's disease: an example of a transgenic approach to modeling a CNS disorder[J]. *CNS Spectr*, 2005, 10(3):207-222. DOI:10.1017/s1092852900010051.
- [16] RIJAL UPADHAYA A, SCHEIBE F, KOSTERIN I, et al. The type of  $A\beta$ -related neuronal degeneration differs between amyloid precursor protein (APP23) and amyloid  $\beta$ -peptide (APP48) transgenic mice[J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2013, 1(1):77. DOI:10.1186/2051-5960-1-77.
- [17] STURCHLER-PIERRAT C, ABRAMOWSKI D, DUKE M, et al. Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(24):13287-13292. DOI:10.1073/pnas.94.24.13287.
- [18] FLOOD D G, REAUME A G, DORFMAN K S, et al. FAD mutant PS-1 gene-targeted mice: increased  $A\beta$ 42 and  $A\beta$  deposition without APP overproduction[J]. *Neurobiol Aging*, 2002, 23(3): 335-348. DOI:10.1016/S0197-4580(01)00330-X.
- [19] ZHAO R H, HU W L, TSAI J, et al. Microglia limit the expansion of  $\beta$ -amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Mol Neurodegeneration*, 2017, 12(1):47. DOI:10.1186/s13024-017-0188-6.
- [20] SHI Q Q, CHOWDHURY S, MA R, et al. Complement C3 deficiency protects against neurodegeneration in aged plaque-rich APP/PS1 mice[J]. *Sci Transl Med*, 2017, 9(392): eaaf6295. DOI:10.1126/scitranslmed.aaf6295.
- [21] KIM T K, LEE J E, PARK S K, et al. Analysis of differential plaque depositions in the brains of Tg2576 and Tg-APPswe/PS1dE9 transgenic mouse models of Alzheimer disease[J]. *Exp Mol Med*, 2012, 44(8): 492-502. DOI: 10.3858/emmm.2012.44.8.056.
- [22] EIMER W A, VASSAR R. Neuron loss in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease correlates with intraneuronal  $A\beta$ 42 accumulation and Caspase-3 activation[J]. *Mol Neurodegener*, 2013, 8:2. DOI:10.1186/1750-1326-8-2.
- [23] MAZI A R, ARZUMAN A S, GUREL B, et al. Neonatal neurodegeneration in Alzheimer's disease transgenic mouse model[J]. *J Alzheimers Dis Rep*, 2018, 2(1):79-91. DOI:10.3233/ADR-170049.
- [24] HSIAO K, CHAPMAN P, NILSEN S, et al. Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice[J]. *Science*, 1996, 274(5284): 99-102. DOI: 10.1126/science.274.5284.99.
- [25] SPANGENBERG E E, LEE R J, NAJAFI A R, et al. Eliminating microglia in Alzheimer's mice prevents neuronal loss without modulating amyloid- $\beta$  pathology[J]. *Brain*, 2016, 139(4):1265-1281. DOI:10.1093/brain/aww016.
- [26] BAGLIETTO-VARGAS D, FORNER S, CAI L N, et al. Generation of a humanized  $A\beta$  expressing mouse demonstrating aspects of Alzheimer's disease-like pathology[J]. *Nat Commun*, 2021, 12:2421. DOI:10.1038/s41467-021-22624-z.
- [27] HUR J Y, FROST G R, WU X Z, et al. The innate immunity protein IFITM3 modulates  $\gamma$ -secretase in Alzheimer's disease [J]. *Nature*, 2020, 586(7831):735-740. DOI:10.1038/s41586-020-2681-2.
- [28] BALU D, KARSTENS A J, LOUKENAS E, et al. The role of APOE in transgenic mouse models of AD[J]. *Neurosci Lett*, 2019, 707:134285. DOI:10.1016/j.neulet.2019.134285.
- [29] DUAN A R, JONASSON E M, ALBERICO E O, et al. Interactions between tau and different conformations of tubulin: implications for tau function and mechanism[J]. *J Mol Biol*, 2017, 429(9):1424-1438. DOI:10.1016/j.jmb.2017.03.018.
- [30] GIACOBINI E, GOLD G. Alzheimer disease therapy—moving from amyloid- $\beta$  to tau[J]. *Nat Rev Neurol*, 2013, 9(12):677-686. DOI:10.1038/nrneurol.2013.223.
- [31] JOHNSON K A, SCHULTZ A, BETENSKY R A, et al. Tau positron emission tomographic imaging in aging and early Alzheimer disease[J]. *Ann Neurol*, 2016, 79(1): 110-119. DOI:

- 10.1002/ana.24546.
- [32] LEWIS J, MCGOWAN E, ROCKWOOD J, et al. Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein[J]. *Nat Genet*, 2000, 25(4):402-405. DOI:10.1038/78078.
- [33] SAHARA N, LEWIS J, DETURE M, et al. Assembly of tau in transgenic animals expressing P301L tau: alteration of phosphorylation and solubility[J]. *J Neurochem*, 2002, 83(6): 1498-1508. DOI:10.1046/j.1471-4159.2002.01241.x.
- [34] LEWIS J, DICKSON D W, LIN W L, et al. Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP[J]. *Science*, 2001, 293(5534): 1487-1491. DOI:10.1126/science.1058189.
- [35] D'ABRAMO C, ACKER C M, JIMENEZ H, et al. Passive immunization in JNPL3 transgenic mice using an array of phospho-tau specific antibodies[J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0135774. DOI:10.1371/journal.pone.0135774.
- [36] LAMBOURNE S L, HUMBY T, ISLES A R, et al. Impairments in impulse control in mice transgenic for the human FTDP-17 tau V337M mutation are exacerbated by age[J]. *Hum Mol Genet*, 2007, 16(14):1708-1719. DOI:10.1093/hmg/ddm119.
- [37] TANEMURA K, MURAYAMA M, AKAGI T, et al. Neurodegeneration with tau accumulation in a transgenic mouse expressing V337M human tau[J]. *J Neurosci*, 2002, 22(1):133-141. DOI:10.1523/jneurosci.22-01-00133.2002.
- [38] SCHNÖDER L, GASPARONI G, NORDSTRÖM K, et al. Neuronal deficiency of p38 $\alpha$ -MAPK ameliorates symptoms and pathology of APP or Tau-transgenic Alzheimer's mouse models[J]. *FASEB J*, 2020, 34(7): 9628-9649. DOI: 10.1096/fj.201902731RR.
- [39] SAHARA N, VEGA I E, ISHIZAWA T, et al. Phosphorylated p38MAPK specific antibodies cross-react with sarkosyl-insoluble hyperphosphorylated tau proteins[J]. *J Neurochem*, 2004, 90(4):829-838. DOI:10.1111/j.1471-4159.2004.02558.x.
- [40] ODDO S, CACCAMO A, SHEPHERD J D, et al. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles[J]. *Neuron*, 2003, 39(3): 409-421. DOI: 10.1016/S0896-6273(03)00434-3.
- [41] BILLINGS L M, ODDO S, GREEN K N, et al. Intraneuronal a $\beta$  causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice[J]. *Neuron*, 2005, 45(5): 675-688. DOI:10.1016/j.neuron.2005.01.040.
- [42] HUBER C M, YEE C, MAY T, et al. Cognitive decline in preclinical Alzheimer's disease: amyloid-beta versus tauopathy[J]. *J Alzheimers Dis*, 2018, 61(1): 265-281. DOI: 10.3233/JAD-170490.
- [43] ESCARTIN C, GALEA E, LAKATOS A, et al. Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions[J]. *Nat Neurosci*, 2021, 24(3): 312-325. DOI: 10.1038/s41593-020-00783-4.
- [44] BELFIORE R, RODIN A, FERREIRA E, et al. Temporal and regional progression of Alzheimer's disease-like pathology in 3xTg-AD mice[J]. *Aging Cell*, 2019, 18(1): e12873. DOI:10.1111/ace1.12873
- [45] LE DOUCE J, MAUGARD M, VERAN J, et al. Impairment of glycolysis-derived 1-serine production in astrocytes contributes to cognitive deficits in Alzheimer's disease[J]. *Cell Metab*, 2020, 31(3): 503-517. DOI: 10.1016/j.cmet.2020.02.004.

(收稿日期:2021-12-13 修回日期:2022-05-21)

(本文编辑:丁宇菁,富群华,任益凡)

\*\*\*\*\*

## 《实验动物与比较医学》“前沿文献述评” ——青年编委专栏邀请函

2022年1月,《实验动物与比较医学》在第七届编委会改选之际新成立了青年编委会。本刊青年编委会由44位年龄在45周岁以下、职称在副高以上(或博士学位以上)的青年专家组成,任期2年。为鼓励青年编委在自身能力提升的基础上,增强参与国内外学术交流及期刊建设的积极性和使命感,本刊特开辟针对实验动物与比较医学研究前沿的文献述评专栏。

本专栏来稿的第一作者一般是本刊青年编委。文章要求针对某一重点、热点或新兴研究领域的突破性进展,以国内外最新(3个月内)发表的1~3篇优秀文献为基础,进行方法学介绍、结果点评或类比研究展望。文章内容必须是作者感兴趣的或与所在团队的研究相关,鼓励作者结合本团队的相关研究提出自己的观点和思考,鼓励采用方法学流程图或简略醒目的图片展示结果及作者观点,以便读者学习,字数一般控制在8000字以内。

本专栏的宗旨是普及与提高,并助力青年科研团队建设。因此,也欢迎本刊资深编委专家或国内外高水平研究学者(具有高级职称)积极参与本专栏的撰写工作,也可提供热点资讯或推荐优质青年作者,为我国实验动物与比较医学的科技、人才培养及学术交流平台建设做出积极贡献。

本专栏来稿一律走绿色通道,快审、快编校、快数字出版。发表周期一般控制在2个月。

投稿要求同常规论文,咨询电话:021-50793657。

联系邮箱:bjb50793657@163.com。

投稿地址: <http://www.slarc.org.cn/dwyx>。

《实验动物与比较医学》编辑部