

·老年性痴呆专题·

## $\beta$ -淀粉样蛋白对叉头蛋白 O3a 和突触后致密蛋白 95 的影响

牛波, 王欣怡, 徐江平, 汪海涛

(南方医科大学药学院神经药理学科, 广东广州 510515)

**摘要:**【目的】为了研究 $\beta$ -淀粉样蛋白(A $\beta$ )产生神经毒性的机制,本研究探讨了A $\beta$ 对凋亡相关核转录因子叉头蛋白 O3a (FoxO3a)和突触后致密蛋白 95 (PSD95)的作用及可能的机制。【方法】采用梯度浓度(5、10、20  $\mu$ mol/L)寡聚化的A $\beta_{25-35}$ 处理PC12细胞和神经元24 h,采用Western blot法检测FoxO3a和PSD95的变化。免疫荧光法检测PC12细胞中PSD95表达量的变化和FoxO3a在细胞内的定位。在A $\beta_{25-35}$ 海马注射的大鼠和APP/PS1转基因鼠中,考察脑组织中PSD95和FoxO3a的变化。采用Western Blot法检测体外环境和在体环境中,A $\beta$ 对FoxO3a和蛋白激酶B(AKT)磷酸化的影响。【结果】与正常对照组相比,20  $\mu$ mol/L的A $\beta_{25-35}$ 处理组PSD95蛋白水平下调至(45.09 $\pm$ 1.61)% ( $F=7.487$ ,  $P=0.0540$ )。与之对应,20  $\mu$ mol/L的A $\beta_{25-35}$ 上调FoxO3a的蛋白水平为对照组的(228.7 $\pm$ 20.44)% ( $F=17.48$ ,  $P=0.0210$ )。在原代培养的神经元中,获得了相似的结果。另外,免疫荧光的结果显示A $\beta_{25-35}$ 可以促进FoxO3a进入细胞核。大鼠海马注射A $\beta_{25-35}$ 后,水迷宫实验中目标区域的平均停留时间为(24.35 $\pm$ 1.29) s ( $F=2.843$ ,  $P=0.098$ ),平均穿越次数为(2.53 $\pm$ 0.49)次 ( $F=3.459$ ,  $P=0.0149$ ),与对照组相比都显著降低。RT-PCR结果显示A $\beta_{25-35}$ 组大鼠海马组织中PSD95的mRNA水平下降为对照组的(58.40 $\pm$ 8.28)% ( $F=1.193$ ,  $P=0.0101$ ),同时FoxO3a的mRNA的表达量上调(140.90 $\pm$ 7.45)% ( $F=2.378$ ,  $P=0.0496$ )。在7月龄的APP/PS1转基因小鼠的大脑组织中,PSD95的mRNA和蛋白水平分别下调为野生型小鼠的(60.89 $\pm$ 1.53)% ( $F=20.05$ ,  $P=0.0088$ )和(59.63 $\pm$ 13.55)% ( $F=8.496$ ,  $P=0.0445$ ),而FoxO3a的mRNA和蛋白水平则分别上调为对照组的(172.4 $\pm$ 4.87)% ( $F=2.351$ ,  $P=0.0004$ )和(235.00 $\pm$ 39.03)% ( $F=2.754$ ,  $P=0.0320$ )。20  $\mu$ mol/L的A $\beta_{25-35}$ 处理PC12细胞不同时间后(5、10、20和40 min),FoxO3a和AKT的磷酸化水平随着时间增长而降低,APP/PS1转基因小鼠脑组织中的AKT和FoxO3a的磷酸化水平与对照组相比也显著下降至(65.75 $\pm$ 3.51)% ( $F=6.362$ ,  $P=0.0236$ )和(46.62 $\pm$ 9.64)% ( $F=8.562$ ,  $P=0.0079$ )。【结论】A $\beta$ 在体外细胞模型和体内动物模型中都可以上调核转录因子FoxO3a的表达,下调PSD95的水平,可能的机制是通过磷酸化AKT从而减少了PSD95的合成,同时降低了FoxO3a的磷酸化水平并增加FoxO3a的表达量。

**关键词:**  $\beta$ -淀粉样蛋白;叉头框蛋白 O3a;突触后致密蛋白 95;蛋白激酶 B;老年性痴呆

中图分类号:R741.02

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2021)05-0676-10

DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2021.0505

## Effects of $\beta$ -amyloid on the Expression of Forkhead Protein O3a and Postsynaptic Density Protein 95

NIU Bo, WANG Xin-yi, XU Jiang-ping, WANG Hai-tao

(Department of Neuropharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Correspondence to: WANG Hai-tao, E-mail: wht821@smu.edu.cn

**Abstract:**【Objective】To understand the mechanism of  $\beta$ -amyloid (A $\beta$ )-induced neurotoxicity, this study aimed to investigate the effects and possible pathways of A $\beta$  on apoptosis-related nuclear transcription forkhead protein O3a (FoxO3a) and postsynaptic density protein 95 (PSD95).【Methods】PC12 cells and neurons were treated with gradient

收稿日期:2021-05-07

基金项目:国家自然科学基金(81301099)

作者简介:牛波,在读博士研究生,研究方向:神经药理学,E-mail: hongyaofe@163.com;汪海涛,通信作者,硕士研究生导师,副教授,研究方向:神经退行性疾病药物靶点研究,E-mail: wht821@smu.edu.cn

concentrations (5, 10, 20  $\mu\text{mol/L}$ ) of  $\text{A}\beta_{25-35}$  for 24 h, and the alterations of FoxO3a and PSD95 were detected by RT-PCR and Western blot. Immunofluorescence assay was used to detect the level of PSD95 in PC12 cells and the subcellular localization of FoxO3a in the cells. Then in rats injected with  $\text{A}\beta_{25-35}$  and *APP/PS1* transgenic mice, the changes of PSD95 and FoxO3a in brain tissue were investigated. Western Blot was used to detect the effects of  $\text{A}\beta$  on the phosphorylation of FoxO3a and protein kinase B (AKT) *in vitro* and *in vivo*.【Results】 Compared with cells in the normal control group, the protein levels of PSD95 in the cells treated with  $\text{A}\beta_{25-35}$  at the dosage of 20  $\mu\text{mol/L}$  were down-regulated to  $(45.09\pm 1.61)\%$  ( $P=0.0540$ ). Correspondingly, the protein levels of FoxO3a were increased to  $(228.70\pm 20.44)\%$  ( $F=17.48, P=0.0210$ ) when the cells were treated with 20  $\mu\text{mol/L}$  of  $\text{A}\beta_{25-35}$ . In the primary cultured neurons, similar results were obtained. In addition, the results of immunofluorescence showed that  $\text{A}\beta_{25-35}$  promoted the nuclear translocation of FoxO3a. The residence time of  $\text{A}\beta_{25-35}$ -injected group was  $(24.35\pm 1.29)$  s ( $F=2.843, P=0.098$ ) and the number of crossings was  $2.53\pm 0.49$  ( $F=3.459, P=0.0149$ ) of rats in the water maze test. There was significant difference between the CTL group and  $\text{A}\beta_{25-35}$ -injected group ( $P<0.05$ ). The RT-PCR assay showed that the mRNA level of PSD95 in the hippocampus of rats treated with  $\text{A}\beta_{25-35}$  was decreased to  $(58.40\pm 8.28)\%$  ( $F=1.193, P=0.0101$ ) of that in the CTL group, and the mRNA expression of FoxO3a was increased to  $(140.90\pm 7.45)\%$  ( $F=2.378, P=0.0496$ ). In the brain tissue of 7-month-old *APP/PS1* transgenic mice, the mRNA and protein levels of PSD95 were down-regulated to  $(60.89\pm 1.53)\%$  ( $F=20.05, P=0.0088$ ) and  $(59.63\pm 13.55)\%$  ( $F=8.496, P=0.0445$ ). Meanwhile the mRNA and protein levels of FoxO3a were up-regulated to  $(172.4\pm 4.87)\%$  ( $F=2.351, P=0.0004$ ) and  $(235.00\pm 39.03)\%$  ( $F=2.754, P=0.0320$ ), respectively. After treatment with 20  $\mu\text{mol/L}$   $\text{A}\beta_{25-35}$  for different times (5, 10, 20, 40 min), the phosphorylation of FoxO3a and AKT in PC12 cells was decreased with time. The levels of phosphorylated AKT and FoxO3a in the brain tissue of *APP/PS1* transgenic mice were decreased to  $(65.75\pm 3.51)\%$  ( $F=6.362, P=0.0236$ ) and  $(46.62\pm 9.64)\%$  ( $F=8.562, P=0.0079$ ) when compared with mice in the control group.【Conclusions】  $\text{A}\beta$  can up-regulate the expression of nuclear transcription FoxO3a and down-regulate the change of PSD95 in both *in vitro* cell models and *in vivo* animal models. The possible mechanism is to reduce the phosphorylation level of FoxO3a and increase the expression of FoxO3a by dephosphorylating AKT.

**Key words:**  $\beta$ -amyloid; fork box protein O3a; postsynaptic dense protein 95; protein kinase B; Alzheimer's disease

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2021, 42(5): 676-685]

阿尔兹海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是最为常见的中枢神经系统退行性疾病<sup>[1]</sup>, 患者在发病过程中会出现进行性不可逆转性的认知功能和记忆力的下降, 最终患者会失去自主生活能力<sup>[2]</sup>。目前 AD 的发病机制尚不明确, 但普遍存在神经元凋亡及突触蛋白丢失等病理表现。通过前期的基础研究,  $\beta$  淀粉样蛋白 (amyloid  $\beta$ -protein,  $\text{A}\beta$ ) 沉积假说是目前学术界较为认可的假说之一<sup>[3]</sup>, 由于患者脑内蛋白质水解能力的改变, 导致  $\text{A}\beta$  多肽的异常合成、寡聚和聚集, 形成了淀粉样蛋白斑块<sup>[4]</sup>, 淀粉样蛋白斑块对神经元有一定的毒性作用, 同时可以引起了脑内炎症的激活, 从而进一步影响神经元的功能<sup>[5]</sup>。叉头框蛋白 O3a (forkhead box protein O3a, FoxO3a) 属于叉形头转录因子的 O 亚型, 这一类转录因子的特点是有明显的叉头型 DNA 结合域; 可进入细胞核调控相应基因的转录与翻译, 而

磷酸化的 FoxO3a 是其非活性形式<sup>[6]</sup>。FoxO3a 广泛分布于神经系统中<sup>[7-8]</sup>, 有研究报道 FoxO3a 可以调控 AD 动物模型中神经细胞的凋亡<sup>[9]</sup>; 近期也有研究将血清中可检测出的 FoxO3a 作为早期诊断 AD 的参考<sup>[10]</sup>; 这些研究提示转录因子 FoxO3a 参与到 AD 的发病过程中, 但是 AD 患者病理学产物之一  $\text{A}\beta$  对 FoxO3a 的作用尚不明确。另一方面, 突触后致密蛋白 95 (postsynaptic density protein 95, PSD95) 作为突触的重要组成之一, 参与学习过程和记忆的形成<sup>[11-12]</sup>。PSD95 表达量可以一定程度上反映学习记忆功能的受损程度<sup>[13]</sup>。本研究以体外细胞模型和 AD 动物模型为研究对象, 系统地考察  $\text{A}\beta$  对 FoxO3a 及 PSD95 的作用, 同时初步探讨了其可能的机制, 为揭示 AD 的发病机制和探索治疗途径提供新思路。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

PC12 细胞,购自中科院细胞库。SPF 级健康 Sprague Dawley (SD) 雄性大鼠 26 只(6~8 周, 体质量 150~180 g),购自南方医科大学实验动物中心(实验动物合格证号:SCXK(粤)2015-0041);SPF 级雄性 *APP<sup>swe/PS1<sup>dE9</sup></sup>* (APP/PS1) 转基因小鼠(7 月龄,体质量 22~25 g)购自南京大学国家遗传工程小鼠资源库。动物合格证号:SCXK(苏)2010-0003,由本实验室繁殖鉴定。大小鼠分别在饲养笼内自由摄食饮水,环境温度(20±2)℃,相对湿度 40%~70%。DMEM 培养基、Neurobasal 培养基、B27、胰酶、多聚赖氨酸、HBSS、胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司,  $A\beta_{25-35}$  ( $\beta$ -淀粉样蛋白片段 25-35)购自 Sigma-Aldrich 公司,RIPA 裂解液购自碧云天生物技术有限公司。FoxO3a、磷酸化蛋白激酶 B (p-AKT)、磷酸化 FoxO3a (p-FoxO3a) 抗体购自 Cell Signaling 公司,PSD95、GAPDH 抗体购自 Abcam 公司,BCA 蛋白定量分析试剂盒购自 Thermo scientific 公司。Alexa Fluor 488、DAPI 购自 Invitrogen 公司,PVDF 膜、ECL 发光液购自 Merck Millipore 公司,Real Time RT-PCR 逆转录试剂盒购自南京诺唯赞有限公司,2×Taq PCR Mastermix 及 DNA marker 购自 Gene Star 公司。其他试剂均为进口或国产分析纯。

### 1.2 $A\beta_{25-35}$ 的寡聚化

将  $A\beta_{25-35}$  粉末在超净台中用无菌 PBS 配制浓度为 1 mmol/L 的母液,放置于 37℃ 的 CO<sub>2</sub> 孵箱中孵化 7 d;置于 4℃ 冰箱保存,根据实验需求稀释成工作液。

### 1.3 大鼠皮层神经元的培养

取孕 19 d 的孕鼠用异氟烷麻醉后,用 75% 酒精消毒,剪开子宫,小心夹出胎鼠,消毒后,剪下脑袋,用眼科镊取出脑组织,分离皮层组织,用预冷的 PBS 冲洗后,剥去表面的血管,眼科剪子将组织剪至糜状,加 HBSS 冲洗干净后,加胰酶消化 10 min,加 FBS 终止消化反应,吸去 FBS,加 HBSS,反复吹打至分散均匀,经细胞筛过滤,过滤后再吹打均匀,111.8×g 离心 10 min 后洗去上清,加入适量的培养基接种到提前包被多聚赖氨酸的培养板上,置 CO<sub>2</sub> 培养箱,6 h 后换成神经元培养基(Neuronbasal:

B27 = 50:1),每 3 天换一半培养基。

### 1.4 $A\beta_{25-35}$ 海马注射

将大鼠随机分成假手术组和模型组,将大鼠腹腔注射水合氯醛麻醉后,将其头部固定在立体定位仪上。沿头背中部纵向切口,碘伏消毒,暴露前囟,参照大鼠脑立体定位仪使用说明,定位左右两侧海马区的坐标:前囟后 5.2 mm,旁开 4.4 mm。用颅骨钻在坐标点周围环形钻开颅骨,微量注射器自此处缓慢垂直进针 4.8 mm,然后将 1.5  $\mu$ L  $A\beta_{25-35}$  缓慢注入大鼠左右侧海马,留针 5 min,再缓慢撤针,缝合切口。假手术组则用同样的方法注射生理盐水。注射完成 7 d 后进行行为学实验。

### 1.5 水迷宫实验

将大鼠/小鼠面朝池壁放入水中,4 个象限每个象限各放 1 次,记录动物找到平台的时间,找到后让动物在平台上停留 10 s 以便记忆,在训练 7 d 获记忆后,将平台移走,记录在平台所在象限停留的时间和穿越的次数,时长短和次数少的动物学习记忆功能受损。

### 1.6 RT-PCR 实验

按 Trizol 试剂说明书提取细胞 RNA,以 OD<sub>260/280</sub> 作为 RNA 纯度检测的指标,OD<sub>260/280</sub> 在 1.9~2.1 之间,符合要求可进一步按 Prime-Script RT Master Mix 试剂盒说明,将 5×PrimeScript Buffer、PrimeScript RT Enzyme Mix I、Oligo dT Primer (50  $\mu$ mol/L) 和 Random 6 mers (100  $\mu$ mol/L) 试剂置冰上解冻,RNase-free H<sub>2</sub>O 在室温解冻,按步骤合成 cDNA。将引物、cDNA、试剂按比例混匀后,采用 PCR 扩增试剂盒对 cDNA 进行扩增。PSD95 上游引物: TGCACTATGCTCGTCCCATCATCA,下游引物: TGTGCCTGGATGTCTTCTCCATT; FoxO3a 上游引物: 5'-GGAACGUGAUGCUUCGCAATT-3',下游引物: 5'-UUGCGAAGCAUCACGUUCCTT-3', GAPDH 上游引物: GCAGTGGCAAAGTGGAGATT,下游引物: ACAGTCTTCTGGGTGGCAGT。在琼脂凝胶上每孔加入 1.5~2  $\mu$ L 的各组样品和 Maker 进行电泳,完成后统计结果。

### 1.7 Western Blot 免疫印迹法

细胞采用预冷的细胞裂解液(含 1% 蛋白酶抑制剂和 1% 磷酸酶抑制剂)进行振荡裂解,组织样品在加入上述裂解液后采用超声裂解。裂解完成后采用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量后,样品加入裂解液和上样缓冲液稀释至终浓度 1  $\mu$ g/ $\mu$ L,

煮沸 10 min 后备用。样品随后分别加入到聚丙烯酰胺 SDS 凝胶孔中, 80 V 电泳后完成后, 转至 PVDF 膜上; 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 一抗稀释液孵育 4 ℃ 过夜; 将 TBST 缓冲液洗脱 3 次后, 二抗稀释液孵育 2 h; TBST 洗脱后, 滴加发光液曝光。

### 1.8 免疫荧光

将 PC12 细胞接种于共聚焦小皿中,  $A\beta_{25-35}$  处理后, 弃培养基, 40 g/L 的多聚甲醛固定 20 min, TritonX-100 室温孵育 20 min, 5% 的 FBS 室温封闭 1 h, 一抗溶液 4 ℃ 孵育过夜后, 荧光二抗溶液室温避光孵育 1 h, DAPI 溶液室温孵育 15 min, 滴加防荧光淬灭剂封片后, 于共聚焦荧光显微镜下观察。

### 1.9 统计分析

所有实验数据均采用均数 $\pm$ 标准误描述, 数据由 Graphpad Prism 8.0 软件进行统计分析。实验设计分组是两组数据时, 如果每一组资料都呈正态分布并且方差齐性, 组间比较采用 *t* 检验, 反之用校正 *t* 检验或秩和检验。多组均数比较, 若各组定量资料都呈正态分布并且方差齐性采用 One way-ANOVA 进行分析, 反之则用 Kruskal Wallis *H* 检验。不满足方差齐性的情况时, 采用 Welch's anova 方法分析。柱状图采用 GraphPad Prism 8.0 软件绘制。

## 2 结果

### 2.1 $A\beta_{25-35}$ 在 PC12 细胞中降低 PSD95 的表达且增加 FoxO3a 的表达

如图 1A、B、C 所示, 梯度浓度 (5、10、20  $\mu\text{mol/L}$ ) 的寡聚化的  $A\beta_{25-35}$  处理 PC12 细胞 24 h, Western Blot 的结果显示  $A\beta_{25-35}$  可以浓度依赖性地降低 PSD95 的蛋白水平的表达量和增加 FoxO3a 蛋白的表达。20  $\mu\text{mol/L}$   $A\beta_{25-35}$  处理时, PSD95 蛋白表达量下调至 (45.09 $\pm$ 1.61)% ( $F=7.487$ ,  $P=0.054$  0)。FoxO3a 的蛋白表达的上调则在 20  $\mu\text{mol/L}$   $A\beta_{25-35}$  处理时有统计学差异 ( $F=17.48$ ,  $P=0.021$  0), 是对照组表达量的 (228.7 $\pm$ 20.4)%。图 1D 是  $A\beta_{25-35}$  处理 PC12 细胞后对 PSD95 蛋白的染色结果, 绿色荧光标记 PSD95, 蓝色为 DAPI 染色, 免疫荧光的结果与 Western blot 的结果一致,  $A\beta_{25-35}$  处理组的绿色荧光强度变弱, 提示 PSD95 表达下调。而如图 1E 所示, 同样用免疫荧光的方法检测了  $A\beta_{25-35}$  处理后

FoxO3a 的亚细胞定位, 结果显示  $A\beta_{25-35}$  有促进 FoxO3a 进入细胞核的作用。以上结果提示  $A\beta_{25-35}$  在引起 PC12 细胞突触受损的同时促进了 FoxO3a 的表达和进核。

### 2.2 $A\beta_{25-35}$ 在神经元中对 PSD95 及 FoxO3a 表达的影响

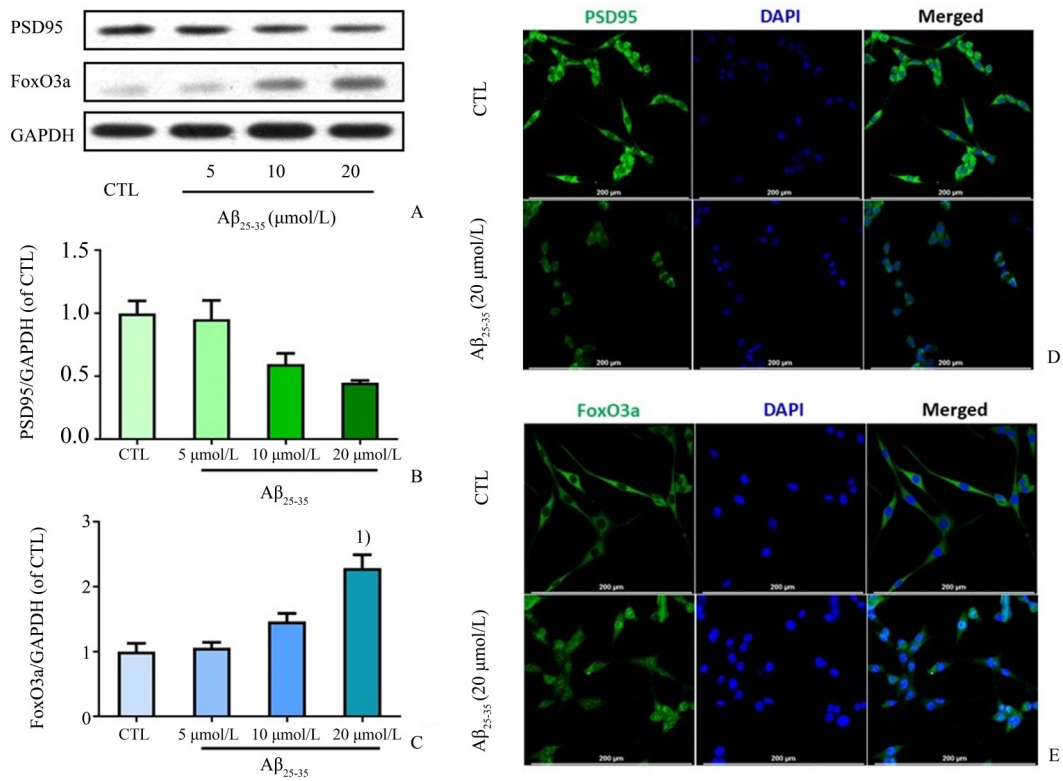
为进一步证实在 PC12 细胞中获得的结果, 我们培养了体外的原代神经元 (图 2A)。在神经元中用同样梯度浓度的寡聚化的  $A\beta_{25-35}$  (5 ~ 20  $\mu\text{mol/L}$ ) 去处理 24 h。结果如图 2B、C、D 所示, PSD95 的蛋白表达量随  $A\beta_{25-35}$  浓度增加而下降, 在剂量 20  $\mu\text{mol/L}$  时与对照组相比有统计学差异 ( $F=5.445$ ,  $P=0.015$  3), 此时 PSD95 的表达量下调至 (53.52 $\pm$ 3.85)%, 而  $A\beta_{25-35}$  的处理也浓度依赖性地增加 FoxO3a 的表述, 在 20  $\mu\text{mol/L}$  浓度时即可上调 FoxO3a 至 (314.9 $\pm$ 31.51)% ( $F=17.46$ ,  $P=0.019$  7)。此结果与 PC12 细胞中获得的结果一致, 提示  $A\beta_{25-35}$  在神经元中引起突触损伤的同时可促进 FoxO3a 的表达。

### 2.3 $A\beta_{25-35}$ 立体定位注射的 AD 大鼠模型中 FoxO3a 的表达增加

在 SD 大鼠的海马组织中立体定位注射寡聚化的  $A\beta_{25-35}$  后对假手术组和模型组进行水迷宫训练, 第 8 天进行探索性实验, 实验结果如图 3A、B 所示: 对照组的目标象限的探索实践为 (31.56 $\pm$ 2.17) s,  $A\beta_{25-35}$  组的时长为 (24.35 $\pm$ 1.29) s, 组间对比有统计学差异 ( $F=2.843$ ,  $P=0.098$ ); 对照组在目标象限的穿越次数为 (5.31 $\pm$ 0.91) 次, 而  $A\beta_{25-35}$  组的穿越次数为 (2.53 $\pm$ 0.49) 次 ( $F=3.459$ ,  $P=0.014$  9), 水迷宫的实验结果表明  $A\beta_{25-35}$  引起了大鼠的认知障碍。RT-PCR 法检测海马组织中 PSD95 的 mRNA 水平, 结果如图 3C、D、E 所示, 与行为学结果一致, PSD95 的 mRNA 显著下降至对照组的 (58.40 $\pm$ 8.28)% ( $F=1.193$ ,  $P=0.010$  1), 同时 FoxO3a 的 mRNA 水平升高至 (140.9 $\pm$ 7.45)% ( $F=2.378$ ,  $P=0.049$  6), 说明在  $A\beta_{25-35}$  注射的在体 AD 模型中, 突触功能受损的同时 FoxO3a 的表达水平上调, 注射  $A\beta_{25-35}$  的动物模型的结果与细胞模型中趋势一致。

### 2.4 APP/PS1 转基因小鼠脑组织中 FoxO3a 及 PSD95 表达的变化

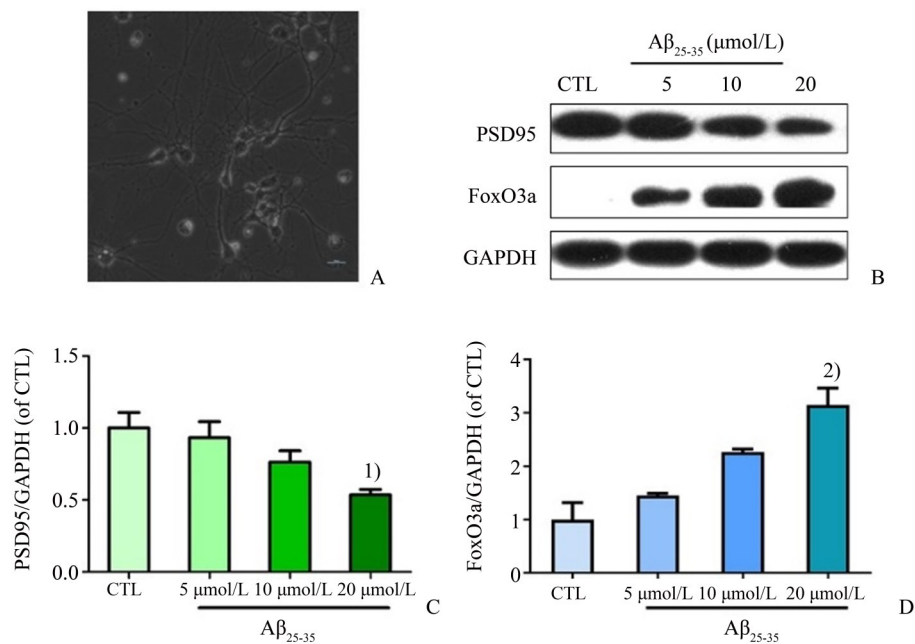
APP/PS1 转基因小鼠是 AD 的动物模型。野生型和 APP/PS1 转基因小鼠在水迷宫实验训练如图



The expression of PSD95 and FoxO3a were detected by Western blot (A, B, C). The expression of PSD95 (D) and FoxO3a nuclear translocation (E) were assessed by immunofluorescence.  $n = 3$ , 1)  $P < 0.05$  vs CTL ( $F = 17.48$ ,  $P = 0.021$ ); Scar bar = 200  $\mu\text{m}$ .

图1  $\beta$ 淀粉样蛋白在PC12细胞中对PSD95和FoxO3a表达的影响

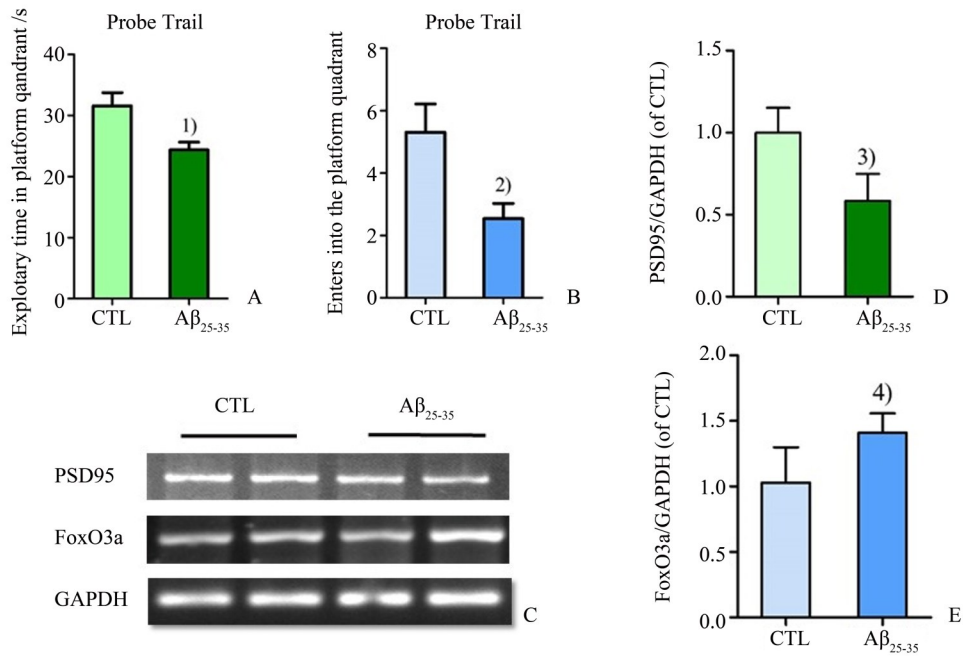
Fig.1 Effects of  $A\beta_{25-35}$  on the expression of PSD95 and FoxO3a in PC12 cells



The primary cultured neurons was visualized by the microscope (A). The levels of PSD95 and FoxO3a were detected by Western blot (B,C,D).  $n = 3$ , 1)  $P < 0.05$  vs CTL ( $F = 5.445$ ,  $P = 0.015$ ); 2)  $P < 0.05$  vs CTL ( $F = 17.46$ ,  $P = 0.019$ ); Scar bar = 20  $\mu\text{m}$ .

图2  $\beta$ 淀粉样蛋白在神经元中对PSD95和FoxO3a的影响

Fig. 2 Effects of  $A\beta_{25-35}$  on the expression of PSD95 and Foxo3a in neurons



The behavioral performance of rats were detected by Morris water maze (A,B). The levels of PSD95 and FoxO3a in the hippocampus were detected by RT-PCR (C, D, E).  $n = 13$ , 1)  $P < 0.05$  vs CTL ( $F = 2.843$ ,  $P = 0.098$ ); 2)  $P < 0.01$  vs CTL ( $F = 3.459$ ,  $P = 0.014$ );  $n = 4$ , 3)  $P < 0.05$  vs CTL ( $F = 1.193$ ,  $P = 0.010$ ); 4)  $P < 0.05$  vs CTL ( $F = 2.378$ ,  $P = 0.049$ ).

图3 在 $A\beta_{25-35}$ 注射的大鼠模型中 $\beta$ 淀粉样蛋白对PSD95和FoxO3a的影响

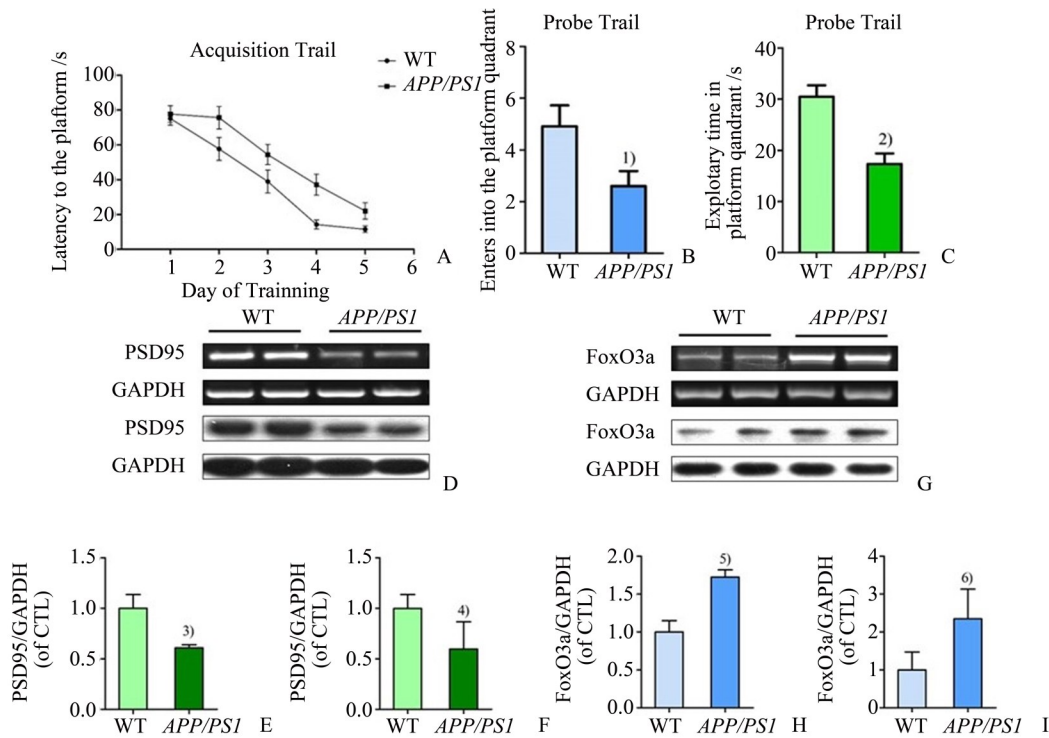
Fig. 3 Effects of  $A\beta_{25-35}$  on the expression of PSD95 and FoxO3a in  $A\beta_{25-35}$ -injected rats

4A所示。探索性的结果如图4B,野生型小鼠在目标象限的穿越次数为 $(4.91 \pm 0.81)$ 次, $APP/PS1$ 转基因小鼠的穿越次数是 $(2.6 \pm 0.58)$ 次,与野生型组相比显著下降( $F = 2.158$ ,  $P = 0.033$ )。在目标象限的停留时间如图4C所示野生型小鼠为 $(30.47 \pm 2.23)$  s,而 $APP/PS1$ 转基因小鼠的探索时间为 $(17.32 \pm 2.08)$  s,组间对比具有统计学差异( $F = 1.265$ ,  $P = 0.0004$ )。行为学实验结果表明7月龄的转基因小鼠表现出明显的认知障碍。进一步用RT-PCR法和Western Blot的方法检测野生型和转基因小鼠脑组织中PSD95和FoxO3a的表达情况。结果如图4D所示,与野生型组相比,转基因小鼠中的PSD95的mRNA水平下降至对照组的 $(60.89 \pm 1.53)\%$  ( $F = 20.05$ ,  $P = 0.0088$ ),而蛋白表达量水平为野生型组的 $(59.63 \pm 13.55)\%$ ,具有统计学差异( $F = 8.496$ ,  $P = 0.0445$ ),与行为学中表现出的记忆认知障碍相符。在检测突触相关蛋白PSD95的表达量变化的同时,图G所示在转基因小鼠脑组织中FoxO3a的mRNA是野生型小鼠表达量的 $(172.4 \pm 4.87)\%$ ,有统计学差异( $F = 2.351$ ,  $P = 0.0004$ ),而对应的蛋白水平是野生型组的 $(235 \pm 39.03)\%$  ( $F = 2.754$ ,  $P = 0.0320$ ),这

进一步说明 $\beta$ -淀粉样蛋白在降低突触相关蛋白PSD95表达量的同时,上调了FoxO3a的表达水平。

### 2.5 $A\beta$ 对AKT及FoxO3a磷酸化的影响

在上述实验结果中我们发现, $A\beta$ 可以增加体外神经细胞模型中FoxO3a的表达量,与此同时在体内模型中也可以上调FoxO3a的表达水平。已经证实磷酸化的AKT可以增加FoxO3a的磷酸化水平,降低FoxO3a的活性,那么 $\beta$ -淀粉样蛋白上调FoxO3a表达的作用是不是通过介导AKT磷酸化而实现的呢?如图5A所示,用 $20 \mu\text{mol/L}$ 的寡聚化的 $A\beta_{25-35}$ 处理PC12细胞,Western Blot方法检测不同处理时间点(5、10、20和40 min)p-AKT的量,发现随着处理时间的增加,AKT的磷酸化水平降低,在处理时间为40 min时AKT的磷酸化水平为对照组的 $(37.64 \pm 11.92)\%$ ,有统计学差异( $F = 6.553$ ,  $P = 0.0426$ )。与此同时,如图5B所示,FoxO3a的磷酸化水平与AKT的磷酸化水平变化趋势一致,在处理时间为10 min有统计学差异,p-FoxO3a的量是对照组的 $(41.43 \pm 9.49)\%$  ( $F = 44.88$ ,  $P = 0.0414$ )。此外,图5C、D所示 $APP/PS1$ 转基因小鼠中脑组织中的p-AKT的下降为对照组的 $(65.75 \pm 3.51)\%$  ( $F =$



The behavioral performance of APP/PS1 transgenic mice were detected by Morris water maze (A, B, C). The levels of PSD95 were detected by RT-PCR (D, E) and Western Blot (D, F). The levels of FoxO3a were detected by RT-PCR (G, H) and Western blot (G, I).  $n = 10-11$ , 1)  $P < 0.05$  vs CTL ( $F = 2.158$ ,  $P = 0.033$ ); 2)  $P < 0.001$  vs CTL ( $F = 1.265$ ,  $P = 0.000$  4);  $n = 4$ , 3)  $P < 0.01$  vs CTL ( $F = 20.05$ ,  $P = 0.008$  8); 4)  $P < 0.05$  vs CTL ( $F = 8.496$ ,  $P = 0.044$  5); 5)  $P < 0.001$  vs CTL ( $F = 2.351$ ,  $P = 0.000$  4); 6)  $P < 0.05$  vs CTL ( $F = 2.754$ ,  $P = 0.032$  0).

图4 在APP/PS1转基因小鼠脑组织中 $\beta$ 淀粉样蛋白对PSD95和FoxO3a的影响  
Fig. 4 The levels of PSD95 and Foxo3a in the brain of APP/PS1 transgenic mice

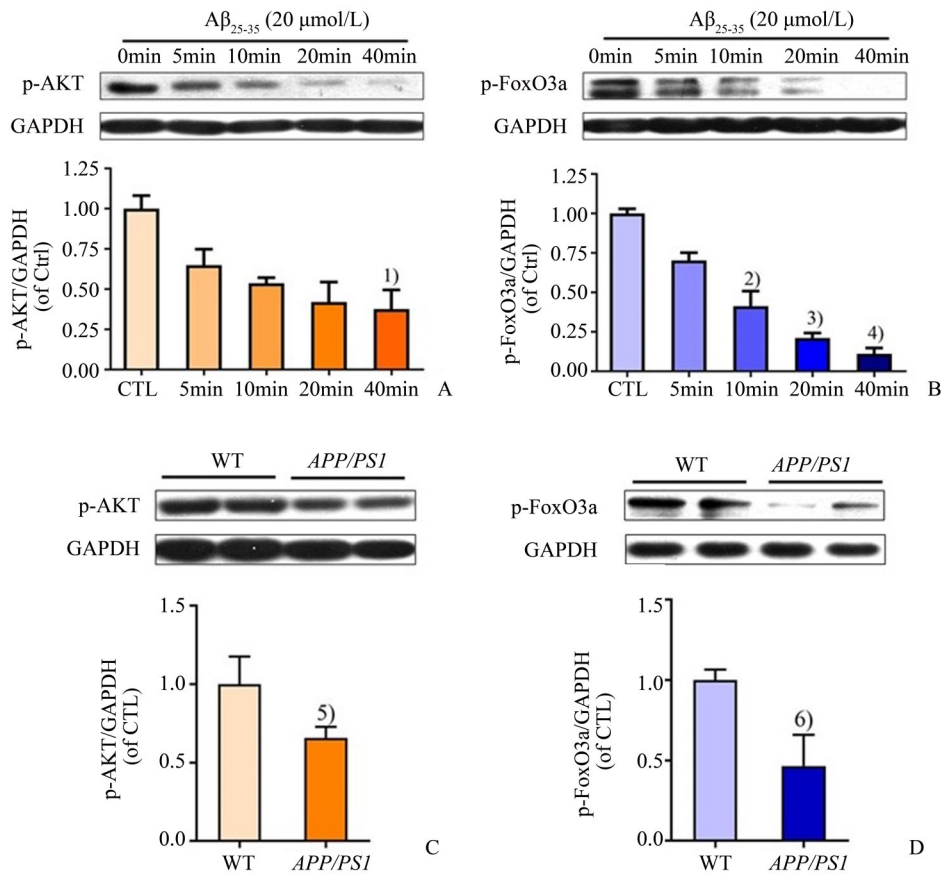
6.362,  $P = 0.023$  6), 而p-FoxO3a的表达量下降至对照组的(46.62±9.64)% ( $F = 8.562$ ,  $P = 0.007$  9)。综上所述,在细胞模型和动物模型中, $A\beta$ 都可以降低AKT和FoxO3a的磷酸化水平。

### 3 讨论

为了考察异常沉积的 $\beta$ 淀粉样蛋白对核转录因子FoxO3a的作用,本研究首先从体外细胞模型入手,选取了操作方便可重复性强的PC12细胞。 $\beta$ 淀粉样蛋白的前体是淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP),APP是一种广泛存在于细胞膜上的蛋白,APP本身无毒,只有在被分泌酶裂解后产生了 $\beta$ 淀粉样蛋白沉积后,才会对中枢神经元有毒性作用<sup>[14-15]</sup>。本研究中为了确保 $\beta$ 淀粉样蛋白产生并且有一定的毒性作用,将突触后膜蛋白PSD95作为神经元功能正常的标志物,学习认知能力的下降受损伴随着PSD95表达量的减少<sup>[16-17]</sup>。本研究中采用37℃孵育7d的方法去制备寡聚化

的 $A\beta_{25-35}$ ,在处理24h后,在神经元细胞系和体外培养的神经元中的结果都显示寡聚化的 $A\beta_{25-35}$ 可以浓度依赖性的减少PSD95蛋白的表达,提示体外寡聚化的 $A\beta_{25-35}$ 处理可以模拟阿尔兹海默的发病过程。同时,相应组别的FoxO3a的表达量浓度依赖性的上调。这些结果提示 $A\beta_{25-35}$ 处理PC12细胞及原代神经元会导致FoxO3a及PSD95的变化,但这些变化是一个伴随过程还是一个有因果关系的事件,值得进一步的研究。

在体外细胞模型上证实了 $A\beta$ 可以促进核转录因子Foxo3a的表达以及降低PSD95的表达,那么在体内模型中 $A\beta$ 是否有相同的作用呢?实验设计将寡聚化的 $A\beta_{25-35}$ 立体定位注射大鼠海马造模<sup>[18]</sup>,选择大鼠进行 $A\beta_{25-35}$ 海马注射的主要是因为术后大鼠的存活率高于小鼠。在水迷宫实验中,模型组大鼠表现出明显的记忆认知障碍的同时也同样检测到海马组织中PSD95表达量下降,这与认知功能受损的分子生物学上的变化相符。进一步检测模型组海马中的FoxO3a的表达量,与假手术比模型组



The levels of p-AKT (A) and p-FoxO3a (B) were detected by Western Blot in PC12 cells treated with 20  $\mu\text{mol/L}$  of  $\text{A}\beta_{25-35}$  for the indicated time. The levels of p-AKT (C) and p-FoxO3a (D) were assessed by Western Blot in the brain of *APP/PS1* transgenic mice.  $n = 3$ , 1)  $P < 0.05$  vs CTL ( $F = 6.553$ ,  $P = 0.042$  6); 2)  $P < 0.05$  vs CTL ( $F = 44.88$ ,  $P = 0.041$  4); 3)  $P < 0.001$  vs CTL ( $P = 0.000$  2); 4)  $P < 0.001$  vs CTL ( $P = 0.000$  2);  $n = 4$ , 5)  $P < 0.05$  vs CTL ( $F = 6.362$ ,  $P = 0.023$  6); 6)  $P < 0.001$  vs CTL ( $F = 8.562$ ,  $P = 0.007$  9).

图5  $\text{A}\beta$ 在体内、外模型中抑制AKT及FoxO3a磷酸化水平

Fig. 5  $\text{A}\beta$  inhibited the phosphorylation of Akt and FoxO3a both in *in vitro* and *in vivo* models.

显著增加,说明在体内环境中,  $\text{A}\beta$  同样促进核转录因子 FoxO3a 的表达。利用体外立体定位在海马区注射的方法主要是在脑组织中加入外源性的  $\text{A}\beta$ , 那么在体内环境中增加内源性的  $\text{A}\beta$ , 是否也会影响 FoxO3a 和 PSD95 表达呢? 本研究中采用了 *APP/PS1* 转基因小鼠模型<sup>[19]</sup>。文献报道  $\text{A}\beta$  是由 *APP* 基因编码产生的, *APP* 蛋白经过蛋白水解作用可产生  $\text{A}\beta$ ,  $\text{A}\beta$  在正常生理状态下存在于血液和脑脊液中<sup>[20]</sup>。但是病理状态下如 AD 患者脑组织中出现大量  $\text{A}\beta$  沉积, 这种异常的蛋白沉积对神经元产生毒性。前期的基础研究发现: 在家族性 AD 患者有多个 *APP* 基因的突变位点, *APP* 突变可改变 *APP* 的水解代谢过程, 导致具有神经毒性作用的  $\text{A}\beta$  沉积产生, 并引发包括神经炎症在内的多种病理机制, 进一步促进神经细胞凋亡或死亡, 因神经元不可逆的受损, 患者会出现认知障碍和记忆功能下

降。而 *PS1* 基因编码的 PS 蛋白是  $\gamma$  分泌酶的重要组成部分, 在生成  $\text{A}\beta$  的过程中起重要作用。 *PS1* 基因的突变是另一个引起家族性 AD 的主要原因之一。本实验中所选用 *APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup>* 转基因小鼠能较为真实地模拟  $\beta$  淀粉样蛋白引起的 AD 的发病过程<sup>[21]</sup>。 *APP/PS1* 转基因小鼠一般在 6-7 月龄开始表现出较为明显的认知功能障碍<sup>[22]</sup>。将 7 月龄的野生型和转基因小鼠进行行为学检测, 结果与文献报道一致, *APP/PS1* 小鼠的认知功能明显受损, 同时转基因小鼠脑组织中的 PSD95 表达量与野生型组相比显著下调, 并伴随着 FoxO3a 表达量的增加。由此通过对“外源性”和“内源性”的  $\text{A}\beta$  聚集的两种动物模型脑组织中 FoxO3a 的检测, 发现两种模型中 FoxO3a 的水平皆上调, 与细胞模型中  $\text{A}\beta$  的作用相同。与此同时, 也有文献报道  $\text{A}\beta$  可以通过调节 FoxO3a 激活 NF- $\kappa$ B 的中枢神经系统中经典炎

症通路<sup>[23]</sup>,脑内的神经炎症假说也逐渐成为近年来AD研究热点之一。此外APP蛋白的胞内肽段可以激活FoxO3a从而阻止海马神经元的神经发生<sup>[24]</sup>,神经发生在神经退行性疾病和颅脑损伤的治疗方面也有着重要意义。文献报道与本研究结果都提示核转录因子FoxO3a与AD的发病过程关系密切。

无论是体外还是体内模型中,AB $\beta$ 都可以促进FoxO3a的表达,但是其机制却尚不明确。AKT可通过磷酸化生成p-AKT,p-AKT是激活模式,有文献报道AKT已经被证实是FoxO3a的上游信号通路之一<sup>[25-26]</sup>,p-AKT可以磷酸化FoxO3a,上调p-FoxO3a的表达量,而p-FoxO3a是非“激活”状态,p-FoxO3a无法进入细胞核与DNA结合,继而对下游的基因发挥调控作用。为了研究 $\beta$ 淀粉样蛋白上调FoxO3a水平作用是否是通过介导AKT磷酸化实现的,本研究中采用了20  $\mu$ mol/L的AB $\beta$ 去处理PC12细胞不同时间,发现随着时间的增加,AB $\beta_{25-35}$ 可以减少p-AKT的量,同时,p-FoxO3a的量也随处理时间增长而降低。而在体内环境中,与野生型相比,APP/PS1转基因小鼠的脑组织中p-AKT和p-FoxO3a的量都显著下降。本研究结果提示 $\beta$ 淀粉样蛋白可能是通过降低AKT磷酸化水平从而去磷酸化FoxO3a,上调FoxO3a的表达水平。AKT除了可以直接通过FoxO3a影响下游基因转录外,实际上还参与到神经元内功能蛋白的合成,突触可塑性

的形成以及神经元在疾病模型中功能的改变等过程中<sup>[27]</sup>。PSD95作为突触后致密蛋白,维持着突触间信息的传递和突触可塑性的形成。在中枢神经系统疾病如抑郁症和AD模型的动物模型脑组织中都能观察到PSD95的表达量的下降。有研究报道,在抑郁症模型p-AKT的水平低于生理状态下水平,而激活AKT可以提高PSD95的水平,改善突触功能同时增强长时程增强<sup>[28]</sup>。在实验结果也发现AB $\beta$ 处理的细胞模型和APP/PS1转基因小鼠脑组织中的AKT的磷酸化下调,而PSD95的表达量也下降,与文献报道的趋势一致,说明AKT也参与到AD的发病过程中。但AB $\beta$ 及AKT通过怎样的途径影响PSD95的表达还需进一步研究。另外,FoxO3a在AB $\beta$ 对PSD95的调控中发挥怎样的作用,值得深入研究。通过鉴定PSD95的启动子区是否存在FoxO3a转录因子的结合位点,并通过双荧光素酶报告基因和点突变实验有利于研究该问题。同时还可通过转染组成性激活的AKT(constitutively active AKT)来研究AB $\beta$ 是否通过AKT/FoxO3a途径来调控PSD95的表达。

综上, $\beta$ 淀粉样蛋白无论在体外细胞模型还是在体内模型中都可以降低PSD95的表达,同时上调转录因子FoxO3a的水平,并可能是通过介导AKT磷酸化水平实现的对PSD95和FoxO3a的作用。

#### 参考文献

- [1] Bateman RJ, Aisen PS, Strooper BD, et al. Autosomal-dominant Alzheimer's disease: a review and proposal for the prevention of Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Res Ther*, 2011, 3(1): 1.
- [2] Vos SJ, Xiong CJ, Visser PJ, et al. Preclinical Alzheimer's disease and its outcome: a longitudinal cohort study [J]. *Lancet Neurol*, 2013, 12(10): 957-965.
- [3] Panza F, Lozupone M, Logroscino G, et al. A critical appraisal of amyloid-beta-targeting therapies for Alzheimer disease [J]. *Nat Rev Neurol*, 2019, 15(2): 73-88.
- [4] Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, et al. Neuropathological alterations in Alzheimer disease [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2011, 1(1): a006189.
- [5] Cristiano C, Volpicelli F, Lippiello P, et al. Neutralization of IL-17 rescues amyloid- $\beta$ -induced neuroinflammation and memory impairment [J]. *Br J Pharmacol*, 2019, 176(18): 3544-3557.
- [6] Nho RS, Hergert P. FoxO3a and disease progression [J]. *World J Biol Chem*, 2014, 5(3): 346.
- [7] Zhang YN, You BM, Chen YL, et al. Effect of transcriptional regulatory factor FoxO3a on central nervous system oxygen toxicity [J]. *Front Physiol*, 2020, 18(11): 596326.
- [8] 钱敏,高帅芸,王波,等. FoxO3a蛋白在缺氧小鼠脑组织中的表达 [J]. *神经解剖学杂志*, 2021, 37(1): 61-66.
- [9] Qian M, Gao SY, Wang B, et al. Expression of FoxO3a in the mouse brain tissues with hypoxia [J]. *Chin J Neuroanat*, 2021, 37(1): 61-66.
- [9] Sanhui P, Biswas SC. FoxO3a is activated and ex-

- cutes neuron death via Bim in response to  $\beta$ -amyloid [J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4(5): e625.
- [10] Pradhan R, Yadav SK, Prem NN, et al. Serum FoxO3a: A ray of hope for early diagnosis of Alzheimer's disease [J]. *Mech Ageing Dev*, 2020, 190: 111290.
- [11] Mardones MD, Jorquera PV, Herrera-Soto A, et al. PSD95 regulates morphological development of adult-born granule neurons in the mouse hippocampus [J]. *J Chem Neuroanat*, 2019, 7(98):117-123.
- [12] Broadhead MJ, Horrocks MH, Zhu F, et al. PSD95 nanoclusters are postsynaptic building blocks in hippocampus circuits [J]. *Sci Rep*, 2016, 6(1):24626.
- [13] 吴世卫, 关建军, 陈瑜. 醒神益智颗粒对血管性痴呆大鼠学习记忆能力及海马突触后致密蛋白95及突触蛋白表达的影响 [J]. *解剖学报*, 2020, 51(5): 745-750.
- Wu SW, Guan JJ, Chen Y. Effects of Xingshen Yizhi granule on the learning and memory ability and the expression of postsynaptic dense protein 95 and synapsin protein in the hippocampus of vascular dementia rats [J]. *Acta Anatomica Sinica*, 2020, 51(5): 745-750.
- [14] O'Brien RJ, Wong PC. Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease [J]. *Annu Rev Neurosci*, 2011, 34(1): 185-204.
- [15] John H. The discovery of Alzheimer-causing mutations in the APP gene and the formulation of the "amyloid cascade hypothesis" [J]. *FEBS J*, 2017, 284(7): 1040-1044.
- [16] Ling YZ, Ma W, Yu L, et al. Decreased PSD95 expression in medial prefrontal cortex (mPFC) was associated with cognitive impairment induced by sevoflurane anesthesia [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2015, 16(9): 763-771.
- [17] Manczak M, Kandimalla R, Yin XL, et al. Hippocampal mutant APP and amyloid beta-induced cognitive decline, dendritic spine loss, defective autophagy, mitophagy and mitochondrial abnormalities in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Hum Mol Genet*, 2018, 27(8): 1332-1342.
- [18] Díaz A, Rojas K, Espinosa B, et al. Aminoguanidine treatment ameliorates inflammatory responses and memory impairment induced by amyloid-beta 25-35 injection in rats [J]. *Neuropeptides*, 2014, 48(3): 153-159.
- [19] Chen LZ, Xu SC, Wu T, et al. Studies on APP metabolism related to age-associated mitochondrial dysfunction in APP/PS1 transgenic mice [J]. *Aging (Albany, NY)*, 2019, 11(22): 10242-10251.
- [20] Giau VV, Bagyinszky E, Youn YC, et al. APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in Asian patients with early-onset Alzheimer disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(19):4757.
- [21] Jin G, Zhu L, Liu P, et al. Xanthoceraside prevented synaptic loss and reversed learning-memory deficits in APP/PS1 transgenic mice [J]. *J Physiol Sci*, 2019, 69(3): 477-488.
- [22] 孟召友, 孙欢, 兰震, 等. APP/PS1 痴呆小鼠海马特异性过表达芳香化酶对空间学习记忆的影响及相关神经机制研究 [J]. *第三军医大学学报*, 2021, 43(9): 779-789.
- Meng ZY, Sun H, Lan Z, et al. Effects of hippocampal aromatase overexpression on spatial learning and memory in APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease and related neural mechanism [J]. *J Third Mil Med Univ*, 2021, 43(9): 779-789.
- [23] Shi C, Shi RJ, Guo H, et al.  $\beta$ -amyloid-induced gonadotropin-releasing hormone decline involving Forkhead transcription factor FoxO3a and nuclear factor- $\kappa$ B [J]. *Neuro Report*, 2020, 31(12): 923-927.
- [24] Jiang M, Vanan S, Tu HT, et al. APP intracellular domain (AICD)-dependent regulation of FoxO3a inhibits adult hippocampal neurogenesis [J]. *Neurobiol Aging*, 2020, 95: 250-263.
- [25] Gomes AR, Zhao F, Lam EW. Role and regulation of the forkhead transcription factors FoxO3a and FOXM1 in carcinogenesis and drug resistance [J]. *Chin J Cancer*, 2013, 32(7): 365-370.
- [26] 李梦楠, 马振凯, 白宏英. 姜黄素通过 IGF-1/Akt/FoxO3a 通路保护鱼藤酮诱导 PC12 细胞的 PD 模型 [J]. *中风与神经疾病杂志*, 2017, 34(7): 588-592.
- Li MN, Ma ZK, Bai HY. Curcumin prevents the PD model of rotenone-induced PD12 cells through IGF-1/Akt/FoxO3a signaling pathway [J]. *J Apoplexy Nerv Dis*, 2017, 34(7): 588-592.
- [27] Li M, You MD, Li SY, et al. Effects of maternal exposure to nonylphenol on learning and memory in offspring involve inhibition of BDNF-PI3K/Akt signaling [J]. *Brain Res Bull*, 2019, 146:270-278.
- [28] Pazini FL, Cunha MP, Rosa JM, et al. Creatine, similar to ketamine, counteracts depressive-like behavior induced by corticosterone via PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(10): 6818-6834.

(编辑 孙慧兰)