

Presenilin-1/Presenilin-2 双基因敲除小鼠脑中单胺类神经递质变化的研究*

张冬丽¹⁾ 梁立韵²⁾ 嵇婷婷¹⁾ 陈逸群¹⁾ 周天舒^{2)**} 梅 兵^{1)**}

(¹⁾华东师范大学脑功能基因组学研究所, 上海 200062; ²⁾华东师范大学环境科学系, 上海 200062)

摘要 条件性 *presenilins* 双基因敲除小鼠(dKO 小鼠)表现出类似阿尔茨海默症(AD)的大部分神经退行性病症, 如 Tau 蛋白磷酸化、神经元凋亡、皮层萎缩以及认知能力受损等。为探讨 *presenilins* 功能缺失、神经退行性症状与单胺类递质变化的相关性, 利用毛细管电泳法检测 6、9 和 12 月龄 dKO 小鼠皮层、海马及其他前脑部位中各单胺类神经递质的含量。结果显示, 与对照组相比, dKO 小鼠皮层中单胺类神经递质在 6 月龄时显著降低, 而随着年龄的增长, 神经退行性病变加剧, 递质浓度也均明显上升, 在海马区, dKO 小鼠单胺类递质则呈上升趋势, 但仅 6 月龄时 5-羟色胺和肾上腺素及 12 月龄时各递质的上升有统计学意义, 前脑其他部位 5-羟色胺和多巴胺递质在 6、9 月龄时与对照组相近, 在 12 月龄时则显著降低, 而去甲肾上腺素和肾上腺素在 6 月和 12 月龄时均呈降低趋势, 且均有统计学差异(6 月龄肾上腺素除外)。实验表明, 单胺类神经递质在 *presenilins* 双基因敲除的小鼠前脑各区域中的水平均发生了随龄化的变化, 且在前脑皮层、海马与前脑其他区域的变化趋势各有不同, 而单胺类递质的变化是 *presenilins* 双基因敲除导致的直接结果还是间接结果, 单胺类递质在 AD 样神经退行性病变中的作用如何, 还有待于进一步的研究。

关键词 *presenilins* 基因, 神经退行性病变, 毛细管电泳, 单胺能递质

学科分类号 Q7

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00196

阿尔茨海默症(Alzheimer's disease, AD)是最常见的神经退行性疾病, 也是导致痴呆的主要原因。AD 的病理特征主要表现为大脑皮层及皮层下结构出现典型的老年斑和神经纤维缠结、神经元凋亡以及脑萎缩, 其临床症状主要包括逐渐出现的记忆力减退、认知功能障碍、人格改变以及晚期机体功能障碍等, 严重者导致死亡^[1, 2]。研究发现, *presenilin-1*(PS1)及 *presenilin-2*(PS2)的突变与早发性的家族性阿尔茨海默症密切相关^[2~4]。

PS1 和 PS2 是两种跨膜的天冬氨酸蛋白酶, 具有约 67%的同源性^[5], 均是构成 γ -分泌酶的重要组成部分, 而 γ -分泌酶负责将淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)水解生成 β 淀粉样蛋白(amyloid peptide, A β)^[5], 后者在脑中的聚集则形成老年斑。研究表明, PS1 敲除的小鼠表现出严重的发育缺陷和胚胎致死, PS2 敲除的小鼠可以存活, 仅表现出轻微的肺部纤维化和随龄出现的出血现象^[6]。利用 Cre/LoxP 系统仅将前脑 PS1 条件性敲除

的小鼠则可以存活和繁殖, 只表现出在复杂环境诱导下的新生神经元显著减少^[7]。有意思的是, 将 PS1 前脑条件性敲除的小鼠与 PS2 敲除的小鼠杂交得到的 PS1、PS2 双基因敲除的小鼠(dKO 小鼠)存活情况良好, 其脑中虽缺乏 A β 的沉积, 但表现出 AD 样神经退行性疾病的其他表型: 学习记忆能力下降、大量神经元凋亡、皮层和海马萎缩、脑室扩大以及神经元内 Tau 蛋白的高度磷酸化^[8, 9]。

神经递质平衡状态的打破, 是衰老和许多神经退行性疾病的原因之一。有研究表明单胺能神经元在 AD 患者中有不同程度的退变^[10]。由 PS1/PS2 功能缺失导致出现 AD 样症状的小鼠脑中单胺能递质

* 上海市科委资助项目(06DZ19003)。

** 通讯联系人。Tel: 021-62233967

梅 兵。E-mail: bmei@brain.ecnu.edu.cn

周天舒。E-mail: tszhou@env.ecnu.edu.cn

收稿日期: 2009-04-01, 接受日期: 2009-08-17

是否变化? 如何变化? 单胺类神经递质变化与 AD 样神经退行性病变之间的关系如何? 本实验通过对不同年龄 dKO 小鼠皮层、海马及前脑其他区域中单胺类递质——多巴胺(DA)、5-羟色胺(5-HT)、肾上腺素(E)与去甲肾上腺素(NE)含量的测定, 初步探讨 PS1/PS2 双基因敲除致神经退行性病变的递质变化规律, 为进一步理解 AD 的发病机理提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器及试剂

PCR 仪、高速冷冻离心机(Eppendorf 公司); 组装毛细管电泳 - 电化学检测装置系统见文献[11]所述; CHI832 电化学系统(上海辰华仪器公司); 70 cm 长熔融石英毛细管(河北永年锐泽色谱器件有限公司); 高压电源(0~±30 kV, 中国科学院上海应用物理研究所); 三电极系统即直径为 300 μ m 的碳盘电极, Ag/AgCl 参比电极(KCl 3.0 mol/L), Pt 丝对电极。

5-羟色胺、多巴胺、肾上腺素、去甲肾上腺素标准品购自 Sigma 公司; Taq 酶(Takara 公司); 蛋白酶 K(天根生化科技有限公司); 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 实验动物和基因型检测

PS1/PS2 双基因敲除小鼠由 Joe Z. Tsien 教授惠赠, 遗传背景为 B6CBAF1, 其繁殖和基因型鉴定方法同文献[8]所述, 即将前脑 PS1 条件性敲除的杂合子与 PS2 敲除的杂合子杂交, 并利用 PCR 方法对其后代进行鉴定。

进行基因型检测时, 以鼠尾 DNA 为模板, 用针对 Cre、PS1 和 PS2 三个基因的特异性引物进行 PCR 检测, 引物序列分别为: Cre, 正义链, 5' A-GATGTTTCGCGATTATC 3', 反义链, 5' AGCT-ACACCAGAGACGG 3'; PS1, 正义链, 5' CAGACATTAGCACTGTCTGTAAGGAGTC 3', 反义链, 5' GTTCCTAAACCTCTAACTTCCATGAGC 3'; PS2, 正义链, 5' ATCAGCGTCATCGTAGTCA 3', 反义链, 5' TGGTGGCACAGTTAGGTC 3'。PCR 检测结果为 Cre +/-, PS1 F/F, PS2 -/- 的小鼠即为 dKO 实验组。基因型为 Cre -/-, PS1 F/+ 或 +/+, PS2 +/- 或 +/+, 且年龄、性别相同的同窝小鼠为对照组。所有小鼠生长条件为 12 h/12 h 光照周期, 温度(22 ± 3)°C, 相对湿度(70 ± 4)%, SPF 级净化空间, 自由进食、饮水。

1.3 毛细管电泳法测定神经递质含量

将 6, 9, 12 月龄的 dKO 小鼠及同窝对照组小鼠断颈处死后于冰浴中迅速剥离前脑皮层、海马, 剩余部分去除小脑和脑干后视为本实验中的前脑其他区域。组织称重后加入一定体积的 1 × PBS (pH = 7.2) 溶液, 匀浆后在 13 800 r/min, 4°C 下离心 30 min。吸取上清在相同条件下再次离心 30 min, 将上清分装存于 -80°C 备用。5-羟色胺、多巴胺、肾上腺素、去甲肾上腺素的标准液分别用二次去离子水配制成 1.0 × 10⁻³ mol/L 置于 4°C 冷藏备用。所有溶液及样品使用前须经 0.22 μ m 聚丙烯滤膜过滤并经超声除气。

毛细管使用前分别用 0.05 mol/L NaOH、二次去离子水及运行缓冲液各清洗 10 min。电泳操作条件为: pH 5.8 的磷酸缓冲溶液(浓度为 0.16 mol/L)为运行液, 检测电位为 0.85 V (以 Ag/AgCl 电极为参比电极), 分离电压 15 kV, 电动进样时间为 10 s, 进样后记录样品的电泳峰, 根据保留时间和电流的大小进行被测组分的定性和定量研究。以上所有操作均在室温((25 ± 2)°C)下进行。

1.4 实验数据处理及分析

所有实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 利用 SigmaPlot Software (Systat Software Inc.) 进行 *t*-test 检验, *P* < 0.05 视为有显著差异。

2 结 果

2.1 PCR 检测结果

将前脑 PS1 条件性敲除的杂合子与 PS2 全身

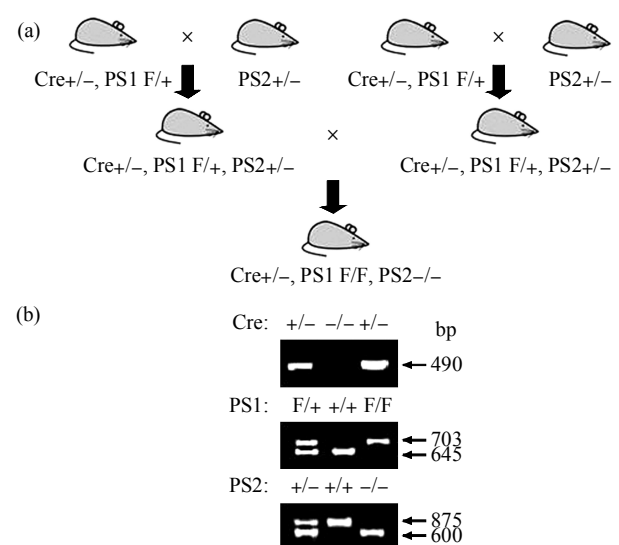


Fig. 1 Generation and PCR results of *presenilins* dKO mice (a) Strategy of producing *presenilins* dKO mice. (b) PCR results for Cre transgene, floxed PS1 alleles and PS2 -/- knockout alleles. The PCR band size is shown on the right.

性敲除的杂合子分别进行杂交,再以得到的后代中基因型为 Cre +/−, PS1 F/+, PS2 +/- 的杂合子分别进行交配,最终得到基因型为 Cre +/−, PS1 F/F, PS2 −/− 的 dKO 小鼠(图 1a). dKO 小鼠的 PCR 检测结果如图 1b 所示.

2.2 单胺类神经递质在 dKO 小鼠皮层中出现先降后升的随龄化变化

分别对 6 月、9 月和 12 月龄实验组及对照组小

鼠脑中各单胺类神经递质含量进行检测,发现 6 月龄 dKO 小鼠皮层中 5-HT、DA、E 和 NE 的含量都较对照组小鼠显著降低. 随着年龄的增长,各神经递质的含量相对于对照组都出现上升,但 9 月龄 dKO 小鼠只有 NE 的上升具有统计学意义,而在 12 月龄 dKO 小鼠中,5-HT($8.07 \times 10^{-4} \pm 2.16 \times 10^{-6}$ μg/g)、NE 和 E 的增加均具有统计学意义(图 2).

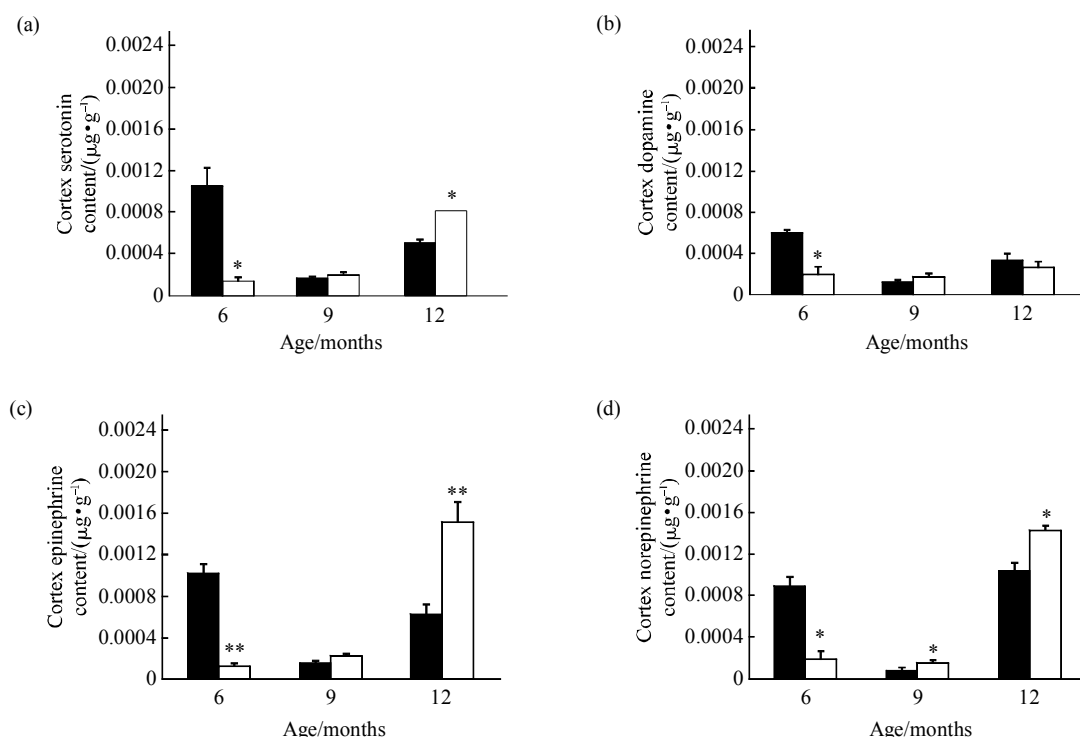


Fig. 2 Profiles of monoamine neurotransmitter in cortex of dKO mice

(a) Significant decrease of 5-HT in cortex of dKO mice at 6 months but increase at 9 and 12 months, data at 12 months reached statistic significant. (b) DA was significantly decreased in cortex of dKO at 6 months but increased at 9 months without statistic difference. Trends of E (c) and NE (d) were consistent with 5-HT in cortex of dKO, in addition, NE in cortex of dKO mice at 9 months also showed a statistic difference. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Number of individual mouse in each age point: for 6 months, control $n=4$, dKO $n=3$; for 9 months, control $n=7$, dKO $n=6$; for 12 months, control $n=4$, dKO $n=3$. ■: Control ($n=4 \sim 6$); □: dKO ($n=3 \sim 7$).

2.3 dKO 小鼠海马中单胺类神经递质水平升高

如图 3 所示,与对照组相比,dKO 小鼠海马中 5-HT、DA、E 和 NE 的浓度在 6、9 和 12 月龄时均有上升趋势(6 月龄时 DA 除外),但仅有 6 月龄时 5-HT 和 E 的浓度上升,以及 12 月龄时的 4 种递质浓度上升有统计学意义,与皮层中神经递质含量的变化呈现出不同的规律.

2.4 dKO 小鼠前脑其他部位单胺类递质的变化

对前脑其他部位单胺类递质含量进行检测发

现,dKO 小鼠中 5-HT 和 DA 在 6 月、9 月龄时与对照组相当,12 月龄时均显著降低(图 4a, b). 而 dKO 小鼠中 NE 和 E 又有着不同的变化趋势,在 6 月和 12 月龄时显著降低,但 6 月龄时 E 含量差异无统计学意义($P = 0.07$),9 月龄时 E 和 NE 含量与对照组相近(图 4c, d). 单胺类神经递质在前脑其他区域呈现出与皮层、海马均不同的变化趋势.

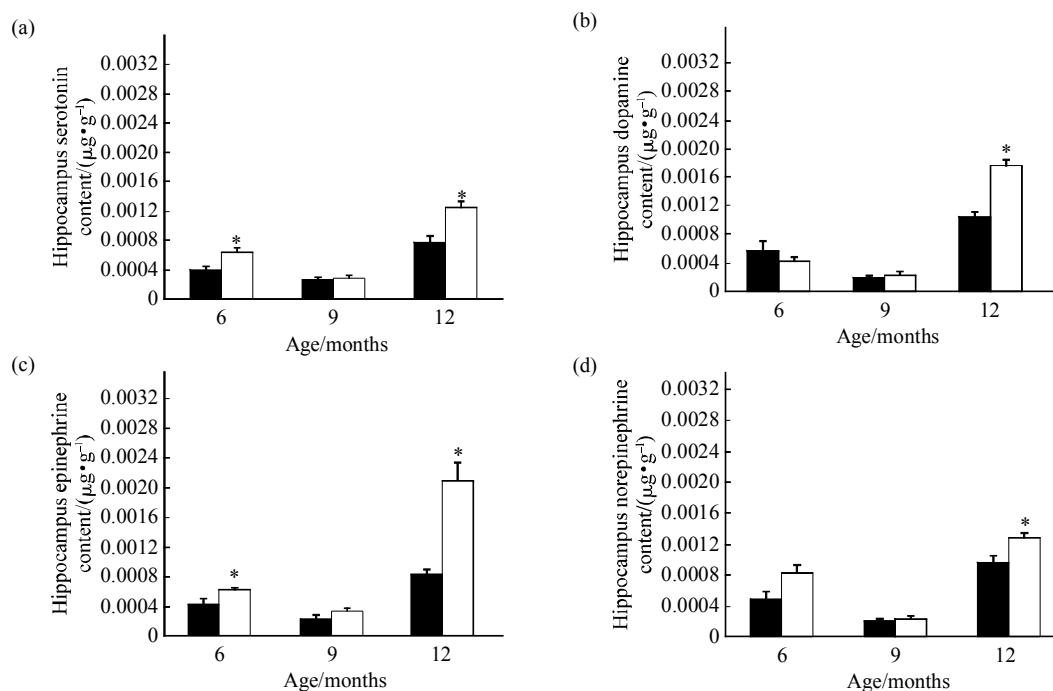


Fig. 3 Increase of monoamine neurotransmitter in hippocampus of dKO mice

Data showed a significant increase of the level of 5-HT (a) and E (c) in hippocampus of dKO mice at 6 and 12 months. Significant increased level of DA (b) and NE (d) in hippocampus of dKO at 12 months age. * $P < 0.05$. Number of individual mouse in each age point: for 6 months, control $n = 4$, dKO $n = 3$; for 9 months, control $n = 7$, dKO $n = 6$; for 12 months, control $n = 4$, dKO $n = 3$. ■ : Control ($n = 4 \sim 6$); □ : dKO ($n = 3 \sim 7$).

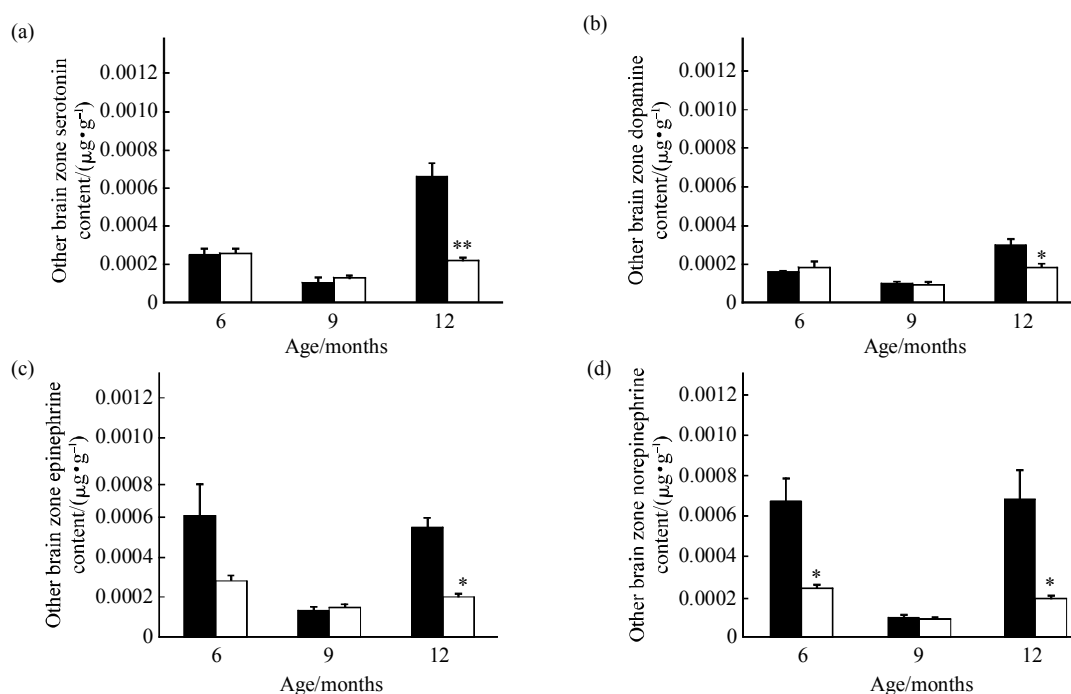


Fig. 4 Monoamine neurotransmitter levels in other region of dKO mice forebrain

Significant decrease of 5-HT (a) and DA (b) in other forebrain region of dKO mice at 12 months when compared to the controls. (c) Decrease level of E in other forebrain region of dKO mice at 6 and 12 months, data at 12 months reached statistic difference. (d) Decrease level of NE in other forebrain region of dKO mice at 6 and 12 months with significant difference. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Number of individual mouse in each age point: for 6 months, control $n = 4$, dKO $n = 3$; for 9 months, control $n = 7$, dKO $n = 6$; for 12 months, control $n = 4$, dKO $n = 3$. ■ : Control ($n = 4 \sim 6$); □ : dKO ($n = 3 \sim 7$).

3 讨 论

单胺类神经递质包括儿茶酚胺、5-羟色胺及组胺三类, 而儿茶酚胺类又包括多巴胺、肾上腺素及去甲肾上腺素. 单胺类神经递质参与了体内多种生理活动, 如体温调节、精神情绪活动及睡眠等^[12]. 对 AD 患者死亡后各脑区中单胺类递质检测发现, 5-HT、DA 及 NE 在大部分脑区中含量均有所降低, 其原因可能是由于各神经递质的代谢发生改变引起的^[13], 表明 AD 患者脑中儿茶酚胺及 5-羟色胺能系统均受到了影响.

本实验中所用的模型小鼠是利用 Cre/LoxP 系统将前脑中的 PS1 条件性敲除以及利用基因打靶技术将 PS2 全身性敲除的双基因敲除小鼠. Cre/LoxP 系统是利用细菌噬菌体 P1 中的 Cre 重组酶, 特异性识别两个同向的 LoxP (34bp) 位点并催化将位于其间的 PS1 序列剔除, 而 Cre 序列则由 α -CaMK II 启动子启动, 由于 α -CaMK II 启动子仅在出生后的前脑中特异性表达, 因此 Cre 也只在小鼠出生后的前脑中有所表达, 从而使 PS1 仅在前脑中被敲除, 而不影响小鼠的发育. 已有的研究表明, dKO 小鼠呈现 AD 的大部分病理和临床特征, 具体表现在: 在 2 月龄时, 无论是脑组织形态、生化特征还是认知行为, dKO 小鼠与对照组小鼠相比, 都无明显差异; 至 6 月龄时, dKO 小鼠开始表现出神经元凋亡、神经元内 Tau 蛋白磷酸化、皮层萎缩、第三脑室及侧脑室扩大、认知功能受损等神经退行性病变的典型症状, 之后随着年龄的增加, 这些症状更加显著^[8, 9, 14]. 因此本实验选用 6、9 和 12 月龄的小鼠进行实验. 结果发现, PS1/PS2 双基因敲除小鼠自 6 月龄始, 前脑中的单胺类神经递质水平较对照组小鼠都发生了变化, 而且单胺类递质在前脑皮层、海马与前脑其他区域的变化趋势各有不同. 那么, PS1/PS2 双基因敲除是通过影响神经递质系统的平衡进而导致神经退行性病变, 还是通过先导致神经退行性病变继而影响递质系统的平衡? 值得一提的是, 与其他 AD 模型不同的是, PS1/PS2 双基因敲除小鼠的脑中没有 A β 的沉积^[15], 那么, 这两类 AD 样小鼠脑中单胺类递质的变化规律是否一致? 何种递质首先受到影响进而触发其他递质水平发生变化, 以及单胺类递质在不同脑区呈现不同变化规律的意义何在? 这些问题只有在全面测定 PS1/PS2 小鼠脑中的神经递质水平并与其他 AD 样模型小鼠递质变化规律相比较的基础上才能

予以阐明. 而对这些问题的解答, 有助于对 PS1/PS2 的生物功能以及 AD 病变的分子机制进行深入的了解.

参 考 文 献

- Goedert M, Spillantini M G. A Century of Alzheimer's disease. Science, 2006, **314** (5800): 777~780
- 鲍云鹤, 邹 泉, 郑坚瑜. 早老蛋白(Presenilins)功能研究进展. 生命科学, 2000, **12**(5): 217~220
Bao Y H, Zou Q, Zheng J Y. Chin Bull Life Sci, 2000, **12**(5): 217~220
- Haass C. Presenilins: Genes for life and death. Neuron, 1997, **18**(5): 687~690
- Czech C, Tremp G, Pradier L. Presenilins and Alzheimer's disease: biological functions and pathogenic mechanisms. Prog Neurobiol, 2000, **60**(4): 363~384
- Selkoe D J, Wolfe M S. Presenilin: running with scissors in the membrane. Cell, 2007, **131**(2): 215~221
- Donoviel D B, Hadjantonakis A K, Ikeda M, et al. Mice lacking both *presenilin* genes exhibit early embryonic patterning defects. Genes Dev, 1999, **13**(21): 2801~2810
- Feng R, Rampon C, Tang Y P, et al. Deficient neurogenesis in forebrain-specific *presenilin-1* knockout mice is associated with reduced clearance of hippocampal memory traces. Neuron, 2001, **32** (5): 911~926
- Feng R, Wang H, Wang J, et al. Forebrain degeneration and ventricle enlargement caused by double knockout of Alzheimer's *presenilin-1* and *presenilin-2*. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, **101**(21): 8162~8167
- Saura C A, Choi S Y, Beglopoulos V, et al. Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration. Neuron, 2004, **42**(1): 23~36
- Arai H, Kosaka K, Iizuka R. Changes of biogenic amines and their metabolites in postmortem brains from patients with Alzheimer-type dementia. J Neurochem, 1984, **43**(2): 388~393
- 方禹之, 方晓明, 叶建农. 高效毛细管电泳 - 电化学检测对多羟基抗生素分离测定的研究. 高等学校化学学报, 1995, **16**(10): 1514~1518
Fang Y Z, Fang X M, Ye J N. Chem J Chin Univ, 1995, **16**(10): 1514~1518
- 孟 强. 单胺类神经递质与缺血性脑损伤. 国外医学脑血管疾病分册, 1998, **6**(2): 74~77
Meng Q. Foreign medical sciences cerebrovascular diseases, 1998, **6**(2): 74~77
- Nazarali A J, Reynolds G P. Monoamine neurotransmitters and their metabolites in brain regions in Alzheimer's disease: A postmortem study. Cell Mol Neurobiol, 1992, **12**(6): 581~587
- Wu P, Shen Q, Dong S Z, et al. Calorie restriction ameliorates neurodegenerative phenotypes in forebrain-specific *Presenilin-1* and *Presenilin-2* double knockout mice. Neurobiol Aging, 2008, **29**(10): 1502~1511
- Zhang D L, Chen Y Q, Jiang X, et al. Oxidative damage increased in *presenilin1/presenilin2* conditional double knockout mice. Neurosci Bull, 2009, **25**(3): 131~137

Variation of Monoamine Neurotransmitter in Forebrain of *Presenilin-1/Presenilin-2* Double Knockout Mice*

ZHANG Dong-Li¹⁾, LIANG Li-Yun²⁾, JI Ting-Ting¹⁾, CHEN Yi-Qun¹⁾, ZHOU Tian-Shu^{2)**}, MEI Bing^{1)**}

¹⁾Shanghai Institute of Brain Functional Genomics, East China Normal University, Shanghai 200062, China;

²⁾Resources and Environment Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract Conditional forebrain-specific *presenilin-1* and *presenilin-2* double knockout mice (dKO mice) exhibit several neurodegenerative phenotypes of Alzheimer's disease (AD) pathology, such as tau hyperphosphorylation, neuron loss, forebrain cortical shrinkage and memory impairment. By using capillary electrophoresis assay, monoamine neurotransmitters in forebrain cortex, hippocampus and other forebrain region of dKO mice aged at 6, 9 and 12 months were measured to illustrate the relationship among *presenilins* function deficiency, neurodegenerative phenotypes and monoamine neurotransmitters. Data showed that levels of monoamine neurotransmitters in forebrain cortex of dKO mice were significantly decreased at 6 months when compared to controls, while as mice getting older, levels of monoamine neurotransmitters increased to that of controls, or even higher. In hippocampus, 5-hydroxytryptamin and epinephrine in dKO mice had a significant increase at 6 months, followed with a significant increase of each monoamine neurotransmitter at 12 months age. In other forebrain region, 5-hydroxytryptamin and dopamine had a similar level between control and dKO mice at 6 and 9 months but a significant decrease at 12 months; however, level of norepinephrine and epinephrine were significantly decreased at 6 and 12 months except epinephrine of 6 months. These results demonstrated that knockout of *presenilins* genes could lead to the variation of monoamine neurotransmitters, and the variation profiles were different among forebrain cortex, hippocampus and other forebrain region. However, whether *presenilins* deficiency caused the variation of monoamine neurotransmitter directly or not, and how about the effects of variation of monoamine neurotransmitters on AD-like pathology need to be further analyzed.

Key words *presenilins*, neurodegenerative symptom, capillary electrophoresis assay, monoamine neurotransmitter

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00196

*This work was supported by a grant from Shanghai Science and Technology Commission (06DZ19003).

**Corresponding author. Tel: 86-21-62233967

MEI Bing. E-mail: bmei@brain.ecnu.edu.cn

ZHOU Tian-Shu. E-mail: tszhou@env.ecnu.edu.cn

Received: April 1, 2009 Accepted: August 17, 2009