

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.04.002

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20201210.1743.015.html\(2020-12-11\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20201210.1743.015.html(2020-12-11))

LXR β 调节海马突触可塑性改善 APP/PS1 小鼠 认知功能的研究*

万腾飞¹, 吕彦², 刘亮^{2 Δ}

(北部战区总医院:1. 干一科;2. 神经内科, 沈阳 110016)

[摘要] **目的** 探讨肝 X 受体(LXR) β 激动剂 T0901317 对阿尔茨海默病(AD)模型小鼠海马突触可塑性及认知功能的影响。**方法** 共纳入 30 只 9 个月龄雄性小鼠,其中 10 只野生型(WT)小鼠作为 WT 组,20 只 APP/PS1 转基因 AD 模型小鼠分为 AD 组和 AD+T0 组。采用新物体识别实验、Morris 水迷宫、免疫组织化学及 Western blot 等方法,对小鼠的认知功能、小胶质细胞数量及成对免疫球蛋白样受体 B(PirB)、海马突触相关蛋白 Synapsin 和 PSD-95 表达水平进行检测。**结果** 与 WT 组比较,AD 组对新物体的探索偏爱指数明显降低,且 Morris 水迷宫实验中在目标象限停留时间百分比及进入次数明显减少($P < 0.05$),而 AD+T0 组对新物体的探索偏爱指数增高,且在目标象限停留时间百分比及进入次数明显增多($P < 0.05$)。此外,与 AD 组比较,AD+T0 组海马组织离子钙结合衔接分子-1(Iba-1)阳性细胞数明显减少,海马突触相关蛋白 Synapsin 和 PSD-95 表达水平明显升高($P < 0.05$)。**结论** LXR β 激动剂 T0901317 通过调节 AD 小鼠海马组织突触的形成进而改善 AD 小鼠的认知功能障碍。

[关键词] 阿尔茨海默病;肝 X 受体;神经元可塑性;小神经胶质细胞;成对免疫球蛋白样受体 B

[中图分类号] R741.05;R392.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2021)04-0547-05

Study on LXR β ameliorating the cognitive function of APP/PS1 mice via regulating synaptic plasticity in the hippocampus*

WAN Tengfei¹, LYV Yan², LIU Liang^{2 Δ}

(1. Department of First Cadre Ward; 2. Department of Neurology, the General Hospital of Northern Theater Command, Shenyang, Liaoning 110016, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of liver X receptor β (LXR) agonist T0901317 on the synaptic plasticity and cognitive function of Alzheimer's disease (AD) model mice. **Methods** A total of 30 9-month-old male mice were included, 10 wild-type (WT) mice were taken as the WT group, and 20 APP/PS1 transgenic AD model mice were divided into the AD group and the AD+T0 group. Novel object recognition test, Morris water maze test, immunohistochemistry and Western blot were used to detect cognitive function, the number of microglia, the expressions of paired-immunoglobulin-like receptor B (PirB), synapse-related proteins in hippocampus Synapsin and PSD-95. **Results** Compared with the WT group, the preference for novel objects significantly reduced in the AD group, meanwhile, in the Morris water maze test, the time of staying in the target quadrant and the number of entries also significantly reduced ($P < 0.05$). While the preference for novel objects increased in the AD+T0 group, and the time spent in the target quadrant and the number of entries also increased ($P < 0.05$). In addition, compared with the AD group, the number of ionized calcium binding adapter molecule-1 (Iba-1) positive cells in the hippocampus of the AD+T0 group significantly reduced, while the expression levels of synapsin and PSD-95 in the hippocampus significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** LXR β agonist T0901317 regulates synaptic plasticity in the hippocampus of AD mice, thereby improving cognitive function in AD mice.

[Key words] alzheimer disease; liver X receptors; neuronal plasticity; microglia; paired-immunoglobulin-like receptor B

* 基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(81901217);辽宁省沈阳市科技计划项目(19-112-4-037)。 作者简介:万腾飞(1992—),护师,本科,主要从事认知功能障碍研究。 Δ 通信作者, E-mail:18580763671@163.com。

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种起病隐匿、进行性发展的神经系统退行性疾病,主要表现为渐进性记忆和认知功能障碍及神经精神症状^[1]。AD 早期的病理改变主要表现为淀粉样蛋白的沉积(β -amyloid, A β)、神经纤维缠结和突触的丢失。既往研究表明,通过促进 AD 小鼠的突触形成可有效改善认知功能^[2]。而成对免疫球蛋白样受体 B (paired-immunoglobulin-like receptor B, PirB) 能作为 A β 的受体,使丝切蛋白去磷酸化并活化,导致突触的丢失和可塑性的降低^[3]。肝 X 受体(liver X receptor, LXR)包括 LXR α 和 LXR β 两型,属于配体激活的核转录因子,研究表明中枢神经系统中的内源性 LXR β 活化能够有效调节脂代谢、神经炎症及突触可塑性^[4]。然而,LXR β 能否通过 PirB 调节海马突触可塑性来改善 AD 小鼠的认知功能障碍目前尚缺乏报道。本研究采用经典的 APP/PS1 转基因 AD 模型小鼠,通过给予 LXR β 激动剂,检测对 APP/PS1 转基因小鼠学习记忆功能的改善作用,并探讨 LXR β 对 PirB 的影响和对海马组织突触形成的调节作用与机制,旨在为治疗 AD 引起的学习认知障碍提供治疗靶点,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂

LXR β 激动剂 T0901317(美国 Sigma 公司)、PirB 抗体(美国 R&D 公司)、 β -actin 抗体(英国 Abcam 公司)、Synapsin 抗体(英国 Abcam 公司)、PSD-95 抗体(英国 Abcam 公司)、生物素二抗(美国 Life Technologies 公司)等。

1.1.2 实验动物

20 只 APP/PS1 转基因 AD 模型小鼠及 10 只同窝野生(wild-type, WT)小鼠购于南京模式动物中心,9 个月龄,雄性,所有实验小鼠饲养在温度与湿度适宜的洁净环境中,自由摄食,分笼饲养。所有动物实验按照实验动物管理及保护的有关规定进行。

1.2 方法

1.2.1 实验分组与药物处理

WT 小鼠作为对照组(WT 组, $n=10$), APP/PS1 双转基因小鼠分为 AD 组(AD 组, $n=10$)和 T0901317 处理组(AD+T0 组, $n=10$)。其中 AD+T0 组小鼠采用灌胃给予 50 mg/kg 的 T0901317,连续处理 14 d, WT 组和 AD 组给予同等剂量的二甲基亚砜(DMSO)溶剂。

1.2.2 新物体识别实验

参考文献[5]的方法,对小鼠进行新物体识别行为学检测。具体操作如下:先将两个完全相同的圆柱形物体(A 物体)分别放在测试箱的两侧,放入小鼠让

其在箱内适应 3 min,再让小鼠休息 15 min,进行测试阶段,将一侧的圆柱形物体换为立方体盒(B 物体),立方体盒底面边长与之前的圆柱体盒直径一样,然后将待测试小鼠放入测试箱中,让其自由探索 3 min,采用 Ethovision XT 软件记录并分析小鼠探索新物体及旧物体的时间,即鼻尖距离物体边缘小于 2 cm,探索偏爱指数=小鼠探索新物体的时间(B)/小鼠探索所有物体的总时间(A+B) $\times 100\%$ 。

1.2.3 水迷宫行为学实验

参考文献[6]的方法,对小鼠进行 Morris 水迷宫行为学检测。具体操作如下:在正式进行行为学检测的前 1 d,将所有小鼠进行适应性训练,消除不同实验组小鼠对各个象限的探索偏爱。接着对所有小鼠进行 4 d 正式的实验训练,将小鼠放入水中,让小鼠游泳找到隐藏的平台,总共限时 60 s,若在 60 s 以内未能找到平台,则将小鼠放到平台上,小鼠每次在平台上停留 20 s,记录小鼠每次找到平台的潜伏期。第 5 天将平台撤去,检测小鼠对平台象限的记忆水平。每次试验进行 60 s,记录小鼠找到正确象限的潜伏期,并记录小鼠在 60 s 内进入正确象限的总次数。

1.2.4 免疫组织化学检测

小鼠行为学检测结束后,对小鼠进行灌注,取材,将脑组织利用 4%及 30%蔗糖溶液进行脱水固定后,进行冰冻切片。用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)对小鼠脑切片进行漂洗,加入一抗兔抗-离子钙结合衔接分子-1(Iba-1),放入 4 °C 冰箱中孵育 12 h,再用 0.01 mol/L PBS 进行漂洗后,加入生物素二抗,在 37 °C 孵箱中反应 3 h,再用 0.01 mol/L PBS 进行漂洗,加入 SABC 溶液放入到 37 °C 孵箱中反应 1 h,漂洗后采用 DAB 溶液进行显色,贴片,采图。统计海马组织中 Iba-1 阳性细胞数,并计算出 Iba-1 阳性细胞数的密度,每组共采用 4 个标本进行检测,以此反映小胶质细胞数量。

1.2.5 Western blot 检测

取材后,将小鼠脑组织置于冰上分离出海马组织,加入组织裂解液,用组织破碎机对海马组织进行研磨,离心后取上清液。利用 BCA 试剂盒对各标本的蛋白浓度进行测定。按照说明书上的流程配制十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳凝胶,加入蛋白样品进行电泳,接着采用湿转法转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜,用 5%的脱脂奶粉溶液对 PVDF 膜进行封闭 3 h,漂洗后分别加入对应的抗体,在 4 °C 条件下孵育 12 h,采用 TBST 清洗后,分别加入对应的二抗,在 37 °C 条件下反应 2 h,漂洗后加入发光液,用 Bio-Rad ChemiDoc MP 多功能成像系统显影采图。最后利用 ImageJ 软件对各条带上的灰度值进行分析,并以 β -actin 为内参计算出成对免疫球蛋白

样受体 B(PirB)、海马突触相关蛋白 Synapsin 和 PSD-95 相对表达水平。并以 WT 组为参考,分别算出各组目的蛋白的相对表达水平,每组共采用 4 个标本进行检测。

1.3 统计学处理

采用 SPSS20.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 LSD-*t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 T0901317 对 AD 小鼠认知功能的影响

新物体识别行为学检测发现,AD 组存在短时记忆的障碍,表现为对新物体的探索偏爱指数明显低于 WT 组,而 AD+T0 组对新物体的探索偏爱指数明显提升($P < 0.05$)。Morris 水迷宫行为学检测发现,在第 5 天测试阶段,AD 组在目标象限停留时间百分比

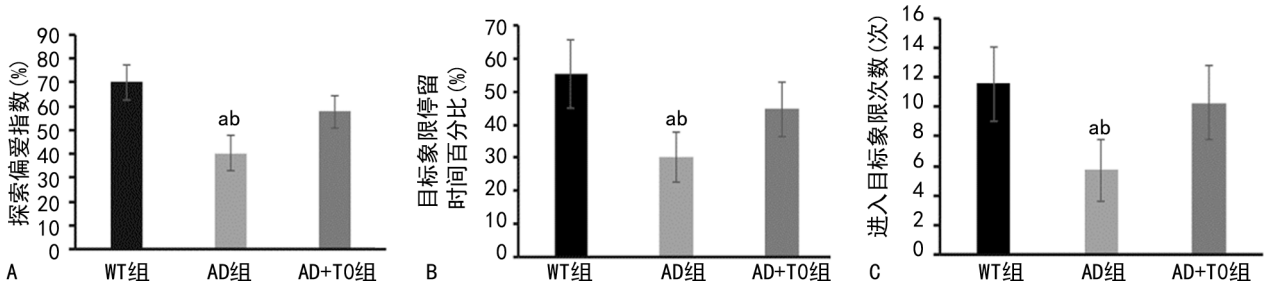
明显低于 WT 组($P < 0.05$),AD 组同时进入目标象限的次数也明显低于 WT 组($P < 0.05$)。而 AD+T0 组在目标象限停留时间百分比及进入目标象限的次数明显增加($P < 0.05$),见图 1。

2.2 T0901317 对 AD 小鼠海马组织 Iba-1 阳性细胞数的影响

免疫组织化学检测发现,AD 组海马组织 Iba-1 阳性细胞数比 WT 组多($P < 0.05$),而 AD+T0 组海马组织 Iba-1 阳性细胞数明显降低($P < 0.05$),见图 2。

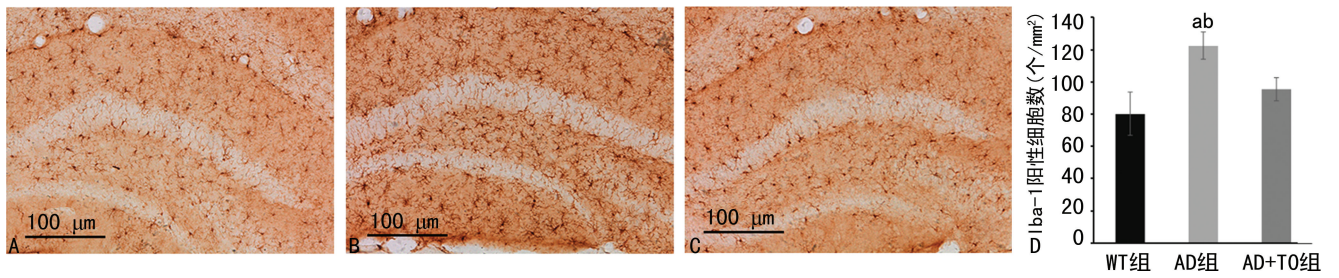
2.3 T0901317 对 AD 小鼠海马组织 PirB、Synapsin 和 PSD-95 表达水平的影响

Western blot 检测发现,与 WT 组比较,AD 组海马组织 PirB 表达水平升高,Synapsin 和 PSD-95 表达水平降低($P < 0.05$),而 AD+T0 组 PirB 表达水平降低,Synapsin 和 PSD-95 表达水平明显升高($P < 0.05$),见图 3。



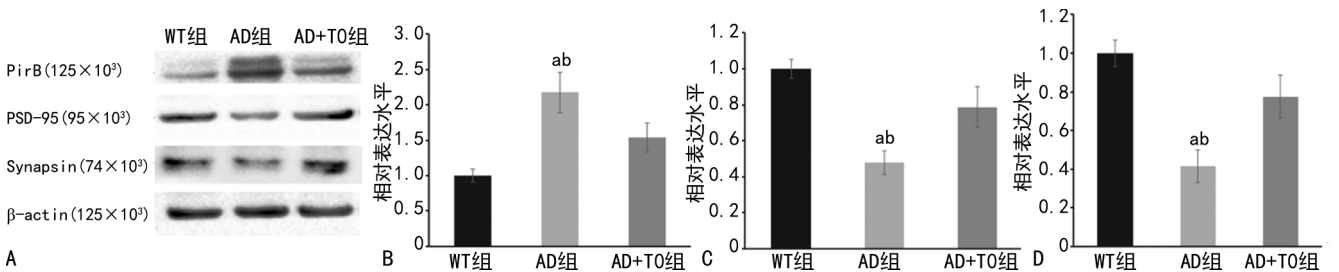
A:小鼠进行新物体识别实验对新物体的探索偏爱指数;B:Morris 水迷宫实验中小鼠在目标象限停留时间所占的百分比;C:Morris 水迷宫实验中各组小鼠进入目标象限的次数;^a: $P < 0.05$,与 WT 组比较;^b: $P < 0.05$,与 AD+T0 组比较。

图 1 T0901317 对 AD 小鼠认知功能的影响



A:WT 组小鼠海马组织 Iba-1 免疫组织化学染色图;B:AD 组小鼠海马组织 Iba-1 免疫组织化学染色图;C:AD+T0 组小鼠海马组织 Iba-1 免疫组织化学染色图;D:3 组小鼠海马组织 Iba-1 阳性细胞密度统计图;^a: $P < 0.05$,与 WT 组比较;^b: $P < 0.05$,与 AD+T0 组比较。

图 2 T0901317 对 AD 小鼠海马组织 Iba-1 阳性细胞数的影响



A:Western blot 检测;B:小鼠海马组织 PirB 半定量分析 C:小鼠海马组织 Synapsin 半定量分析;D:小鼠海马组织 PSD-95 半定量分析;^a: $P < 0.05$,与 WT 组比较;^b: $P < 0.05$,与 AD+T0 组比较。

图 3 T0901317 对 AD 小鼠海马组织 PirB、Synapsin 和 PSD-95 表达水平的影响

3 讨 论

AD 是一种起病隐匿的进行性发展的神经系统退行性疾病。AD 患者最早表现出的临床症状为海马相关的记忆丢失,是突触功能异常的结果。使用功能磁共振成像(fMRI)在体脑成像技术,发现与记忆相关的脑区往往形成异常的网络联系^[7]。采用电子显微镜进行超微结构观察发现 AD 患者海马区域突触丢失明显,且这种突触丢失的严重程度与记忆减退的程度明显相关^[8]。BERTONI-FREDDARI 等^[9]证实 AD 小鼠海马组织平均单个神经元的突触数较非 AD 对照组减少 50%。AD 患者脑组织内突触相关蛋白(Synapsin 和 PSD-95)的丢失与 AD 患者认知功能减退的程度密切相关^[10]。采用免疫组织化学与免疫印迹分析表明 AD 患者脑组织中突触前蛋白与突触后蛋白较同龄非 AD 对照组明显降低,亦提示这些特异的突触蛋白参与 AD 病的进程^[11]。同样,在 AD 动物模型中观察到 AD 早期的病理改变主要表现为淀粉样蛋白的沉积和突触的丢失。此外,通过将胚胎干细胞来源的神经前体细胞移植入 AD 模型大鼠内能分化为神经元并与靶区神经元建立了突触,并检测到学习记忆得到改善^[12]。因此,对 AD 中突触功能调控机制研究为 AD 治疗提供重要途径。本研究结果提示,LXR β 激动剂 T0901317 可以通过调节 AD 小鼠海马组织的突触可塑性来改善认知功能。

LXR 包括 LXR α 和 LXR β 两型,属于配体激活的核转录因子。其中 LXR α 主要分布在与脂代谢相关的组织与细胞如肝脏、小肠、脂肪组织等,LXR β 在体内有更广泛的表达。研究资料显示 LXR 在中枢神经系统发育中亦有重要功能,其中 LXR β 为主要的亚型表达受体。中枢神经系统中内源性 LXR β 活化能够有效调节脂代谢与炎症反应^[13]。当脑组织的炎症使疾病加重时,小胶质细胞会过多活化产生严重的神经毒性^[14]。已有研究表明,LXR β 能通过核因子- κ B(NF- κ B)通路来减少 AD 小鼠中的星形胶质细胞形成,从而防止胆碱能神经元被损伤^[15]。同时,LXR β 能够促进小胶质细胞对脑内的 A β 蛋白的清除^[16]。在本研究中,也进一步证实了,LXR β 激动剂 T0901317 可以明显降低 AD 小鼠海马组织的 Iba-1 阳性细胞数,从而抑制脑内的过度炎症反应。

PirB 是存在于小鼠体内和人类白细胞免疫球蛋白样蛋白受体 B2(human leukocyte immunoglobulin-like receptor B2,LILRB2)同源的一类膜蛋白受体。起初发现,在免疫系统中 PirB 在 B 淋巴细胞、肥大细胞、巨噬细胞、粒细胞和树突细胞中表达,能作为主要组织相容性复合体 I(MHC I)的受体来调节免疫反应^[17]。近期研究发现,PirB 表达在中枢神经系统的神经元和星形胶质细胞中,在中枢神经系统损伤后,

PirB 的表达水平增高,且能通过和轴突抑制生长因子 Nogo、OMgp 和 MAG 的相互作用来抑制轴突的生长和神经元的可塑性^[18-19]。此外,PirB 的突变鼠,在视神经损伤后对比对照组,表现出极强的视皮层的可塑性^[20]。最新研究发现,在 AD 小鼠中,PirB 能作为 A β 的受体,使蛋白磷酸酶 PP2A 和 PP2B 上调,从而使丝切蛋白去磷酸化并活化,活化的丝切蛋白使肌动蛋白解聚,最终导致突触的丢失和可塑性的丢失^[3]。本研究也进一步发现,通过活化内源的 LXR β 可以降低 AD 小鼠海马组织 PirB 的表达水平,同时上调突触相关蛋白的表达,进而改善 AD 小鼠的认知功能,提示 LXR β 可能通过 PirB 调节 AD 小鼠海马的突触可塑性,进而改善记忆和认知功能障碍。

综上所述,本研究证实了 LXR β 激动剂激活内源性 LXR β 会对 AD 所致的突触损伤有一定的修复作用,并能改善 AD 小鼠的记忆和认知功能障碍。该研究可为治疗 AD 提供新的靶点,并提供干预的措施以缓解 AD 引起的记忆和认知功能障碍,为临床治疗 AD 患者提供新的药物可能。

参考文献

- [1] CHAN K Y,WANG W,WU J J,et al. Epidemiology of Alzheimer's disease and other forms of dementia in China,1990—2010;a systematic review and analysis[J]. *Lancet*,2013,381(9882):2016-2023.
- [2] WANG Q J,SHEN Y E,WANG X,et al. Concomitant memantine and *Lactobacillus plantarum* treatment attenuates cognitive impairments in APP/PS1 mice[J]. *Aging*,2020,12(1):628-649.
- [3] KIM T,VIDAL G S,DJURISIC M,et al. Human LILRB2 is a beta-amyloid receptor and its murine homolog PirB regulates synaptic plasticity in an Alzheimer's model[J]. *Science*,2013,341(6152):1399-1404.
- [4] MOUZAT K,CHUDINOVA A,POLGE A,et al. Regulation of brain cholesterol:what role do liver X receptors play in neurodegenerative diseases[J]. *Int J Mol Sci*,2019,20(16):1-9.
- [5] ZHANG Q,YANG C,LIU T,et al. Citalopram restores short-term memory deficit and non-cognitive behaviors in APP/PS1 mice while halting the advance of Alzheimer's disease-like pathology[J]. *Neuropharmacol*,2018,131:475-486.

- [6] WANG Z J, ZHAO F, WANG C F, et al. Xestospingonin C, a reversible IP3 receptor antagonist, alleviates the cognitive and pathological impairments in APP/PS1 mice of Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2019, 72(4): 1217-1231.
- [7] SCHERR M, PASQUINI L, BENSON G, et al. Alzheimer's disease neuroimaging I: decoupling of local metabolic activity and functional connectivity links to amyloid in Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2018, 64(2): 405-415.
- [8] LENDVAI D, MORAWSKI M, NEGYESSY L, et al. Neurochemical mapping of the human hippocampus reveals perisynaptic matrix around functional synapses in Alzheimer's disease [J]. *Acta Neuropathol*, 2013, 125(2): 215-229.
- [9] BERTONI-FREDDARI C, SENSI S L, GIORGETTI B, et al. Decreased presence of perforated synapses in a triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Rejuvenation Res*, 2008, 11(2): 309-313.
- [10] QIN S, HU X Y, XU H, et al. Regional alteration of synapsin I in the hippocampal formation of Alzheimer's disease patients [J]. *Acta Neuropathol*, 2004, 107(3): 209-215.
- [11] LEUBA G, SAVIOZ A, VERNAY A, et al. Differential changes in synaptic proteins in the Alzheimer frontal cortex with marked increase in PSD-95 postsynaptic protein [J]. *J Alzheimers Dis*, 2008, 15(1): 139-151.
- [12] ZHANG W, WANG P J, SHA H Y, et al. Neural stem cell transplants improve cognitive function without altering amyloid pathology in an APP/PS1 double transgenic model of Alzheimer's disease [J]. *Mol Neurobiol*, 2014, 50(2): 423-437.
- [13] LI Y J, ZHANG K, SUN T, et al. Epigenetic suppression of liver X receptor β in anterior cingulate cortex by HDAC5 drives CFA-induced chronic inflammatory pain [J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1): 132.
- [14] UGALDE-MUNIZ P, FETTER-PRUNEDA I, NAVARRO L, et al. Chronic systemic inflammation exacerbates neurotoxicity in a Parkinson's disease model [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 4807179.
- [15] CUI W, SUN Y, WANG Z, et al. Liver X receptor activation attenuates inflammatory response and protects cholinergic neurons in APP/PS1 transgenic mice [J]. *Neuroscience*, 2012, 210(1): 200-210.
- [16] TERWEL D, STEFFENSEN K R, VERGHESE P B, et al. Critical role of astroglial apolipoprotein E and liver X receptor- α expression for microglial A β phagocytosis [J]. *J Neurosci*, 2011, 31(19): 7049-7059.
- [17] TAKAI T. Paired immunoglobulin-like receptors and their MHC class I recognition [J]. *Immunol*, 2005, 115(4): 433-440.
- [18] LU X M, MAO M, XIAO L, et al. Nucleic acid vaccine targeting nogo-66 receptor and paired immunoglobulin-like receptor b as an immunotherapy strategy for spinal cord injury in rats [J]. *Neurotherapeutics*, 2019, 16(2): 381-393.
- [19] LIU Y, MA C, LI H, et al. Nogo-A/Pir-B/TrkB signaling pathway activation inhibits neuronal survival and axonal regeneration after experimental intracerebral hemorrhage in rats [J]. *J Mol Neurosci*, 2019, 69(3): 360-370.
- [20] DATWANI A, MCCONNELL M J, KANOLD P O, et al. Classical MHCI molecules regulate retinogeniculate refinement and limit ocular dominance plasticity [J]. *Neuron*, 2009, 64(4): 463-470.

(收稿日期: 2020-05-22 修回日期: 2020-10-26)