|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 分类号 |  | 密级 |  |
| U D C |  | 编号 |  |



博士学位论文

**Apelin-13 通过 ABCA1 改善**

**APP/PS1 小鼠的认知与记忆功能**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 研 究 生 姓 名 | ： | 欧阳新平 |
| 指导教师姓名、职称 | ： | 唐朝克 教授 |
| 学 科 、 专 业 名 称 | ： | 病理学与病理生理学 |
| 研 究 方 向 | ： | 神经退行性病变防治 |

2014 年 5 月

南华大学学位论文原创性声明

本人声明，所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了论文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得南华大学或其他单位的学位或证书而使用过的材料。与我共同工作的同志对本研究所作的贡献均已在论文中作了明确的说明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

作者签名： 年 月 日

南华大学学位论文版权使用授权书

本学位论文是本人在南华大学攻读博士学位期间在导师指导下完成的学位论文。本论文的研究成果归南华大学所有，本论文的研究内容不得以其它单位的名义发表。本人同意南华大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留学位论文，允许学位论文被查阅和借阅；学校可以公布学位论文的全部或部分内容，可以采用复印、缩印或其它手段保留学位论文；学校可根据国家或湖南省有关部门规定送交学位论文。同意学校将论文加入《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》，并按《中国优秀博硕士学位论文全文数据库出版章程》规定享受相关权益。同意授权中国科学信息技术研究所将本学位论文收录到《中国学位论文全文数据库》，并通过网络向社会公众提供信息服务。对于涉密的学位论文，解密后适用该授权。

作者签名： 导师签名：

年 月 日 年 月 日

1

目 录

[第一部分 Apelin-13增加PC-12细胞](#_Toc686721677) 7

[结论：](#_Toc686721678) 7

[第二部分 Apelin-13改善APP/PS1小鼠认知与记忆功能](#_Toc686721679) 7

[结论：](#_Toc686721680) 8

[第三部分 Apelin-13通过ABCA1改善](#_Toc686721681) 8

[结论：](#_Toc686721682) 8

[Abstract](#_Toc686721683) 8

[第一部分](#_Toc686721684) **[Apelin-13](#_Toc686721684)**[增加](#_Toc686721684)**[PC-12](#_Toc686721684)**[细胞](#_Toc686721684) 9

[1.前言](#_Toc686721685) 9

**[第二部分 Apelin-13](#_Toc686721686)**[改善](#_Toc686721686)**[APP/PS1](#_Toc686721686)**[小鼠认知与记忆功能](#_Toc686721686) 16

[前言](#_Toc686721687) 16

**[第三部分 Apelin-13](#_Toc686721688)**[通过](#_Toc686721688)**[ABCA1](#_Toc686721688)**[改善](#_Toc686721688) 22

[前言](#_Toc686721689) 22

[结论](#_Toc686721690) 27

[参 考 文 献](#_Toc686721691) 27

[参 考 文 献](#_Toc686721692) 31

3

主要缩略语中英文索引

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 缩写词 | 英文全称 | 中文全称 |
| ABCA1 | ATP-binding cassette transporter A1 | 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 |
| ABCB1 | ATP binding cassette transporter B1 | 三磷酸腺苷结合盒转运体 B1 |
| ABCG2 | ATP binding cassette transporter G2 | 三磷酸腺苷结合盒转运体 G2 |
| ABCG4 | ATP binding cassette transporter G4 | 三磷酸腺苷结合盒转运体 G4 |
| AD | Alzheimer’s disease | 阿尔茨海默病 |
| ApoA-I | Apolipoprotein A-I | 载脂蛋白 A-I |
| ApoE | Apolipoprotein E | 载脂蛋白 E |
| APJ | Putative recep tor p rotein related to the angiotensin recep tor AT1 | 血管紧张素受体 AT1 相关的受体蛋白 |
| APP | Amyloid precursor protein | 淀粉样前体蛋白 |
| Aβ | β-Amyloid protein | β-淀粉样蛋白 |
| BACE1 | Beta-site APP cleaving enzyme 1 | β 位淀粉样前体蛋白分解酶 1 |
| IDE | Insulin degrading enzym | 胰岛素降解酶 |
| LXR | Liver X receptor | 肝 X 受体 |
| miRNAs | microRNAs | 小分子 RNA |
| NEP | neprilysin | 脑啡肽酶 |
| PS1 | Presenilin 1 | 早老素 l |
| PS2 | Presenilin 2 | 早老素 2 |
| PVDF | Polyvinylidene fluoride | 聚偏二氟乙烯 |
| Real-time PCR | Real-time quantitative PCR | 实时定量 PCR |

1

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 缩写词 | 英文全称 | 中文全称 |
| SP | Senile plaque | 老年斑 |
| SPF | Specific pathogen free | 无特定病原体 |
| VD | Vascular dementia | 血管性痴呆 |

2

**Apelin-13通过ABCA1改善APP/PS1小鼠的认知与记忆功能**中文摘 要

阿尔茨海默病（Alzheimer's disease, AD）是一种发病率较高、危害性较大的

神经系统退行性疾病，其主要临床特征为进行性认知和记忆功能减退。β-淀粉样蛋白（β-Amyloid protein, Aβ）在脑内的生成和沉积所形成的老年斑（senile plaque, SP）在AD的病理过程中起重要的作用。Aβ生成增加、酶介导的Aβ降解不足以及

Aβ从脑内清除减少是导致Aβ聚集的重要原因。过量的Aβ聚集后形成淀粉样沉积和老年斑，从而产生神经毒性，出现认知及记忆功能损害。

三磷酸腺苷结合盒转运体A1（ATP binding cassette transporter A1, ABCA1）与Aβ代谢联系紧密。ABCA1蛋白缺失会导致脑内载脂蛋白E(apolipoprotein E，

apoE）荷脂减少和Aβ水平增加。ABCA1蛋白过表达会增加脑内apoE荷脂和减少Aβ水平，进而对AD产生影响。ABCA1高表达时，Aβ生成减少，降解和清除增加。鉴于ABCA1在Aβ的代谢和集聚中起非常重要作用，可以将ABCA1作为治疗AD的一个重要靶点。因此，寻找一种能有效增加ABCA1表达的物质变得至关重要。

Apelin是脂肪细胞分泌的一种具有生物活性的肽类激素，在体内具有广泛的组织学分布。近来研究表明，Apelin在海马神经元保护过程中起重要的作用。基于海马神经元在学习与记忆中具有重要的地位，提示apelin对学习记忆具有调节作用。我们前期研究表明，Apelin-13增加THP-1源性巨噬细胞ABCA1水平，但其对Aβ代谢的作用目前尚不清楚。鉴于ABCA1蛋白与Aβ代谢之间的密切关系，我们提出以下假设：apelin-13通过增加ABCA1蛋白水平减少Aβ沉积及改善AD模型鼠认知与记忆功能。

本课题分三个部分来验证假设，第一部分使用apelin-13处理大鼠嗜铬细胞瘤细胞株（PC-12细胞，具有神经内分泌细胞特性），观察apelin-13是否通过影响ABCA1蛋白水平从而调节PC-12细胞Aβ代谢，并阐明其机制。第二部分使用apelin-13处理

APP/PS1转基因小鼠，观察apelin-13是否改善AD模型鼠的认知记忆功能及减少其Aβ

沉积。第三部分使用ABCA1 SiRNA沉默APP/PS1转基因小鼠脑组织ABCA1表达，观

察apelin-13是否通过ABCA1蛋白改善AD模型鼠的认知记忆功能及减少其Aβ沉积。本研究对AD的防治提供了一个新的实验依据。

# 第一部分 Apelin-13增加PC-12细胞

ABCA1蛋白水平调节Aβ代谢

目的：观察apelin-13是否通过影响ABCA1蛋白水平从而调节Aβ代谢，并阐明其机制。

方法：①Western blot检测PC-12细胞血管紧张素受体AT1相关的受体蛋白

（putative recep tor p rotein related to the angiotensin recep tor AT1, APJ）表达，以确定PC-12细胞存在apelin-13作用受体。②用不同浓度（1、10、100nmol/L）的apelin-13处理PC-12细胞24h及用100nmol/L apelin-13处理细胞24不同时间（12h、24h、48h）后，酶联免疫吸附法（ELISA）检测Aβ1-40及Aβ1-42水平，Western blot免疫印迹法检测APP、BACE1及NEP蛋白水平，根据试剂盒方法检测BACE1及NEP酶活性，RT-PCR检测ABCA1 mRNA水平，Western Blot检测ABCA1蛋白水平，液体闪烁计数法检测细胞内胆固醇的流出。③先使用ABCA1 SiRNA抑制PC-12细胞ABCA1蛋白表达，再使用100nmol/L apelin-13处理PC-12细胞24h, ELISA检测Aβ1-40及Aβ1-42水平，根据试剂盒方法检测BACE1及NEP酶活性。以确定ABCA1在apelin-13对PC-12细胞Aβ代谢影响中所起的作用。④先使用PKCαSiRNA抑制PKCα表达，再使用100nmol/L apelin处理PC-12细胞24h，检测apelin对ABCA1蛋白水平的影响。使用不同浓度（1、10、100nmol/L）的apelin-13处理PC-12细胞24h，检测钙调蛋白（calpain）活性。⑤使用不同浓度（1、10、100nmol/L）apelin-13处理PC-12细胞24h, Western blot方法检测apoE蛋白表达水平。使用apoE SiRNA抑制apoE表达，100nmol/L apelin处理PC-12细胞24h，检测apelin对BACE1及NEP酶活性的影响。

结果：①PC-12细胞存在APJ表达。②Apelin-13显著降低PC-12细胞Aβ1-40

及Aβ1-42水平，对APP、BACE1及NEP蛋白表达无显著影响，降低BACE1酶活性，增加NEP酶活性，对ABCA1 mRNA水平无影响，增加ABCA1蛋白水平，促进胆固醇流出，减少细胞内脂质蓄积。③使用ABCA1 SiRNA抑制PC-12细胞ABCA1蛋白表达后，apelin-13降低PC-12细胞Aβ1-40及Aβ1-42水平的作用显著减弱，其降低BACE1酶活性及增加NEP酶活性的作用显著抑制。④使用PKCαSiRNA抑制PC-12细胞PKCα表达后，apelin增加ABCA1蛋白水平的作用减弱；Apelin-13显著抑制PC-12细胞calpain活性。⑤Apelin-13对PC-12细胞apoE蛋白表达无显著影响；使用apoE SiRNA抑制PC-12细胞apoE表达后，apelin-13降低BACE1酶活性及增加NEP酶活性的作用显著减弱。

结论：

①Apelin-13通过PKCα途径增加PC-12细胞ABCA1蛋白水平；

②Apelin-13通过增加PC-12细胞ABCA1蛋白水平，降低BACE1活性减少Aβ

生成、增强NEP活性增加Aβ降解，从而减少Aβ水平。

# 第二部分 Apelin-13改善APP/PS1小鼠认知与记忆功能

目的：观察apelin-13是否影响APP/PS1小鼠认知与记忆功能及脑组织Aβ代谢。方法：用不同剂量（1、2、4μg）的apelin-13侧脑室注射处理APP/PS1小鼠

30天（1次/天）后，Y迷宫实验、新物体识别实验及Morris水迷宫实验检测小鼠认知与记忆功能。随后处死小鼠，ELISA检测小鼠海马和前额叶组织的Aβ1-40及Aβ1-42水平，刚果红染色检测海马组织Aβ沉积情况，Western blot检测海马和前额叶组织

APP、BACE1及NEP蛋白水平，根据试剂盒方法检测海马和前额叶组织BACE1 及

NEP酶活性，ELISA检测小鼠外周血Aβ1-40及Aβ1-42水平，Western blot检测海马和前额叶组织ABCA1蛋白水平。

结果：Apelin-13显著提高APP/PS1小鼠在Y迷宫实验中的正确率，显著增

加APP/PS1小鼠在新物体识别实验中（无论是短时检测还是长时检测）对新物体的认知能力，并且显著减少APP/PS1小鼠在Morris水迷宫实验中的平均游泳距离及平均潜伏期。Apelin-13显著降低APP/PS1小鼠海马和前额叶组织的Aβ1-40及Aβ1-42水平，对APP、BACE1及NEP蛋白水平无显著影响，减少海马和前额叶组织BACE1酶活性，增加NEP酶活性，显著增加外周血Aβ1-40及Aβ1-42水平，显著提高海马和前额叶组织ABCA1蛋白水平。

结论：

①Apelin-13改善APP/PS1小鼠的认知与记忆功能；

②Apelin-13减少APP/PS1小鼠海马和前额叶组织Aβ生成，增加Aβ降解及清

除。

③Apelin-13增加APP/PS1小鼠海马和前额叶组织ABCA1蛋白水平。

# 第三部分 Apelin-13通过ABCA1改善

APP/PS1小鼠的认知与记忆能力

目的：观察apelin-13是否通过ABCA1蛋白影响APP/PS1小鼠认知与记忆功能及脑组织Aβ代谢。

方法：使用ABCA1 SiRNA侧脑室注射沉默APP/PS1小鼠脑组织ABCA1蛋白表达，观察apelin-13对AD模型小鼠认知与记忆功能及脑组织Aβ代谢的影响。Y迷宫实验、新物体识别实验及Morris水迷宫实验检测小鼠认知与记忆功能。处死小鼠，ELISA检测小鼠海马和前额叶组织的Aβ1-40及Aβ1-42水平，刚果红染色检测海马组织Aβ沉积情况，试剂盒检测海马和前额叶组织BACE1及NEP酶活性，ELISA检测小鼠外周血Aβ1-40及Aβ1-42水平。

结果：当脑组织ABCA1表达被沉默后，Apelin-13对APP/PS1小鼠认知记忆功能及脑组织Aβ沉积的改善作用减弱，Apelin-13对APP/PS1小鼠海马和前额叶组织BACE1活性的抑制作用及对NEP活性的促进作用降低，Apelin-13增加外周血

Aβ1-40及Aβ1-42水平的效应下降。

结论：

①Apelin-13通过增加ABCA1蛋白水平改善APP/PS1小鼠的认知与记忆功能；

②Apelin-13通过增加ABCA1蛋白水平减少APP/PS1小鼠海马和前额叶组织

Aβ生成，增加Aβ降解及清除。

关键词：Apelin-13； 三磷酸腺苷结合盒； A1； 阿尔茨海默病； β-淀粉样蛋白

**Apelin-13 improve cognition and memory function through ABCA1 in APP/PS1 mice**

Abstract

Alzheimer disease (AD) is a kind of higher incidence and more destructive degenerative disease in central nervous system with clinical features of progressive cognition functional disturbance and the decrease of memory ability. Senile plaque (SP) which generated from production and deposition ofβ-Amyloid protein（Aβ）in the brain

Plays an important role in the pathological process of AD. Production increase, insufficient degradation mediated by enzyme and clearance reduction from the brain of Aβis the important reasons causing gather of Aβ. Too much Aβgather and form into amyloid deposition and SP, which produces neurotoxicity and induces impairment of cognitive and memory.

ATP binding cassette from the A1 (ABCA1) is closely linked with Aβ metabolism. Lack of ABCA1 protein can reduce lipid-loaded level of apolipoprotein E (apoE) and increase of Aβlevel in the brain. However, overexpression of ABCA1 protein can increase lipid-loaded level of apoE and reduce the level of Aβ, so that influence the progress of AD. High expression of ABCA1 promotes decrease of Aβproduction and increase of degradation and clearance. ABCA1 plays a very important role in Aβ metabolism and gather, so ABCA1 can be as an important target for the treatment of AD. Therefore, it is crucial to looking for a kind of material to effectively increase ABCA1 expression.

Apelin is a kind of peptide hormone with biological activity secreted in adipose cells and has an extensive histologic distribution in the body. Recent studies have shown that apelin plays an important role in the protection process of hippocampal neuron. Based on the important function of hippocampal neurons in the learning and memory, it suggests apelin can adjust learning and memory. Our previous studies have shown that apelin-13 increased ABCA1 level in THP-1 derived macrophages, but its effect on Aβmetabolism was unclear. Given the close relationship between the ABCA1 protein and Aβmetabolism, we put forward the following hypothesis: apelin-13 decreases Aβ deposition

Through increasing ABCA1 protein level and improve cognition and memory function in AD model rat.

This research was divided into three parts to verify the hypothesis. In part I we used apelin-13 to treat rat pheochromocytoma cell line (PC-12 cell) with the feature of neuroendocrine cell and further observed whether apelin-13 adjusted Aβ metabolism in PC-12 cells is by influencing the ABCA1 protein level, and then clarified its mechanisms. In partⅡwe used apelin-13 to treat APP/PS1 transgenic mice and further observed whether apelin-13 improved learning and memory function of AD model rats and reduced its Aβdeposition. In partⅢwe used ABCA1 SiRNA to silence ABCA1 expression in brain tissue of APP/PS1 transgenic mouse and observed whether apelin-13 improved learning and memory function of AD model rats is by influencing ABCA1 protein level and reducing its Aβdeposition. This study provides an experimental basis for the prevention and treatment of AD.

**Part I Apelin-13 increases ABCA1 protein level to adjust Aβmetabolism in PC-12 cells**

**Objective:** To observe whether adjustment of apelin-13 to Aβmetabolism is by influencing the ABCA1 protein level and clarify its mechanisms.

**Methods:** ①Putative receptor protein related to the angiotensin receptor AT1 (APJ) was detected by Western blot PC-12 cells to determine the receptor of apelin-13 existed in PC-12 cells. ②PC-12 cells were treated with different concentrations of

Apelin-13 (1, 10, 100nmol/L) for 24 h and treated with 100nmol/L apelin-13 with different time (12 h, 24 h, 48 h), the method of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect Aβ1-40 and Aβ1-42, Western blot was used to detect APP, BACE1 and NEP protein levels, the kits was used to detect enzyme activity of BACE1 and NEP, RT-PCR was used to detect ABCA1 mRNA level, Western blot was used to detect ABCA1 protein levels, the method of liquid scintillation counting was used to detect intracellular cholesterol efflux, Oil red O staining was used to detect the contents

Of lipids in the cells. ③ABCA1 siRNA was used to inhibit ABCA1 protein expression in PC-12 cells, then PC-12 cells were treated with 100nmol/L apelin-13 for 24 h, ELISA was used to detect Aβ1-40 and Aβ1-42 levels, the kits were used to detect enzyme activity of BACE1 and NEP. Treatment of PC-12 cells with ABCA1 siRNA is to study the role of ABCA1 in the effects of apelin-13 on Aβmetabolism in PC-12 cells. ④PKCα siRNA was used to inhibit expression of PKCα, and then 100nmol/L apelin was used to treat PC-12 cells for 24 h, the affects of apelin on ABCA1 protein levels were detected. PC-12 cells were treated with different concentrations (1, 10, 100nmol/L) of apelin-13 for 24 h, calpain activity was test. ⑤PC-12 cells were treated with different concentrations (1, 10, 100nmol/L) of apelin-13 for 24 h and Western blot was used to detect apoE protein levels. ApoE siRNA was used to inhibit expression of apoE and PC-12 cells were treated with

100Nmol/L apelin for 24 h. Then the impact of apelin on BACE1 and the enzyme activity of NEP were detected.

**Results:** ①APJ existed in PC - 12 cells. ②Apelin-13 significantly reduced Aβ1-40 and Aβ1-42 levels in PC-12 cells, had no significant effect on the APP, BACE1 and NEP protein expression, reduced the enzyme activity of BACE1, increased the enzyme activity of NEP, had no effect on ABCA1 mRNA level, increased ABCA1 protein levels, promoted cholesterol efflux and reduced the lipid accumulation in the cells. ③After using ABCA1 siRNA to inhibit ABCA1 protein expression in PC-12 cells, the lowering affects of apelin-13 on Aβ1-40 and Aβ1-42 levels significantly reduced, the lowering affects of apelin-13 on the enzyme activity of BACE1 and the increasing affects of apelin-13 on the enzyme activity of NEP were significant inhibited. ④After PKCαsiRNA was used to inhibit PKCαexpression in PC-12 cells, the effects of apelin increasing ABCA1 protein levels weakened. Apelin-13 obviously inhibited calpain activity in PC-12 cells. Apelin-13 had no significant effect on expression of apoE protein in the PC-12 cells. ⑤After using apoE siRNA to suppress apoE expression in PC-12 cells, the lowering affects of apelin-13 on the enzyme activity of BACE1 and the increasing affects of apelin-13 on the enzyme activity of NEP significantly decreased.

**Conclusion:**

①Apelin-13 increases ABCA1 protein level through PKCαpathway in the PC-12

cells.

②Apelin-13 increases ABCA1 protein levels, decreases Aβ production, and

Increases Aβdegradation in the PC-12 cells.

**PartⅡApelin-13 improves cognition and memory function in APP/PS1 mice**

**Objective:** To observe whether apelin-13 impact cognition and memory function and Aβmetabolism in APP/PS1 mice.

**Methods:** Lateral ventricle injection with different doses (1, 2, 4μg) of apelin-13 were used to APP/PS1 mice after 30 days (1 time/day), Y maze experiment, new object recognition and Morris water maze experiments were used to test cognition and memory function in mice. Then mice were killed, ELISA was used to test the Aβ1-40 and Aβ1-42 levels in hippocampus and prefrontal tissues, Congo red staining was used to detect Aβdeposition in hippocampal tissue, Western blot was used to detect APP, BACE1 and NEP protein levels in hippocampus and prefrontal tissues, the kits were used to test enzyme activity of BACE1 and NEP in hippocampus and prefrontal tissues, ELISA test was used to test Aβ1-40 and Aβ1-42 levels in peripheral blood, Western blot was used to detect ABCA1 protein levels of hippocampus and prefrontal tissues.

**Results:** Apelin-13 significantly improved accuracy in the Y maze test in APP/PS1 mice, significant increased the cognition to the new object in the new object recognition experiments (whether short-term or long-term test) in the APP/PS1 mice, and significant reduced the average swimming distance and the average latency period in Morris water maze experiment in APP/PS1 mice. Apelin-13 significantly reduced Aβ1-40 and Aβ1-42 levels in hippocampus and prefrontal tissues in APP/PS1 mice, had no significant effect on the APP, BACE1 and NEP protein levels, reduced the enzyme activity of BACE1 in hippocampus and prefrontal tissues, increased the enzyme activity of NEP, significantly increased Aβ1-40 and Aβ1-42 levels in the peripheral blood, and improved ABCA1 protein levels in the hippocampus and prefrontal tissues.

**Conclusion:**

①Apelin-13 improves cognition and memory function in APP/PS1 mice.

②Apelin-13 reduces Aβproduction, increases Aβdegradation and Aβclearance in hippocampus and prefrontal tissues in APP/PS1 mice.

③Apelin-13 increases ABCA1 protein levels in hippocampus and prefrontal

Tissues in APP/PS1 mice.

**PartⅢApelin-13 improves memory and cognition function in APP/PS1 mice through ABCA1**

**Objective:** To observe whether the impact of apelin-13 on the cognition and memory function and Aβmetabolism in APP/PS1 mice is by ABCA1 protein.

**Methods:** Lateral ventricle injection with ABCA1 siRNA was used to silence ABCA1 protein expression in brain in APP/PS1 mice, the affects of apelin-13 on cognition and memory function and Aβmetabolism in brain in AD model mice were observed. Y maze experiment, new object recognition experiment and Morris water maze experiment were used to test cognition and memory function in mice. After mice were killed, ELISA was used to test Aβ1-40 and Aβ1-42 levels in hippocampus and prefrontal tissues in mice, Congo red staining was used to detect Aβdeposition in hippocampal tissues, the kits were used to test enzyme activity of BACE1 and NEP in hippocampus and prefrontal tissues, ELISA was used to test Aβ1-40 and Aβ1-42 levels in peripheral blood of mice.

**Results:** After ABCA1 expression was silent in the brain tissue, the improving affects of apelin-13 on cognition and memory function and Aβdeposition in brain in APP/PS1 mice were reduced, inhibition of apelin-13 on BACE1 activity and promotion of apelin-13 on NEP activity decreased in hippocampus and prefrontal tissues in APP/PS1 mice. Increase effects of apelin-13 on Aβ1-40and Aβ1-42 levels in peripheral blood of mice decreased.

**Conclusion:**

①Apelin-13 improves cognition and memory function by increasing ABCA1 protein levels in the APP/PS1 mice.

②Apelin-13 reduces Aβproduction, increases Aβdegradation and clearance in

Hippocampus and prefrontal tissue in APP/PS1 mice by increasing ABCA1 protein levels.

**KEYWORDS:** Apelin-13; ABCA1; AD; Aβ

# 第一部分 **Apelin-13**增加**PC-12**细胞

**ABCA1蛋白水平调节Aβ代谢**

1.前言

伴随世界老龄人口的剧增及我国逐渐进入老龄化社会，老年期痴呆的患病率逐年成上升趋势，其中80%以上为阿尔茨海默病（Alzheimer's disease, AD）及血管性痴呆（Vascular dementia, VD）。在65岁以上的人群中，西方发达国家大约有5%-10%的人患有AD，85岁以上人群AD患病率则高达47%-50%。据推算，我国现有AD患者在700万人以上[[1]](#_bookmark0)。

AD是一种危害性较大的神经系统退行性疾病，其临床特征为进行性认知和记忆功能的减退。淀粉样蛋白（β-Amyloid protein, Aβ）在脑内的生成和沉积所形成的老年斑（senile plaque, SP）在AD的病理过程中起重要的作用[[2]](#_bookmark1)。Aβ含有39-43个氨基酸残基，其中最常见的亚型是Aβ1-40 和Aβ1-42。淀粉样前体蛋白（amyloid

precursor protein，APP）是Aβ生成的原料，它经β位淀粉样前体蛋白分解酶（1 beta-site

APP cleaving enzyme 1，BACE1）和γ-分泌酶（γ-secretase）裂解后生成Aβ。APP是一种在组织中广泛表达的跨膜蛋白，含有770个氨基酸残基，其功能尚不清楚。几乎所有表达APP蛋白的神经细胞和非神经细胞都有Aβ的生成。APP有两条代谢途径，一条为非淀粉样物质代谢途径，也称为α途径；另一条为淀粉样物质代谢途径，也称为β途径。在正常情况下，α途径为主要代谢途径。在AD病理状态下，β途径异常增加。在α途径中，APP被α-分泌酶（α-secretase）切割，α-分泌酶从Aβ结构域内部进行切割，因此不产生完整的Aβ。而在β途径中，BACE1为Aβ生成的限速酶，BACE1在Aβ的N-末端裂解APP，产生sAPPβ和C-末端片段C99, C99进一步由γ-分泌酶裂解产生Aβ[[3]](#_bookmark2)（见P100附图1）。许多研究表明在AD模型小鼠和APP转基因大鼠，敲除BACE1基因会显著减少Aβ的生成，并且提高AD鼠的认知与学习记忆功能[[4](#_bookmark3)[-5]](#_bookmark4)。

最近研究表明Aβ从脑内清除减少及酶介导的Aβ降解不足也是导致Aβ聚集的重要原因之一。Aβ从脑内清除的可能途径为：荷脂的apoE将Aβ携带至血脑屏障，通过血脑屏障基底膜上的低密度脂蛋白受体相关蛋白-1（LRP-1）及血脑屏障管腔膜上的三磷酸腺苷结合盒转运体B1（ATP binding cassette transporter B1, ABCB1）、

三磷酸腺苷结合盒转运体G4（ATP binding cassette transporter G4, ABCG4）和三磷酸腺苷结合盒转运体G2（ATP binding cassette transporter G2, ABCG2）跨血脑屏障转运至血液[[6](#_bookmark5)[-10]](#_bookmark9)。参与Aβ降解的酶主要包括脑啡肽酶（neprilysin, NEP）和胰岛素降解酶（insulin degrading enzym, IDE），NEP为Aβ降解的限速酶[[11](#_bookmark10)[-12]](#_bookmark11)。正常情况下Aβ在脑内的生成、清除及降解处于动态平衡状态，而一旦生成增多或清除及降解减少则平衡被打破，产生过量的Aβ，其聚集后形成老年斑和淀粉样沉积，从而产生神经毒性，出现认知及记忆功能损害（见P101附图2）。因此，针对Aβ代谢寻找防治AD的潜在途径是目前AD防治研究中非常重要的方向。

三磷酸腺苷结合盒转运体A1（ATP binding cassette transporter A1, ABCA1）是一种跨细胞膜蛋白，在维持细胞胆固醇的动态平衡过程中起着非常重要的作用[[13](#_bookmark12)[-17]](#_bookmark16)。在外周，ABCA1转运细胞内及细胞膜的胆固醇和磷脂给载脂蛋白A-I(apolipoprotein A-I, apoA-I)[[18](#_bookmark17)[-21]](#_bookmark20)。在中枢，ABCA1转运细胞内及细胞膜的胆固醇和磷脂给载脂蛋白E(apolipoprotein E, apoE)[[22]](#_bookmark21)。研究表明ABCA1蛋白缺失会减少脑内apoE荷脂和增加Aβ水平。Hirsch等研究发现，小鼠的ABCA1缺失导致脂质流出到apoE减少[[22]](#_bookmark21)。在两种APP过表达的AD小鼠（Tg-SwDI/B和APP/PS1模型）中，ABCA1缺失会减少脑组织的apoE荷脂[[23]](#_bookmark22)。Jaekwang等研究证明在神经细胞中miR-106b通过抑制ABCA1蛋白表达及减少胆固醇流出，从而显著增加Aβ水平，其机制是使Aβ生成增加及清除减少[24]。

研究显示ABCA1蛋白过表达会增加脑内apoE荷脂和减少Aβ水平，进而对

AD产生影响。在大鼠和人类转染淀粉样前体蛋白（APP）的细胞系，肝X受体（liver X receptor, LXR）促进ABCA1表达，减少Aβ的生成[[25]](#_bookmark23)。在AD模型鼠证实ABCA1上调可以减少Aβ的脑沉积，其机制尚未阐明。ABCA1不能直接转运Aβ[[26]](#_bookmark24)，它是胆固醇和磷脂的转运体。研究表明，ABCA1通过影响apoE脂化和脑胆固醇动态平衡，进而影响APP加工和Aβ聚集[[27]](#_bookmark25)。ABCA1高表达时，细胞内胆固醇减少导致

膜脂筏数量减少，进入脂筏的APP也随之减少，从而使Aβ生成减少[[25]](#_bookmark23)。其次，ABCA1影响Aβ的降解。ABCA1可通过促进apoE脂化使胰岛素降解酶活性增强，从而增加Aβ降解[[28]](#_bookmark26)。另外，ABCA1也影响Aβ的清除。ABCA1可通过促进apoE脂化增加Aβ的清除[[29]](#_bookmark27)（见P102附图3）。因此，ABCA1在Aβ的代谢和集聚中起重要作用，可以将ABCA1作为治疗AD的一个重要靶点，寻找一种能有效上调ABCA1表达的物质变得至关重要。另外，ABCA1、脑的脂质代谢与AD之间的关系非常复杂，其机制还很不清楚，需要进一步深入的研究。

Apelin是脂肪细胞分泌的一种具有生物活性的肽类激素，1998年由Tatemoto等利用反向药理学的方法从牛胃的分泌物中提取并纯化[[30]](#_bookmark28)，是血管紧张素受体AT1相关的受体蛋白（putative recep tor p rotein related to the angiotensin recep tor AT1, APJ）的天然配体。Apelin原前体肽由于蛋白水解酶的酶切位点不同，可以形成多个长度不同的肽段，较常见的有apelin-12、apelin-13和apelin-36. Apelin作为一种新型脂肪因子，在体内具有广泛的组织学分布，其在中枢也具有广泛的表达，包括脊髓、嗅球、海马、丘脑、下丘脑、松果体、尾核、基底前脑、胼胝体、杏仁核、黑质、垂体以及大脑皮层[[31]](#_bookmark29)。Apelin/APJ系统具有广泛的生物学功能，包括血管保护，抗血栓及抗氧自由基；增强心肌收缩力，降低血压，促进细胞增殖；调控垂体激素释放及水盐代谢；调节免疫等[[32](#_bookmark30)[-35]](#_bookmark33)。

在apelin中枢功能研究方面，目前主要集中在摄食调节、呼吸调节、镇痛、中枢血压调节、垂体轴功能调节、体温调节与脑血管保护等方面[[36](#_bookmark34)[-39]](#_bookmark36)。近来研究表明，

Apelin在海马神经元保护过程中起重要的作用[[40](#_bookmark37)[-42]](#_bookmark39)。基于海马神经元在学习与记忆中具有重要的地位，提示apelin对学习记忆具有调节作用。

我们前期研究表明，Apelin-13通过PKCα途径抑制钙蛋白酶（calpain）活性，减少ABCA1降解，从而增加THP-1源性巨噬细胞ABCA1水平[[43]](#_bookmark40)，但其对Aβ代谢的作用目前尚不清楚。鉴于ABCA1蛋白与Aβ代谢之间的密切关系，我们提出以下假设：apelin-13通过PKCα途径抑制钙蛋白酶活性，减少ABCA1降解，增加ABCA1蛋白水平，从而减少Aβ生成及增加Aβ降解和清除（图1-1）。因此，本研究使用apelin-13处理PC-12细胞，观察apelin-13是否通过影响ABCA1蛋白水平从而调节Aβ代谢，并阐明其机制。

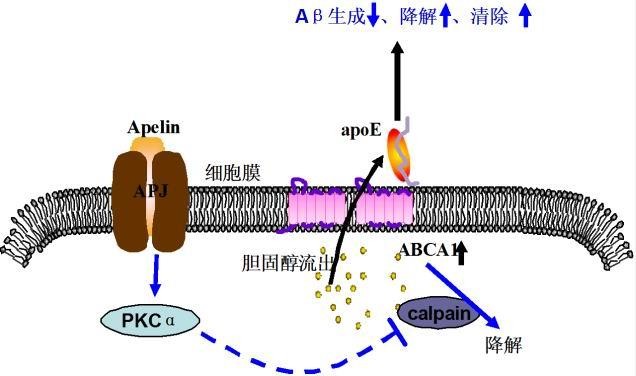


图1-1. Apelin-13通过ABCA1蛋白影响Aβ代谢机制假设图

**图的说明：**apelin-13通过PKCα途径抑制钙蛋白酶活性，减少ABCA1降解，增加ABCA1蛋白水平，从而减少Aβ生成及增加Aβ降解和清除。

**注：**Aβ：β淀粉样蛋白；ABCA1：三磷酸腺苷结合盒转运体A1；PKCα：蛋白激酶Cα；calpain：钙蛋白酶；apoE：载脂蛋白E；APJ：血管紧张素受体AT1相关的受体蛋白

## 1. 实验材料

### **1.1** 主要试剂

大鼠嗜铬细胞瘤细胞株（PC-12细胞）由中ft大学生理教研室提供；

Apelin-13购自美国Peptide公司；RPMI-1640培养基购自美国Gibco公司；DMEM培养基购自美国Gibco公司；

胎牛血清购自杭州四季清生物工程材料有限公司；牛血清白蛋白购自美国Sigma公司；

聚偏二氟乙烯（polyvinylidene fluoride, PVDF）膜购自Amersham公司；胰酶购自Amresco公司；

兔抗鼠ABCA1、BACE1、NAP及β-actin一抗以及辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗购自Santa Cruz公司；

BCA蛋白含量测定试剂购自Hyclone-Pierce公司；

Aβ1-40、Aβ1-42 Elisa检测试剂盒购自Invitrogen公司；

BlueRanger预染蛋白分子量标准购自Hyclone-Pierce公司；

小鼠特异性ABCA1、PKCα及apoE小干扰RNA（SiRNA）购自圣克鲁斯生物技术公司；

丽春红染色试剂购自美国Sigma公司；

Western blot荧光检测试剂盒购自Hyclone-Pierce公司；引物序列购自上海生工生物工程有限公司；

实时定量PCR 试剂盒（DyNAmoTM SYBR® Green qPCR Kits）购于芬兰

Finnzymes公司；

Reverse Transcription System购自美国Promega公司；

ApoE购自Fluka Biochemika公司；

[3H]胆固醇购自美国PerkinElmer公司；

BACE1活性检测试剂盒购自Calbioehem公司；二甲基亚飒（DMSO）购自Sigma公司；

微量反应板（96孔）购自Coming Costar公司；

NEP活性检测试剂盒购自Sigma公司；

Leucine Aminopeptidase购自Sigma公司；

钙蛋白酶活性检测试剂盒（Calpain Activity Assay Kit）购自BioVision公司；其它试剂均为国产分析纯。

### **1.2** 主要仪器：

CO2细胞培养箱为美国SL TC2323二氧化碳培养箱；实时定量PCR仪为应用生物系统7900HT；

电泳用基础电源购自美国BIO-RAD公司；半干转印槽购自美国BIO-RAD公司；

凝胶成像分析系统（GOS7500型）购自美国UVP公司；电子分析天平购自美国Sartorius公司；

MK3型酶标仪购自美国Thermo公司；

高速离心机（5804型、5804R型）购自德国Eppendorf公司；

DNA Thermal Cycler购自美国Perkin Elmer公司；

紫外分光光度计（型号Lambda25）购自美国PE公司；超速离心机购自日本日立公司；

卧式电泳槽购自北京六一仪器厂；

超声波破碎器（型号VC130）购自美国Sonics公司；超纯水系统购自英国ELGA公司；

超低温冰箱购自日本三洋公司；

倒置生物显微镜（型号BX51）购自日本Olympus公司；

微量移液器（10μl、100μl、1000μl）购自德国Eppendorf公司；

FJ-2107P液体闪烁计数器购自国营二六二厂；垂直电泳仪系统购自美国BIO-RAD公司；

图像分析系统（型号HMIAS2000）购自武汉千屏影像技术有限责任公司。

## 2. 实验方法

### **2.1** 细胞培养

大鼠嗜铬细胞瘤细胞株（PC-12细胞，具有神经内分泌细胞特性）培养于含1%的青-链霉素及10%胎牛血清的1640细胞培养液内，放入37℃、5% CO2恒温细胞培养箱内进行培养。当细胞生长至80%融合时，进行胰酶消化后传代。当细胞进入对数生长期时，更换培养液，24h加入1640培养液（对照）或不同浓度（1、10、100nmol/L）的apelin-13（溶于1640培养液），作用不同时间（12h、24h、48h）后分别收取上清液冻存备用。使用RIPA 细胞裂解液裂解细胞，4℃12000rpm 离心

30min，转移上清液至新EP管后冻存备用。

### **2.2** 酶联免疫吸附实验（**Elisa**）

将收集到的细胞培养液离心（4℃, 12000rpm, 10min），取上清液。使用Aβ1-40或Aβ1-42试剂盒进行测定，根据试剂盒说明书采用双抗体夹心酶标免疫法检测样本中Aβ1-40或Aβ1-42水平。首先将纯化后抗体包被96孔板，制作成为固相抗体，再往包被抗体的孔中依次分别加入Aβ1-40或Aβ1-42抗原、生物素化的抗Aβ1-40或Aβ1-42抗体及HRP标记的亲和素，彻底进行洗涤后使用底物TMB显色。TMB被过氧化物酶催化下成蓝色，并在酸作用下最后转变为黄色。颜色的深浅程度与样本中的

Aβ1-40或Aβ1-42呈正相关。最后，使用酶标仪在450nm波长下测定吸光度值（OD值），计算出样本浓度。

### **2.3** 小干扰**RNA**转染

小鼠特异性ABCA1、PKCα及apoE小干扰RNA（SiRNA）由圣克鲁斯生物技术公司提供。ABCA1 siRNA: sense 5′-GGAUUUUUUGCUCAGAUUGTT-3′，antisense 5′-CAAUCUGAGCAAAAAAUCCTT-3′；PKCA siRNA: sense 5′-AAUCAUCA GCAA CCUCAGCCU-3′，antisense 5′-AAAGGCTGAGGTTGCTGATGACCT-3′；ApoE

siRNA: sense 5′-ACCATGAAGGTTCTGTGGGCTG-3′，antisense: 5′-GTGATTGTCG CTGGGCACA-3′。将PC-12细胞放入六孔板（2×10 6细胞/孔）24h. 使用脂质体2000

分别进行转染48h. 使用western blot检测ABCA1、PKCα及apoE SiRNA对相应蛋白抑制效果。

### **2.4** 蛋白质免疫印迹实验（**Western Blot**）

收集细胞，使用预冷的PBS洗涤2次，然后加入RIPA蛋白裂解液500μL裂解细胞，冰上孵育30min后，将样本于4℃、15000rpm离心30min，收集上清，即为细胞的总蛋白。采用BAC法测定蛋白含量。将100μl蛋白质样本加入到2×SDS凝胶上样缓冲液中煮沸5-10min后迅速冷却，使蛋白质充分变性。上样后进行电泳，电压为80mV，在6%SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳1h分离蛋白质。将分离的蛋白质用湿转法转膜至硝酸纤维素膜上，使用丽春红染色观察转膜是否达到效果。将转膜后的硝酸纤维素膜放置于10%脱脂牛奶中，室温下封闭2-3h或4℃封闭过夜，加入兔抗鼠β-actin（1:200）、

ABCA1(1:200)、BACE1（1:200）及NAP（1:200）一抗，摇床上室温孵育4-6h。使用TBST缓冲液摇床上洗膜3次，每次10min，然后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗，摇床上室温孵育2-4h，TBST缓冲液摇床上洗膜3次，每次10min。显影剂显影后，使用凝胶图像分析系统扫描，并进行半定量分析。

### **2.5** 细胞胆固醇流出实验

细胞胆固醇流出实验按参考文献方法进行[[44]](#_bookmark41)。使用0.2µCi/ml [ 3H] -胆固醇孵育PC-12细胞24h以标记细胞。用新鲜培养基洗涤细胞3次，然后使用不同处理因素处理PC-12细胞。使用PBS冲洗PC-12细胞2次，在0.1%(w/v) BSA的培养基中培养细胞12h，以达到平衡胆固醇的目的，PBS洗涤平衡后的的PC-12细胞3次，再将细胞放入含25µg/ml人血浆apoE的培养基中孵育6h，14000rpm离心10min，分离细胞和培养基，使用异丙醇溶解PC-12细胞，检测细胞总的放射活性。使用液体闪烁计数器检测PC-12 细胞及培养基所含[3H] -胆固醇的每分钟计数（count per

minute，CPM）。细胞胆固醇流出率计算公式如下：流出率（%）＝｛培养液CPM/

（细胞CPM+培养液CPM）｝×100% 。

### **2.6 RNA**提取和实时定量**PCR**（**Real-time Quantitative PCR**，**Real-time PCR**）

按照总RNA抽提TRIzol试剂盒说明书提取细胞总RNA. 使用SYBR绿色荧光测定试剂盒，采用Roche light Cycler Run 5.32 Real-Time PCR系统进行Real-time PCR分析。Real-time PCR引物序列如下：小鼠ABCA1，5'-GGGTGAACGAGTTTCGG TATG-3'和5'-CTGAAGATGCTTGGCTTTGCT-3'. 采用Melt曲线分析所有产物。使用ΔΔCt方法进行定量测定，设定β-actin表达为内参照。

### **2.7** **BACE1**酶活性水平测定

使用BACE1活性检测试剂盒检测BACE1活性，具体步骤如下：用HAc缓冲液稀释各组PC-12细胞的蛋白质样品至0.25μg/μl和1μg/μl，保存在冰上。使用HAc缓冲液稀释BACEI底物Vl工作液（230μM）至50μM，避光操作，稀释后室温避光保存。开启酶标仪，预热3min。进行预实验，以确定最终的样品加样量：取一个蛋白质样品，在96孔微量反应板的各孔内重复2次加入不同量的该样品（0.25μg, 0.5μg, 1μg, 2μg, 4μg, 8μg, 10μg, ），空白对照孔加入10μlHAc缓冲液。在避光条件下，快速将100μl 50μM的BACE1底物Vl稀释液加入各个孔内，轻摇微量反应板使样品和稀释液混均，然后放入酶标仪读取荧光强度（FU值）（发射光波长为550nm，激发光波长为405nm）。计算1-4点Max V，选择出最合适的蛋白质样品加样量，即低于饱和反应量一半且有明显信号的加样量。根据前面预实验所确定的样品加样量，在各孔内重复加入相同体积的各样品，空白对照孔内加入相同体积HAc缓冲液，避光条件下，快速将100μl 50μM的BACE1底物Vl稀释液加入各个孔内，轻摇微量反应板使样品和稀释液充分混均，然后放入酶标仪读取荧光强度（FU值）。计算1-4点Max V，即得出各样品的BACE1活性水平。

### **2.8** **NEP**酶活性水平测定

使用NEP活性检测试剂盒检测NEP活性，测定方法参照Bormann等方法[[45]](#_bookmark42)。将不同组细胞提取蛋白，BCA法测定总蛋白浓度。在96孔板中加入蛋白样品，再

加入含1% n-辛基-β-D-吡喃葡萄糖苷的20mM Mes 300μl（pH6.5），将反应定容为1.5ml，整个反应系统中包括了：0.1mM底物（glutaryl-Ala-Ala-Phe-4-methoxy-2- naphthylamide），100mM Mes(pH6.5)，0.3M NaCl和NEP 37℃孵育30min，底物转化为Phe-4-methoxy-2-naphthylamide. 加入20μM的phosphormidon以终止NEP继续反应。将酶标仪激发波长设定为367nm，发射波长设定为440nm，检测底物产生的荧光强度（FU值）。绘制出标准曲线，最后计算出NEP酶的活性。

### **2.9** **Calpain**酶活性水平测定

使用calpain活性检测试剂盒进行calpain酶活性水平测定。先从培养的细胞离心分离1-2x106个细胞，加入到100µl提取缓冲液中重悬并在冰上孵化20min，在孵化过程中轻摇混合。离心1min，取上清检测蛋白浓度。用提取缓冲液稀释蛋白至85µl，在每个样品中加入10µl 的10X反应缓冲液及5µl 的钙蛋白酶底物Ac-LLY-

AFC，37℃避光孵育1h，Ac-LLY-AFC能发射蓝光（λmax=400nm），而被酶切后生成的自由AFC则释放出黄绿光荧光（λmax=505nm），使用酶标仪读取数据。对比处理的样品和正常对照组的样品发射的荧光强度，得出蛋白酶活性的改变。

### **2.10** 统计学分析

所有的数据采用均数±标准差（*X*±S）表示。3组或多组之间的组间比较采用one-way ANOVA分析，2组间比较采用Student's t检验。统计分析采用SPSS 13.0软件，*P*<0.05被视为差别有显著性。

## **3.** 结果

### **3.1** **PC-12**细胞**APJ**受体表达检测

为了检测PC-12细胞是否存在apelin-13的作用位点，我们使用western-blot检测PC-12细胞APJ受体表达，结果显示APJ受体在PC-12细胞显著表达，说明PC-12细胞存在apelin-13的作用位点（图1-2）。



图1-2**.** APJ受体在PC-12细胞中的表达

### **3.2** **Apelin-13**对**PC-12**细胞Aβ代谢的影响

#### **3.2.1** **Apelin-13**减少Aβ**1-40**和Aβ**1-42**水平

为了明确apelin-13对Aβ水平是否有影响，我们分别使用1、10、100nmol/L apelin-13处理PC-12细胞24h, Elisa方法检测PC-12细胞培养液Aβ1-40和Aβ1-42水平（Aβ由膜上剪切生成后进入细胞培养液）。结果显示10及100nmol/L组Aβ1-40和Aβ1-42水平显著下降，且100nmol/L组下降更明显（图1-3, 图1-4）。

使用100nmol/L apelin-13处理PC-12细胞，处理后12h、24h、48h使用Elisa方法分别检测PC-12细胞培养液Aβ1-40和Aβ1-42水平。结果显示12h、24h及48h组Aβ1-40和Aβ1-42水平显著下降（图1-5, 图1-6）。以上说明apelin-13能减少Aβ1-40和Aβ1-42水平。



图1-3 不同浓度apelin-13对Aβ1-40水平的影响（n=3）

\**P*<0.05 vs control group



图1-4 不同浓度apelin-13对Aβ1-42水平的影响（n=3）

\**P*<0.05 vs control group



图1-5 Apelin-13处理不同时间对Aβ1-40水平的影响（n=3）

\**P*<0.05 vs control group; \*\**P*<0.01 vs control group



图1-6 Apelin-13处理不同时间对Aβ1-42水平的影响（n=3）

\**P*<0.05 vs control group; \*\**P*<0.01 vs control group

#### **3.2.2** **Apelin-13**对**PC-12**细胞**APP**、**BACE1**和**NEP**蛋白表达无影响

前面实验已经证实apelin-13减少Aβ水平，APP是Aβ生成的原料，BACE1 是

Aβ生成的限速酶，NEP是Aβ降解的限速酶，为了证实apelin-13是否通过改变APP、

BACE1和NEP蛋白表达来减少Aβ水平，我们分别使用1、10、100nmol/L apelin-13处理PC-12细胞24h, Western-blot检测APP、BACE1和NEP蛋白的表达，结果显示1、10、100nmol/L apelin-13对PC-12细胞APP、BACE1和NEP表达无显著影响

（图1-7）。说明apelin-13减少Aβ水平不是通过改变APP、BACE1和NEP蛋白表达实现的。



图1-7 Apelin-13对PC-12细胞APP、BACE1和NEP蛋白表达的影响

#### **3.2.3** **Apelin-13**降低**PC-12**细胞**BACE1**蛋白活性，增加**NEP**蛋白活性

Apelin-13不影响PC-12细胞BACE1和NEP蛋白表达，那是否影响BACE1 和

NEP蛋白活性，为了证实这个问题，我们分别使用1、10、100nmol/L apelin-13处理PC-12细胞24h，检测BACE1和NEP蛋白的活性，结果显示100nmol/L apelin-13降低PC-12细胞BACE1蛋白活性（图1-8），10和100nmol/L apelin-13增加NEP蛋白活性（图1-9）。结果说明apelin-13通过降低PC-12细胞BACE1蛋白活性从而减少Aβ生成，增加NEP蛋白活性从而增加Aβ降解，最终减少Aβ水平。



图1-8 Apelin-13对PC-12细胞BACE1蛋白活性的影响（n=3）

\**P*<0.01 vs control group



图1-9 Apelin-13对PC-12细胞NEP蛋白活性的影响（n=3）

\**P*<0.05 vs control group; \*\**P*<0.01 vs control group

### **3.3** **Apelin-13**对**PC-12**细胞**ABCA1**水平及胆固醇流出的影响

#### **3.3.1** **Apelin-13**增加**PC-12**细胞**ABCA1**蛋白水平

为了探讨apelin-13对PC-12细胞ABCA1表达的影响，我们分别使用1、10、100nmol/L apelin-13处理PC-12细胞24h, Western-blot检测ABCA1蛋白的表达，RT-PCR检测ABCA1 mRNA水平。结果显示1nmol/L apelin-13处理组PC-12细胞

ABCA1蛋白表达与对照组比较差异无显著性。而10、100nmol/L apelin-13处理组与对照组比较，PC-12细胞ABCA1蛋白表达显著增加，并且100nmol/L apelin-13处理组ABCA1蛋白表达增加更明显（图1-10）。ABCA1 mRNA表达与对照组比较差异无显著性（图1-12）。

使用100nmol/L apelin-13处理PC-12细胞，处理后12h、24h、48h使用western-blot方法检测PC-12细胞ABCA1蛋白水平，RT-PCR检测ABCA1 mRNA水平。结果显示12h、24h及48h组PC-12细胞ABCA1水平显著增加（图1-11），ABCA1 mRNA表达与对照组比较差异无显著性（图1-12）。说明apelin-13不影响PC-12细胞ABCA1

mRNA水平，增加ABCA1蛋白水平。



图1-10 不同浓度apelin-13对PC-12细胞ABCA1蛋白水平的影响



图1-11 apelin-13处理不同时间对PC-12细胞ABCA1蛋白水平的影响



图1-12 不同浓度apelin-13对PC-12细胞ABCA1 mRNA的影响（n=3）



图1-13 Apelin-13处理不同时间对PC-12细胞ABCA1 mRNA的影响（n=3）

#### **3.3.2** **Apelin-13**促进**PC-12**细胞内胆固醇流出

Apelin-13增加PC-12细胞ABCA1蛋白水平，ABCA1能转运细胞内胆固醇及磷脂到细胞外。因此，我们检测1、10、100nmol/L apelin-13对PC-12细胞胆固醇流出的影响。结果显示1nmol/L apelin-13处理组与对照组相比，细胞内胆固醇流出无显著差异。而10、100nmol/L apelin-13处理组与对照组相比，胆固醇流出显著增加，

并且100nmol/L组胆固醇流出增加更显著（图1-14）。

使用100nmol/L apelin-13处理PC-12细胞，处理后12h、24h、48h检测PC-12细胞胆固醇流出水平。结果显示12h、24h及48h组PC-12细胞胆固醇流出水平显著增加（图1-15）。以上结果说明apelin-13增加PC-12细胞胆固醇流出。



图1-14 不同浓度apelin-13对PC-12细胞胆固醇流出的影响（n=3）

\**P*<0.05 vs control group



图1-15 Apelin-13处理不同时间对PC-12细胞胆固醇流出的影响（n=3）

\**P*<0.05 vs control group; \*\**P*<0.01 vs control group

### **3.4** **Apelin-13**通过**PC-12**细胞**ABCA1**蛋白减少Aβ水平

#### **3.4.1** **ABCA1 SiRNA**抑制效果检测

为了观察ABCA1 SiRNA对ABCA1的抑制效果，本研究使用了ABCA1 SiRNA后，检测PC-12细胞ABCA1蛋白水平。结果显示ABCA1 SiRNA能有效抑制PC-12细胞ABCA1表达（图1-16）。



图1-16 ABCA1 SiRNA对PC-12细胞ABCA1表达的影响

#### **3.4.2** **Apelin-13**通过**PC-12**细胞**ABCA1**蛋白减少Aβ水平

为了研究ABCA1是否参与了apelin对Aβ水平的影响，我们分别使用100nmol/L apelin-13、ABCA1 SiRNA及100nmol/L apelin-13+ABCA1 SiRNA处理PC-12细胞

24h，结果显示apelin-13处理组与对照组比较，Aβ1-40和Aβ1-42水平显著下降。ABCA1

SiRNA处理组与对照组比较，Aβ1-40和Aβ1-42水平显著增加。Apelin-13+ABCA1 SiRNA处理组与apelin-13处理组比较，Aβ1-40和Aβ1-42水平显著增加（图1-17, 图1-18）。说明apelin-13通过PC-12细胞ABCA1蛋白减少Aβ1-40和Aβ1-42水平。



图1-17 Apelin-13通过PC-12细胞ABCA1蛋白减少Aβ1-40水平（n=3）

\**P*<0.05 vs control group;＃*P*<0.05 vs apelin group



图1-18 Apelin-13通过PC12细胞ABCA1蛋白减少Aβ1-42水平（n=3）

\**P*<0.05 vs control group;＃*P*<0.01 vs apelin group

#### **3.4.3** **Apelin-13**通过**PC-12**细胞**ABCA1**蛋白减少**BACE1**活性

为了研究ABCA1是否参与了apelin对BACE1活性的影响，我们使用ABCA1

SiRNA抑制ABCA1表达，检测apelin对BACE1蛋白活性的影响。结果显示使用100nmol/L apelin处理PC-12细胞24h, BACE1活性显著减少。使用ABCA1 SiRNA抑制ABCA1表达后，与对照组比较，PC-12细胞BACE1活性显著增加。先使用ABCA1 SiRNA抑制ABCA1表达，再使用100nmol/L apelin处理PC-12细胞24h，与apelin组比较，BACE1活性显著增加（图1-19）。说明apelin-13通过ABCA1蛋白降低PC-12细胞BACE1活性。



图1-19 Apelin-13通过PC-12细胞ABCA1蛋白减少BACE1活性（n=3）

\**P*<0.05 vs control group;＃*P*<0.05 vs apelin group

#### **3.4.4** **Apelin-13**通过**PC-12**细胞**ABCA1**蛋白增加**NEP**活性

为了研究ABCA1是否参与了apelin对NEP活性的影响，我们使用ABCA1

SiRNA抑制ABCA1表达，检测apelin对NEP活性的影响。结果显示使用100nmol/L apelin处理PC-12细胞24h, NAP活性显著增加。使用ABCA1 SiRNA抑制ABCA1表达后，与对照组比较，PC-12细胞NEP活性显著降低。先使用ABCA1 SiRNA抑制ABCA1表达，再使用100nmol/L apelin处理PC-12细胞24h，与apelin组比较，NEP活性显著降低（图1-20）。说明apelin-13通过PC-12细胞ABCA1蛋白增加NEP活性。



图 1-20 Apelin-13通过PC-12细胞ABCA1蛋白增加NEP活性（n=3）

\**P*<0.05 vs control group; \*\**P*<0.01 vs control group;＃*P*<0.01 vs apelin group

### **3.5** **Apelin-13**通过**PKC**α途径增加**PC-12**细胞**ABCA1**蛋白水平

#### **3.5.1** **PKC**α**siRNA**效果检测

为了检测PKCαSiRNA对PKCα的抑制效果，本研究使用了PKCαSiRNA抑制后，观察PC-12细胞PKCα蛋白表达。结果显示PKCαSiRNA能有效抑制PC-12细胞PKCα蛋白表达（图1-21）。



图1-21 PKCαSiRNA对PC-12细胞PKCα蛋白表达的影响

#### **3.5.2** **Apelin-13**通过**PC-12**细胞**PKC**α途径增加**ABCA1**蛋白水平

为了研究PKCα是否参与了apelin对ABCA1蛋白水平的影响，我们使用PKCαSiRNA抑制PKCα表达，检测apelin对ABCA1蛋白水平的影响。结果显示使用100nmol/L apelin处理PC-12细胞24h, ABCA1蛋白水平显著增加。使用PKCαSiRNA抑制PKCα表达后，与对照组比较，PC-12细胞ABCA1蛋白水平显著降低。先使用PKCαSiRNA抑制PKCα表达，再使用100nmol/L apelin处理PC-12细胞24h，与apelin组比较，ABCA1蛋白水平显著降低（图1-22）。说明apelin-13通过PC-12细胞PKCα途径增加ABCA1蛋白水平。



图1-22 Apelin-13通过PC-12细胞PKCα途径增加ABCA1蛋白水平

#### **3.5.3** **Apelin-13**降低**PC-12**细胞**calpain**蛋白活性

钙调蛋白（calpain）是ABCA1的降解蛋白，为了研究apelin-13对PC-12细胞calpain蛋白活性的影响，我们分别使用1、10、100nmol/L apelin-13处理PC-12细胞24h，检测calpain蛋白活性。结果显示10和100nmol/L处理组calpain蛋白活性显著降低（图1-23）。说明apelin-13降低PC-12细胞calpain蛋白活性，减少ABCA1

蛋白降解从而增加其蛋白水平。



图1-23 Apelin-13降低PC-12细胞calpain蛋白活性（n=3）

\**P*<0.05 vs control group

#### **3.5.4** **Apelin-13**通过**PKC**α降低**PC-12**细胞**calpain**蛋白活性

为了研究PKCα是否参与了apelin对calpain蛋白活性的影响，我们使用PKCαSiRNA抑制PKCα表达，检测apelin对calpain蛋白活性的影响。结果显示使用100nmol/L apelin处理PC-12细胞24h, calpain蛋白活性显著降低，与前面结果相一致。使用PKCαSiRNA抑制PKCα表达后，与对照组比较，PC-12细胞calpain蛋白活性改变无显著。先使用PKCαSiRNA抑制PKCα表达，再使用100nmol/L apelin处理PC-12细胞24h，与apelin组比较，calpain蛋白活性显著增加（图1-24）。说明Apelin-13通过PKCα降低PC-12细胞calpain蛋白活性。



图1-24 Apelin-13通过PKCα增加PC-12细胞calpain蛋白活性（n=3）

\**P*<0.05 vs control group;＃*P*<0.05 vs apelin group

### **3.6** **Apelin-13**通过酯化的**apoE**影响**PC-12**细胞Aβ代谢

#### **3.6.1** **Apelin-13**对**PC-12**细胞**apoE**蛋白表达的影响

为了研究apelin-13对PC-12细胞apoE蛋白表达的影响，我们分别使用1、10、100nmol/L apelin-13处理PC-12细胞24h, Western-blot方法检测apoE蛋白表达水平，结果显示不同剂量apelin-13对PC-12细胞apoE蛋白表达无影响（图1-25）。

使用100nmol/L apelin-13处理PC-12细胞12、24及48h, Western-blot方法检测apoE蛋白表达水平，结果显示100nmol/L apelin-13处理对PC-12细胞不同时间对apoE蛋白表达影响均无显著性差异（图1-26）。表明apelin-13对PC-12细胞apoE蛋白表达无影响。



图1-25 不同Apelin-13对PC-12细胞apoE蛋白表达的影响



图1-26 Apelin-13处理不同时间对PC-12细胞apoE蛋白表达的影响

#### **3.6.2** **ApoE siRNA**效果检测

为了检测apoE siRNA对apoE的抑制效果，本研究使用了apoE SiRNA后检测PC-12细胞apoE蛋白表达。结果显示apoE SiRNA能有效抑制PC-12细胞apoE蛋白表达（图1-27）。



图1-27 ApoE siRNA效果检测

#### **3.6.3** **Apelin-13**通过酯化**apoE**降低**PC-12**细胞**BACE1**活性、增加**NEP**活性

为了研究apoE是否参与了apelin对Aβ代谢的影响，我们使用apoE SiRNA抑制apoE表达，检测apelin-13对BACE1和NEP蛋白活性的影响。结果显示使用100nmol/L apelin-13处理PC-12细胞24h, BACE1蛋白活性显著降低，NEP蛋白活性显著增加。使用apoE SiRNA抑制apoE表达后，与对照组比较，PC-12细胞BACE1蛋白活性显著增加，NEP蛋白活性显著降低。先使用apoE SiRNA抑制apoE表达，再使用100nmol/L apelin处理PC-12细胞24h，与apelin组比较，BACE1蛋白活性显著增加，NEP蛋白活性显著降低（图1-28、图1-29）。说明apelin-13通过apoE降低PC-12细胞BACE1蛋白活性、增加NEP蛋白活性，从而影响Aβ代谢。

我们的研究结果表明apelin-13增加PC-12细胞ABCA1蛋白水平，而不影响

apoE蛋白表达，但apelin-13又通过apoE蛋白影响Aβ代谢。有研究表明，ABCA1可通过促进apoE脂化使另一种Aβ降解酶胰岛素降解酶（IDE）活性增强，从而增加Aβ降解[[28]](#_bookmark26)。因此，我们认为apelin-13增加PC-12细胞ABCA1蛋白水平后，apoE蛋白水平虽无改变，但apoE荷脂随之增加，酯化的apoE降低BACE1蛋白活性、增加NEP蛋白活性，从而降低Aβ水平。



图1-28 Apelin-13通过apoE降低PC-12细胞BACE1活性（n=3）

\**P*<0.05 vs control group;＃*P*<0.05 vs apelin group



图1-29 Apelin-13通过apoE增加PC-12细胞NEP活性（n=3）

\**P*<0.05 vs control group; \*\**P*<0.01 vs control group;＃*P*<0.05 vs apelin group

## **4.** 讨论

Aβ的沉积是AD病变老年斑的主要组成成分，它在神经退行性病变过程中起着至关重要的作用[[46](#_bookmark43)[-47]](#_bookmark44)。在AD中，Aβ通过破坏线粒体的功能、氧化和应激、损害细胞膜的完整性、损伤轴突运输以及突触传递等机制导致神经变性丢失[[47]](#_bookmark44)。在AD脑组织Aβ沉积的过程中，Aβ的生成是限速步骤，因此调节Aβ的代谢是治疗AD的一种有效策略[[48](#_bookmark57)[-49]](#_bookmark58)。

研究表明，胆固醇代谢异常在AD的发病过程中起重要作用，它可以导致老年痴呆的发生**。**一些参与AD病理过程的关键因子，例如APP、BACE1和早衰蛋白

（PSEN1）的募集会因胆固醇代谢的异常而发生改变[[50]](#_bookmark45)。胆固醇代谢异常以及Aβ沉积均与AD的发生发展有密切关系，二者常常伴随存在，并且胆固醇代谢异常会加重Aβ的沉积[[50](#_bookmark45)[-51]](#_bookmark46)。

ABCA1是调节脑胆固醇平衡的一个重要因子。在脑中，ABCA1促进胆固醇和磷脂流出到apoE，并且影响到载脂蛋白的荷脂及脑apoE的水平。研究表明，ABCA1缺失增加Aβ水平。Koldamova等研究表明过表达APP的小鼠（APP23和PDAPP模型）中，敲除ABCA1可降低脑中apoE荷脂及apoE水平，增加脑中Aβ1-40及Aβ1-42的水平[[52]](#_bookmark47)。ABCA1增加则减少Aβ水平。使用T0901317处理野型及APP23小鼠，增加ABCA1蛋白表达并显著减少Aβ1-40和Aβ1-42的脑水平[[52]](#_bookmark47)。ABCA1蛋白可作为减少Aβ水平及治疗AD的一个靶点。我们在先前的研究中已经证实apelin-13能够增加ABCA1蛋白水平[[43]](#_bookmark40)，因此我们推测apelin-13能够影响Aβ代谢。

研究表明，Apelin/APJ系统在中枢神经系统广泛分布。首先，我们检测PC-12细胞是否表达APJ受体，结果表明PC-12细胞存在APJ受体表达，由于PC-12细胞具有神经细胞特性，因此我们使用其来研究apelin-13对Aβ的影响及机制。随后，我们检测apelin-13对PC-12细胞Aβ代谢的影响，结果显示apelin-13能减少PC-12细胞的Aβ1-40和Aβ1-42水平，对APP、BACE1及NEP蛋白的表达无影响，而降低BACE1活性，增加NEP活性，说明apelin-13通过降低BACE1活性从而减少Aβ生成，通过增加NEP活性从而提高Aβ降解，最终减少PC-12细胞的Aβ水平。

我们以前实验结果表明apelin-13能够增加THP-1源性巨噬细胞ABCA1蛋白水

平，而apelin-13对PC-12细胞ABCA1蛋白是否具有同样的作用及机制尚不清楚。因此，我们随后探讨了apelin-13对PC-12细胞ABCA1蛋白的影响。实验结果显示，Apelin-13通过PKCα降低PC-12细胞calpain蛋白活性，通过减少ABCA1蛋白降解增加其水平，而对ABCA1 mRNA水平无影响。并且，Apelin-13能增加PC-12细胞胆固醇流出水平。这与我们前期研究结果相一致。

由于诸多文献已证实ABCA1蛋白与Aβ代谢之间存在密切联系。我们实验结果显示apelin-13能减少PC-12细胞的Aβ水平及增加其ABCA1蛋白水平，那ABCA1是否介导了apelin-13对Aβ代谢的影响。我们使用ABCA1 SiRNA抑制ABCA1蛋白表达后检测apelin-13对Aβ代谢的影响，结果表明apelin-13的确通过增加ABCA1水平从而降低BACE1活性并提高NEP活性，最终减少Aβ水平。

由于荷脂的apoE可促进Aβ从脑内清除入血[[29]](#_bookmark27)，并且荷脂的apoE可促进IDE活性增强，从而增加Aβ降解[[28]](#_bookmark26)。因此，我们接下来研究apoE是否在apelin-13对Aβ代谢的影响中起了作用。结果表明apelin-13不影响apoE蛋白表达水平，但敲除apoE蛋白会显著降低apelin-13对BACE1活性、NEP活性及Aβ水平的影响。由此我们推测apelin-13是通过增加apoE蛋白荷脂降低BACE1活性并提高NEP活性，从而减少Aβ水平。

综上所述，我们实验结果表明apelin-13结合PC-12细胞APJ受体，增加PKCα表达，降低calpain蛋白活性，减少ABCA1蛋白降解从而增加其水平，ABCA1蛋白水平增加导致细胞内胆固醇流出增加，apoE荷脂增加，脂化的apoE促使BACE1活性降低、NEP活性增加，最终减少Aβ水平（图1-30）。



图1-30 Apelin-13通过ABCA1蛋白影响Aβ代谢

注：APJ：血管紧张素受体AT1相关的受体蛋白；PKCα：蛋白激酶Cα；calpain：钙蛋白酶；ABCA1：三磷酸腺苷结合盒转运体A1；apoE：载脂蛋白E；APP：淀粉样前体蛋白；BACE1：β位淀粉样前体蛋白裂解酶1；γ-secretase：γ-分泌酶；Aβ：淀粉样蛋白；NEP：脑啡肽酶；AD：阿尔茨海默病

## 6.小结

1) Apelin-13通过PKCα途径增加PC-12细胞ABCA1蛋白水平；

2) Apelin-13通过增加PC-12细胞ABCA1蛋白水平，降低BACE1活性减少Aβ

生成、增强NEP活性增加Aβ降解，从而减少Aβ水平。

# **第二部分 Apelin-13**改善**APP/PS1**小鼠认知与记忆功能

前言

阿尔茨海默病（Alzheimer's disease, AD）是发病率较高的一种神经退行性疾病，约占老年期痴呆发病总数的70%. AD的主要临床表现为：起病较隐匿、病程时间长，出现渐进性学习记忆能力障碍，认知功能、生活自理能力及社会活动能力均减退，并且可伴发帕金森综合症和抑郁等病变。AD的发病机制还尚未阐明，目前认为细胞外β-淀粉样蛋白（amyloidβpeptides, Aβ）沉积所形成的老年斑的及细胞内τ蛋白磷酸化所形成的神经元纤维缠结（neurofib-rillary tangles）是AD形成的两个重要原因[2]。越来越多的研究表明：细胞外Aβ的沉积是AD主要病理学特征之一[4-5]。

Aβ是由淀粉样前体蛋白（amyloid precursor protein, APP）经过β位淀粉样前体蛋白分解酶1（beta-site APP cleaving enzyme 1, BACE1）和γ-分泌酶（γ-secretase）剪切后形成的，常见的包括Aβ1-40及Aβ1-42。它们产生后聚集在细胞外形成老年斑，产生神经毒性，导致神经元丢失，造成认知及记忆功能障碍[[2]](#_bookmark1)。

在本课题第一部分实验中，我们已经证实apelin-13可以增加PC-12细胞三磷酸腺苷结合盒转运体A1（ATP binding cassette transporter A1, ABCA1）蛋白水平，并且减少Aβ的生成，增加Aβ的降解。在本部分，我们将在APP/PS1转基因小鼠上证实apelin-13对认知与记忆能力、Aβ代谢及ABCA1蛋白水平的影响。

## 1. 实验材料

### **1.1** 实验动物

APP/PS1转基因小鼠购自北京大学医学院实验动物中心。

### **1.2** 主要试剂

Apelin-13购自美国Peptide公司；

人工脑脊液购自湖州英创生物科技有限公司；

戊巴比妥钠购自中国医药集团上海化学试剂公司；胰酶购自Amresco公司；

BlueRanger预染蛋白分子量标准购自Hyclone-Pierce公司；

兔抗鼠ABCA1、BACE1、NAP及β-actin一抗以及辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗购自 Santa Cruz 公司；BCA蛋白含量测定试剂购自Hyclone-Pierce公司；

Aβ1-40及Aβ1-42 Elisa检测试剂盒购自Invitrogen公司；

BACE1活性检测试剂盒购自Calbioehem公司；二甲基亚飒（DMSO）购自Sigma公司；

丽春红染色试剂购自美国Sigma公司；

微量反应板（96孔）购自ComingCostar公司；

聚偏二氟乙烯（polyvinylidene fluoride, PVDF）膜购自Amersham公司；

Western blot荧光检测试剂盒购自Hyclone-Pierce公司；引物序列购自上海生工生物工程有限公司；

实时定量PCR试剂盒购于芬兰Finnzymes公司；

NEP活性检测试剂盒购自美国Sigma公司；

Reverse Transcription System购自美国Promega公司；Leucine Aminopeptidase购自美国Sigma公司；Phosphormidon购自美国Sigma公司；

其它试剂均为国产分析纯。

### **1.3** 主要仪器：

导管、导管帽、注射内管及微量注射器（2μl、5μl）购自深圳市瑞沃德生命科技有限公司； Morris水迷宫购自成都泰盟公司；

小鼠自发活动箱购自上海吉量软件有限公司；

Y迷宫购自成都泰盟公司；

小鼠脑立体定位仪购自与美国Stoelting公司；紫外分光光度计购自日本Shimadzu公司；

震动切片机（KD-400型）购自浙江省金华市科迪仪器设备有限公司；紫外分光光度计（型号Lambda25）购自美国PE公司；

电子分析天平购自美国Sartorius公司；

倒置生物显微镜（型号BX51）购自日本Olympus公司；超纯水系统购自英国ELGA公司；

垂直电泳仪系统购自美国BIO-RAD公司；实时定量PCR仪为应用生物系统7900HT；半干转印槽购自美国BIO-RAD公司；

凝胶成像分析系统（GOS7500型）购自美国UVP公司；电泳用基础电源购自美国BIO-RAD公司；

DNA Thermal Cycler购自美国Perkin Elmer公司；高速离心机购自德国Eppendorf公司；

卧式电泳槽购自北京六一仪器厂；超速离心机购自日本日立公司；

MK3型酶标仪购自美国Thermo公司；

液体闪烁计数器（型号FJ-2107P）购自国营二六二厂；BMJ-Ⅲ型病理组织包埋冷冻台购自常州中威电子仪器厂；

图像分析系统（型号HMIAS2000）型号武汉千屏影像技术有限责任公司；微量移液器（10μl、100μl、1000μl）型号德国Eppendorf公司；

超低温冰箱购自日本三洋公司；

超声波破碎器（型号VC130）购自美国Sonics公司。

## **2.** 实验方法

### **2.1** 动物饲养

6月龄雄性APP/PS1转基因小鼠饲养在南华大学药学与生物科学学院实验动物部无特定病原体（specific pathogen free, SPF）级实验动物房内，温度25±1℃、湿度恒定，普通饲料饲养，自由饮水及取食。每天7时打开动物房照明装置，19时关闭房间照明装置。

### **2.2** 实验分组

实验小鼠随机分成5组：假手术组、对照组、apelin 1μg组、apelin 2μg组和apelin 4μg组（每组10只）。其中，假手术组小鼠只进行侧脑室注射手术不给药物；对照组小鼠每天侧脑室注射2μL溶媒（人工脑脊液）；Apelin 1μg组小鼠每天侧脑室注射1μg apelin-13; Apelin 2μg组小鼠每天侧脑室注射2μg apelin-13; Apelin 4

μg组小鼠每天侧脑室注射4μg apelin-13。

### **2.3** 实验程序

将五组小鼠分别行单侧侧脑室埋管术，术后放入鼠笼休息7天，术后第8天开

始侧脑室注射apelin-13（1次/天），连续注射30天。在进行行为训练和测试前 3

天，每天抚摸实验小鼠1分钟，避免刺激小鼠，使其消除与测试者的陌生感。第38天进行Y迷宫实验，第40-41天进行新物体识别实验，第43-47天进行Morris水迷宫实验。随后处死小鼠，进行western blot、刚果红染色、酶活性测定及外周血Aβ水平检测（图2-1）。



图2-1 Apelin-13改善APP/PS1小鼠认知与记忆功能实验程序

### **2.4** 侧脑室微注射

用双蒸水洗净消毒后的手术器械。1%戊巴比妥钠（腹腔注射，45mg/kg）麻醉

APP/PS1小鼠，将小鼠固定在脑立体定位仪上。将头部皮肤剪开并暴露颅骨，刮净颅骨表面，使用过氧化氢烧灼止血。将前囟做为坐标原点，小鼠侧脑室坐标为向后

0.2mm，左旁开1mm，使用黑色墨水进行标记。使用牙科钻在标记处垂直钻入颅骨，将导管以前囟点为坐标原点向下2.5mm埋植入侧脑室，然后使用牙科水泥和不锈钢螺丝钉将注射导管固定在小鼠颅骨表面。手术整个过程中应将小鼠体温保持在

（37±1）℃，手术后小鼠分笼单独喂养，腹腔注射青霉素3天以预防感染，术后恢

复7天。侧脑室微注射时用毛巾轻微束缚小鼠，使用微量注射泵通过注射内管向侧脑室注射溶媒或目标药物（注射体积为2μl）。

### **2.5** **Y**迷宫检测实验

Y迷宫由三个同样的封闭臂组成，三个臂间夹角相等，均为120°，迷宫正上方放置摄像头。迷宫材料为黑色树脂，每个臂内侧用白色不干胶贴成不同图案，以便小鼠辨认。将三个臂分别设定为A、B和C。将小鼠由A臂放入，开启摄像头记录小鼠在3分钟的运动，检测完成后将小鼠放回鼠笼。分析并记录小鼠进入各臂的代号，每相邻3次进入的臂分别为不同臂记为正确，例如ABC、ACB、BAC。否则为错误，例如ACA、CCB、CBB。算出正确率，正确率=正确次数/进入各臂总次数-1

（图2-2）。



图2-2. Y迷宫检测实验

### **2.6** 新物体识别实验

新物体识别实验在自发活动箱中进行，该实验设备为一个70cm×70cm×50cm的黑色聚氯乙烯塑料检测箱，箱子上方约60cm处有一照明用的25W灯泡。用于识别的物体形状分别为立方体和圆柱体。在进行实验前24小时，将小鼠放在进行实验的房间内，适应实验环境。实验分为两个部分，分别为短时认知记忆检测及长时认知记忆检测。短时认知记忆检测的程序如下：先将小鼠置于检测箱中以适应新环境，

2min后将小鼠取出，然后再放入已放置两个相同立方体的检测箱中10min进行训练，小鼠背朝两物体放入检测箱内，并且小鼠鼻尖距离两物的长度一致。放入后立即开启录像设备，记录小鼠鼻子或嘴巴触及物体及距离物体2-3cm范围内探究的时间（前爪搭在物体上、鼻子嗅物体、舔物体等均属探究物体，摆个架势或爬到物体上不动不能算是对新物体的探究）。完成后将小鼠取出放入鼠笼。3小时后进行新物体识别检测，将训练阶段中的一个立方体换成另一种圆柱体，将动物置于检测箱中5min，记录探视新物体的时间，计算出探视新物体时间占探视新物体和旧物体总时间百分比。为避免气味及偏侧优势影响，用酒精擦洗物体并随机放置于盒子的不同角落。长时认知记忆检测与短时认知记忆检测的实验步骤一致，仅检测与训练完成之间的间隔时间由3h改为24h[[53]](#_bookmark48)（图2-3）。



图2-3 新物体识别实验

### **2.7** **Morris**水迷宫实验

水迷宫为一个圆形大盆（直径为2m、高为0.6m），盆壁材料为黑色树脂，摄像位于距盆底正上方约2m处，通过数据线连接电脑。求生平台为粗糙的白色有机玻璃，平面直径为3cm。水迷宫实验前，将盆中的水放至高于平台表面1cm，并加入奶粉将缸内水染白。将水迷宫平均划分为四个象限，平台放置于其中某一象限，这个实验过程保持平台位置不变。水迷宫的定位航行实验连续进行5天，每天将小鼠从四个不同象限轻放入水，入水时小鼠面对盆壁，每次入水后的游泳时间设定为

120s，使用软件记录小鼠从入水到找到逃生平台的时间（又称为逃避潜伏期）以及这段时间的游泳距离。每只小鼠每天训练4次（即从每个象限都入水一次），每次训练之间然小鼠休息1min。假如小鼠在120s的训练时间内没有寻找到平台，则将该小鼠的逃避潜伏期记为120s。小鼠水迷宫测试的成绩为第3-5天的逃避潜伏期及游泳距离的平均数，即使用平均逃避潜伏期及平均游泳距离代表被测小鼠的空间记忆能力的好坏。实验室应保持室内光线、温度、湿度、气味及背景噪音的恒定，盆内水温应稳定在37℃，检测过程中应及时清理盆中漂浮在水面上的小鼠粪便，每次训练完成应将小鼠毛发用电吹风吹干，以防其感冒。每天实验结束后，及时清理盆中的垃圾和粪便，更换为新水。到第二天训练开始前，再将盆内水染白（图2-4）。



图2-4. Morris水迷宫实验

### **2.8** 小鼠海马组织刚果红染色

将所有小鼠使用100mg/kg戊巴比妥钠腹腔注射深度麻醉后，左心室插入灌流针头，先使用生理盐水灌流以清除体内血液，然后再使用10%的多聚甲醛进行灌流进行固定组织，待肝脏发白变硬后取出脑组织，将其放置于10%甲醛溶液中固定

12h。分离出小鼠的海马组织，使用石蜡包埋，切片（厚度为5μm）后进行刚果红染色。切片脱蜡（二甲苯Ⅰ20min，二甲苯Ⅱ20min），水化（100%酒精Ⅰ3min、100%酒精Ⅱ3min 、95%酒精Ⅰ3min、95%酒精Ⅱ3min、85%酒精3min、75%酒精3min），置入甲醇刚果红染液20min，碱性乙醇分化液分化3秒后入水洗，经苏木素复染2min后再次水洗，脱水（75%酒精3min、85%酒精3min、95%酒精Ⅰ3min、95%酒精Ⅱ3min、100%酒精Ⅰ3min、100%酒精Ⅱ3min），透明（二甲苯Ⅰ5min、二甲苯Ⅱ20min），中性树胶封片，光镜下观察。

### **2.9** 小鼠海马、前额叶组织Aβ**1-40**及Aβ**1-42**酶联免疫吸附实验（**Elisa**）

小鼠处死取脑，从大脑纵裂正中切开，取左侧脑在冰上分离出海马、前额叶组织，分别装入EP管中捣碎。然后每20mg组织加入100ml裂解液，匀浆器匀浆至裂解充分。裂解充分后，4℃离心（14000转/min, 4min），EP管分装上清。实验使用Aβ1-40或Aβ1-42试剂盒进行检测，试剂盒采用双抗体夹心酶标免疫分析法测定样本中Aβ1-40或Aβ1-42水平。先将纯化的抗体包被微孔板，制作成固相抗体，再往包被抗体的微孔中依次加入Aβ1-40或Aβ1-42抗原、生物素化的抗Aβ1-40或Aβ1-42抗体及HRP标记的亲和素，彻底进行洗涤后使用底物TMB显色。TMB被过氧化物酶催化下成蓝色，并在酸作用下最后转变为黄色。颜色的深浅程度与样本中的Aβ1-40或Aβ1-42呈正相关。最后，使用酶标仪在450nm波长下测定吸光度值（OD 值），计算出样本浓度。

### **2.10** **Western Blot**检测

小鼠处死取脑，从大脑纵裂正中切开，取左侧脑在冰上分离出海马、前额叶组织，分别装入EP管中捣碎。然后每20mg组织加入100ml裂解液，匀浆器匀浆至裂解

充分。裂解充分后，4℃离心（14000转/min, 4min），EP管分装上清。采用BAC法测定蛋白含量。将100μl蛋白质样本加入到2×SDS凝胶上样缓冲液中煮沸5-10min后迅速冷却，使蛋白质充分变性。上样后进行电泳，电压为80mV，在6%SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳1h分离蛋白质。将分离的蛋白质用湿转法转膜至硝酸纤维素膜上，使用丽春红染色观察转膜效果。将转膜后的硝酸纤维素膜放置于10%脱脂牛奶中，室温下封闭2-3h或4℃封闭过夜，加入兔抗鼠β-actin(1:200)、ABCA1(1:200)、BACE1

（1:200）及NAP（1:200）一抗，孵育4-6h. TBST缓冲液摇床上洗膜3次，每次10min，使用TBST缓冲液摇床上洗膜3次，每次10min，然后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗，摇床上室温孵育2-4h，TBST缓冲液摇床上洗膜3次，每次10min。显影剂显影后，使用凝胶图像分析系统扫描，并进行半定量分析。

### **2.11** **BACE1**酶活性水平测定

使用BACE1活性检测试剂盒检测BACE1活性，具体步骤如下：用HAc缓冲液稀释小鼠海马及前额叶组织的蛋白质样品至0.25μg/μl和1μg/μl，保存在冰上。使用HAc缓冲液稀释BACE1底物Vl工作液（230μM）至50μM，避光操作，稀释后室温避光保存。开启酶标仪，预热3min。进行预实验，以确定最终的样品加样量：取一个蛋白质样品，在96 孔微量反应板的各孔内重复2 次加入不同量的该样品

（0.25μg、0.5μg、1μg、2μg、4μg、8μg、10μg），空白对照孔内加入10μl HAc缓冲液。在避光条件下，快速将100μl 50μM的BACE1底物Vl稀释液加入各个孔内，轻轻摇晃微量反应板使样品和稀释液混均，然后放置于酶标仪检测荧光强度（FU值）（设置发射光波长为550nm，激发光波长为405nm）。计算1-4点Max V，选择出最适合的蛋白质样本加样量（该加样量低于饱和反应量的一半并且有明显的信号）。根据前面预实验所确定的蛋白质样品加样量，将相同体积的各个样品分别重复加入各个孔内，对照孔内加入同体积的HAc缓冲液，避光条件下，快速将100μl 50

μM的BACE1底物Vl稀释液加入各个孔内，轻摇微量反应板使样品和稀释液充分混均，然后放入酶标仪读取荧光强度（FU值）。计算1-4点Max V，即得出各样品的BACE1活性水平。

### **2.12** **NEP**酶活性水平测定

使用NEP活性检测试剂盒检测NEP活性，测定方法参照Bormann等方法[[45]](#_bookmark42)。将不同组海马和前额叶组织提取蛋白，BCA法测定总蛋白浓度。在96孔板中加入蛋白样品，再加入含1% n-辛基-β-D-吡喃葡萄糖苷的20mM Mes 300μl（pH6.5），将反应定容为1.5ml，反应系统中包含了：0.1mM 底物（glutaryl-Ala-Ala-Phe-4–

methoxy-2-naphthylamide），100mM Me(s pH6.5)，0.3M NaCl和NEP 37℃孵育30min，

底物转化为Phe-4-methoxy-2- naphthylamide。加入20μM的phosphormidon终止NEP反应。根据底物产生的荧光强度分析NEP酶的活性：使用酶标仪在激发波长367nm，发射波长440nm条件下检测荧光强度（FU值）。根据试剂盒说明书绘制标准曲线计算出NEP酶活性。

### **2.13** 血Aβ**1-40**水平检测

Aβ1-40 采用ELISA 法检测。断尾取2ml 血置于聚丙烯管中，4℃低温离心

（1000r/min, 3min），取上清液保存于-80℃冰箱内。2h 内完成取血到存入冰箱。将待测标本及试剂盒置于室温，30min后加入蛋白酶体抑制剂苯磺酸到终浓度为1M，以防止蛋白酶降解Aβ1-40。配制Aβ1-40标准品，浓度为分别为500.00、250.00、

125.00、62.50、31.25、15.63、7.81、0.00 pg/ml，描记标准曲线。将50μl待测标本加入已包被的孔板，设定各个浓度的Aβ1-40空白对照及标准品，以上标本及对照均进行双平行孔测定。每孔加入抗Aβ1-40一抗（兔抗小鼠Aβ1-40抗体）50μl，用胶纸封住板孔，室温放置于摇床3h。洗板5 次，将辣根过氧化物酶标记的抗兔IgG

（IgG-HRP）二抗100μl加入板孔，胶纸封住板孔，置于室温30min。然后洗板4次，每孔加入显色试剂100μl，室温下避光环境下显色30min。然后每孔再加入100μl终止液，混匀，测量出OD 450nm的值。将标准品浓度设定为横坐标，OD值设定为纵坐标，绘制出标准曲线，从而得出Aβ1-40的浓度。

### **2.14** 血Aβ**1-42**水平检测

血Aβ1-42水平检测使用ELISA法检测[[54](#_bookmark49)]。断尾取2ml血置于聚丙烯管中，4℃

低温离心（1000r/min, 3min），取上清液保存于-80℃冰箱内。2h 内完成取血到存入冰箱。将待测血标本及试剂盒放于室温20-30min，配制Aβ1-42标准品，浓度分别为：500.00、250.00、125.00、62.50、31.25、15.63、7.81、0.00 pg/ml，描记标准曲线。将100μl待测样本加入已包被的96孔板孔内，不同浓度的Aβ1-42标准品和空白对照均做双平行孔检测。胶纸封住板孔，室温放置于摇床3h。洗板5次。板孔内加入生物素标记的兔抗小鼠Aβ1-42一抗100μl，胶纸封住板孔，置于室温1h。洗板4次。将辣根过氧化物酶标记的抗兔IgG（IgG-HRP）二抗100μl加入板孔，胶纸封住板孔，置于室温30min。然后洗板4次，每孔加入显色试剂100μl，室温下避光环境下显色30min。然后每孔再加入100μl终止液，混匀，测量出OD 450nm的值。将标准品浓度设定为横坐标，OD值设定为纵坐标，绘制出标准曲线，从而得出Aβ1-40的浓度。

### **2.15** 统计学分析

所有的数据采用均数±标准差（*X*±S）表示。3组或多组之间的组间比较采用one-way ANOVA分析，2组间比较采用Student's t检验。统计分析采用SPSS 13.0软件，*P*<0.05被视为差别有显著性。

## **3.** 结果

### **3.1** **Apelin-13**提高**APP/PS1**小鼠的认知与记忆能力

#### **3.1.1** **Apelin-13**提高**APP/PS1**小鼠在**Y**迷宫实验中的正确率

为了检测apelin-13对APP/PS1小鼠认知与学习记忆功能的影响，我们将侧脑室注射不同剂量apelin-13的APP/PS1小鼠进行Y迷宫检测。结果显示溶媒对照组与假手术组之间比较，其正确率无显著差异。Apelin 2μg组和apelin 4μg组与对照组比较，其正确率显著增加（图2-5）。



图2-5 Apelin-13对APP/PS1小鼠在Y迷宫实验中正确率的影响（n=10）

\**P*<0.05 vs control group

#### **3.1.2** **Apelin-13**提高**APP/PS1**小鼠对新物体的认知能力

为了进一步证实apelin-13对APP/PS1小鼠认知与学习记忆功能的影响，我们将侧脑室注射不同剂量apelin-13的APP/PS1小鼠进行新物体识别检测。该实验分为短时程检测和尝时程检测两个部分。结果显示无论短时程还是长时程检测，Apelin 2μg组和apelin 4μg组与对照组比较，其对新物体认知能力都显著增加（图2-6、图

2-7)。



图2-6 Apelin-13对APP/PS1小鼠在新物体识别实验（短时程检测）中的影响（n=10）

\**P*<0.05 vs control group



图2-7 Apelin-13对APP/PS1小鼠在新物体识别实验（长时程检测）中的影响（n=10）

\**P*<0.05 vs control group

#### **3.1.3** **Apelin-13**提高**APP/PS1**小鼠在**Morris**水迷宫实验中的空间记忆能力

为了证实apelin-13对APP/PS1小鼠空间记忆功能的影响，我们将侧脑室注射不同剂量apelin-13的APP/PS1小鼠进行Morris水迷宫检测。结果表明，对照组小

鼠的平均逃避潜伏期和平均游泳距离与假手术组小鼠比较，其差异无显著性。Apelin 2μg组和apelin 4μg组小鼠与对照组小鼠比较，平均逃避潜伏期和平均游泳距离显著降低（图2-8、图2-9）。说明apelin-13明显改善APP/PS1小鼠的空间记忆能力。



图2-8 Apelin-13对APP/PS1小鼠在水迷宫检测中平均逃避潜伏期的影响（n=10）

\**P*<0.05 vs control group



图2-9 Apelin-13对APP/PS1小鼠在水迷宫检测中平均游泳距离的影响（n=10）

\**P*<0.05 vs control group

### **3.2** **Apelin-13**减少**APP/PS1**小鼠脑组织Aβ沉积

为了检测apelin-13对APP/PS1小鼠脑组织Aβ水平的影响，我们对APP/PS1小鼠侧脑室注射不同剂量apelin-13后，Elisa检测海马和前额叶的Aβ1-40及Aβ1-42水平，刚果红染色检测海马组织Aβ沉积水平。结果显示假手术组、对照组及apelin

1μg组小鼠之间海马和前额叶组织的Aβ1-40及Aβ1-42水平改变无显著差异，海马组织Aβ沉积水平差异无显著性。Apelin 2μg组和apelin 4μg组小鼠与对照组小鼠相比较，其海马和前额叶的Aβ1-40及Aβ1-42水平显著降低（图2-10、图2-11、图2-12、图2-13），海马组织Aβ沉积显著降低（图2-14）。



图2-10 Apelin-13对APP/PS1小鼠海马组织Aβ1-40水平的影响(n=3)

\**P*<0.05 vs control group



图2-11 Apelin-13对APP/PS1小鼠前额叶组织Aβ1-40水平的影响（n=3）

\**P*<0.05 vs control group



图2-12 Apelin-13对APP/PS1小鼠海马组织Aβ1-42水平的影响（n=3）

\**P*<0.05 vs control group



图2-13 Apelin-13对APP/PS1小鼠前额叶组织Aβ1-42水平的影响（n=3）

\**P*<0.05 vs control group; \*\**P*<0.01 vs control group



图2-14 Apelin-13对APP/PS1小鼠海马组织Aβ沉积的影响（刚果红染色，×40倍）

### **3.3** **Apelin-13**减少**APP/PS1**小鼠脑组织**BACE1**蛋白活性，增加**NEP**

**蛋白活性**

#### **3.3.1** **Apelin-13**不影响**APP/PS1**小鼠脑组织**APP**、**BACE1**及**NEP**蛋白表达

为了进一步证实apelin-13对Aβ代谢的影响，我们使用western blot方法检测不同剂量apelin-13处理APP/PS1小鼠后，其海马及前额叶组织APP、BACE1及NEP蛋白表达情况。结果显示apelin-13对APP/PS1小鼠马及前额叶组织APP、BACE1及NEP蛋白表达无显著影响（图2-15、图2-16）。

**Hippocampus**

****

图2-15 Apelin-13对APP/PS1小鼠海马组织APP、BACE1和NEP蛋白表达的影响

**Prefrontal cortex**

****

图2-16 Apelin-13对APP/PS1小鼠前额叶组织APP、BACE1和NEP蛋白表达的影响

#### **3.3.2** **Apelin-13**减少**APP/PS1**小鼠脑组织**BACE1**蛋白活性

分别使用1、2和4μg apelin-13处理APP/PS1小鼠，根据试剂盒方法检测海马及前额叶组织BACE1蛋白活性。结果显示2μg apelin和4μg apelin组小鼠海马及前额叶BACE1蛋白活性显著低于对照组小鼠（图2-17、图2-18）。说明apelin-13减少APP/PS1小鼠海马及前额叶组织BACE1蛋白活性。



图2-17 Apelin-13对APP/PS1小鼠海马组织BACE1活性的影响

\**P*<0.05 vs control group



图2-18 Apelin-13对APP/PS1小鼠前额叶组织BACE1活性的影响

\**P*<0.05 vs control group

#### **3.3.3** **Apelin-13**增加**APP/PS1**小鼠脑组织**NEP**蛋白活性

分别使用1、2和4μg apelin-13处理APP/PS1小鼠，根据试剂盒方法检测海马及前额叶组织NEP蛋白活性。结果显示2μg apelin和4μg apelin组小鼠海马及前额

叶NEP蛋白活性显著高于对照组小鼠（图2-19、图2-20）。说明apelin-13增加APP/PS1

小鼠海马及前额叶组织NEP蛋白活性。



图2-19 Apelin-13对APP/PS1小鼠海马组织NEP活性的影响

\**P*<0.05 vs control group; \*\**P*<0.01 vs control group



图2-20 Apelin-13对APP/PS1小鼠前额叶组织NEP活性的影响

\**P*<0.05 vs control group

### **3.4** **Apelin-13**增加**APP/PS1**小鼠血液中Aβ水平

为了检测apelin-13对APP/PS1小鼠脑组织Aβ清除的影响，我们分别使用1、2和4μg apelin-13处理小鼠，断尾取血，Elisa法检测血中Aβ1-40及Aβ1-42水平。结果显示2μg apelin和4μg apelin组小鼠血液中Aβ1-40及Aβ1-42水平显著高于对照组小鼠（图2-21、图2-22）。说明apelin-13促进APP/PS1小鼠Aβ1-40及Aβ1-42从脑中清除进入血液，从而增加血液中Aβ1-40及Aβ1-42水平。



图2-21 Apelin-13对APP/PS1小鼠血液中Aβ1-40水平的影响（n=3）

\**P*<0.01 vs control group



图2-22 Apelin-13对APP/PS1小鼠血液中Aβ1-42水平的影响（n=3）

\**P*<0.01 vs control group

### **3.5** **Apelin-13**增加**APP/PS1**小鼠脑组织**ABCA1**蛋白水平

为了证实apelin-13对APP/PS1小鼠脑组织ABCA1蛋白水平的影响，我们使用western blot检测各组小鼠海马和前额叶组织ABCA1蛋白水平。实验结果显示假手术组、对照组及apelin 1μg组小鼠之间海马和前额叶的ABCA1蛋白水平改变无显著差异。Apelin 2μg组和apelin 4μg组小鼠与对照组小鼠相比较，其海马和前额叶的ABCA1水平显著增加（图2-23、图2-24）。



图2-23 Apelin-13对APP/PS1小鼠海马组织ABCA1蛋白水平的影响



图2-24 Apelin-13对APP/PS1小鼠前额叶组织ABCA1蛋白水平的影响

## **4.** 讨论

AD是一种中枢神经系统的退行性疾病，其主要病理改变之一为脑内的Aβ淀粉沉积所形成的老年斑。伴随着遗传学和生物学研究进展，己经研究出数种能比较好模拟人类临床AD发病的转基因动物模型，包括：APP、早老素l（presenilin 1, PS1）和早老素2（presenilin 2, PS2）。研究表明，APP单转基因小鼠脑内Aβ斑块出现比较晚，一般出现在9月龄左右，而APP/PS1双转基因小鼠脑内淀粉样斑块出现较早，一般出现在5-6月龄左右[[55]](#_bookmark50)。因此，本研究使用6月龄APP/PS1双转基因小鼠作为模型鼠。

AD的主要临床表现为进行性的记忆和行为障碍，APP/PS1双转基因小鼠5-6月龄时已经存在少量的Aβ斑块，但斑块小并且数量少。7月龄时Aβ斑块的面积及数量显著增加，并且多分布于海马组织及皮层区。随着Aβ 斑块的出现，7 月龄

APP/PS1双转基因小鼠的认知与记忆功能也出现了明显的减退[[56]](#_bookmark51)。因此，APP/PS1双转基因小鼠脑内Aβ沉积所形成的老年斑病变与其认知与记忆能力的降低有着非常紧密的联系。

在本部分实验中，我们使用不同剂量apelin-13通过侧脑室注射方法处理6月龄

APP/PS1双转基因小鼠，7月龄时检测其认知与记忆水平。结果表明，在Y迷宫实验中apelin-13能显著提高APP/PS1小鼠的正确率，在新物体识别实验中（无论是短时程检测还是长时程检测）apelin-13能显著提高APP/PS1小鼠对新物体的认知能力。在Morris水迷宫实验中apelin-13能显著减少APP/PS1小鼠的平均游泳距离及平均潜伏期。这些结果都说明apelin-13能改善APP/PS1小鼠的认知与记忆能力。

并且我们也检测了apelin-13对APP/PS1小鼠海马及前额叶组织Aβ水平的影响。

Elisa检测结果显示，apelin-13能显著降低APP/PS1小鼠海马及前额叶组织Aβ1-40及Aβ1-42水平，刚果红染色结果显示apelin-13能显著降低APP/PS1小鼠海马组织Aβ沉积。以上研究表明，apelin-13能提高7月龄APP/PS1小鼠认知与记忆功能，并且降低其海马及前额叶组织Aβ1-40及Aβ1-42水平。Aβ水平降低与认知与记忆功能的增加在时间上的一致性说明，apelin-13改善APP/PS1小鼠认知与记忆功能与其降低海马及前额叶组织Aβ1-40及Aβ1-42水平是密切相关的。

Aβ在脑内的代谢包括三个部分，首先是Aβ的生成，在这个过程中，APP是原材料，BACE1是限速酶。然后是Aβ的降解过程，其限速酶是NEP。最后是Aβ从脑内清除入血液的过程，主要是通过荷脂的apoE介导的[[6](#_bookmark5)[-7]](#_bookmark6)。我们在第一部的实验也就是细胞实验部分已经证明，apelin-13是通过降低PC-12细胞BACE1酶活性减少Aβ生成，以及通过增强PC-12细胞NEP酶活性增加Aβ的降解，最终减少Aβ水平。在这部分实验中，我们在整体动物模型上进一步证实以上实验结果，并且研究了apelin-13对Aβ清除的影响。实验结果表明，apelin-13不影响APP/PS1小鼠海马及前额叶组织的APP、BACE1及NEP蛋白的表达，减少APP/PS1小鼠海马及前额叶组织BACE1酶活性，增加NEP酶活性，这些结果与第一部分细胞实验结果相一致。以上结果表明apelin-13可以减少APP/PS1小鼠脑组织Aβ生成，并且增加其降解。另外，我们通过Elisa检测APP/PS1小鼠外周血Aβ1-40及Aβ1-42水平发现，apelin-13增加APP/PS1小鼠外周血Aβ1-40及Aβ1-42水平。这说明apelin-13增加

APP/PS1小鼠Aβ从脑中清除入血液（图2-26）。



图2-26 apelin-13增加APP/PS1小鼠脑组织Aβ代谢的影响

注：APJ：血管紧张素受体AT1相关的受体蛋白；ABCA1：三磷酸腺苷结合盒转运体A1；Cholesterol efflux ：胆固醇流出；apoE：载脂蛋白E；APP：淀粉样前体蛋白；BACE1：β位淀

粉样前体蛋白裂解酶1；γ-secretase：γ-分泌酶；Aβ：淀粉样蛋白；NEP：脑啡肽酶；AD：阿尔茨海默病

在第一部分实验中，我们证明apelin-13通过ABCA1蛋白调节PC-12细胞Aβ代谢。在本部分实验中，我们观察apelin-13对APP/PS1小鼠脑组织ABCA1蛋白水平的影响，结果表明apelin-13增加APP/PS1小鼠海马及前额叶组织ABCA1蛋白水平，这与细胞实验结果相一致。那在apelin-13是否通过ABCA1蛋白调节APP/PS1小鼠的认知记忆功能及脑组织Aβ代谢，我们将在第三部分实验进行研究。

## 小结

1) Apelin-13改善APP/PS1小鼠的认知与记忆功能；

2）Apelin-13减少APP/PS1小鼠海马和前额叶组织Aβ生成，增加Aβ降解及清除。

3) Apelin-13增加APP/PS1小鼠海马和前额叶组织ABCA1蛋白水平。

# **第三部分 Apelin-13**通过**ABCA1**改善

**APP/PS1小鼠的认知与记忆能力**

前言

在中枢，三磷酸腺苷结合盒转运体A1（ATP binding cassette transporter A1, ABCA1）转运细胞内及细胞膜的胆固醇和磷脂给载脂蛋白E(apolipoprotein E, apoE) [[22]](#_bookmark21)。在两种淀粉样前体蛋白（amyloid precursor protein, APP）过表达的阿尔茨海默病（Alzheimer's disease, AD）小鼠（Tg-SwDI/B和APP/PS1模型）中，ABCA1缺失减少apoE的荷脂，并且增加脑组织β-淀粉样蛋白（β-Amyloid protein, Aβ）水平[[23](#_bookmark22)[-57]](#_bookmark52)。在40周龄APP/PS1小鼠，肝X受体（liver X receptor, LXR）促进ABCA1上调可改善在物体认知测试中的认知缺陷，而抑制ABCA1表达后其认知功能缺陷则没有改变。在ABCA1高表达小鼠，其脑组织Aβ的沉积显著减少[[58]](#_bookmark53)。以上说明ABCA1与AD的关系非常密切，可将ABCA1作为治疗AD的一个潜在靶点。

我们在先前的研究中发现apelin-13可以增加THP-1源性巨噬细胞ABCA1蛋白水平[[43]](#_bookmark40)，并且在本课题第一部分实验中，我们已经证实apelin-13可以增加PC-12细胞ABCA1蛋白水平，并且减少Aβ的生成，增加Aβ的降解。在本课题第二部分实验中，我们证实apelin-13可以改善APP/PS1转基因小鼠认知与记忆能力，减少脑组织Aβ沉积并增加ABCA1蛋白水平。在本部分，我们将在APP/PS1转基因小鼠上证实apelin-13是否通过增加ABCA1蛋白水平影响Aβ代谢及认知记忆能力。

## **1.** 实验材料

### **1.1** 实验动物

APP/PS1转基因小鼠购自北京大学医学院实验动物中心。

### **1.2** 主要试剂

Apelin-13购自美国Peptide公司；

人工脑脊液购自湖州英创生物科技有限公司；

戊巴比妥钠购自中国医药集团上海化学试剂公司；胰酶购自 Amresco 公司；BCA蛋白含量测定试剂购自Hyclone-Pierce公司；

BlueRanger预染蛋白分子量标准购自Hyclone-Pierce公司；

聚偏二氟乙烯（polyvinylidene fluoride, PVDF）膜购自Amersham公司；

兔抗鼠ABCA1、BACE1、NAP及β-actin一抗以及辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗购自美国Santa Cruz公司；

丽春红染色试剂购自美国Sigma公司；

Aβ1-40及Aβ1-42 Elisa检测试剂盒购自Invitrogen公司；

BACE1活性检测试剂盒购自Calbioehem公司；二甲基亚飒（DMSO）购自美国Sigma公司；微量反应板（96孔）购自Coming-Costar公司；

小鼠特异性ABCA1小干扰RNA（SiRNA）购自圣克鲁斯生物技术公司；

pENTRTM/U6购自Invitrogen公司；

293FT细胞购自中科院细胞库；

Western blot荧光检测试剂盒购自Hyclone-Pierce公司；Reverse Transcription System购自美国Promega公司；脂质体2000购自Invitrogen公司；

NEP活性检测试剂盒购自美国Sigma公司；

Leucine Aminopeptidase购自美国Sigma公司；

Phosphormidon购自美国Sigma公司；其它试剂均为国产分析纯。

### **1.3** 主要仪器：

导管、导管帽、注射内管及微量注射器（2μl、5μl）购自深圳市瑞沃德生命科技有限公司；

小鼠脑立体定位仪购自美国Stoneling公司；Y 迷宫购自成都泰盟公司；Morris水迷宫购自成都泰盟公司；

小鼠自发活动箱购自上海吉量软件有限公司；

震动切片机（KD-400型）购自浙江省金华市科迪仪器设备有限公司；超纯水系统购自英国ELGA公司；

倒置生物显微镜（型号BX51）购自日本Olympus公司；实时定量PCR仪为应用生物系统7900HT；

高速离心机（5804型、5804R型）购自德国Eppendorf公司；凝胶成像分析系统（GOS7500型）购自美国UVP公司；

半干转印槽购自美国BIO-RAD公司；电子分析天平购自美国Sartorius公司；

电泳用基础电源购自美国BIO-RAD公司；

DNA Thermal Cycler购自美国Perkin Elmer公司；超低温冰箱购自日本三洋公司；

紫外分光光度计购自美国PE公司；

垂直电泳仪系统购自美国BIO-RAD公司；卧式电泳槽购自北京六一仪器厂；

超速离心机购自日本日立公司；

酶标仪（MK3型）购自美国Thermo公司；

超声波破碎器（型号VC130）购自美国Sonics公司产品；

微量移液器（10μl、100μl、1000μl）购自德国Eppendorf公司；液体闪烁计数器购自国营二六二厂；

病理组织包埋冷冻台（BMJ-Ⅲ型）购自常州中威电子仪器厂；

图像分析系统（型号HMIAS2000）购自武汉千屏影像技术有限责任公司。

## **2.** 实验方法

### **2.1** 动物饲养

按照第二部分2.1中所述的方法进行。

### **2.2** 实验分组

实验小鼠随机分为4组：对照组、ABCA1 SiRNA组、apelin组、apelin +ABCA1 SiRNA组（每组10只）。其中，对照组小鼠每天侧脑室注射2μl溶媒（人工脑脊液）；ABCA1 SiRNA组小鼠每周侧脑室注射滴度为2.5x107的慢病毒包装ABCA1 SiRNA

2μL；Apelin组小鼠每天侧脑室注射2μg apelin-13; Apelin+ABCA1 SiRNA组小鼠每天侧脑室注射2μg apelin-13，每周侧脑室注射滴度为2.5x107的慢病毒包装ABCA1 SiRNA 2μL。

### **2.3** 实验程序

将四组小鼠分别行单侧侧脑室埋管术，术后放入鼠笼休息7天，术后第8天开始apelin组及apelin+ABCA1 SiRNA组小鼠侧脑室注射apelin-13（2μg/2μl、1次/天），对照组小鼠每天侧脑室注射2μl溶媒（人工脑脊液），连续注射30天。ABCA1 SiRNA组及apelin+ABCA1 SiRNA组小鼠侧脑室注射滴度为2.5x107的慢病毒包装ABCA1 SiRNA 2μL（1次/周，共5次）。在进行行为训练和测试前3天，每天抚摸实验小鼠1分钟，避免刺激小鼠，使其消除与测试者的陌生感。第38天进行Y迷宫实验，第40-41天进行新物体识别实验，第43-47天进行Morris水迷宫实验。随后处死小鼠，进行western blot、刚果红染色、酶活性测定及外周血Aβ水平检测（图3-1）。



图3-1 Apelin-13增加ABCA1蛋白水平改善APP/PS1小鼠认知与记忆功能实验程序

### **2.4** **ABCA1-siRNA**慢病毒表达载体的构建与包装

以ABCA1 cDNA作为靶序列设计siRNA sense: 5`-UGUGGAUGACUGAGUA CCUGA-3`; antisense: 5`-UCAGGUACUCA GUCAUCCACA-3`. SiRNA退火后与

pENTRTM/U6连接。构建ABCA1-siRNA慢病毒表达载体：将pENTRTM/U6 siRNA纯化质粒和pLenti6/BLOCK-iTTM慢病毒表达质粒按说明书建立L-R重组反应体系。ABCA1-siRNA慢病毒在293FT细胞内的包装：将ABCA1-siRNA慢病毒表达载体质粒及病毒包装质粒通过脂质体2000 介导的方法共转染入病毒包装细胞

293FT中，将细胞放置于CO2孵箱内，37℃孵育过夜，更换为含丙酮酸钠及非必需氨基酸的DMEM完全培养基后继续培养，72小时后收集细胞培养基，离心（4℃、

3000r/min、15min），除去沉淀，收集含假病毒颗粒的上清液分装，-80℃冻存备用。

### **2.5** 侧脑室微注射

按照第二部分2.4中所述的方法进行。

### **2.6** **Y**迷宫检测实验

按照第二部分2.5中所述的方法进行。

### **2.7** 新物体识别实验

按照第二部分2.6中所述的方法进行。

### **2.8** **Morris**水迷宫实验

按照第二部分2.7中所述的方法进行。

### **2.9** 小鼠海马组织刚果红染色

按照第二部分2.8中所述的方法进行。

### **2.10** 小鼠海马、前额叶组织Aβ**1-40**及Aβ**1-42**酶联免疫吸附实验（**Elisa**）

按照第二部分2.9中所述的方法进行。

### **2.11** **Western Blot**检测

按照第二部分2.10中所述的方法进行。

### **2.12** **BACE1**酶活性水平测定

按照第二部分2.11中所述的方法进行。

### **2.13** **NEP**酶活性水平测定

按照第二部分2.12中所述的方法进行。

### **2.14** 血Aβ**1-40**水平检测

按照第二部分2.13中所述的方法进行。

### **2.15** 血Aβ**1-42**水平检测

按照第二部分2.14中所述的方法进行。

### **2.16** 统计学分析

所有的数据采用均数±标准差（*X*±S）表示。3组或多组之间的组间比较采用one-way ANOVA分析，2组间比较采用Student's t检验。统计分析采用SPSS 13.0软件，*P* <0.05 被视为差别有显著性。

## **3.** 结果

### **3.1** 侧脑室注射**ABCA1 SiRNA**效果观察

为了检测ABCA1 siRNA对脑组织ABCA1蛋白表达的抑制效果，我们在ABCA1

siRNA侧脑室注射后41天采用western blot检测APP/PS1小鼠海马及前额叶组织

ABCA1蛋白表达，结果显示使用ABCA1 siRNA后，海马及前额叶组织ABCA1蛋白表达显著减少（图3-2, 图3-3），说明ABCA1 siRNA能有效抑制ABCA1蛋白表达。



图3-2 ABCA1 siRNA对APP/PS1小鼠海马组织ABCA1蛋白抑制效果检测



图3-3 ABCA1 siRNA对APP/PS1小鼠前额叶组织ABCA1蛋白抑制效果检测

### **3.2** **Apelin-13**通过**ABCA1**蛋白改善**APP/PS1**小鼠的认知与记忆能力

#### **3.2.1** **Apelin-13**通过**ABCA1**蛋白改善**APP/PS1**小鼠在**Y**迷宫认知与记忆能力

为了证实ABCA1蛋白在apelin-13改善APP/PS1小鼠认知与记忆能力所起的作用，我们使用ABCA1 siRNA侧脑室注射抑制脑组织ABCA1表达，采用Y迷宫检测2μg apelin-13对APP/PS1小鼠的认知与记忆能力的影响。结果显示ABCA1

siRNA组小鼠在Y迷宫中的正确率显著低于control组，apelin组小鼠在Y迷宫中的正确率显著高于control组。Apelin+ABCA1 siRNA组小鼠在Y迷宫中的正确率显著低于apelin组，说明apelin-13通过ABCA1蛋白增加APP/PS1小鼠在Y迷宫认知与记忆能力（图3-4）。



图3-4 Apelin-13通过ABCA1蛋白增加APP/PS1小鼠在Y迷宫的正确率（n=10）

\**P*<0.05 vs control group; #*P*<0.05 vs apelin group

#### **3.2.2** **Apelin-13**通过**ABCA1**蛋白改善**APP/PS1**小鼠在新物体识别实验中的认知与记忆能力

使用ABCA1 siRNA侧脑室注射抑制脑组织ABCA1表达，采用新物体识别实验（短时程检测和长时程检测）检测2μg apelin-13对APP/PS1小鼠的认知与记忆能力的影响。结果显示无论短时程检测和长时程检测，apelin组小鼠对新物体的识别时间显著高于control组。Apelin+ABCA1 siRNA组小鼠对新物体的识别时间显著低

于apelin组，说明apelin-13通过ABCA1蛋白增加APP/PS1小鼠对新物体的识别时间（图3-5、图3-6）。



图3-5 Apelin-13通过ABCA1蛋白增加APP/PS1小鼠对新物体的识别时间（短时程检测，n=10）

\**P*<0.05 vs control group; #*P*<0.05 vs apelin group



图3-6 Apelin-13通过ABCA1蛋白增加APP/PS1小鼠对新物体的识别时间（长时程检测，n=10）

\**P*<0.05 vs control group; #*P*<0.05 vs apelin group

#### **3.2.3** **Apelin-13**通过**ABCA1**蛋白减少**APP/PS1**小鼠在**Morris**水迷宫实验中的平均逃避潜伏期及平均游泳距离

使用ABCA1 siRNA侧脑室注射抑制脑组织ABCA1表达，采用Morris水迷宫实验检测2μg apelin-13对APP/PS1小鼠的认知与记忆能力的影响。结果显示ABCA1 siRNA组小鼠与control组小鼠比较，其平均逃避潜伏期及平均游泳距离显著增加，apelin组小鼠平均逃避潜伏期及平均游泳距离显著低于control组。Apelin+ABCA1 siRNA组小鼠平均逃避潜伏期及平均游泳距离显著高于apelin组，说明Apelin-13通过ABCA1蛋白减少APP/PS1小鼠在Morris水迷宫实验中的平均逃避潜伏期及平均游泳距离（图3-7、图3-8）。



图3-7 Apelin-13通过ABCA1蛋白减少APP/PS1小鼠在Morris水迷宫实验中的平均逃避潜伏期（n=10）

\**P*<0.05 vs control group; #*P*<0.05 vs apelin group



图3-8 Apelin-13通过ABCA1蛋白减少APP/PS1小鼠在Morris水迷宫实验中的平均游泳距离（n=10）

\**P*<0.05 vs control group; #*P*<0.05 vs apelin group

### **3.3** **Apelin-13**通过**ABCA1**蛋白减少**APP/PS1**小鼠海马和前额叶组织

**Aβ水平**

为了进一步证实ABCA1蛋白在apelin-13减少Aβ水平效应中的作用，我们使用ABCA1 SiRNA抑制APP/PS1小鼠海马和前额叶组织ABCA1蛋白表达后，Elisa方法检测apelin-13对APP/PS1小鼠海马和前额叶组织Aβ水平的影响，刚果红染色检测海马组织Aβ沉积情况。结果显示ABCA1 SiRNA组小鼠海马、前额叶组织Aβ1-40、Aβ1-42水平及海马Aβ沉积都显著高于control组小鼠，这与以前文献报道相一致。Apelin组小鼠海马、前额叶组织Aβ1-40、Aβ1-42水平及海马Aβ沉积显著低于

control组小鼠。Apelin+ABCA1 SiRNA组小鼠海马、前额叶组织Aβ1-40、Aβ1-42水平及海马Aβ沉积显著高于apelin组小鼠（图3-9、图3-10、图3-11、图3-12、图3-13）。这说明apelin-13通过ABCA1蛋白减少APP/PS1小鼠海马和前额叶组织Aβ水平。



图3-9 Apelin-13通过ABCA1蛋白减少APP/PS1小鼠海马组织Aβ1-40水平（n=3）

\**P*<0.05 vs control group; #*P*<0.05 vs apelin group



图3-10 Apelin-13通过ABCA1蛋白减少APP/PS1小鼠海马组织Aβ1-42水平（n=3）

\**P*<0.05 vs control group; #*P*<0.05 vs apelin group



图3-11 Apelin-13通过ABCA1蛋白减少APP/PS1小鼠前额叶组织Aβ1-40水平（n=3）

\**P*<0.05 vs control group; #*P*<0.05 vs apelin group



图3-12 Apelin-13通过ABCA1蛋白减少APP/PS1小鼠前额叶组织Aβ1-42水平（n=3）

\**P*<0.05 vs control group; #*P*<0.05 vs apelin group



图3-13 Apelin-13通过ABCA1蛋白减少APP/PS1小鼠海马组织Aβ沉积（刚果红染色，×40倍）

### **3.4** **Apelin-13**通过**ABCA1**蛋白减少**APP/PS1**小鼠海马和前额叶组织

**BACE1活性**

为了进一步证实apelin-13是否通过ABCA1蛋白影响BACE1活性，我们使用ABCA1 SiRNA抑制APP/PS1小鼠海马和前额叶组织ABCA1蛋白表达后，检测apelin-13对APP/PS1小鼠海马和前额叶组织BACE1活性的影响。结果显示ABCA1 SiRNA组小鼠海马及前额叶组织BACE1活性都显著高于control组小鼠。Apelin组小鼠海马及前额叶组织BACE1活性显著低于control组小鼠。Apelin+ABCA1 SiRNA组小鼠海马及前额叶组织BACE1活性显著高于apelin组小鼠（图3-14、图3-15）。这说明apelin-13通过ABCA1蛋白减少APP/PS1小鼠海马和前额叶组织BACE1活性。



图3-14 Apelin-13通过ABCA1蛋白减少APP/PS1小鼠海马组织BACE1活性（n=3）

\**P*<0.05 vs control group; #*P*<0.05 vs apelin group



图3-15 Apelin-13通过ABCA1蛋白减少APP/PS1小鼠前额叶组织BACE1活性（n=3)

\**P*<0.05 vs control group; #*P*<0.05 vs apelin group

### **3.5** **Apelin-13**通过**ABCA1**蛋白增加**APP/PS1**小鼠海马和前额叶组织

**NEP活性**

为了进一步证实apelin-13 是否通过ABCA1 蛋白影响NEP 活性，我们使用

ABCA1 SiRNA抑制APP/PS1小鼠海马和前额叶组织ABCA1蛋白表达后，检测

apelin-13对APP/PS1小鼠海马和前额叶组织NEP活性的影响。结果显示ABCA1

SiRNA组小鼠海马及前额叶组织NEP活性都显著低于control组小鼠。Apelin组小鼠海马及前额叶组织NEP活性显著高于control组小鼠。Apelin+ABCA1 SiRNA组小鼠海马及前额叶组织NEP活性显著低于apelin组小鼠（图3-16、图3-17）。这说明apelin-13通过ABCA1蛋白增加APP/PS1小鼠海马和前额叶组织NEP活性。



图3-16 Apelin-13通过ABCA1蛋白增加APP/PS1小鼠海马组织NEP活性（n=3）

\**P*<0.05 vs control group; \*\**P*<0.01 vs control group; #*P*<0.05 vs apelin group



图3-17 Apelin-13通过ABCA1蛋白增加APP/PS1小鼠前额叶组织NEP活性（n=3）

\**P*<0.05 vs control group; \*\**P*<0.01 vs control group; #*P*<0.05 vs apelin group

### **3.6** **Apelin-13**通过**ABCA1**蛋白增加**APP/PS1**小鼠血液Aβ水平

为了检测ABCA1在apelin-13对APP/PS1小鼠脑组织Aβ清除中的作用，我们使用ABCA1 SiRNA抑制APP/PS1小鼠脑组织ABCA1蛋白表达后，检测apelin-13对APP/PS1小鼠血液Aβ水平的影响。结果显示ABCA1 SiRNA组小鼠血液Aβ1-40及Aβ1-42水平水平都显著低于control组小鼠。Apelin组小鼠血液Aβ1-40及Aβ1-42水平水平高于control组小鼠。Apelin+ABCA1 SiRNA组小鼠血液Aβ1-40及Aβ1-42水平水平显著低于apelin组小鼠（图3-18、图3-19）。这说明apelin-13通过ABCA1蛋白增加APP/PS1小鼠血液Aβ1-40及Aβ1-42水平水平，也就是增加脑组织内Aβ1-40及Aβ1-42的清除。



图3-18 Apelin-13通过ABCA1蛋白增加APP/PS1小鼠血液Aβ1-40水平（n=3）

\**P*<0.05 vs control group; \*\**P*<0.01 vs control group; #*P*<0.05 vs apelin group



图3-19 Apelin-13通过ABCA1蛋白增加APP/PS1小鼠血液Aβ1-42水平（n=3）

\**P*<0.05 vs control group; \*\**P*<0.01 vs control group; #*P*<0.05 vs apelin group

## **4.** 讨论

许多研究表明，ABCA1与Aβ代谢之间关系密切。ABCA1蛋白缺失会减少apoE荷脂并增加Aβ水平。Zelceretal等在缺失肝X受体（liver X receptor, LXR）的APP/PS1小鼠检测大脑组织的Aβ水平，LXR缺失导致ABCA1蛋白水平的降低，并且增加脑组织Aβ水平[[57]](#_bookmark52)。另有研究表明，ABCA1缺失小鼠出现apoE荷脂减少，并增加Aβ沉积[[59]](#_bookmark54)。

而ABCA1蛋白过表达会增加脑内apoE荷脂及减少Aβ水平，进而影响AD. Vanmierlo等证实LXR激动剂改善APP/PS1老年小鼠记忆功能[[60]](#_bookmark55)。为了进一步理解ABCA1在AD中的作用，Wahrleetal等建立了ABCA1过表达的PDAPP小鼠模型，小鼠12月龄时，ABCA1蛋白表达增加6倍，apoE脂化增加，并且Aβ沉积显著减少[[61]](#_bookmark56)。

我们使用ABCA1 SiRNA沉默APP/PS1小鼠脑组织ABCA1表达后，检测apelin-13对APP/PS1小鼠认知记忆能力及Aβ代谢的影响。结果显示当脑组织ABCA1表达被沉默后，Apelin-13对APP/PS1小鼠认知记忆功能及脑组织Aβ沉积的改善作用减弱。进一步研究发现，当脑组织ABCA1表达被抑制后，Apelin-13对BACE1活性的抑制作用、对NEP活性的促进作用及对Aβ清除出脑的功能都减弱。这与第一部分细胞实验结果相一致。

结合第一、二部分实验及前人研究结果，总的说来，Apelin-13结合APJ受体，增加PKCα表达，降低calpain蛋白活性，减少ABCA1蛋白降解从而增加其水平，

ABCA1蛋白水平增加导致细胞内胆固醇流出增加，apoE荷脂增加，脂化的apoE抑制BACE1活性减少Aβ生成，增强NEP活性增加Aβ降解，并且加强Aβ从脑组织清除入血，从而减低脑组织Aβ水平，改善AD模型鼠的认知与记忆功能。



图3-17 Apelin-13通过ABCA1蛋白改善APP/PS1小鼠脑组织Aβ沉积及认知记忆功能机制图

注：APJ：血管紧张素受体AT1相关的受体蛋白；PKCα：蛋白激酶Cα；calpain：钙蛋白酶；

ABCA1：三磷酸腺苷结合盒转运体A1；apoE：载脂蛋白E；APP：淀粉样前体蛋白；BACE1：

β位淀粉样前体蛋白裂解酶1；γ-secretase：γ-分泌酶；Aβ：淀粉样蛋白；NEP：脑啡肽酶；AD：阿尔茨海默病

## 小结

1）Apelin-13通过增加ABCA1蛋白水平改善APP/PS1小鼠的认知与记忆功能；

2）Apelin-13通过增加ABCA1蛋白水平减少APP/PS1小鼠海马和前额叶组织

Aβ生成，增加Aβ降解及清除。

结论

1. Apelin-13通过增加PC-12细胞ABCA1蛋白，减少Aβ生成并增加Aβ降解，从而减少Aβ水平；

2. Apelin-13通过PKCα途径增加PC-12细胞ABCA1蛋白水平；

3. Apelin-13通过增加ABCA1蛋白水平减少APP/PS1小鼠海马和前额叶组织Aβ生成，增加Aβ降解及清除，从而减少Aβ沉积，改善APP/PS1小鼠的认知与记忆功能。

参 考 文 献

[1]. Zhang ZX, Zahner GE, Roman GC, et al. Dementia subtypes in China: prevalence in Beijing, Xian, Shanghai, and Chengdu. Arch Neurol, 2005, 62 (3): 447-453.

[2]. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. Science, 2002, 297 (5580): 353-356.

[3]. Muller T, Meyer HE, Egensperger R, Marcus K. The amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) as modulator of gene expression, apoptosis, and cytoskeletal dynamics-relevance for Alzheimer's disease. Prog Neurobiol, 2008, 85 (4): 393-406.

[4]. Ohno M, Sametsky EA, Younkin LH, et al. BACE1 deficiency rescues memory deficits and cholinergic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. Neuron, 2004, 41 (1): 27-33.

[5]. Wang WX, Rajeev BW, Stromberg AJ, et al. The expression of microRNA miR-107 decreases early in Alzheimer's disease and may accelerate disease progression through regulation of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1. J Neurosci, 2008, 28 (5): 1213-1223.

[6]. Miners JS, Baig S, Palmer J, et al. A beta-degrading enzymes in Alzheimer's disease. Brain Pathol, 2008, 18 (2): 240-252.

[7]. Candela P, Gosselet F, Saint-Pol J, et al. Apical-to-basolateral transport of amyloid-beta peptides through blood-brain barrier cells is mediated by the receptor for advanced glycation end-products and is restricted by P-glycoprotein. J Alzheimers Dis, 2010, 22 (3): 849-859.

[8]. Saint-Pol J, Candela P, Boucau MC, et al. Oxysterols decrease apical-to-basolateral transport of Ass peptides via an ABCB1-mediated process in an in vitro Blood-brain barrier model constituted of bovine brain capillary endothelial cells. Brain Res, 2013, 1517: 1-15.

[9]. Elali A, Rivest S. The role of ABCB1 and ABCA1 in beta-amyloid clearance at the neurovascular unit in Alzheimer's disease. Front Physiol, 2013, 4: 45.

[10]. ElAli A, Hermann DM. Liver X receptor activation enhances blood-brain barrier integrity in the ischemic brain and increases the abundance of ATP-binding cassette transporters ABCB1 and ABCC1 on brain capillary cells. Brain Pathol, 2012, 22 (2):

175-187.

[11]. Eckman EA, Eckman CB. Abeta-degrading enzymes: modulators of Alzheimer's disease pathogenesis and targets for therapeutic intervention[J]. Biochem Soc Trans, 2005, 33 (Pt 5): 1101-1105.

[12]. Carson JA, Turner AJ. Beta-amyloid catabolism: roles for neprilysin (NEP) and other metallopeptidases[J] JNeurochem, 2002, 81(1), 1-8.

[13]. Hirsch-Reinshagen V, Burgess BL, Wellington CL. Why lipids are important for Alzheimer disease[J] MolCellBiochem, 2009, 326(1-2): 121-129.

[14]. 欧阳新平, 周寿红, 唐朝克, 等. 槟榔碱对泡沫细胞胆固醇流出和ABCA1表达的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20 (4): 289-294.

[15]. 李国术, 何平平, 王波, 等. 硫化氢上调ABCA１表达促进泡沫细胞胆固醇流出的实验研究[J]. 重庆医学, 2013, 42 (30): 3596-3598.

[16]. Jiang J, Mo ZC, Yin K, et al. Epigallocatechin-3-gallate prevents TNF-alpha-induced NF-kappaB activation thereby upregulating ABCA1 via the Nrf2/Keap1 pathway in macrophage foam cells[J]. Int J Mol Med, 2012, 29 (5): 946-956.

[17]. Wu JF, Wang Y, Zhang M, et al. Growth differentiation factor-15 induces expression of ATP-binding cassette transporter A1 through PI3-K/PKCzeta/SP1 pathway in THP-1 macrophages[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 444 (3): 325-331.

[18]. Tang SL, Chen WJ, Yin K, et al. PAPP-A negatively regulates ABCA1, ABCG1 and SR-B1 expression by inhibiting LXRalpha through the IGF-I-mediated signaling pathway. Atherosclerosis[J], 2012, 222 (2): 344-354.

[19]. Yu XH, Jiang HL, Chen WJ, et al. Interleukin-18 and interleukin-12 together downregulate ATP-binding cassette transporter A1 expression through the interleukin-18R/nuclear factor-kappaB signaling pathway in THP-1 macrophage- derived foam cells[J]. Circ J, 2012, 76 (7): 1780-1791.

[20]. Yin K, Chen WJ, Zhou ZG, et al. Apolipoprotein A-I inhibits CD40 proinflammatory signaling via ATP-binding cassette transporter A1-mediated modulation of lipid raft in macrophages[J]. J Atheroscler Thromb, 2012, 19 (9): 823-836.

[21]. Zhao G J, Tang S L, Lv Y C, etal. Antagonism of betulinic acid on LPS-mediated inhibition of ABCA1 and cholesterol efflux through inhibiting nuclear factor-kappaB signaling pathway and miR-33 expression[J]. PLoS One 2013, 8 (9), e74782.

[22]. Hirsch-Reinshagen V, Zhou S, Burgess BL, et al. Deficiency of ABCA1 impairs apolipoprotein E metabolism in brain[J]. J Biol Chem, 2004, 279 (39): 41197-41207.

[23]. Hirsch-Reinshagen V, Maia LF, Burgess BL, et al. The absence of ABCA1 decreases soluble apoE levels but does not diminish amyloid deposition in two murine models of Alzheimer disease[J]. J Biol Chem, 2005, 280 (52): 43243-43256.

[24]. 欧阳新平, 何平平, 唐艳艳, 等. 三磷酸腺苷结合盒转运体A1 在脑疾病发生发展中的作用[J]. 生物化学与生物物理进展, 2014, 41 (4): 317-323.

[25]. Sun Y, Yao J, Kim TW, et al. Expression of liver X receptor target genes decreases cellular amyloid beta peptide secretion[J]. J Biol Chem, 2003, 278 (30): 27688- 27694.

[26]. Akanuma S, Ohtsuki S, Doi Y, et al. ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) deficiency does not attenuate the brain-to-blood efflux transport of human amyloid-beta peptide (1-40) at the blood-brain barrier[J]. Neurochem Int, 2008, 52 (6): 956-961.

[27]. Simons M, Keller P, De SB, et al. Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95 (11): 6460-6464.

[28]. Jiang Q, Lee CY, Mandrekar S, et al. ApoE promotes the proteolytic degradation of Abeta[J]. Neuro 2008, 58 (5): 681-693.

[29]. Kim J, Yoon H, Ramirez CM, et al. miR-106b impairs cholesterol efflux and increases Abeta levels by repressing ABCA1 expression[J]. Exp Neurol, 2012, 235 (2): 475-483.

[30]. Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, et al. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor[J]. Biochem Biophys Res Commun 1998, 251 (2): 471-476.

[31]. Lee DK, Saldivia VR, Nguyen T, et al. Modification of the terminal residue of apelin-13 antagonizes its hypotensive action[J]. Endocrinology 2005, 146 (1): 231- 236.

[32]. Yu XH, Tang ZB, Liu LJ, et al. Apelin and its receptor APJ in cardiovascular diseases [J]. Clin Chim Acta, 2014, 428: 1-8.

[33]. Tasci I. Apelin, prediabetes and atherosclerosis[J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes,

2011, 119 (8): 457-458.

[34]. Wang G, Anini Y, Wei W, et al. Apelin, a new enteric peptide: localization in the gastrointestinal tract, ontogeny, and stimulation of gastric cell proliferation and of cholecystokinin secretion[J]. Endocrinology, 2004, 145 (3): 1342-1348.

[35]. O'Carroll AM, Lolait SJ, Harris LE, et al. The apelin receptor APJ: journey from an orphan to a multifaceted regulator of homeostasis[J]. J Endocrinol 2013, 219 (1): R13-R35.

[36]. Gu Q, Zhai L, Feng X, et al. Apelin-36, a potent peptide, protects against ischemic brain injury by activating the PI3K/Akt pathway[J]. Neurochem Int, 2013, 63 (6): 535-540.

[37]. 廖慧颖, 游咏. Apelin/APJ系统与血管发生[J]. 中国动脉硬化杂志, 2014, 22 (03): 304-308.

[38]. Newson MJ, Pope GR, Roberts EM, et al. Stress-dependent and gender-specific neuroregulatory roles of the apelin receptor in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to acute stress[J]. J Endocrinol 2013, 216 (1): 99-109.

[39]. Penney CC, Volkoff H. Peripheral injections of cholecystokinin, apelin, ghrelin and orexin in cavefish (Astyanax fasciatus mexicanus): effects on feeding and on the brain expression levels of tyrosine hydroxylase, mechanistic target of rapamycin and appetite-related hormones[J]. Gen Comp Endocrinol, 2014, 196: 34-40.

[40]. Zeng XJ, Yu SP, Zhang L, et al. Neuroprotective effect of the endogenous neural peptide apelin in cultured mouse cortical neurons[J]. Exp Cell Res, 2010, 316 (11): 1773-1783.

[41]. O'Donnell LA, Agrawal A, Sabnekar P, e tal. Apelin, an endogenous neuronal peptide, protects hippocampal neurons against excitotoxic injury[J]. J Neurochem, 2007, 102 (6): 1905-1917.

[42]. Telegdy G, Adamik A, Jaszberenyi M. Involvement of neurotransmitters in the action of apelin-13 on passive avoidance learning in mice[J]. Peptides, 2013, 39: 171-174.

[43]. Liu XY, Lu Q, Ouyang XP, et al. Apelin-13 increases expression of ATP-binding cassette transporter A1 via activating protein kinase C alpha signaling in THP-1 macrophage-derived foam cells[J]. Atherosclerosis 2013, 226 (2): 398-407.

[44]. Hans CP, Feng Y, Naura AS, et al. Opposing roles of PARP-1 in MMP-9 and TIMP-2

Expression and mast cell degranulation in dyslipidemic dilated cardiomyopathy[J]. Cardiovasc Pathol, 2011, 20 (2): e57-e68.

[45]. Bormann H, Melzig MF. Inhibition of metallopeptidases by flavonoids and related compounds[J]. Pharmazie, 2000, 55 (2): 129-132.

[46]. Frautschy SA, Baird A, Cole GM. Effects of injected Alzheimer beta-amyloid cores in rat brain[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88 (19), 8362-8366.

[47]. Yankner BA, Dawes LR, Fisher S, et al. Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease[J]. Science, 1989, 245 (4916): 417- 240.

[48]. Gandy S. The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease[J]. J Clin Invest, 2005, 115 (5): 1121-1129.

[49]. Citron M. Strategies for disease modification in Alzheimer's disease[J]. Nat Rev Neurosci, 2004, 5 (9): 677-685.

[50]. Kim J, Basak JM, Holtzman DM. The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease[J]. Neuron, 2009, 63 (3): 287-303.

[51]. Wang XF, Cao YW, Feng ZZ, et al. Quantitative assessment of the effect of ABCA1 gene polymorphism on the risk of Alzheimer's disease[J]. Mol Biol Rep, 2013, 40 (2): 779-85.

[52]. Koldamova R, Staufenbiel M, Lefterov I. Lack of ABCA1 considerably decreases brain ApoE level and increases amyloid deposition in APP23 mice[J]. J Biol Chem, 2005, 280 (52): 43224-43235.

[53]. He P, Ouyang X, Zhou S, et al. A novel melatonin agonist Neu-P11 facilitates memory performance and improves cognitive impairment in a rat model of Alzheimer' disease[J]. Horm Behav, 2013, 64 (1): 1-7.

[54]. Morishima-Kawashima M, Ihara Y. Alzheimer's disease: beta-Amyloid protein and tau[J]. J Neurosci Res, 2002, 70 (3): 392-401.

[55]. Hsiao KK, Borchelt DR, Olson K, et al. Age-related CNS disorder and early death in transgenic FVB/N mice overexpressing Alzheimer amyloid precursor proteins[J]. Neuron, 1995, 15 (5): 1203-1218.

[56]. 朱斌, 陈静, 秦红芳, 等. APP/PS1 双转基因老年性痴呆小鼠早期病理和认知行为变化[J]. 广州中医药大学学报, 2012, 29 (2): 193-196.

[57]. Zelcer N, Khanlou N, Clare R, et al. Attenuation of neuroinflammation and Alzheimer's disease pathology by liver x receptors[J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007, 104 (25): 10601-10606.

[58]. Donkin JJ, Stukas S, Hirsch-Reinshagen V, et al. ATP-binding cassette transporter A1 mediates the beneficial effects of the liver X receptor agonist GW3965 on object recognition memory and amyloid burden in amyloid precursor protein/presenilin 1 mice[J]. J Biol Chem, 2010, 285 (44): 34144-34154.

[59]. Wahrle SE, Jiang H, Parsadanian M, et al. Deletion of Abca1 increases Abeta deposition in the PDAPP transgenic mouse model of Alzheimer disease[J]. J Biol Chem 2005, 280 (52): 43236-43242.

[60]. Vanmierlo T, Rutten K, Dederen J, et al. Liver X receptor activation restores memory in aged AD mice without reducing amyloid[J]. Neurobiol Aging, 2011, 32 (7): 1262-1272.

[61]. Wahrle SE, Jiang H, Parsadanian M, et al. Overexpression of ABCA1 reduces amyloid deposition in the PDAPP mouse model of Alzheimer disease[J]. J Clin Invest, 2008, 118 (2): 671-682.

**附图：**



附图1 . 分泌酶介导的APP代谢途径

**图的说明**：在正常情况下，APP通过两条途径代谢，即非淀粉样物质途径（α途径）和淀粉样物质途径（β途径），在一般情况下，α途径是主要途径，只有少量APP通过β途径代谢。在AD病理状态下，β途径异常增加。在α途径中，APP被α-分泌酶（α-secretase）切割，α-分泌酶的切割位点位于Aβ结构域内部，因此能阻止完整Aβ的生成。而在β途径中，BACE1 为

Aβ生成的限速酶，BACE1在Aβ的N-末端裂解APP，产生可溶性片段sAPPβ和含膜成分的C-

末端片段C99, C99 进一步由γ-分泌酶裂解产生Aβ。

**注：**APP：淀粉样前体蛋白；BACE1：β位淀粉样前体蛋白分解酶1；γ-secretase：γ分泌酶；Aβ：β淀粉样蛋白；α-secretase：α-分泌酶



附图2 . Aβ的代谢过程

**图的说明**：Aβ从脑内清除的可能途径为：荷脂的apoE将Aβ携带至血脑屏障，通过血脑屏障基底膜上的低密度脂蛋白受体相关蛋白-1（LRP-1）及血脑屏障管腔膜上的三磷酸腺苷结合盒转运体B1（ATP binding cassette transporter B1, ABCB1）、三磷酸腺苷结合盒转运体G4（ATP binding cassette transporter G4, ABCG4）和三磷酸腺苷结合盒转运体G2（ATP binding cassette transporter G2, ABCG2）跨血脑屏障转运至血液。参与Aβ降解的酶主要包括脑啡肽酶（neprilysin，

NEP）和胰岛素降解酶（insulin degrading enzym, IDE），NEP为Aβ降解的限速酶。正常情况下Aβ在脑内的生成、清除及降解处于动态平衡状态，而一旦生成增多或清除及降解减少则平衡被打破，产生过量的Aβ，其聚集后形成老年斑和淀粉样沉积，从而产生神经毒性，出现认知及记忆功能损害。

**注：**APP：淀粉样前体蛋白；BACE1：β位淀粉样前体蛋白分解酶1；γ-secretase：γ分

泌酶；Aβ：β淀粉样蛋白；AD：阿尔茨海默病；apoE：载脂蛋白E；ABCB1：三磷酸腺苷结合盒转运体B1；ABCG4：三磷酸腺苷结合盒转运体G4；ABCG2：三磷酸腺苷结合盒转运体G2；NEP：脑啡肽酶；IDE：胰岛素降解酶



附图3 . ABCA1与Aβ代谢的关系

**图的说明**：LXR促进ABCA1的表达，ABCA1将细胞内的胆固醇转出细胞，细胞内胆固醇减少导致膜脂筏数量减少，进入脂筏的APP也随之减少，从而使Aβ生成减少。ABCA1将细胞内胆固醇转出交给无脂的apoE，apoE脂化使IDE活性增强，从而增加Aβ降解。另外，apoE脂化后可增加Aβ的清除。Aβ生成减少、降解和清除增加可使其聚集沉积减少，从而改善AD。

**注：**LXR：肝X受体；ABCA1：三磷酸腺苷结合盒转运体A1；cholesterol efflux：胆固

醇流出；apoE：载脂蛋白E；APP：淀粉样前体蛋白；BACE1：β位淀粉样前体蛋白裂解酶1；sAPPβ：β-N端末端；γ-secretase：γ-分泌酶；IDE：胰岛素降解酶；Aβ：淀粉样蛋白；AD：阿尔茨海默病

**综述**

**ABCA1在脑疾病发Th发展中的作用**

**摘要：**三磷酸腺苷结合盒转运体A1（ABCA1）在脑组织中广泛表达，它将脑细胞内胆固醇转运给载脂蛋白E（apoE）及载脂蛋白A1（apoA-I）形成高密度脂蛋白（HDL），从而调控脑内胆固醇平衡。研究表明，ABCA1与胆固醇代谢相关脑疾病存在密切联系，包括阿尔茨海默病（AD）、创伤性脑损伤（TBI）、脑梗死及脑型疟疾。虽然近来在ABCA1与相关脑疾病的研究取得了一些进展，但仍存在许多问题尚未阐明。本文对ABCA1在各种相关脑疾病发生发展中的作用做一综述，期望为相关脑疾病的治疗寻找新的靶点和方法。

**关键词：**三磷酸腺苷结合盒转运体； A1； 阿尔茨海默病； 创伤性脑损伤； 脑梗死； 脑型疟疾

脑是人体胆固醇含量最多的器官，并且脑中几乎所有胆固醇都由脑组织自身产生。脑胆固醇平衡对于神经细胞膜的维持及神经髓鞘的形成有重要的作用。三磷酸腺苷结合盒转运体A1（ABCA1）在脑胆固醇代谢过程中起重要作用。在脑组织中，ABCA1主要将胆固醇转运给贫脂的载脂蛋白E（apoE）及载脂蛋白A-I（apoA-I）形成高密度脂蛋白（HDL）。研究发现，ABCA1参与了诸多脑的病理生理过程。ABCA1通过调节胆固醇平衡影响β-淀粉状蛋白（Aβ）代谢，从而参与阿尔茨海默病（AD） 及创伤性脑损伤（TBI）的病理生理学过程。另外，ABCA1与脑梗死、脑型疟疾等疾病也有密切联系。本文对ABCA1在脑疾病发生发展中的作用做一综述，以期为相关脑疾病的防治提供新的治疗靶点和途径。

## **1.** **ABCA1**在脑组织的分布

在脑组织中，ABCA1表达于人和鼠的神经细胞、小胶质细胞、星形胶质细胞及少突胶质细胞[[1]](#_bookmark0)。在胚胎脑，ABCA1 高表达于室管膜（ventricular zone, VZ），

出生后，在灰质、白质及脉络丛都可检测到ABCA1[[2]](#_bookmark1)。猪脑的毛细血管内皮细胞

（pBCEC）表达ABCA1[[3]](#_bookmark2). Do等研究显示在小鼠血脑屏障的pBCEC上表达ABCA1，在正常条件下，80%的ABCA1位于pBCEC的基底面[[4]](#_bookmark3)（图1）。



**Fig.** **1** The distribution of ABCA1 in the **brain**

**图 1** ABCA1**在脑中的分布**

注：Brain：脑，Blood：血液，Endothelial Cell：内皮细胞，Neuron：神经细胞，Microglia：小胶质细胞，Astrocyte：星形胶质细胞，Oligodendrocyte：少突胶质细胞，ABCA1：三磷酸腺苷结合盒转运体A1

## **2.** **ABCA1**在脑中的功能

在脑中，ApoE是ABCA1的主要载脂蛋白接受体，形成新生的HDL进入脑脊液（CSF）[[5]](#_bookmark4)。ABCA1可以通过防止脂质过多聚集从而保护脑。ABCA1活性的丧失导致脑中apoE蛋白水平下降，并且贫脂的载脂蛋白也快速地分解[[6]](#_bookmark5)，但是其具体机制尚未阐明。研究结果表明鼠ABCA1缺乏会减少CNS中apoE及apoA-I蛋白的水平[[7]](#_bookmark6)，但是对apoA-I的影响要弱于对apoE的影响。研究发现，ABCA1参与了脑中GW3965促进apoE蛋白的表达，其可能的机制是在脑中GW3965通过ABCA1

促进ApoE酯化，并增加其蛋白稳定性从而减少apoE的分解代谢[[8]](#_bookmark7)。在AD脑，ABCA1上调促使Aβ生成和分泌减少，并通过促进apoE脂化增加Aβ的清除，从而改善AD [[9]](#_bookmark8)。在TBI中，ABCA1上调降低脑Aβ水平，从而改善TBI的预后[[10]](#_bookmark9)。

## **3.** **ABCA1**在脑组织中的调控

### **3.1** **LXR**对**ABCA1**的调控

LXR是一种氧化固醇激活的核受体，也是多种细胞内胆固醇含量的感受器。LXR有两种亚型：LXRα和LXRβ。ABCA1是受LXR直接调控的靶基因，LXR激活促进ABCA1的表达[[11]](#_bookmark10)。无论在体内还是体外实验，LXR激动剂都诱导ABCA1的表达并且增加脂质流出到apoA-I及其它HDL接受体[[12]](#_bookmark11)。24（S）-羟胆固醇是LXR的一种天然配体，Fujiyoshi等研究发现24（S）-羟胆固醇通过激活LXR诱导ABCA1的表达从而促进来自脉络丛上皮细胞（CPE）的胆固醇释放入脑脊液[[13]](#_bookmark12)。Kim等研究表明27-羟胆固醇能上调人类神经细胞LXR靶基因ABCA1及apoE [[14]](#_bookmark13). T0901317及GW3965是两种人工合成的LXR激动剂，使用T0901317处理新生大鼠的少突胶质细胞可诱导LXR靶基因（ABCA1及apoE）的表达[[15]](#_bookmark14)。使用T0901317处理pBCEC，不仅增加ABCA1及apoA-I mRNA水平，也促进ABCA1蛋白表达，并且使apoA-I分泌到pBCEC的顶膜（血液面）[[16]](#_bookmark15)（图2）。

### **3.2** **MicroRNA**对**ABCA1**的调控

微小RNA（miRNAs）是一类包含21-23个核苷酸序列的小的非编码的RNA，它们调节蛋白编码基因的表达。miRNAs通过结合到它们靶基因的信使RNA (mRNAs)，抑制靶基因mRNAs的转录或降解靶基因mRNAs[[17]](#_bookmark16). ABCA1基因有一个长的3′UTR

（> 3.3kb），这增加了转录后调节的可能，例如miRNA介导的基因抑制。Jaekwang等使用质粒将miR-106b转染进体外培养的鼠神经母细胞瘤Neuro2a细胞和海马神经元细胞，48小时后进行检测，结果显示miR-106b直接靶向作用于ABCA1 mRNA的

3′UTR，显著减少Neuro2a细胞及海马神经元细胞ABCA1蛋白水平，对ABCA1 mRNA

水平无影响，显著降低ABCA1介导的胆固醇流出，这种miR-106b对ABCA1基因表

达的抑制，其原因是由于miR-106b抑制ABCA1 mRNA的翻译，而不是增加ABCA1

mRNA的降解[[18]](#_bookmark17)。因此，miR-106b可作为ABCA1的一个调节因子，负性调控ABCA1

蛋白的表达（图2）。



**Fig.** **2** The **regulation of ABCA1 in the brain tissue**

**图 2** ABCA1**在脑组织中的调控**

注：cell membrane: 细胞膜，Nucleus: 细胞核，24(S) -cholesterol: 24-羟胆固醇，

LXR: 肝X受体，ABCA1: 三磷酸腺苷结合盒转运体A1，miR-106b: 微小RNA-106b, ABCA1 mRNA: 三磷酸腺苷结合盒转运体A1信使RNA, cholesterol efflux: 胆固醇流出，apoE: 载脂蛋白 E

## **4.** **ABCA1**与**AD**

研究表明，胆固醇代谢异常在AD的发病过程中起重要作用，它可以导致老年

**4.1 ABCA1 多态性与 AD**

痴呆的发生**。**一些参与AD病理过程的关键因子，例如淀粉样前体蛋白（APP）、β-分泌酶（BACE1）和早衰蛋白（PSEN1）的募集会因胆固醇代谢的紊乱而改变[[19]](#_bookmark18)。胆固醇代谢紊乱与Aβ淀粉样蛋白的沉积均与AD的发生发展密切相关，二者常相伴存在，且胆固醇代谢异常可加重Aβ沉积[[19]](#_bookmark18)。ABCA1是调节脑胆固醇平衡的一个重要因子。Akram等发现AD患者其海马脑组织的ABCA1 mRNA及蛋白表达高于同年龄对照组，ABCA1 mRNA表达与老年痴呆症的严重程度、Braak评分（评价tau蛋白缠结程度）以及Aβ斑块密度相关，ABCA1蛋白表达与老年痴呆症的严重程度和Braak得分一致[[20]](#_bookmark19)。Kim等发现AD患者海马组织的ABCA1蛋白及mRNA水平高于同年龄对照组[[21]](#_bookmark20)。因此，ABCA1与AD之间关系密切。

人类ABCA1基因呈单核苷酸多态性（SNP）改变。许多研究表明ABCA1基因

单核苷酸多态性增加AD的风险[[22](#_bookmark21)[-30]](#_bookmark29). Katzov等通过研究欧洲1750例早发型和晚发型AD病例发现，ABCA1的多态性影响AD的风险[[23]](#_bookmark22)。Rodriguez等通过对372例西班牙AD 患者的研究表明，ABCA1 基因编码区多态性R219K（rs2230806）、

I883M、R1587K及启动子区多态性C-14T增加AD的风险[24]。Sundar等通过美国992例晚发型AD病例研究ABCA1基因多态性R219K和G-17C（rs2740483）的作用，结果表明女性的R219K等位基因携带者表现为AD的风险增加[[25]](#_bookmark23)。Wavrant等的实验也证实ABCA1基因多态性R219K增加AD的风险[[28]](#_bookmark27)。Kolsch等研究表明，G-395C多态性的等位基因与脑脊液（CSF）24-羟胆固醇的减少有关[[26]](#_bookmark25)。Reynolds等通过研究1567例瑞典AD病例发现，单核苷酸多态性rs2230805与脑脊液Aβ水平减少有关[[22]](#_bookmark21)。携带ABCA1多态性及尼曼匹克C1基因的个体，以及携带与羟甲基戊二酸辅酶A还原酶多态性相联系的ABCA1基因多态性的个体，都会增加AD的风险[[27]](#_bookmark26)。

### **4.2** **ABCA1**缺失与**AD**

在脑中，ABCA1促进胆固醇和磷脂流出到apoE，并且影响到载脂蛋白的荷脂

及脑apoE的水平。Hirsch等研究发现，小鼠的ABCA1缺失导致脂质流出到apoE减少，并且也显著降低ApoE的脑水平，但其机制尚未阐明[31]。在两种APP（β-淀粉状蛋白前体蛋白）过表达的AD小鼠(Tg-SwDI/B和APP/PS1模型)中，ABCA1缺失减少apoE的脑水平[[7]](#_bookmark6)。Koldamova等研究表明过表达APP的小鼠（APP23 和

PDAPP模型）中，敲除ABCA1可降低脑中apoE荷脂及apoE水平，增加脑中不可溶的Aβ40及Aβ42的水平[[32]](#_bookmark30)。Zelceretal等在缺失LXRα或LXRβ的APP/PS1小鼠检测大脑的Aβ水平，LXR缺失导致ABCA1和apoE蛋白水平的降低，并且增加脑Aβ水平[[33]](#_bookmark31)。以上结果表明，ABCA1缺失的小鼠出现贫脂的apoE及脑可溶性apoE水平的下降，贫脂的apoE增加Aβ沉积[[34]](#_bookmark32)。Jaekwang等研究证明在神经细胞中miR-106b通过抑制ABCA1蛋白表达及减少胆固醇流出，从而显著增加Aβ的分泌水平，其机制是使Aβ产生增加及清除减少[[18]](#_bookmark17)。

### **4.3** **ABCA1**过表达与**AD**

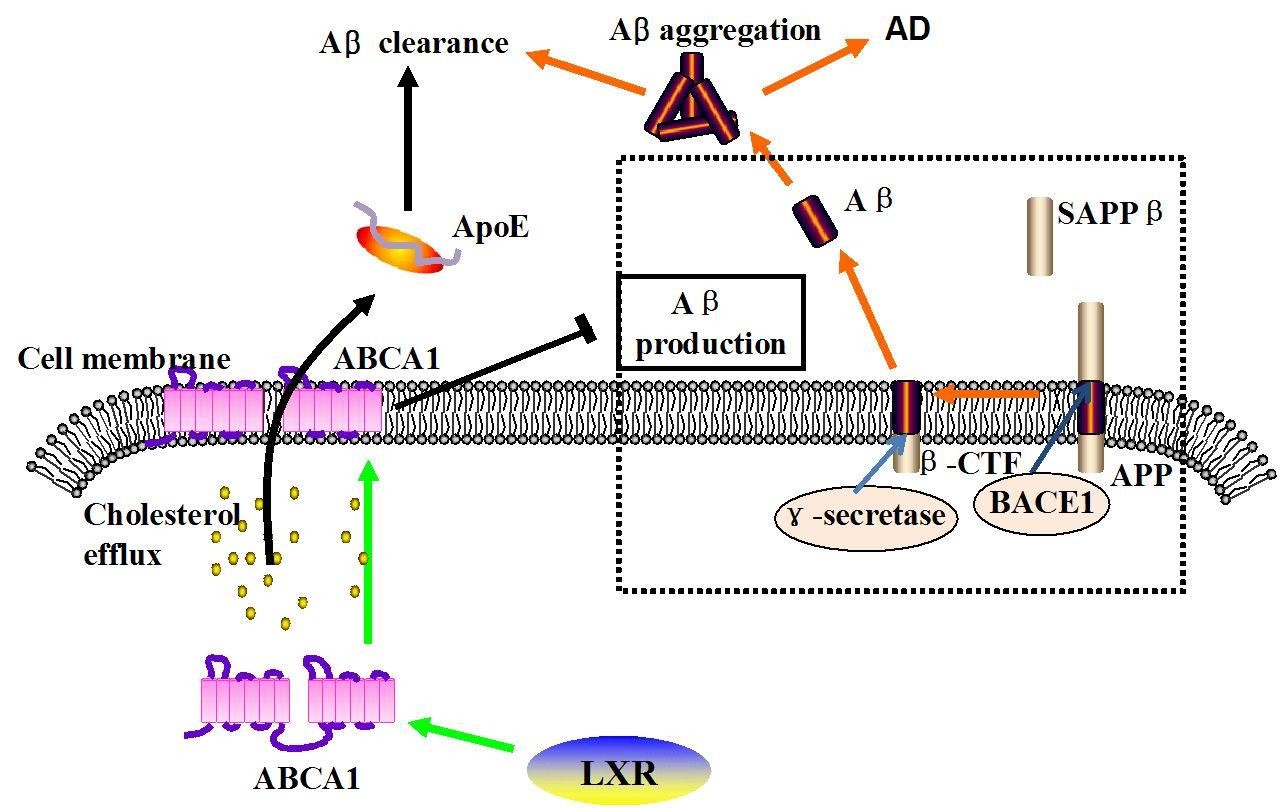
研究显示ABCA1蛋白过表达会影响脑内apoE和Aβ水平，进而对AD产生影响。在大鼠和人类转染淀粉样前体蛋白（APP）的细胞系，LXR促进ABCA1表达，减少Aβ的生成和分泌[[9]](#_bookmark8)。使用T0901317处理野型及APP23小鼠，增加ABCA1蛋白表达并显著减少Aβ40和Aβ42的脑水平[[32]](#_bookmark30)。在40周龄APP/PS1小鼠，LXR促进ABCA1和apoE蛋白水平上调可改善在物体认知测试中的认知缺陷，而在APP/PS1—ABCA1缺陷小鼠其认知功能缺陷则没有改变。在ABCA1高表达小鼠，其Aβ的沉积显著减少[[35]](#_bookmark33)。Vanmierlo等证实LXR激动剂改善APP/PS1老年小鼠记忆的功能[[36]](#_bookmark34)。为了进一步理解ABCA1在AD中的作用，Wahrleetal等建立了ABCA1过表达的PDAPP小鼠模型，小鼠12月龄时，ABCA1蛋白表达增加6倍，Aβ沉积显著减少，并且在ABCA1过表达的PDAPP小鼠，其海马apoE水平显著增加，不溶性的apoE比例增加，并且apoE脂化增加[37]。

在AD模型鼠证实ABCA1上调可以减少Aβ的脑沉积，其机制尚未阐明。ABCA1不能直接转运Aβ[[38]](#_bookmark35)，它是胆固醇和磷脂的转运体。研究表明，ABCA1 通过影响

ApoE脂化和脑胆固醇动态平衡，进而影响APP加工和Aβ聚集[[39]](#_bookmark36)。ABCA1高表达时，细胞内胆固醇减少导致膜脂筏数量减少，进入脂筏的APP也随之减少，从而

使Aβ生成和分泌减少[[9]](#_bookmark8)。另外，ABCA1也影响Aβ的清除。ABCA1可通过促进apoE

脂化增加Aβ的清除[[40]](#_bookmark37)。



ABCA1在Aβ的代谢和集聚中起重要作用，可以将ABCA1作为治疗AD的一个潜在靶点**。**但ABCA1、脑的脂质代谢及AD之间的关系非常复杂，其机制还很不清楚，需要进一步深入的研究。

**Fig.** **3** The relation of ABCA1 and **AD**

**图 3** ABCA1**与AD的关系**

**图的说明**：LXR促进ABCA1的表达，ABCA1将细胞内的胆固醇转出细胞，细胞内胆固醇减少导致膜脂筏数量减少，进入脂筏的APP也随之减少，从而使Aβ生成减少。ABCA1将细胞内胆固醇转出交给无脂的apoE，apoE脂化后可增加Aβ的清除。

Aβ生成减少及清除增加可使其聚集沉积减少，从而改善AD。

**注：**Cell membrane：细胞膜，LXR：肝X受体，ABCA1：三磷酸腺苷结合盒转运体A1, cholesterol efflux：胆固醇流出，apoE：载脂蛋白E，APP：淀粉样前体蛋白，BACE1：β位淀粉样前体蛋白裂解酶1，sAPPβ：β-N端末端，β-CTF：β-C端末端，γ-secretase：γ-分泌酶，Aβ：淀粉样蛋白，Aβaggregation: Aβ聚集，Aβproduction: Aβ生成，Aβclearance: Aβ清除，AD：阿尔茨海默病

## **5.** **ABCA1**与脑梗死

脑梗死的病理基础和主要的发病因素是动脉粥样硬化，血脂异常是动脉粥样硬化发生及进展的主要危险因素。研究表明LXR激活增加缺血性脑毛细血管ABCA1的表达[[41]](#_bookmark38)，提示ABCA1可能与脑梗死存在相关性。

R219K是最常见的ABCA1基因多态性，欧洲人群约有16%携带R219K. ABCA1

R219K是第7号外显子中的第1051位核苷酸G碱基突变为A碱基, 219位精氨酸替换为赖氨酸。在匈牙利心脑血管疾病患者，ABCA1的多态性R219K和V771M频率降低[[42]](#_bookmark39)。男性脑梗死的发病可能与ABCA1 R219K的RR基因型有关，但血脂浓度与R219K多态性无关[[43]](#_bookmark40)。ABCA1基因的R219K多态性在中国汉族人的动脉粥样硬化脑梗死（ACI）中有保护作用[[44]](#_bookmark41)。但Pasedar等研究不支持ABCA1基因为缺血性中风的一个危险因素[[45]](#_bookmark42)。另外，Yamada等通过研究1362例日本中风患者证实，

ABCA1的-14C-->T单核苷酸多态性（rs1800977）可能对于动脉粥样硬化脑梗死的遗传风险是有益的[[46]](#_bookmark43)。因此，ABCA1与脑梗死之间的关系将需要更多的研究来验证。

## **6.** **ABCA1**与创伤性脑损伤

创伤性脑损伤（TBI）被认为是AD的一个危险因素，它增加人和动物脑内的Aβ

水平[[47]](#_bookmark44)。虽然Aβ水平在TBI过程中所起的作用还不清楚，但是许多实验证明减少

Aβ可改善TBI的预后[[48]](#_bookmark57)。ABCA1能通过apoE介导的途径增加Aβ的清除。Loane等通过使用T0901317处理C57BL/6J TBI模型小鼠发现，无论损伤前预处理还是损伤后后处理都增加损伤后24小时的ABCA1水平，并且减少损伤后所增加的Aβ。这种Aβ的减少并不是由于淀粉样前体蛋白的减少或转化为可用性的Aβ，而是由于增加了Aβ的清除[[10]](#_bookmark9)。另外，T0901317也改善了TBI小鼠的运动协调性及减少了脑损伤的体积[[10]](#_bookmark9)。这些结果说明LXR激动剂上调ABCA1降低Aβ的水平，并改善脑外伤后的预后[[10]](#_bookmark9)。

## **7.** **ABCA1**与脑型疟疾

ABCA1基因缺失对脑型疟疾有保护作用。Combes等通过组织和整体实验证明，在伯氏疟原虫ANKA株感染的ABCA1(-/-)小鼠中其细胞反应减弱，血浆肿瘤坏死因子水平降低，大脑微血管内皮细胞粘附分子上调，白细胞减少以及血小板聚集消除

[[49]](#_bookmark58). 并且与ABCA1(+/+)的小鼠相比，ABCA1(-/-)小鼠血浆中微粒的数量和凝血活性大大降低。此外，源自伯氏疟原虫ANKA株感染ABCA1(+/+)小鼠的微粒诱导未感染的巨噬细胞释放肿瘤坏死因子显着增加。ABCA1(-/-)小鼠的血小板和巨噬细胞对囊泡形成激动剂的反应减弱[[49]](#_bookmark58)。因此，ABCA1转运体为控制脑型疟疾易感性的一个主要因素之一[[49]](#_bookmark58)。

## **8.** 问题与展望

总的说来，ABCA1在脑中表达广泛，并且参与了许多脑疾病的病理及病理生理过程，如AD、脑梗死、创伤性脑损伤、脑型疟疾等。虽然近来研究取得了一些进展，但还有许多问题亟待解决，例如，ABCA1影响脑内Aβ水平的具体机制是什么？ABCA1是否会影响AD的另一重要病理过程——Tau病变呢？ABCA1与脑梗死的明确关系及机制？ABCA1对脑型疟疾影响的机制是什么？还有帕金森氏病、亨廷顿氏病与AD同为神经退行性病变，同样也有胆固醇代谢参与其中，ABCA1会不会在这些疾病的病理及病理生理过程中起作用呢？通过进一步研究来回答这些问题，将为我们全面地了解ABCA1在脑疾病中功能以及防治这些脑疾病提供线索。

ABCA1的功能研究将为临床脑疾病的治疗提供新的视角，特别是其对脑胆固醇及Aβ代谢的影响，将为多种脑疾病的治疗带来许多启示。目前，ABCA1在脑疾病中仍有很多未知功能有待进一步研究和探讨，多种调节机制相互交叉的现象，也使今后的研究面临更大的挑战。随着对ABCA1在脑疾病中功能的认识加深，最终将为许多脑疾病的防治提供新的靶点。

参 考 文 献

[1]. Kim WS, Guillemin GJ, Glaros EN, et al. Quantitation of ATP-binding cassette subfamily-A transporter gene expression in primary human brain cells[J]. Neuroreport, 2006, 17: 891–896.

[2]. Tachikawa M, Watanabe M, Hori S, et al. Distinct spatio-temporal expression of ABCA and ABCG transporters in the developing and adult mouse brain[J]. J Neurochem, 2005, 95 (1): 294–304.

[3]. Panzenboeck U, Balazs Z, Sovic A, et al. ABCA1 and scavenger receptor class B, type I, are modulators of reverse sterol transport at an in vitro blood-brain barrier constituted of porcine brain capillary endothelial cells[J]. J Biol Chem, 2002, 277 (45): 42781-42789.

[4]. Do T M, Ouellet M, Calon F, etal. Direct evidence of abca1-mediated efflux of cholesterol at the mouse blood-brain barrier[J]. Mol Cell Biochem 2011, 357 (1-2): 397-404.

[5]. Zannis VI, Georgios K, Drosatos K, et al. Discrete roles of apoA-I and apoE in the biogenesis of HDL species: lessons learned from gene transfer studies in different mouse models[J]. Ann Med. 2008, 40 (Suppl 1): 14-28.

[6]. Aiello RJ, Francone OL. ABCA1-deficient mice: insights into the role ofmonocyte lipid efflux in HDL formation and inflammation[J]. Arterioscler, Thrombosis, and Vascular Biology, 2003, 23: 972–980.

[7]. Hirsch-Reinshagen V, Maia LF, Burgess BL, et al. The absence of ABCA1 decreases soluble ApoE levels but does not diminish amyloid deposition in two murine models of Alzheimer disease[J]. J Biol Chem, 2005, 280 (52): 43243-43256.

[8]. Sophie Stukas, May S, Anna Wilkinson, et al. The LXR agonist GW3965 increases apoA-I protein levels in the central nervous system independent of ABCA1[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2012, 1821 (3): 536.

[9]. Sun Y, Yao J, Kim T, et al. Expression of liver X receptor target genes decreases cellular amyloid beta peptide secretion[J]. J Biol Chem, 2003, 278 (30): 27688-27694.

[10]. Loane DJ, Mulder M, Vardanian L, et al. Modulation of ABCA1 by an LXR agonist reduces beta-amyloid levels and improves outcome after traumatic brain injury[J]. J Neurotrauma, 2011, 28 (2): 225-236.

[11]. Liu D, Ji L, Tong X, et al. Human apolipoprotein A-I induces cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin I-2 release in endothelial cells through ATP-binding cassette transporter A1[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2011, 301 (3): C739- C748.

[12]. Calkin A. Liver X receptor signaling pathways and atherosclerosis[J]. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol, 2010, 30: 513–518.

[13]. Fujiyoshi M, Ohtsuki S, Hori S, etal. 24S-hydroxycholesterol induces cholesterol release from choroid plexus epithelial cells in an apical- and apoE isoform-dependent manner concomitantly with the induction of ABCA1 and ABCG1 expression[J]. J Neurochem, 2007, 100 (4): 968-978.

[14]. Kim WS, Hill AF. Impact of 27-hydroxycholesterol on amyloid-beta peptide production and ATP-binding cassette transporter expression in primary human neurons[J]. J Alzheimers Dis, 2009, 16 (1): 121-131.

[15]. Katherine N, Ilse S, et al. Liver X Receptors Regulate Cholesterol Homeostasis in Oligodendrocytes[J]. Journal of Neuroscience Research, 2011, 90(1): 60.

[16]. Panzenboeck U, Sovic A. Regulatory effects of synthetic liver X receptor- and peroxisome-proliferator activated receptor agonists on sterol transport pathways in polarized cerebrovascular endothelial cells[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2006, 38 (8): 1314-1329.

[17]. Eric H. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay[J]. Nature Reviews Genetics, 2011, 12: 99-110.

[18]. Jaekwang K, Hyejin Y, Cristina MR, et al. miR-106b impairs cholesterol efflux and increases Aβlevels by repressing ABCA1 expression[J]. Experimental Neurology, 2012, 235(2): 475-483.

[19]. Kim J, Basak JM, Holtzman DM. The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease[J]. Neuron, 2009, 63 (3): 287-303.

[20]. Akram A, Schmeidler J, Katsel P, et al. Increased expression of cholesterol transporter ABCA1 is highly correlated with severity of dementia in AD hippocampus[J]. Brain Res, 2010, 1318: 167-177.

[21]. Kim WS, Bhatia S, Elliott DA, et al. Increased ATP-binding cassette transporter A1 expression in Alzheimer's disease hippocampal neurons[J]. J Alzheimers Dis, 2010, 21 (1): 193-205.

[22]. Reynolds CA, Hong MG, Eriksson UK, et al. A survey of ABCA1 sequence variation confirms association with dementia[J]. Hum Mutat, 2009, 30 (9): 1348-1354.

[23]. Katzov H, Chalmers K, Palmgren J, et al. Genetic variants of ABCA1 modify Alzheimer disease risk and quantitative traits related to beta-amyloid metabolism[J]. Hum Mutat, 2004, 23 (4): 358-367.

[24]. Rodriguez-Rodriguez E, Mateo I, Llorca J, et al. Association of genetic variants of ABCA1 with Alzheimer's disease risk[J]. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2007, 144B (7): 964-968.

[25]. Sundar PD, Feingold E, Minster RL, et al. Gender-specific association of ATP- binding cassette transporter 1 (ABCA1) polymorphisms with the risk of late-onset Alzheimer's disease[J]. Neurobiol Aging, 2007, 28 (6): 856-862.

[26]. Kolsch H, Lutjohann D, Jessen F, et al. Polymorphism in ABCA1 influences CSF 24S-hydroxycholesterol levels but is not a major risk factor of Alzheimer's disease[J]. Int J Mol Med, 2006, 17 (5): 791-794.

[27]. Rodriguez-Rodriguez E, Mateo I, Infante J, et al. Interaction between HMGCR and ABCA1 cholesterol-related genes modulates Alzheimer's disease risk[J]. Brain Res, 2009, 1280: 166-171.

[28]. Wavrant-De VF, Compton D, Womick M, et al. ABCA1 polymorphisms and Alzheimer's disease[J]. Neurosci Lett, 2007, 416 (2): 180-183.

[29]. Xiao Z, Wang J, Chen W, etal. Association studies of several cholesterol-related genes (ABCA1, CETP and LIPC) with serum lipids and risk of Alzheimer's disease[J]. Lipids Health Dis, 2012, 11: 163.

[30]. Wang XF, Cao Y W, Feng ZZ, et al. Quantitative assessment of the effect of ABCA1 gene polymorphism on the risk of Alzheimer's disease[J]. Mol Biol Rep, 2013, 40 (2): 779-785.

[31]. Hirsch-Reinshagen V, Zhou S, Burgess B L, et al. Deficiency of ABCA1 impairs apolipoprotein E metabolism in brain[J]. J Biol Chem, 2004, 279 (39): 41197-41207.

[32]. Koldamova R, Staufenbiel M, Lefterov I. Lack of ABCA1 considerably decreases brain ApoE level and increases amyloid deposition in APP23 mice[J]. J Biol Chem, 2005, 280 (52): 43224-43235.

[33]. Zelcer N, Khanlou N, Clare R, et al. Attenuation of neuroinflammation and Alzheimer's disease pathology by liver x receptors[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104 (25): 10601-10606.

[34]. Wahrle SE, Jiang H, Parsadanian M, et al. Deletion of Abca1 increases Abeta deposition in the PDAPP transgenic mouse model of Alzheimer disease[J]. J Biol Chem, 2005, 280 (52): 43236-43242.

[35]. Donkin J J, Stukas S, Hirsch-Reinshagen V, et al. ATP-binding cassette transporter A1 mediates the beneficial effects of the liver X receptor agonist GW3965 on object recognition memory and amyloid burden in amyloid precursor protein/presenilin 1 mice[J]. J Biol Chem, 2010, 285 (44): 34144-34154.

[36]. Vanmierlo T, Rutten K, Dederen J, et al. Liver X receptor activation restores memory in aged AD mice without reducing amyloid[J]. Neurobiol Aging 2011, 32 (7): 1262-72.

[37]. Wahrle SE, Jiang H, Parsadanian M, et al. Overexpression of ABCA1 reduces amyloid deposition in the PDAPP mouse model of Alzheimer disease[J]. J Clin Invest, 2008, 118 (2), 671-682.

[38]. Akanuma S, Ohtsuki S, Doi Y, et al. ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) deficiency does not attenuate the brain-to-blood efflux transport of human amyloid-beta peptide (1-40) at the blood-brain barrier[J]. Neurochem Int, 2008, 52 (6): 956-961.

[39]. Simons M, Keller P, De Strooper B, et al. Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95 (11): 6460-6464.

[40]. Kim J, Yoon H, Ramirez CM, et al. miR-106b impairs cholesterol efflux and increases Abeta levels by repressing ABCA1 expression[J]. Exp Neurol, 2011, 235 (2): 476–483.

[41]. Ayman E, Dirk M. Liver X receptor activation enhances blood-brain barrier integrity in the ischemic brain and increases the abundance of ATP-binding cassette

Transporters ABCB1 and ABCC1 on brain capillary cells[J]. Brain Pathol, 2011, 22 (2): 175–187.

[42]. Andrikovics H, Kalina E, Szilvási A, et al. Decreased frequencies of ABCA1 polymorphisms R219K and V771M in Hungarian patients with cerebrovascular and cardiovascular diseases[J]. Cerebrovasc Dis, 2006, 21 (4): 254-259.

[43]. Zhang LF, Chen B, Yanhui Du, et al. Relationship between R219K polymorphism of adenosine triphosphate-binding cassette transporter 1 gene and cerebral infarction: A case-controlled analysis[J]. Neural Regeneration Research, 2009, 4(5): 396.

[44]. Wang N, Xue XH, Lin Y, et al. The R219K polymorphism in the ATP-binding cassette transporter 1 gene has a protective effect on atherothrombotic cerebral infarction in Chinese Han ethnic population[J]. Neurobiology of Aging, 2010, 31 (4): 647-653.

[45]. Alireza P, Ghasem Y, Alastair C, et al. The effect of ABCA1 gene polymorphisms on ischaemic stroke risk and relationship with lipid profile[J]. BMC Medical Genetics, 2007, 8 (30): 1471-2350.

[46]. Yamada Y, Metoki NY, Yoshida H, et al. Genetic factors for ischemic and hemorrhagic stroke in Japanese individuals[J]. Stroke, 2008, 39 (8): 2211-2218.

[47]. Roberts GW, Gentleman SM, Lynch A, et al. beta A4 amyloid protein deposition in brain after head trauma[J]. Lancet, 1991, 338 (8780): 1422-1423.

[48]. Loane DJ, Pocivavsek A, Moussa CE, et al. Amyloid precursor protein secretases as therapeutic targets for traumatic brain injury[J]. NatMed, 2009, 15: 377-379.

[49]. Combes V, C N, Alibert M, et al. ABCA1 gene deletion protects against cerebral malaria: potential pathogenic role of microparticles in neuropathology[J]. Am J Pathol, 2005, 161 (1): 295-302.

注：此文已发表于《生物化学与生物物理进展》杂志。

**The role of ABCA1 in the brain disease development**

**Abstract:** ATP-binding cassette transporters A1(ABCA1) is expressed widely in the brain tissues. It transports intracellular cholesterol to apolipoprotein E(apoE) and apolipoprotein A1(apoA-I) to form high-density lipoprotein, thus regulates the balance of brain cholesterol. Research has shown, there is a close relationship between ABCA1 and brain diseases about cholesterol metabolism, including Alzheimer's disease(AD)、traumatic brain injury(TBI)、Cerebral infarction and cerebral malaria. Recently, there are some research progresses about ABCA1 and brain disease, but there are still many problems that has not been clarified. In this paper, the effects of ABCA1 in various

Related brain diseases are introduced, in order to look for a new target and method for the related brain diseases.

**Key words:** ATP-binding cassette transporters A1; Alzheimer's disease; Traumatic brain injury; Cerebral infarction; Cerebral malaria

**攻读学位期间所获科研成果**

**发表论文：**

**1. Ouyang XP(欧阳新平),** Li P, Zhou SH, Wang L, Qiao G, Tian SW\*, Tang CK\*. Rapid eye movement sleep deprivation disrupts context-modulated effects on morphine locomotor sensitization in mice. Neuroscience Letters, 2011, 504 (1): 73–77. **(SCI 收录, IF:2.105)**

2. **欧阳新平**，何平平，唐艳艳，张敏， 李元， 唐朝克\*. 三磷酸腺苷结合盒转运体A1在脑疾病发生发展中的作用.生物化学与生物物理进展, 2014, 41(4)： 317-323.

**（SCI收录）**

**3.** He PP△, **Ouyang XP△（欧阳新平，△并列第一作者）**, Zhou SH, Yin WD, Tang CK, Laudon M, Tian SW. A novel melatonin agonist Neu-P11 facilitates memory performance and improves cognitive. Hormones and Behavior, 2013, 64 (1): 1–7**.**

**(SCI 收录, IF:3.87)**

4. Liu XY△, Lu Q△, **Ouyang XP△（欧阳新平，△并列第一作者）,** Tang SL, Zhao GJ, Lv YC, He PP, Kuang HJ, Tang YY, Fu Y, Zhang DW, Tang CK\*. Apelin-13 increases expression of ATP-binding cassette transporter A1 via activating protein kinase C a signaling in THP-1 macrophage-derived foam cells. Atherosclerosis, 2013, 226 (2): 398-407.

**(SCI 收录, IF: 3.794)**

5. **欧阳新平**，周寿红，田绍文，李兴，何平平，尹蔚兰，周钰娟，唐朝克.槟榔碱对泡沫细胞胆固醇流出和ABCA1表达的影响. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20 (4)：289-194.

6. **欧阳新平**，何平平，周钰娟，胡丽，顾洪丰，田绍文，唐朝克.小平台应激对小鼠吗啡场景特异性行为敏化的影响.医药前沿, 2011, 1(24)：88-89.

**7.** Jiang J, Mo ZC, Yin K, Zhao GJ, Lv YC, **Ouyang XP(欧阳新平)**, Jiang ZS, Fu YC, Tang CK. Epigallocatechin-3-gallate prevents TNF-α-induced NF-κB activation thereby upregulating ABCA1 via the Nrf2/Keap1 pathway in macrophage foam cells. International Journal of Molecular Medicine, 2012, 29 (5): 946-956**. (SCI 收录, IF:**

**1.97)**

8. Tang SL, Chen WJ, Yin K, Zhao GJ, Mo ZC, Lv YC, **Ouyang XP(欧阳新平)**, Yu

XH, Kuang HJ, Jiang ZS, Fu YC, Tang CK\*. PAPP-A negatively regulates ABCA1, ABCG1 and SR-B1 expression by inhibiting LXRαthrough the IGF-I-mediated signaling pathway. Atherosclerosis, 2012, 222: 344–354. **(SCI 收录, IF: 3.794 )**

9. Yu XH, Jiang HL, Chen WJ, Yin K, Zhao GJ, Mo ZC, **Ouyang XP(欧阳新平)**, Lv YC, Jiang ZS, Zhang DW, Tang CK\*. Interleukin-18 and Interleukin-12 together downregulate ATP-binding cassette transporter A1 expression through the

Interleukin-18R/Nuclear Factor-*κ*B signaling pathway in THP-1 macrophage- derived foam cells. Circulation Journal, 2012, 76: 1780-1791. **(SCI 收录, IF:3.766)**

**10.** Yin K, Chen WJ, Zhou ZG, Zhao GJ, Lv YC, **Ouyang XP(欧阳新平)**, Yu XH, Fu YC, Jiang ZS, Tang CK\*. Apolipoprotein A-I Inhibits CD40 proinflammatory signaling via ATP-binding cassette transporter A1-mediated modulation of lipid raft in macrophages. J Atheroscler Thromb, 19 (9) 823-836. **(SCI 收录, IF: 2.692)**

**11.** He PP, **OuYang XP(欧阳新平)**, Yin K, Chen WJ, Lu Q, Mo ZC, Zhao GJ, Lv YC, Tang CK. PDE inhibitor rolipram increases cholesterol efflux and ABCA1 expression. Biomedical Engineering and Biotechnology (iCBEB), 2012: 1582-1585. **(EI 收录)**

12. Tian GP, Chen WJ, He PP, Tang SL, Zhao GJ, Lv YC, **Ouyang XP(欧阳新平)**, Yin K, Wang PP, Cheng H, Chen Y, Huang SL, Fu Y, Zhang DW, Yin WD, Tang CK\*. MicroRNA-467b targets LPL gene in RAW 264.7 macrophages and attenuates lipid

Accumulation and proinflammatory cytokine secretion. Biochimie. 2012, 94(12): 2749-2755. **(SCI 收录, IF:3.022)**

**13.** Zhao GJ, Tang SL, Lv YC, **Ouyang XP(欧阳新平)**, He PP, Yao F, Chen WJ, Lu Q, Tang YY, Zhang M, Fu YC, Zhang DW, Yin K, Tang CK. Antagonism of Betulinic Acid on LPS-Mediated Inhibition of ABCA1 and Cholesterol Efflux through Inhibiting Nuclear Factor-kappaB Signaling Pathway and miR-33 Expression. PLOS ONE, 2013, 8 (9):1-10. **(SCI 收录)**

14. Tian GP, Tang YY, He PP, Lv YC,, **Ouyang XP(欧阳新平)**,, Zhao GJ,, Tang SL, Wu JF, Wang JL, Peng J, Zhang M, Li Y, Cayabyab FS, Zheng XL, Zhang DW, Yin WD, Tang CK. The effects of miR-467b on lipoprotein lipase (LPL) expression,

Pro-inﬂammatory cytokine, lipid levels and atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014, 443: 428–434. **(SCI 收录)**

**15.** Zhao GJ, Tang SL, Lv YC, **Ouyang XP(欧阳新平)**, He PP, Yao F, Tang YY, Zhang M, Tang YL, Tang DP, Cayabyab FS, Tian GP, Tang CK. NF-κB suppresses the expression of ATP-binding cassette transporter A1/G1 by regulating SREBP-2 and miR-33a in mice. International Journal of Cardiology, 2014, 171: e93–e95. **(SCI 收 录)**

**16.** Wu JF, Wang Y, Zhang M, Tang YY, Wang B, He PP, Lv YC, **Ouyang XP(欧阳新平)**, Yao F, Tan YL, Tang SL, Tang DP, Cayabyab FS, Zheng XL, Zhang DW, Zeng GF, Tang CK. Growth differentiation factor-15 induces expression of ATP-binding cassette transporter A1 through PI3-K/PKCf/SP1 pathway in THP-1 macrophages. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014, 444: 325–331. **(SCI 收录，IF:2.46)**

**17.** 张敏，何平平，**欧阳新平**，尹凯，唐朝克. AIBP介导胆固醇流出调控血管新生. 生物化学与生物物理进展, 2013, 40 (9)：813-815. **(SCI 收录)**

18. 赵国军，汤石林，路倩，陈五军，尹凯，**欧阳新平**，吕运成，唐艳艳，吴剑锋，王甲林，唐朝克. LPS上调miR-33a的表达促巨噬细胞脂质蓄积. 中国病理生理杂志, 2012, 11: 2016-2017.

19. 赵国军，汤石林，田国平，**欧阳新平**，吕运成，何平平，姚峰，唐艳艳，吴剑锋，王甲林，张

摇敏，唐朝克. PDTC对ox-LDL诱导的THP-1巨噬细胞脂质蓄积和胆固醇流出的影响. 中南医学科学杂志, 2013, 41 (3)：225-227.

**参编专著：**

1.**编委**. ATP结合盒转运体基础与临床. 北京. 科学出版社. 2011. 第一版.

**获得奖励：**

1.**欧阳新平**，李鹏，周寿红，王琳，乔鸽，田绍文，唐朝克. Rapid eye movement sleep

deprivation disrupts context-modulated effects on morphine locomotor sensitization in mice. 湖南省生理科学会2011年度优秀论文一等奖.

**主持和参与课题：**

1. 衡阳市科技局课题：Apelin防治阿尔茨海默病及机制研究（NO: 2013KS25），排名第一，0.5万，2014-2015。

2. 国家自然科学基金青年项目：miR-590靶向沉默LPL对巨噬细胞脂质蓄积和炎症反应的影响（NO: 81300158），排名第二，23万，2014-2016。

3. 国家自然科学基金面上项目：ABCA1 甲基化在动脉粥样硬化中的作用及

miR-155靶向调控机制（NO: 81370377），排名第三，70万，2014-2017.

4. 湖南省科技厅课题：重组人Canstatin蛋白与Cisplatin联合用药对荷宫颈癌小鼠的抗癌效用研究（NO: 2011FJ3045），排名第二，2万，2012-2014。

5. 国家自然科学基金面上项目：Ape1in 抗抑郁效应及其神经机制研究（NO：

81171281），排名第五，58万，2013-2015.

6. 衡阳市科技局课题：MIR-590靶向沉默LPL对动脉粥样硬化巨噬细胞脂质蓄积的影响（NO: 2013KS20），排名第三，0.5万，2014-2015。

7. 衡阳市社科课题：衡阳市城镇社区医疗救助现状调查与对策研究（NO：

2013C34），排名第二，0.1万，2014-2015.

致谢

光阴似箭，日月如梭，转眼我的研究生时光接近尾声。当我在键盘上敲出毕业论文的最后一行时，涌上心头的不只是轻松、愉悦，还有一丝淡淡的离别忧伤。尊敬的老师和亲爱的同学。此时此刻，我心潮澎湃，思绪飞扬，心生感激！

首先，衷心感谢我的导师唐朝克教授！他严谨求是的学术精神、一丝不苟的工作态度、与人为善的处事原则，给了我深深的影响。唐老师对我思想上的严格要求、学业上的悉心指导、精神上的鼓舞鼓励、生活上的关心照顾，让我由衷感激，终生难忘！

同时非常感谢南华大学心血管疾病研究所的姜志胜教授、易光辉教授、袁中华教授、王佐教授、刘录ft教授、危当恒教授等在我课题设计、实验及论文撰写中给予的关心、帮助和指导！

感谢生理学教研室全体同仁对我就读博士期间给予的支持和帮助。感谢本课题组的各位同学在我课题实施过程中给予的帮助和支持，是他们的帮助协助我完成了课题实验，衷心的感谢你们！

感谢我家人的理解、支持、鼓励和无私奉献。感谢父母对我家庭悉心的照顾，感谢妻儿默默的支持和奉献，他们是我完成学业的精神支柱和坚强后盾！

诚心感谢参加我的论文评审和答辩的各位专家教授！最后，再次感谢所有曾经关心和帮助过我的人们！

2014年5 月

**课题资 助**

**本研究受国家自然科学基金面上项目（项目批准号：81370377，**

**81170278）、国家自然科学基金青年项目（项目批准号：81300158）、湖南省科技厅项目（项目批准号：2013FJ3027）、湖南省教育厅科学研究青年项目（项目批准号：13B103）、衡阳市科技局项目（项目批准号：**

**2013KS20，2013KS25）的共同资助，在此特别予以致谢！**