

·基础研究·

Arginase1 敲低通过增强 A β 降解和减轻神经炎症改善 APP/PS1 小鼠认知功能

王清波, 唐姣玲, 郭开华, 徐杰

(中山大学中山医学院解剖学教研室, 广东广州 510080)

摘要:【目的】探讨表达 M2 型小胶质细胞标志物精氨酸酶 1 (Arginase1, Arg1) 敲低对阿尔茨海默病模型小鼠 (APP/PS1) 认知功能的影响。【方法】采用 Arginase1 基因工程小鼠, 分为 C57BL/6 对照组 (WT)、Arginase1 低表达组 (Arg1^{-/-})、阿尔茨海默病小鼠模型组 (APP/PS1)、Arginase1、APP/PS1 转基因小鼠 Arginase1 低表达组 (Arg1^{-/-}; APP/PS1), 旷场实验 (OFT)、Morris 水迷宫 (MWM) 实验分别测试小鼠自主活动和适应能力、学习记忆能力, 硫磺素 S 染色法和免疫荧光染色法检测小鼠脑内 β -淀粉样蛋白 (A β) 沉积; 小鼠海马区域 Arginase1, 小胶质细胞特征性标志物离子钙接头蛋白分子 1 (Iba1)、跨膜蛋白 119 (Tmem119) 及溶酶体蛋白 (CD68) 表达量; ELISA 法检测海马和皮质组织 A β ₁₋₄₀、A β ₁₋₄₂ 表达量, 蛋白免疫印迹 (Western blot) 法检测淀粉样蛋白前体蛋白 (APP)、APP- β 位点剪切酶 (BACE)、脑啡肽酶 (NEP)、白细胞介素-1 β (IL-1 β) 表达量。【结果】OFT 结果显示, 与 APP/PS1 组比较 Arg1^{-/-}; APP/PS1 组在中央格区域的持续时间和运动频率明显增高 ($P < 0.001$); MWM 实验结果显示, 与 APP/PS1 组比较 Arg1^{-/-}; APP/PS1 组小鼠逃避潜伏期明显减少 ($P < 0.001$)、目标象限停留时间和距离及穿越平台次数均明显增多 (均 $P < 0.05$); 硫磺素 S 和免疫荧光染色法测定, 与 APP/PS1 组比较 Arg1^{-/-}; APP/PS1 组海马区域 A β 水平显著降低 ($P < 0.001$), 与 APP/PS1 组比较 Arg1^{-/-}; APP/PS1 组海马区域小胶质细胞表达 CD68 增多 ($P = 0.0392, P = 0.0003$); ELISA 与 Western blot 结果显示, 与 APP/PS1 组比较, Arg1^{-/-}; APP/PS1 组 A β ₁₋₄₀、A β ₁₋₄₂、APP、IL-1 β 水平下降, NEP 蛋白表达量增加 ($P < 0.0001$), BACE 蛋白表达量无明显差异 ($P = 0.4977$)。【结论】在 APP/PS1 模型小鼠中, 下调 Arginase1 可能促进脑内小胶质细胞激活, 上调 A β 降解酶 NEP 水平, 减少脑内 A β 沉积和神经炎症, 从而提高 AD 模型小鼠空间学习能力。

关键词: 精氨酸酶 1; APP/PS1 转基因小鼠; β -淀粉样蛋白

中图分类号: R3 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2022)03-0352-09

DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2022.0303

Arginase1 Knockdown Improves Cognitive Function by Enhancing A β Degradation and Reducing Neuroinflammation in APP/PS1 Mouse

WANG Qing-bo, TANG Jiao-ling, GUO Kai-hua, XU Jie

(Department of Anatomy and Neurobiology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Correspondence to: XU Jie, E-mail: xujie@mail.sysu.edu.cn

Abstract:【Objective】To investigate the effect of the M2 microglia marker Arginase1 (Arg1) knockdown on cognitive function in APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease (AD).【Methods】Arginase1 genetically engineered mice were used and divided into C57BL/6 control group (WT), Arginase1 low expression group (Arg1^{-/-}), Alzheimer's disease mouse model group (APP/PS1), Arginase1, APP/PS1 transgenic mice Arginase1 low expression group (Arg1^{-/-}; APP/PS1). We used open field test (OFT) to assess the autonomous activity and adaptive capacity of mice; morris water

收稿日期: 2022-03-10

基金项目: 国家自然科学基金(81971021), 广东省自然科学基金(2019A1515011184, 2020A151501001)

作者简介: 王清波, 硕士生, 研究方向: 阿尔茨海默病的神经免疫学机制, E-mail: wangqb7@mail2.sysu.edu.cn; 徐杰, 通信作者, 教授, 博士生导师, E-mail: xujie@mail.sysu.edu.cn

maze experiment (MWM) to evaluate learning and memory function of mice; thioflavine-S staining to observe the brain amyloid β -protein (A β) deposition in mice; immunofluorescence staining to detect the expression of microglia markers ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba1), transmembrane protein 119 (Tmem119) and lysosomal protein (CD68); Elisa to determine A β_{1-40} and A β_{1-42} expression in hippocampal and cortical tissues; and protein immunoblot (Western blot) to measure the expression of amyloid precursor protein (APP), beta-site APP-cleaving enzyme (BACE), enkephalinase (NEP), and interleukin-1 β (IL-1 β).【Results】Compared with APP/PS1 group, Arg1^{-/-}; APP/PS1 group showed significantly increased duration and frequency in central area ($P<0.001$); significantly reduced escape latency ($P<0.001$), significantly increased dwell time, path length in the target quadrant and times of crossing the platform (all $P<0.05$); significant decrease of A β deposition in the hippocampus ($P<0.0001$) and significant increased expression of CD68 by microglia in the hippocampal region ($P=0.0392$, $P=0.0003$); decreased levels of A β_{1-40} , A β_{1-42} , APP, IL-1 β and increased expression of NEP protein ($P<0.0001$). No significant difference in BACE protein expression ($P=0.4977$) was found.【Conclusion】Down-regulation of Arg1 may promote microglia activation in the brain, up-regulate the level of A β -degrading enzyme NEP, reduce A β deposition and neuroinflammation in the brain, thus improve the spatial learning capacity of APP/PS1 mouse model of AD.

Key words: Arginase1 (Arg1); APP/PS1 transgenic mice; amyloid β -protein (A β)

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2022, 43(3): 352-360]

β -淀粉样蛋白(amyloid β -protein, A β)聚集形成的神经炎性斑块是较常见的阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)病理特征之一^[1-3]。A β 由淀粉样蛋白前体蛋白(APP)依次被 β -分泌酶和 γ -分泌酶连续式蛋白水解代谢生成^[4],主要生成A β_{1-40} 和A β_{1-42} ,A β_{1-42} 更具神经毒性^[5-7]。研究者对 β -淀粉样蛋白沉积展开研究以寻找靶向治疗药物。百健(Biogen)公司的单抗药物aducanumab(商品名Aduhelm)于去年上市,但临床试验显示这款药物缺乏有效性证据,且超三成受试者存在脑水肿风险^[8-9],因此深入探讨AD的发病机制具有重要意义。文献报道精氨酸代谢抑制剂/阻断剂,可作为有效促进认知和记忆障碍治疗的候选药物^[10]。此外,也有研究表明精氨酸酶1(Arginase1, Arg1)的高表达被认为是AD的一个危险因素,其上调也与其他几种神经系统疾病相关,如多发性硬化症、脑中风和创伤性脑损伤等^[11]。Arg1是氮代谢的关键环节之一,有研究证实它的表达并不局限于肝细胞,它也在整个皮质和皮质下结构的神经元和神经胶质细胞中表达^[12]。小胶质细胞在脑内作为固有神经免疫细胞扮演着吞噬细胞的角色,激活的小胶质细胞分为经典型(M1)或替代激活型(M2),其中,M1型分泌促炎细胞因子,M2型具有抗炎作用加快组织修复^[13]。AD患病时与脑内免疫调节及外周免疫系统都存在密切联系,当机体受到神经炎性斑块损害时,炎症介质参与组织受损和修复,过度的炎

症反应导致继发性神经元损伤,对认知功能的恢复有重要影响^[14]。本实验通过Arg1条件性敲低杂合型小鼠与APP(APP^{swe})/PS1(PSEN1dE9)转基因小鼠杂交构建Arg1基因低表达模型(Arg1^{+/-}; APP/PS1),进一步验证AD初始阶段小胶质细胞的活性和功能变化,以及能否调节神经炎症反应减少神经毒性,探索其在AD疾病进展中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 实验所需动物分为C57BL/6对照组(WT)、Arginase1低表达组(Arg1^{+/-})、阿尔茨海默病小鼠模型组(APP/PS1)、Arginase1, APP/PS1转基因小鼠Arginase1低表达组(Arg1^{+/-}; APP/PS1),均8月龄。C57BL/6小鼠及APP/PS1小鼠购于广东省医学实验动物中心[许可证号:SYXK(粤)2018-0209,SYXK(粤)2017-0081],均在中山大学实验动物中心繁育。饲养于SPF级屏障环境,温度(22 \pm 2) $^{\circ}$ C,相对湿度(55 \pm 5)%,12 h光/暗循环,自由获取水和食物,分组分笼饲养。

本实验所有动物的实验操作和动物处理程序均通过中山大学动物伦理委员会批准[批准编号:SYSU-IACUC-2021-B0045]。

1.1.2 主要试剂 实验使用荧光一抗有Iba-1(1:

1000, Wako), CD68(1:400, Bio-Rad), Arginase1(1:600, CST), Tmem119(1:1000, Abcam), Thioflavin S (Sigma), 荧光二抗有驴抗小鼠 647, 驴抗大鼠 488, 山羊抗兔 555(均 1:1 000, Invitrogen); Western Blot 一抗有 β -actin, APP, BACE(均 1:1 000, CST), NEP(1:1 000, Santa), $A\beta_{1-42}$ (1:1 000, Sigma), 1L-1 β (1:1 000, Affinity), Western Blot 二抗有山羊抗兔 HRP, 山羊抗鼠 HRP(均 1:5 000, 弗德); $A\beta$ Elisa 试剂盒(菲恩)。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 提取及基因分型鉴定 按照动物基因组 DNA 快速抽提试剂盒(碧云天)进行操作。APP/PS1: 5'-GAC TGA CCA CTC GAC CAG GTT CTG-3', 5'-CTT GTA AGT TGG ATT CTC ATA TCC G-3'; Arg1^{+/+}/Arg1^{-/-}: 5'-CTG AGA TCA TGG GAC CTC GT-3', 5'-GCC AGA GGC CAC TTG TGT AG-3', 5'-TTC ACA CGC CTT CTT TTC CT-3'。Arg1^{+/+}: 200 bp/414 bp, Arg1^{-/-}: 200 bp, APP/PS1: 350 bp。

1.2.2 旷场实验 将小鼠放入 40 cm×40 cm×40 cm 的不透明反应箱内, 反应箱底面积中心二分之一的区域为中央区, 其余为边缘区。数据采集系统记录小鼠 10 min 内的活动轨迹, 包括总运动距离, 中央区进入频次, 中央区停留时间, 中央区运动路程。每轮实验后使用 75% 乙醇擦拭反应箱, 尽可能减小实验动物的气味对实验的影响。

1.2.3 Morris 水迷宫实验 反应池划分 4 个象限, 在第 III 象限中心水面下 1 cm 放置直径 8 cm 的透明平台。实验前 5 d 每天将小鼠依次从 4 个象限边缘中心处放入水中进行训练, 每次 60 s。反应池顶部采集系统记录小鼠游泳轨迹、逃避潜伏期和游泳速度。定位航行学习结束 1 d 内进行空间探索实验, 撤去平台记录小鼠 60 s 内穿越平台次数, 平台象限停留时间和游泳速度。

1.2.4 荧光染色方法 小鼠经腹腔注射 1% 戊巴比妥钠(45 mg/Kg)进行深度麻醉, 灌注, 冰上取脑, 一半分离海马和皮质, 另一半于 40 g/L 多聚甲醛固定 24 h 后蔗糖溶液梯度脱水, 进行冰冻切片(厚度 40 μ m)。硫磺素 S 染色: 脑片于 3% H₂O₂ 中室温孵育 10 min, 0.5% 硫磺素 S 溶液中室温孵育 30 min, 50% 乙醇溶液和 0.01 mol/L PBS 溶液依次漂洗, 晾干, 封片保存; 免疫荧光染色: 脑片于 1% BSA 封闭液(10% Donkey serum and 0.3% TritonX-100 in

0.01M PBS 溶液)中 37 °C 封闭 30 min, 随后加入一抗溶液 37 °C 孵育 2 h, 4 °C 孵育过夜。加入二抗溶液 37 °C 避光孵育 2 h, PBS 洗 3 次, 晾干, 封片保存。激光扫描共聚焦显微镜进行观察并拍照, Image J 软件对荧光强度进行半定量分析。

1.2.5 酶联免疫吸附剂测定 BCA 法检测样本蛋白浓度, Elisa 步骤按照说明书进行。酶标仪测定 OD 值 450 nm 的吸光度, 绘制标准曲线, 计算样本蛋白浓度, 记录数据用于分析。

1.2.6 蛋白免疫印迹 使用等浓度等体积样本蛋白按比例加入蛋白上样缓冲液。12% PAGE 蛋白预制胶凝胶电泳以恒压 160 V/50 min 分离目的蛋白, 恒流 350 mA/60 min 电转至 PVDF 膜, 5% BSA(牛血清蛋白)封闭液室温封闭 1 h。裁下相应条带的膜放入一抗稀释液中 4 °C 孵育 16 h。再置于相应的二抗稀释液中室温孵育 2 h。化学发光成像系统下采集图像, 用于实验数据分析。

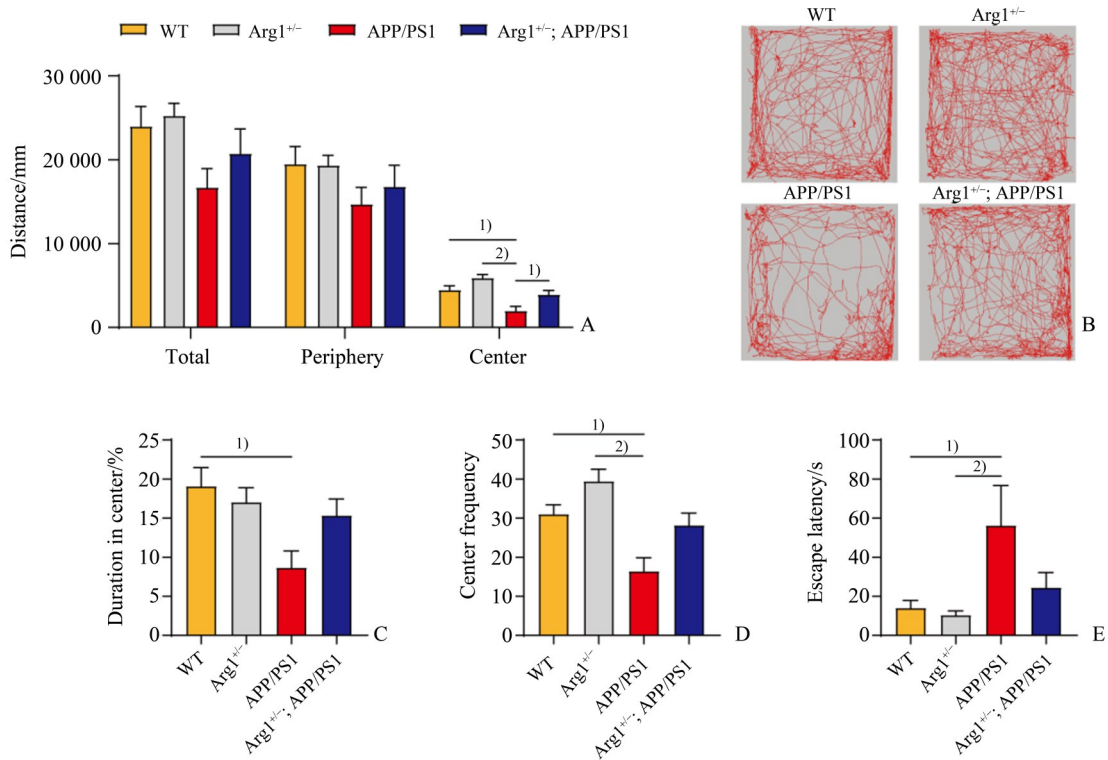
1.2.7 统计学处理 使用 GraphPad Prism 8 软件进行统计学分析, 实验计量数据以均数 \pm 标准误(Means \pm SEM)表示。数据经 Shapiro-Wilk 检验是否符合正态性分布, 每组数据都呈正态分布并且方差齐性, 采用单因素方差分析(one-way ANOVA), 其中 MWM 实验定位航行学习阶段数据用重复测量双因素方差分析(two-way ANOVA), Bonferroni 法进行多重比较, $P < 0.05$ 时被认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠在陌生环境中的自主活动、探索能力及焦虑行为的变化

通过旷场实验探究小鼠自主活动、探索能力及焦虑行为的影响, 如图 1。与 APP/PS1 组比较, WT 组小鼠在进入陌生环境中(中央区)的频次更多(图 1D, $P=0.0113$); 与 APP/PS1 组比较, WT 组、Arg1^{+/+}组小鼠停留时间更长(图 1C, $P=0.0137$; $P < 0.0001$), 进入中央区的逃避潜伏期更短(图 1E, $P=0.0047$; $P=0.0019$); 与 APP/PS1 组比较, Arg1^{+/+}; APP/PS1 组虽差异无统计学意义($P > 0.05$), 但呈现优于 APP/PS1 组的趋势。单因素方差分析结果显示各组小鼠在中央区活动距离差异具有统计学意义(图 1A, $F_{(3, 28)}=12.26$, $P < 0.0001$); WT 组、Arg1^{+/+}组和 Arg1^{-/-}; APP/PS1 组小鼠的总活动距离和边缘

区活动距离虽优于APP/PS1组,但差异无统计学意义(图1A, $P>0.05$)。



A: Cumulative distance travelled (mm) in the entire box (total), the periphery and the center zone during the 10 min session in the OFT. B: Representative tracks of movement patterns of mice in an open field box. C: The percent time that was spent in the center zone during 10 min sessions in the OFT. D: Entries into the center zone during the 10 min session in the OFT. E: Escape latencies in the center zone. Data are presented as the Means \pm SEM. ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, compared with APP/PS1 group after ANOVA, $n=8$).

图1 旷场实验比较各组小鼠的探究行为与焦虑行为

Fig. 1 The exploratory behaviors and anxiety behaviors of mice were compared in OFT

2.2 各组小鼠认知功能的变化

旷场实验结束1 d后采用Morris水迷宫实验对各组小鼠的学习认知功能进行评估,如图2。结果显示,定位航行的训练阶段最后1 d WT组、Arg1^{+/-}和Arg1^{+/-};APP/PS1组逃避潜伏期较APP/PS1组相比显著缩短(图2A, $P=0.0117$; $P=0.0017$; $P=0.0005$);空间探索阶段,WT组和Arg1^{+/-};APP/PS1组在目标象限游泳时间占比(图2B, $P=0.0321$; $P=0.0100$)、距离占比(图2B, $P=0.0084$; $P=0.0021$)和穿越平台次数(图2C, $P=0.0284$; $P=0.0149$)与APP/PS1组相比明显增多,游泳速度并没有明显差异(图2D, $P>0.05$)。

2.3 硫磺素S染色

为验证Arg1敲低对脑内A β 斑块沉积有无影响,采用硫磺素S染色分析小鼠脑内A β 斑块负荷程度(图3),结果显示,与APP/PS1组小鼠比较,WT组和Arg1^{+/-};APP/PS1组小鼠海马和皮质内A β 斑块

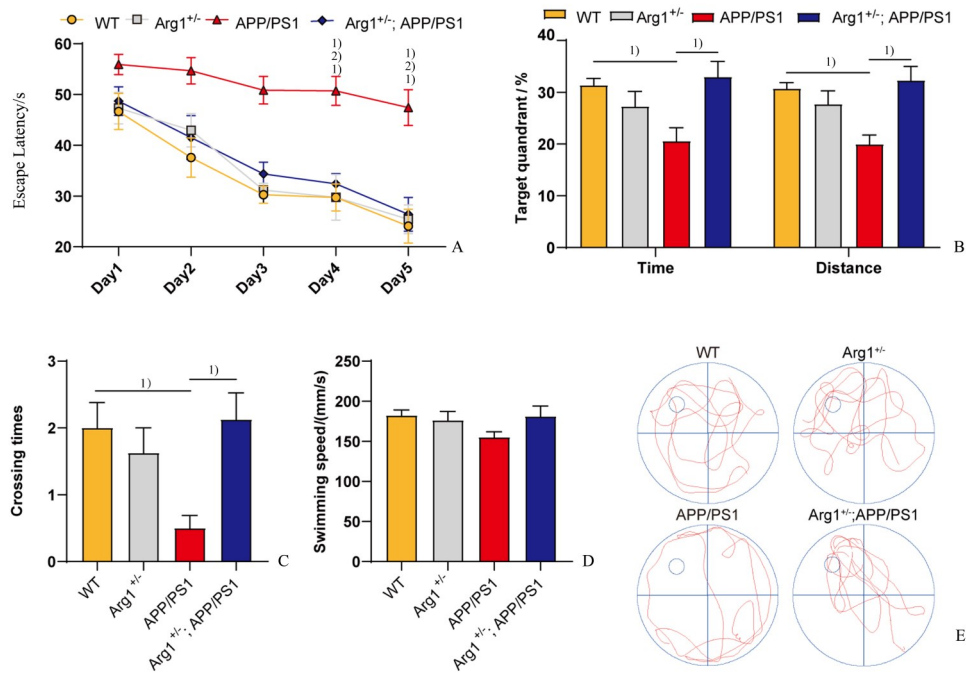
面积(图3B, $P<0.0001$; $P=0.0002$)及数量明显减少(图3C, $P<0.0001$; $P<0.0001$)。

2.4 各组小鼠小胶质细胞相关指标的变化情况

与APP/PS1组小鼠相比,WT组、Arg1^{+/-}组和Arg1^{+/-};APP/PS1组小鼠A β 斑块总面积及所占百分比均显著减少(图4A,B)。采用免疫荧光染色检测小胶质细胞相关指标Tmem119、Iba1、CD68、Arg1表达情况(图4),结果显示各组小鼠小胶质细胞表达无显著差异(Iba1/Tmem119;图4A,C),与APP/PS1组小鼠相比,WT组、Arg1^{+/-}组和Arg1^{+/-};APP/PS1组小鼠海马区域小胶质细胞表达CD68明显增多(TMEMP11/CD68, Arg1/CD68;图4D,E)。

2.5 各组小鼠海马和皮质区域A β_{1-40} 、A β_{1-42} 水平

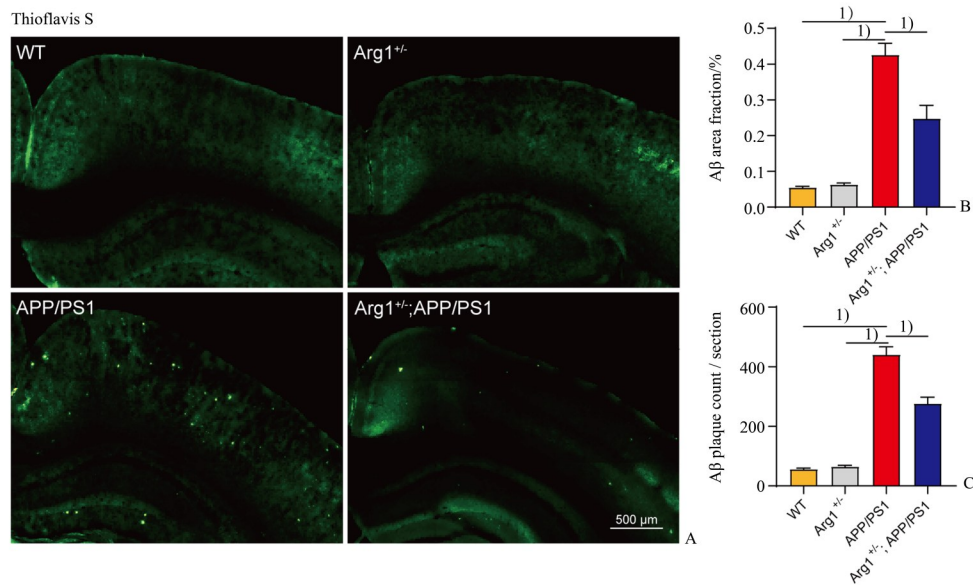
随后各组小鼠经Elisa试剂盒检测皮质和海马组织A β_{1-40} 、A β_{1-42} 的水平,如图5。小鼠海马和皮质组织A β_{1-40} 、A β_{1-42} 水平经重复测量单因素方差分析结果显示:各组间差异具有统计学意义($F_{(3,28)} =$



A: Escape latencies in the hidden platform phase and escape latencies was significantly improved in the other groups on Day4 and Day5 compared to the APP/PS1 group. B: In the probe phase, data are presented as the percent time and percent distance in the target quadrant. C: In the probe phase, the times of crossing platform in the target quadrant. D: Swimming speed observed in the probe phase. E: Representative tracks of movement of mice in a pool. Data are presented as the Means \pm SEM. ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, compared with APP/PS1 group (A: two-way ANOVA, B-D: one-way ANOVA; $n = 8$).

图2 Morris水迷宫实验比较各组小鼠认知功能

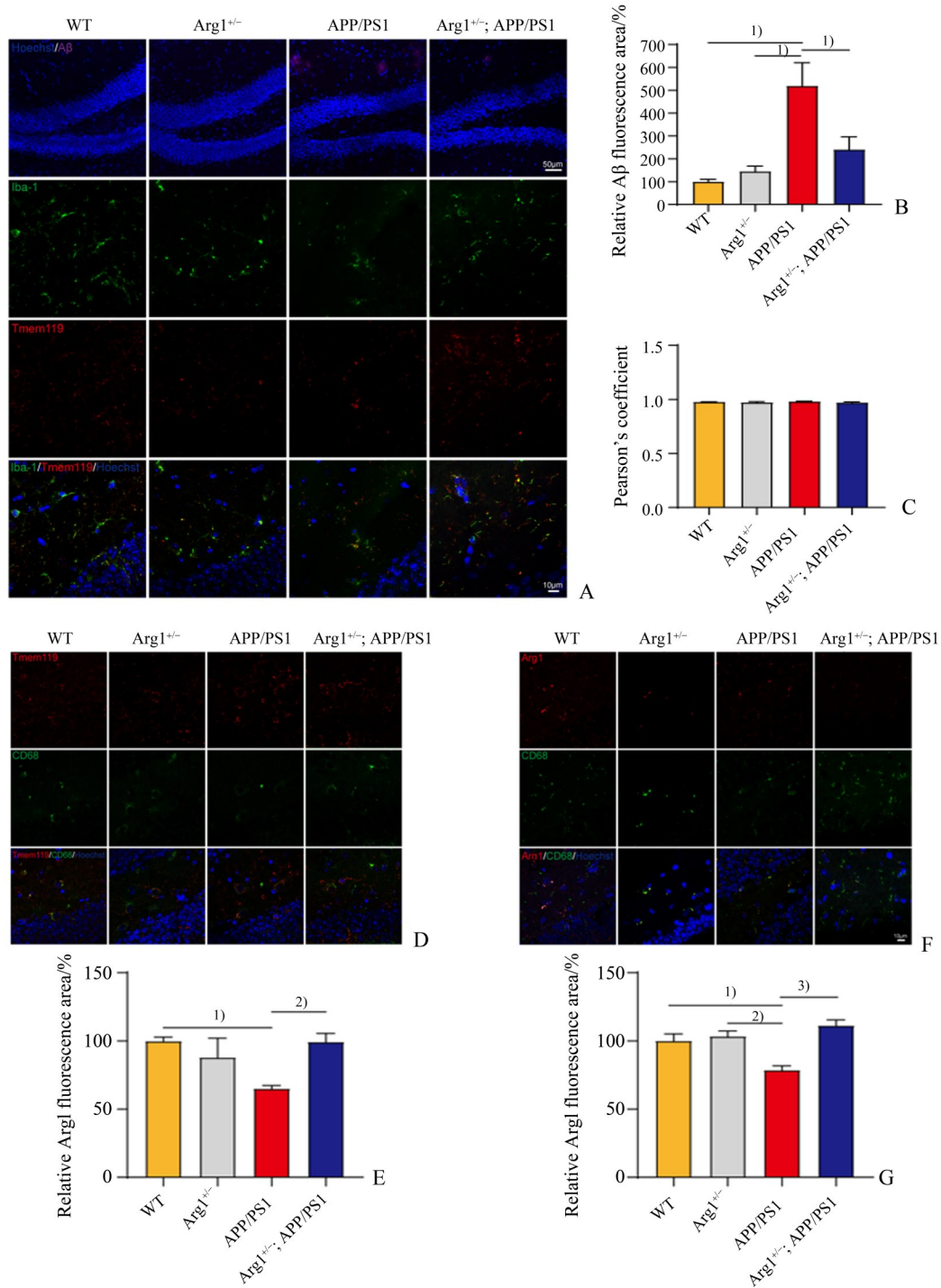
Fig. 2 The cognitive functions of mice in each group were compared by MWM



A: Representative pictures of mouse cerebral Aβ plaque staining by Thioflavin S (green). B: Take 8 equal distance brain slices from each group for Thioflavin S staining, the percentage of stained plaque was analyzed quantitatively. C: The average number of plaques on each slice was analyzed quantitatively. Data are presented as the Means \pm SEM. ¹⁾ $P < 0.001$, compared with APP/PS1 group after ANOVA, $n = 8$.

图3 硫磺素S染色比较Aβ面积及数量

Fig. 3 Comparison of Aβ area and number by Thioflavin S staining



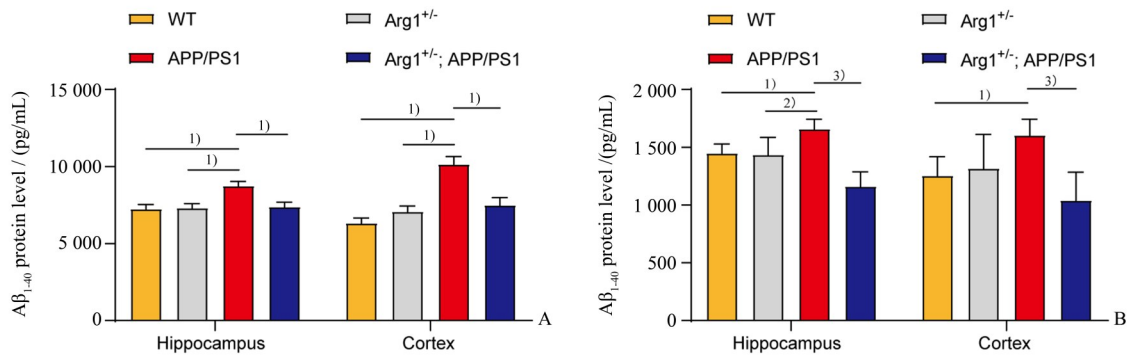
A: Aβ, Iba1 and Tmem119 immunofluorescence of hippocampus in each group (200×, 630×). B: Relative Aβ fluorescence area in each group, n=6. ¹⁾ P<0.05. C: Pearson's coefficient in each group, n=6, all P>0.05. D-E: Tmem119 and CD68 immunofluorescence of hippocampus in each group (630×) and Relative CD68 fluorescence area in each group, n=6. ¹⁾ P=0.0338, ²⁾ P=0.0392 after ANOVA. F-G: Arg1 and CD68 immunofluorescence of hippocampus in each group (630×) and relative Arg1 fluorescence area in each group, n=6. ¹⁾ P<0.05, ²⁾ P<0.01, ³⁾ P<0.001.

图4 免疫荧光法检测小鼠海马区域Aβ、Iba1、Tmem119、CD68、Arg1表达情况

Fig. 4 Immunofluorescence intensities of mouse hippocampal Aβ, Iba1, Tmem119, CD68, Arg1

5.530, $P=0.004\ 1$; $F_{(3, 28)}=14.5$, $P<0.000\ 1$; $F_{(3, 28)}=25.12$, $P<0.000\ 1$; $F_{(3, 28)}=8.911$, $P<0.000\ 3$)。与 APP/PS1 组小鼠比较, WT 组、Arg1^{+/-} 组和 Arg1^{+/-}; APP/PS1 组小鼠海马和皮质 A β_{1-40} 水平明显减少 (图 5A), 差异具有统计学差异 ($P=0.010\ 3$, $P<$

0.000 1; $P=0.014\ 4$, $P=0.000\ 2$; $P=0.023\ 7$, $P=0.001\ 1$); 与 APP/PS1 组小鼠比较, WT 组和 Arg1^{+/-}; APP/PS1 组小鼠海马和皮质 A β_{1-42} 水平同样明显减少 (图 5B), 差异具有统计学差异 ($P=0.006\ 0$, $P=0.022\ 2$; $P<0.000\ 1$, $P=0.000\ 1$)。



A: The level of A β_{1-40} in hippocampus and cortex in each group, $n=8$, $F=5.530$, $P=0.004\ 1$; $F=14.5$, $P<0.000\ 1$, ¹⁾ $P<0.05$. B: The level of A β_{1-42} in hippocampus and cortex in each group, $n=8$, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.001$, ³⁾ $P<0.001$.

图5 小鼠海马和皮质组织 A β_{1-40} 、A β_{1-42} 表达量

Fig. 5 Expression of A β_{1-40} and A β_{1-42} in hippocampal and cortical tissues of mice

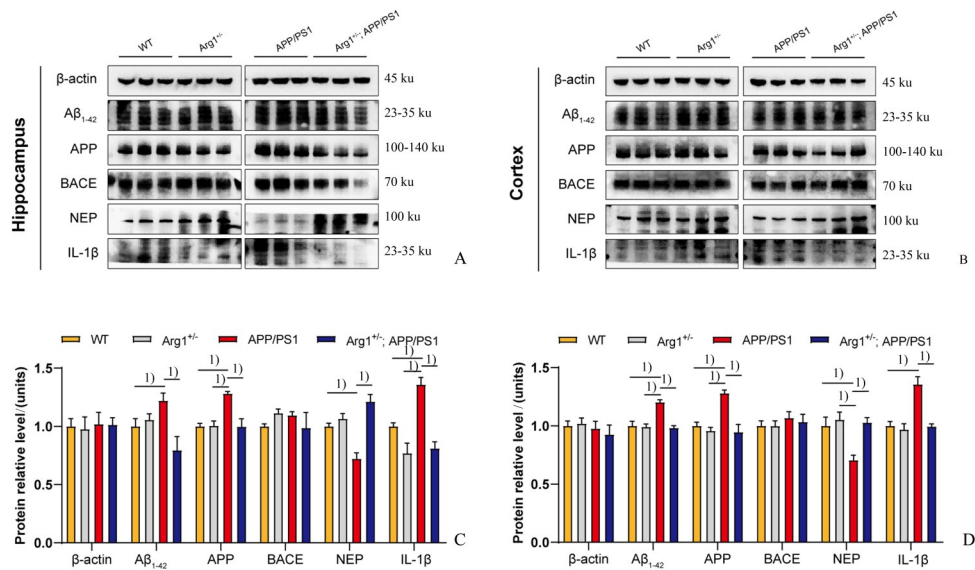
2.6 各组小鼠海马和皮质 A β_{1-42} 、APP、BACE、NEP、IL-1 β 蛋白的表达

Western blot 结果 (图 6): 海马各组间 A β_{1-42} 、APP、NEP、IL-1 β 水平差异具有统计学意义 ($F_{(3, 20)}=4.845$, $P=0.010\ 8$; $F_{(3, 20)}=5.059$, $P=0.009\ 1$; $F_{(3, 20)}=18.88$, $P<0.000\ 1$; $F_{(3, 20)}=19.14$, $P<0.000\ 1$), 采用 Bonferroni 法进行统计假设检验多重比较, 和 APP/PS1 组小鼠比较, WT 组与 Arg1^{+/-}; APP/PS1 组小鼠 A β_{1-42} 、APP、IL-1 β 水平明显升高 ($P<0.05$), 和 APP/PS1 组小鼠比较, WT 与 Arg1^{+/-}; APP/PS1 组小鼠 NEP 水平明显减少 ($P<0.05$), 各组 BACE 含量比较无统计学意义 ($F_{(3, 20)}=0.820\ 7$, $P=0.497\ 7$); 皮质各组间 A β_{1-42} 、APP、NEP、IL-1 β 水平差异具有统计学意义 ($F_{(3, 20)}=15.05$, $P<0.000\ 1$; $F_{(3, 20)}=13.62$, $P<0.000\ 1$; $F_{(3, 20)}=7.616$, $P=0.001\ 4$; $F_{(3, 20)}=15.95$, $P<0.000\ 1$), Bonferroni 法进行多重比较, 和 APP/PS1 组小鼠比较, WT 组与 Arg1^{+/-}; APP/PS1 组小鼠 A β_{1-42} 、APP、IL-1 β 水平明显升高 ($P<0.05$), 和 APP/PS1 组小鼠比较, WT 组与 Arg1^{+/-}; APP/PS1 组小鼠 NEP 水平明显减少 ($P<0.05$), 各组 BACE 含量比较差异无统计学意义 ($F_{(3, 20)}=0.373\ 5$, $P=0.773\ 0$)。

3 讨论

阿尔茨海默病是最常见的神经退行性疾病之一, 病理表现包括神经炎性斑块异常聚集、神经细胞丧失和记忆功能衰退, 临床症状出现前很多年便可发现 A β 沉积^[15-16]。这种病目前尚且无法治愈, 药物治疗的预后并不理想。小胶质细胞作为中枢神经系统固有免疫效应细胞, 参与 AD 的进程, 调控脑内神经功能^[17-18]。精氨酸酶 1 是活化的 M2 型小胶质细胞标志物, 表达 Arg1 的小胶质细胞聚集 A β 斑块附近, 分泌抗炎因子和神经营养因子起到保护作用, M1 型小胶质细胞的激活主要起到释放炎症因子及吞噬等作用^[19-21]。

我们通过条件性基因敲低技术下调了野生型小鼠和转 APP/PS1 基因型痴呆模型小鼠肝细胞及中枢神经系统的 Arg1 表达量, 使用杂合型小鼠进行本研究的研究。在本研究中, 旷场实验及 Morris 水迷宫实验表明, 与 APP/PS1 组小鼠相比, WT 组、Arg1^{+/-} 组和 Arg1^{+/-}; APP/PS1 组小鼠的学习认知功能显著提高, 且荧光染色结果显示 A β 病理炎性斑块含量明显降低, 提示下调 Arg1 基因可以进行早期干预保护神经元提高小鼠学习记忆能力。有研究报道骨髓巨噬细胞和中枢小胶质细胞同时向 M2 型极化, 可以改善阿尔茨海默病模型鼠的学习



A, B: Western blot analysis was used. C, D: β-actin、Aβ₁₋₄₂、APP、BACE、NEP、IL-1β protein in colons of mice, n=6; ¹⁾P < 0.05 between two groups by bonferroni after ANOVA.

图6 小鼠海马和皮质组织Aβ₁₋₄₂、APP、BACE、NEP、IL-1β蛋白表达量

Fig. 6 The expression level of Aβ₁₋₄₂、APP、BACE、NEP、IL-1β in hippocampal and cortical tissues of mice

记忆功能^[22]。本研究中,我们通过荧光染色、Elisa与Western blot检测均可见Arg1^{-/-};APP/PS1组小鼠Aβ水平明显降低,因此,我们推测敲低Arg1激活小胶质细胞发挥吞噬作用(Tmem119/CD68, Arg1/CD68)也能够改善AD小鼠的认知缺陷。大多数小胶质细胞处于静息状态,发挥着“清道夫”的作用维持神经系统微环境的稳态,被激活后便具有吞噬能力,产生促炎和抗炎细胞因子、趋化因子等,对神经发育起到重要作用,但是长期处于激活状态的小胶质细胞会加剧神经炎症反应^[23-25]。CD68在活化的小胶质细胞中水平上调,具有吞噬活性,可能是由于参与AD早期进程清除了炎性斑块的沉积。肽啡酶(nepri-lysin, NEP)是Aβ的主要代谢限速酶,本研究中Western blot结果提示Arg1^{-/-};APP/PS1组小鼠NEP表达水平显著升高,NEP的分泌可能与Arg1呈现负相关的联系。临床研究中AD患者存在Aβ代谢障碍,这可能是由于小胶质细胞长期处于炎症环境下其Aβ降解酶表达水平会随之下落。此外,Arg1^{-/-};APP/PS1组小鼠可IL-1β表达水平明显下降,可推测下调

Arg1能够减轻炎症损伤从而保护神经元。此外值得一提的是,本研究中检测参与淀粉样蛋白前体蛋白(Aβ precursor protein, APP)的转运加工生成Aβ的APP-β位点剪切酶(β-site APP-cleaving enzyme, BACE),我们发现各组小鼠BACE表达水平并没有明显差异,因此可以推测APP会增加脑组织Aβ含量,但与BACE活性没有明显联系。

综上所述,小胶质细胞极化状态的调节对神经系统免疫性疾病进行干预具有重要意义,由于其受到不同刺激后既能够分泌具有神经毒性的炎性物质,又能分泌神经营养因子及抗炎因子减轻炎症损伤保护神经元。本研究结果表明下调Arg1基因可增强Aβ的清除,提高APP/PS1小鼠学习认知能力,其机制可能是通过早期激活小胶质细胞发挥吞噬作用,促进Aβ降解酶NEP表达增加,减少神经炎症和脑内Aβ沉积。本研究为阿尔兹海默症治疗研究提供潜在治疗策略,详细的作用机制有待进一步探索。

致谢:感谢中山大学中山医学院姚志彬教授课题组对本实验工作的指导。

参考文献

[1] Tiwari S, Atluri V, Kaushik A, et al. Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics [J].

Int J Nanomedicine, 2019, 14: 5541-5554.
[2] 2021 Alzheimer's disease facts and figures [J]. Al-

- zheimers Dement, 2021, 17(3): 327–406.
- [3] Li F, Qin W, Zhu M, et al. Model-based projection of dementia prevalence in China and worldwide: 2020–2050 [J]. *J Alzheimers Dis*, 2021, 82(4): 1823–1831.
- [4] Maesako M, Houser MC, Turchyna Y, et al. Presenilin/ γ -secretase activity is located in acidic compartments of live neurons [J]. *J Neurosci*, 2022, 42(1): 145–154.
- [5] Fujita Y, Maeda T, Sato C, et al. Engulfment of Toxic Amyloid beta-protein in Neurons and Astrocytes Mediated by MEGF10 [J]. *Neuroscience*, 2020, 443: 1–7.
- [6] Villemagne VL, Burnham S, Bourgeat P, et al. Amyloid beta deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: a prospective cohort study [J]. *Lancet Neurol*, 2013, 12(4): 357–367.
- [7] Ashok A, Singh N, Chaudhary S, et al. Retinal degeneration and Alzheimer's disease: An Evolving Link [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(19).
- [8] Salloway S, Chalkias S, Barkhof F, et al. Amyloid-related imaging abnormalities in 2 phase 3 studies evaluating Aducanumab in patients with early Alzheimer disease. *JAMA Neurol*. 2022, 79(1): 13–21.
- [9] Alexander GC, Emerson S, Kesselheim AS. Evaluation of Aducanumab for Alzheimer disease: scientific evidence and regulatory review involving efficacy, safety, and futility. *JAMA*. 2021, 325(17): 1717–1718.
- [10] Ovsepian SV, O'Leary VB. Can Arginase Inhibitors be the answer to therapeutic challenges in Alzheimer's disease? [J]. *Neurotherapeutics*, 2018, 15(4): 1032–1035.
- [11] Caldwell RB, Toque HA, Narayanan SP, et al. Arginase: an old enzyme with new tricks [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2015, 36(6): 395–405.
- [12] Mills CD. M1 and M2 Macrophages: Oracles of health and disease [J]. *Crit Rev Immunol*, 2012, 32(6): 463–488.
- [13] Ma C, Hunt JB, Kovalenko A, et al. Myeloid Arginase 1 insufficiency exacerbates Amyloid-beta associated neurodegenerative pathways and glial signatures in a mouse model of Alzheimer's disease: a targeted transcriptome analysis [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 628156.
- [14] Ozben T, Ozben S. Neuro-inflammation and anti-inflammatory treatment options for Alzheimer's disease [J]. *Clin Biochem*, 2019, 72: 87–89.
- [15] Chancellor B, Duncan A, Chatterjee A. Art therapy for Alzheimer's disease and other dementias [J]. *J Alzheimers Dis*, 2014, 39(1): 1–11.
- [16] Calsolaro V, Edison P. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: current evidence and future directions [J]. *Alzheimers Dement*, 2016, 12(6): 719–732.
- [17] Lian H, Litvinchuk A, Chiang AC, et al. Astrocyte-microglia cross talk through complement activation modulates Amyloid pathology in mouse models of Alzheimer's disease [J]. *J Neurosci*, 2016, 36(2): 577–589.
- [18] Liu RT, Gao J, Cao S, et al. Inflammatory mediators induced by amyloid-beta in the retina and RPE in vivo: implications for inflammasome activation in age-related macular degeneration [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54(3): 2225–2237.
- [19] Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion MK. Arginase 1+ microglia reduce A β plaque deposition during IL-1 β -dependent neuroinflammation. *J Neuroinflammation*. 2015, 12:203.
- [20] Rangaraju S, Dammer EB, Raza SA, et al. Identification and therapeutic modulation of a pro-inflammatory subset of disease-associated-microglia in Alzheimer's disease [J]. *Mol Neurodegener*, 2018, 13(1): 24.
- [21] Hansen DV, Hanson JE, Sheng M. Microglia in Alzheimer's disease [J]. *J Cell Biol*, 2018, 217(2): 459–472.
- [22] Zhu D, Yang N, Liu YY, et al. M2 Macrophage transplantation ameliorates cognitive dysfunction in Amyloid- β -treated rats through regulation of microglial polarization. *J Alzheimers Dis*. 2016, 52(2): 483–95.
- [23] Xie L, Zhang N, Zhang Q, et al. Inflammatory factors and amyloid beta-induced microglial polarization promote inflammatory crosstalk with astrocytes [J]. *Ageing (Albany NY)*, 2020, 12(22): 22538–22549.
- [24] 陈冬萍, 肖建民, 董志会, 等. 左旋聚乳酸对单核细胞来源巨噬细胞 M1/M2 极化的影响及姜黄素的干预作用 [J]. *广东医学*, 2020, 41(11): 1139–1144. Chen DP, Xiao JM, Dong ZH, et al. Effect of levopoly-lactic acid on M1/M2 polarization in monocyte-derived macrophages and the interventional effect of curcumin [J]. *Guangdong Med J*, 2020, 41(11): 1139–1144.
- [25] 万亚会, 吴伟, 张轩, 等. 慢性睡眠剥夺对小鼠海马胶质细胞 $\alpha 7$ -nAChR 影响的研究 [J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2019, 45(8): 477–482. Wan YH, Wu W, Zhang X, et al. Effect of chronic sleep deprivation on $\alpha 7$ -nAChR in mouse hippocampal glial cells [J]. *Chin J Nerv Mental Dis*, 2019, 45(8): 477–482.