

题名页

GLP-1/GIP/Gcg 三受体激动剂改善 3xTg-AD 小鼠认知行为和病理特征研究

焦娟娟¹, HÖLSCHER Christian², 李甜¹, 董雪帆¹, 曲雪松¹, 曹越¹, 武美娜¹, 祁金顺^{1,*}

¹山西医科大学生理学系, 细胞生理学省部共建教育部重点实验室, 太原 030001;

²兰卡斯特大学健康与医学学院生物医学和生命科学部, 兰卡斯特 LA1 4YQ, 英国

通讯作者: 祁金顺

地址: 山西省太原市迎泽区新建南路 56 号

电话: 0351-4135091

传真: 0351-4135091

E-mail: jinshunqi2009@163.com

中图分类号: R338.6

总页数: 23

图数: 7

文章字数: 10270

This work was supported by: (1) the National Natural Science Foundation of China (No. 31471080); (2) the Special Foundation for the Doctoral Program of Higher Education of Ministry of Education, China (No.2010141711000)

本课题受国家自然科学基金委面上项目及教育部高等学校博士学科点专项科研基金资助。

*Corresponding author. Tel: 0351-4135091; Fax: 0351-4135091; E-mail:

jinshunqi2009@163.com

GLP-1/GIP/Gcg 三受体激动剂改善 3xTg-AD 小鼠认知行为和病理特征研究

焦娟娟¹, HÖLSCHER Christian², 李甜¹, 董雪帆¹, 曲雪松¹, 曹越¹, 武美娜¹, 祁金顺^{1,*}

¹山西医科大学生理学系, 细胞生理学省部共建教育部重点实验室, 太原 030001;

²兰卡斯特大学健康与医学学院生物医学和 生命科学部, 兰卡斯特 LA1 4YQ, 英国

摘要: 阿尔茨海默病 (AD) 是一种严重威胁人类健康的进行性神经退行性疾病, 目前为止仍然缺乏有效的治疗方法。最新研究表明, 2 型糖尿病 (T2DM) 是 AD 发生的一个重要危险因素, T2DM 的治疗药物如 GLP-1 类似物对 AD 也显示出一定的神经保护效应。GLP-1/GIP/Gcg 三受体激动剂 (Triagonist) 是在 GLP-1 类似物的基础上合成的一种单分子多肽, 最近已在糖尿病模型小鼠上被证实有较好的疗效。本实验利用行为学、脑片免疫荧光技术和 western blot 技术研究了 GLP-1/GIP/Gcg 三受体激动剂对三转 AD (3xTg-AD) 小鼠的神经保护作用。研究结果显示, GLP-1/GIP/Gcg 三受体激动剂明显逆转了 3xTg-AD 小鼠在 Y 迷宫自发交替试验中的工作记忆和在 Morris 水迷宫中的长时程空间参考记忆损伤, 减少了 3xTg-AD 小鼠海马内的淀粉样 β ($A\beta$) 蛋白斑块沉积和 Tau 蛋白过度磷酸化, 并上调了 3xTg-AD 小鼠海马内的 cAMP/ PKA/CREB 信号通路。这些结果表明, GLP-1/GIP/Gcg 三受体激动剂可以改善 3xTg-AD 小鼠的认知行为、减轻海马特征性的病理伤害; cAMP/PKA/CREB 信号通路的上调可能介导了 Triagonist 的神经保护作用。提示 GLP-1/GIP/Gcg 三受体激动剂有望成为预防或治疗 AD 的一种新策略。

关键词: GLP-1/GIP/Gcg 三受体激动剂; 3xTg-AD 小鼠; 淀粉样 β 蛋白; 磷酸化 tau 蛋白; 学习记忆

中图分类号: R338.6

The study on the neuroprotection of GLP-1/GIP/Gcg receptor triagonist against the cognitive deficits and pathological changes in triple-transgenic AD mice

JIAO Juan-Juan¹, HÖLSCHER Christian², LI Tian¹, DONG Xue-Fan¹, QU Xue-Song¹, CAO Yue¹, WU Mei-Na¹, QI Jin-Shun^{1*}

¹Department of Physiology, Key Laboratory for Cellular Physiology of Ministry of Education, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; ²Division of Biomedical and Life Sciences, Faculty of Health and Medicine, Lancaster University, Lancaster LA1 4YQ, UK

Abstract: Alzheimer's disease (AD) is a progressively neurodegenerative disorder which is still irreversible up to now. Increasing evidence indicates that type 2 diabetes mellitus (T2DM) is an important risk factor of AD, and some drugs used for treatment of T2DM have been applied as a novel therapeutic strategy for AD. GLP-1/GIP/Gcg receptor triagonist, a monomeric peptide, has been reported to be effective in alleviating diabetic complications in rodent models of obesity. The present study investigated for the first time the neuroprotective effects of the triagonist on the triple-transgenic AD mice (3×Tg-AD) by using behavioral tests, immunofluorescence technique and western blot. The results show that the triagonist reversed the impairments in working memory and reference memory in 3×Tg-AD mice, reduced immunopositive A β plaques and hyperphosphorylated tau protein in hippocampus, and upregulated the cAMP/PKA/p-CREB signaling in 3×Tg-AD mice. These results indicate that the triagonist can improve the cognitive impairments and pathological damages of 3×Tg-AD mice, and the up-regulation of hippocampal cAMP/PKA/p-CREB signal pathway may mediated the neuroprotection of the triagonist. So, our results suggest that GLP-1/GIP/Gcg receptor triagonist probably become a novel therapeutic strategy for the treatment of AD.

Key words: GLP-1/GIP/Gcg receptor triagonist; 3×Tg-AD mice; amyloid β protein; phosphorylated tau protein; learning and memory

阿尔茨海默病 (Alzheimer's Disease, AD) 是一种严重威胁人类健康特别是老年人寿命和生活质量的进行性神经退行性疾病, 晚期出现痴呆。目前, 全球已有超过 460 万人深受 AD 的困扰, 预计到 2050 年罹患痴呆的人数将会增加到 1315 万^[1]。AD 不仅使患者遭受极大痛苦, 也给其家庭及社会造成沉重的经济负担。然而, 目前为止仍然缺乏有效的治疗办法。AD 的主要临床症状包括认知、记忆和精神行为方面的损害, 典型的病理改变包括脑内出现高密度的老年斑、神经原纤维缠结以及突触功能障碍和神经元的丢失^[2]。其中, 老年斑中的淀粉样 β 蛋白 (amyloid β protein, A β) 具有广泛的神经毒性作用。A β 也与其他病理特征如细胞内 Tau 蛋白过度磷酸化形成的神经原纤维缠结密切相关, 而神经原纤维缠结的严重程度被视为与 AD 痴呆程度成正比。脑内 A β 的产生起因于淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 基因、早老素-1 (presenilin-1, PS1) 和早老素-2 基因突变。早老素-1 (presenilin-1, PS1) 和早老素-2 基因突变可能会使得其编码的 γ 分泌酶异常, 从而导致 APP 上裂解的 A β 增加, 出现 A β 聚集、沉积, 并引起 AD 的发生^[3]。近年来, 根据 A β 学说制备的动物模型有多种, 包括脑内直接注射外源性的 A β 和采用转基因动物过表达内源性的 A β ^[4-7]。本研究采用的 3xTg-AD 小鼠就是分别在 PS1 (M146V)、APP (Swe) 和 tau (P301L) 三个基因的三处位点上发生错义突变形成的 AD 模型小鼠。这种 3xTg-AD 小鼠在到达一定月龄后, 即可表现出脑内 A β 增多、tau 蛋白过度磷酸化等病理特征以及认知行为的损害。这为 AD 的研究提供了极大的方便。

近十多年来, 人们利用转基因动物甚至在二期和三期临床试验中已经针对 A β 设计和开展了一些卓有成效的工作如免疫学治疗, 但其可靠性和副作用仍是目前有待突破的瓶颈^[8, 9]。大量流行病学调查表明, 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 和 AD 之间有密切的联系。AD 病人中 85% 的患者同时具有 T2DM 或伴有血糖明显升高, 而同龄对照组仅有 42%; 与此同时, 患有 T2DM 的病人发展成 AD 的概率也比正常人多出一倍^[10]。这意味着, 胰岛素信号的异常包括胰岛素抵抗可能会导致或者加剧神经退行性疾病的发生^[11, 12]。因此, T2DM 已被视为 AD 发生、发展的一个重要的危险因素, 甚至有人将 AD 称为 3 型糖尿病^[13, 14]。有趣的是, 动物实验和一些临床前研究表明, 用于治疗 T2DM 的药物如胰岛素以及长效肠促胰岛素类似物具有一定的神经保护作用^[15, 16]。我们先前的实验及其他人的

结果显示, 胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 类似物如利鲁拉肽可以改善 AD 小鼠学习记忆和突触可塑性^[17, 18]; 有临床前研究表明, 胰岛素及 GLP-1 类似物可以改善 AD 患者的脑功能紊乱, 尤其是对于具有胰岛素抵抗的脑功能紊乱更有效^[16]; 一种肠促胰岛素类似物 exenatide 被证实可显著提高神经紊乱病人的认知功能。这些研究为 AD 的治疗提供了新的思路和希望^[19,20]。GLP-1/GIP/Gcg 三受体激动剂 (Triagonist) 是一种在 GLP-1 类似物的基础上最新合成的一种新的单分子肽类化合物, 它可以同时激动三个与代谢相关的关键性受体, 分别是胰高血糖素样多肽-1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) 受体、葡萄糖依赖性促胰岛素多肽受体 (glucose-dependent insulintropic polypeptide, GIP) 受体和胰高血糖素 (glucagon, Gcg) 受体。最新研究证实, Triagonist 在啮齿类动物中具有比单受体和双受体激动剂更明显的改善糖尿病症状的作用^[21]。然而, Triagonist 的神经保护作用目前尚未见报道。本研究采用认知行为测定、脑片免疫荧光技术和分子生物学 Western blot 手段, 研究了 Triagonist 对 3xTg-AD 小鼠认知功能和脑 AD 样病理特征的改善作用, 并初步探讨了其作用的分子机制, 旨在为发展 AD 治疗新策略提供思路和实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料

1.1.1 实验动物 实验选用 9 月龄雌性 APP^{Swe}/PS1^{M146V}/tau^{P301L} 三转 AD (3xTg-AD) 小鼠和野生型 C57BL/6J (C57) 对照小鼠。其中, 3xTg-AD 小鼠购自美国 Jackson Lab, C57 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司。所有动物在本实验室的独立送风系统 (IVC) 动物房繁殖或饲养, 动物房温度为 20℃-25℃, 12 小时光照 12 小时黑暗, 并保证充足的进食和饮水。

1.1.2 实验试剂 GLP-1/GIP/Gcg 三受体激动剂 Triagonist 由英国 Lancaster 大学 Christian Hölscher 教授馈赠。实验采用的抗体及主要试剂: Anti- β -Amyloid (6E10, Biogen, 美国)、Anti-Human PHF-Tau Monoclonal Antibody (AT8, Thermo, 美国)、Anti-PKA R2 antibody (Abcam, 美国)、Anti-cAMP protein kinase catalytic subunit antibody (Abcam, 美国)、Anti-CREB (phospho S133) (Abcam, 美国)、anti- β -actin (博士德, 中国)、Biotin-羊抗兔 IgG (博士德, 中国)、Biotin-兔抗羊

IgG (博士德, 中国)、Biotin-羊抗鼠 IgG (博士德, 中国)、多聚甲醛 (博士德, 中国)、蔗糖 (Sigma, 中国)、BSA (博士德, 中国)、Triton X-100 (Sigma, 美国)、羊抗小鼠 IgG-Cy3 (博士德, 中国)、DyLight 488-羊抗兔 IgG (博士德, 中国)、DAPI 染色液 (博士德, 中国)、RIPA 裂解液 (索莱宝, 中国)、BCA 蛋白浓度测试试剂盒 (索莱宝, 中国)、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒 (索莱宝, 中国) 等。

1.1.3 主要实验仪器 冰冻切片机 (LEICA CM1850, 德国)、激光共聚焦显微镜 (FV1200, OLYMPUS, 日本)、酶标仪 (Spectra Max M2/Mze 型, Molecular Oerices Corp, 美国)、高速离心机 (GL-20C, BD 公司, 美国)、电泳仪 (PAC300 型, BIO-RAD 公司, 美国)、转膜仪 (Trans-Blot SD semi-dry transfer cell, Labnet, BIO-RAD 公司, 美国)、凝胶成像系统 (BIO-Rad 公司, 美国)、行为学记录和分析系统 (Ethovision 3.0, Noldus Information Technology, 荷兰) 等。

1.1.4 实验分组及给药 将两种不同的小鼠随机分为 C57 给生理盐水 (C57 + NS)、C57 给药 (C57 + Triagonist)、3×Tg-AD 给生理盐水 (3×Tg-AD + NS) 以及 3×Tg-AD 给药 (3×Tg-AD + Triagonist) 四组。Triagonist 用生理盐水溶解。在小鼠 9 月龄时, 给药组以 10 nmol/kg/day 的剂量将 Triagonist 经腹腔注入, 生理盐水组则按同体积给予 0.9%NaCl。持续给药 28 天后开始行为学测试。

1.2 动物行为学实验

1.2.1 旷场试验 旷场试验用于测定小鼠的运动能力, 为之后的行为学试验进行初步筛选, 同时也可测定小鼠的探索能力。正式实验前, 将实验动物放入实验室预适应 30 min。然后, 将小鼠依次放入 40 cm×40 cm×40 cm 的旷场中。旷场被人为划分为 16 个相等大小的正方形格子, 中间四个定义为中间区, 周围的格子定义为外周区。将小鼠放入旷场中央, 让其自由活动 5 min, 期间用摄像头记录小鼠的运动轨迹, 并用 Ethovision 3.0 (Noldus Information Technology, 荷兰) 软件分析 5 分钟内小鼠行走的总距离和在中间区域所占时间的百分比^[22]。实验结束后, 用 75%的乙醇擦洗旷场, 然后再进行下一只动物测试。

1.2.2 Y 迷宫 Y 迷宫用于测定小鼠的空间工作记忆能力。Y 迷宫宫体由三个长、宽、高分别为 30 cm、15 cm 和 7 cm 的臂组成, 三臂之间的夹角为 120 度, 中间连合部位形成一个三角形区域。实验时, 将小鼠面对同一臂放入中间三角区域,

让其自由活动 8 min，同时用 Ethovision 3.0 软件记录 8 min 内的总进臂次数和进臂顺序。在小鼠自发交替进臂过程中，若第三次进入的臂与前两次均不相同，则视为正确进臂。由此统计进入正确臂的次数并计算自发交替正确率。自发交替正确率=（进入正确臂的次数/进臂总次数-2）×100%^[23, 24]。

1.2.3 Morris 水迷宫和对位水迷宫 水迷宫试验主要测试小鼠的空间参考学习记忆能力。水迷宫由一个直径为 120 cm、高为 50 cm 的圆形宫体组成，宫体壁上和四周设置有不同的图形标志。实验前，在宫体中注入自来水并加入钛白粉搅拌均匀。水温保持在 22±2℃。在图像采集和分析软件（Noldus Information Technology，荷兰）辅助下，将宫体划分为四个象限，并在第一象限中央放入一直径为 12 cm 的逃生用平台，平台表面位于水面下方 1 cm。经典水迷宫试验第一阶段为定位航行试验，持续 5 天。每天将小鼠面朝宫壁放入任一象限水中，进行寻找水下平台学习。当小鼠找到并爬上水下平台或者实验时间到达 1 min 后停止记录，由计算机分析给出小鼠寻找水下平台的时间，即潜伏期。实验第二阶段为空间探索试验。在完成定位航行试验后的第二天（即实验第六天）将水下平台撤出，随机选两个象限，两次将小鼠放入水中，让其自由探索 1 min，记录小鼠在目标象限（第一象限）内的游泳时间及其轨迹。实验第三阶段为可视平台实验。将平台抬高至水面以上 1 cm，随机选择两个象限，将小鼠依次放入，记录小鼠到达平台的平均时间。对位水迷宫试验主要用于测试小鼠重新学习的能力以及认知灵活性。在经典水迷宫试验结束后，将水下平台移位到对侧象限（第三象限）。并于第 7-10 天再次进行前述的定位航行试验和随后第 11 天的空间探索试验^[25]。

1.3 脑片免疫荧光化学测定 行为学实验结束后，将小鼠用 5%水合氯醛腹腔注射进行麻醉、用 PBS 和多聚甲醛灌流固定。取脑在蔗糖溶液中脱水，行冰冻切片，厚度为 30 μm。将脑片用 0.1 M 的 PBS 洗三次后，血清封闭，一抗 4℃过夜后，加荧光二抗，2h 后加入 DAPI，用 PBS 洗三次后加抗荧光衰减封片剂，封片，最后用激光共聚焦显微镜进行观察拍照，并用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析统计。

1.4 海马组织 Western blot 行为学实验结束后，将小鼠用 5%水合氯醛麻醉，剪头，取脑，分离海马组织。组织称重、剪碎后，按照 10:1 的比例加入组织蛋白酶裂解液，再加入广谱磷酸酶抑制剂（1:100）和 PMSF（1: 100）超声破碎组织，4℃放置 4h 后进行离心，尽快取出上清液，分装并进行 BCA 蛋白浓度测定。计

算出上样量，取样后加热 5 min 变性，进行 SDS-PAGE 电泳，电泳完成后将蛋白转移到 PVDF 膜上。用 5%胎牛血清 (BSA) 封闭 2h 后加入一抗，4℃过夜，用 TBST 洗膜 5 min×3 次；再加入二抗，4℃孵育 2h，TBST 洗膜 5 min×3 次。然后，加入 ECL 发光液进行曝光，运用 Alpha View SA 软件分析目的蛋白的相对灰度值。

1.5 统计学处理 所有数据均采用均数±标准误表示，水迷宫第 1 天到第 5 天和对应水迷宫第 7 天到第 10 天的数据采用 SPSS18.0 重复测量方差分析，其余数据采用 Sigmaplot12.0 的 two-way ANOVA 分析，Sigmaplot10.0 作图。P<0.05 定为有统计学意义。

2 结果

2.1 Triagonist 不影响 3×Tg-AD 和 C57 小鼠的自主运动和探索能力

如图 1A 所示，四组小鼠在旷场中自由活动 5 分钟的总距离分别为：C57 + NS 组 2052.1±88.3 cm (n=13)、C57 + Triagonist 组 2033.4±96.0 cm (n=11)、3×Tg-AD + NS 组 1981.3±88.3 cm (n=13)和 3×Tg-AD + Triagonist 组 1968.8±106.1 cm (n=9)，各组之间没有统计学差异 (P>0.05)。同时，以上各组小鼠在中心区的活动时间百分比 (图 1B) 分别为：(19.3±2.7)%、(18.1±2.5)%、(16.3±2.4)%和 (17.9±2.7)%，也无统计学差异。这些结果表明，9 月龄雌性 3×Tg-AD 小鼠的运动和探索能力没有受到损害，Triagonist 本身对两种小鼠的运动和探索能力也没有明显影响。

Fig 1

2.2 Triagonist 改善了 3×Tg-AD 小鼠空间工作记忆

图 2A 显示了小鼠 Y 迷宫自发交替实验结果，四组的自发交替正确率分别为：C57+NS 组 (66.1±2.5)%、C57+Triagonist 组 (65.9±2.4)%、3×Tg-AD+NS 组 (48.4±1.9)%和 3×Tg-AD+Triagonist 组 (62.8±2.5)%。其中，与 C57+NS 组比较，3×Tg-AD+NS 组的小鼠自发交替正确率明显减少 (P<0.001)；与 3×Tg-AD+NS 组比较，3×Tg-AD+Triagonist 组的自发交替正确率则明显升高，具有统计学差异 (**P<0.01)。图 2B 显示了同样四组小鼠的进臂总次数，分别为：C57+NS 组 (33.0±0.8) 次、C57 + Triagonist 组 (33.2±2.2) 次、3×Tg-AD + NS 组 (34.5±2.1) 次和 3×Tg-AD + Triagonist 组 (34.8±2.4) 次，各组之间没有明显差异 (P>0.05)。

这一结果表明，两组小鼠在 Y 迷宫中的运动能力没有区别，Triagonist 也不影响两组小鼠的自主运动；3×Tg-AD 小鼠的 Y 迷宫空间工作记忆受到明显伤害，而 Triagonist 可明显改善 3×Tg-AD 小鼠的空间工作记忆。

Fig 2

2.3 Triagonist 改善了 3×Tg-AD 小鼠长时程空间参考学习记忆

表 1 和图 3A 显示了各组小鼠 Morris 水迷宫连续 5 天的定位航行试验结果。可见，随着训练天数的增加，各组逃避潜伏期均有不同程度的减少。其中，第 1 天四组的逃避潜伏期没有统计学差异；第 2~5 天 3xTg-AD + NS 组与 C57 + NS 组相比明显增加 (**P<0.01 和***P<0.001)；第 3~5 天 3xTg-AD + Triagonist 又较 3xTg-AD + NS 组明显减少 (##P<0.01)。这说明，3xTg-AD 小鼠出现了明显的空间学习障碍，而慢性给予 Triagonist 可明显改善这一学习能力。

Table 1

图 3 B 显示了各组小鼠在 Morris 水迷宫第 6 天进行空间探索试验的代表性游泳轨迹图。经统计学处理，各组小鼠在目标象限游泳时间占总时间的百分比（图 3C）分别为：C57 + NS 组 (44.7±1.7)%、C57 + Triagonist 组 (41.8±1.8)%、3xTg-AD + NS 组 (30.9±1.8)% 和 3×Tg-AD + Triagonist 组 (43.1±1.9)%。其中，3xTg-AD + NS 组较 C57 + NS 组明显减少 (P<0.001)；3×Tg-AD + Triagonist 组与 3xTg-AD + NS 组相比，又有明显改善 (P<0.001)。这表明，3xTg-AD 小鼠空间记忆功能严重受损，Triagonist 处理可明显改善空间记忆。

在可视平台试验中（图 3D），四组小鼠到达平台的时间分别是：C57 + NS 组 (11.6±0.5) s、C57 + Triagonist 组 (12.2±0.4) s、3xTg-AD + NS 组 (10.7±0.5) s、3xTg-AD + Triagonist 组 (11.3±0.4)s, 组间均无统计学差异 (P>0.05)。说明 3×Tg-AD 小鼠逃避潜伏期的延长和目标象限游泳时间的减少不是由于视力和运动能力的差异所致，而是学习、记忆认知功能下降的缘故。

Fig 3

2.4 Triagonist 改善了 3xTg-AD 小鼠空间再学习能力和认知灵活性

以上经典水迷宫空间探索试验结束后，将水下平台移动至对位象限（第 III 象限）中心区域，再进行连续四天的对位水迷宫定位航行和随后的空间探索试验。如图 4A 和表 2 所示，从对位试验第 1 天（即总试验第 7 天）开始 3xTg-AD + NS 组的逃避潜伏期与 C57 + NS 组相比已有明显差异，3xTg-AD + Triagonist 组与 3xTg-AD + NS 组相比，也有统计学差异。对位水迷宫定位航行试验结束后，进行空间探索试验。如图 4B 和 4C 所示，与 C57 + NS 组相比，3xTg-AD + NS 组小鼠在目标象限游泳的时间百分比明显减少 ($P < 0.001$)，两组分别为 $(42.3 \pm 2.2)\%$ 和 $(25.8 \pm 2.2)\%$ 。与 3xTg-AD + NS 组相比，3xTg-AD + Triagonist 组则有所提高，为 $(37.8 \pm 2.0)\%$ ($P < 0.001$)。

Table 2

Fig 4

2.5 Triagonist 预处理减少了 3xTg-AD 小鼠海马组织内 A β 的沉积

图 5A 显示了海马组织内的 A β 免疫荧光染色情况和 A β 斑块密度。虽然四组小鼠海马内均发现有 A β 阳性斑块，但 3xTg-AD + NS 组中斑块数量明显多于 C57 + NS 组，且斑块聚集程度较大；给予 3xTg-AD 小鼠 Triagonist 处理后其斑块量有明显减少，聚集程度也明显减轻。经统计学处理（图 5B），以 C57 + NS 组为基础值，四组的 A β 阳性表达分别是 C57 + NS 组 $(100.0 \pm 5.5)\%$ 、C57 + Triagonist 组 $(90.9 \pm 4.4)\%$ 、3xTg-AD + NS 组 $(566.5 \pm 29.4)\%$ 和 3xTg-AD + Triagonist 组 $(202.5 \pm 3.7)\%$ 。3xTg-AD + NS 组小鼠海马内的 A β 斑块较 C57 + NS 组明显增多 ($P < 0.001$)，给予 3xTg-AD 小鼠 Triagonist 治疗后斑块数量与 3xTg-AD + NS 组比较则有明显减少 ($P < 0.001$)。n=4。

Fig 5

2.6 Triagonist 预处理降低了 3xTg-AD 小鼠海马组织内过度磷酸化的 Tau 蛋白水平

图 6A 显示了海马组织中磷酸化的 tau 蛋白染色情况。各组均有磷酸化 tau 蛋白在胞浆内的阳性表达，但 3xTg-AD + NS 组中的磷酸化 tau 蛋白密度较高，且形状可多见为纤维状，其余组包括 C57 + NS 组的阳性表达则多为密度较低的小颗

粒点状分布。经统计学处理(图 6B),四组的阳性表达分别为: C57 + NS 组(100.0 ± 9.4)%、3xTg-AD + NS 组(247.9 ± 6.4)%、C57 + Triagonist 组 (95.3 ± 3.6)% 和 3xTg-AD + Triagonist 组 (138.6 ± 15.1)%。3xTg-AD + NS 组与 C57 + NS 组比较阳性表达明显增多 ($P < 0.001$), 3xTg-AD + Triagonist 与 3xTg-AD + NS 组比较阳性表达显著减少 ($P < 0.001$)。

Fig 6

2.7 Triagonist 上调了 3xTg-AD 小鼠海马组织中的 cAMP/PKA/p-CREB 通路

为了探讨 Triagonist 影响 3xTg-AD 小鼠行为学和病理学的分子机制,我们使用 Western Blot 对小鼠海马组织中的信号分子 cAMP、PKA、p-CREB 进行了定量分析。如图 7 所示,与 C57 对照组相比,3xTg-AD + NS 组小鼠海马组织中的 cAMP (图 7B)、PKA R2 (图 7C) 以及 p-CREB (图 7D) 均发生了明显的减低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$)。经药物处理后,三者的水平均有明显不同程度的恢复 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$)。

Fig 7

3 讨论

AD 患者最早期的表现是近期记忆即工作记忆障碍,随后逐渐发展为长期记忆损伤和普遍认知活动的下降。目前,临床上主要采用胆碱酯酶抑制剂改善患者的认知行为,但长期疗效尚不理想,且胆碱酯酶抑制剂也不能阻止脑内 AD 病理特征的逐渐加重。糖尿病与 AD 之间的密切联系为 AD 治疗开辟了一个新的途径。本研究旨在观察一种新的抗糖尿病制剂即 GLP-1/GIP/Gcg 三受体激动剂对 AD 小鼠的神经保护作用。我们首先在 3xTg-AD 模型小鼠上进行了各种认知行为学测试。Y 迷宫和水迷宫的实验结果显示,9 月龄 3xTg-AD 小鼠在 Y 迷宫试验中的自发交替正确率明显下降,在水迷宫试验中逃避潜伏期明显延长,目标象限游泳时间百分比则显著减少。同时,小鼠的运动功能和视力均不受影响。这表明,3xTg-AD 小鼠的工作记忆和长时程记忆均受到了损害。对位水迷宫试验则表明,3xTg-AD 小鼠的认知灵活性也受到影响。重要的是,我们观察到,给予 3xTg-AD 小鼠慢性长期腹腔注射 GLP-1/GIP/Gcg 三受体激动剂后,这些行为学的损害都得以不同程

度的减轻。

AD 患者最明确的病理特征是脑内特别是海马组织中出现以 A β 为核心的、高密度的老年斑以及因细胞内 tau 蛋白过度磷酸化形成的神经原纤维缠结。本研究在行为学实验结束后，又利用免疫组织化学手段观察了 GLP-1/GIP/Gcg 三受体激动剂对 3xTg-AD 小鼠脑内 AD 样病理特征改变即 A β 沉积和 Tau 蛋白过度磷酸化的影响。结果显示，与同月龄的 C57 小鼠相比，3xTg-AD 小鼠海马组织中的 A β 斑块明显增多，三受体激动剂则可有效减少 A β 在脑内的生成和沉积。同时，3xTg-AD 小鼠海马内的 Tau 蛋白也发生了过度磷酸化，给予三受体激动剂后，磷酸化 Tau 蛋白含量有所减少。我们最近的研究也表明，GLP-1 类似物 Lixisenatide 可以有效拮抗 A β 引起的神经元损伤和改善其空间记忆^[4]。也有人观察到，Val⁸-GLP-1 可以逆转 APP/PS1 转基因小鼠海马 LTP 的压抑，改善其突触可塑性^[26]。除此之外，GIP 类似物 D-Ala²-GIP 也被报道具有增加 APP/PS1 小鼠脑内突触数量，减少 A β 斑块沉积和脑内炎性反应的功效^[27]。

CREB 是细胞核内一个关键的转录调节因子，其通过自身磷酸化对下游靶基因起到转录调控作用^[28, 29]。CREB 能整合 Ca²⁺和 cAMP 等诱导的信号，是细胞内多条信号通路的交叉靶点^[30]，这些信号通路包括 cAMP/PKA、CaMKII、钙/钙调蛋白 IV 等^[31]。蛋白激酶 A (PKA) 是一种环腺苷酸 (cAMP) 依赖激酶，主要参与调解细胞的代谢、基因表达、细胞增殖分化和学习记忆等功能^[32-34]。当胞浆内 cAMP 水平较低时，PKA 以调节亚基 (R) 和催化亚基 (C) 结合的复合体形式存在；当 cAMP 含量升高时，cAMP 与两个调节亚基结合，释放出催化亚基，并通过 CREB 的 Ser133 位点自身磷酸化，使其保持激活状态^[33, 35]。激活的 PKA 进入细胞核内可使其下游因子活化，包括激活或促进与学习记忆相关的基因表达，从而影响神经元乃至整个神经网络的功能^[36]。已有证据显示，很多记忆损伤的动物模型都存在有 CREB 及其上游信号的异常。例如，AD 小鼠脑内磷酸化 CREB 水平明显下降，AD 病人尸检中也发现脑中磷酸化的 CREB 含量低于正常水平^[37]；AD 模型动物和 AD 病人的脑中均发现有 cAMP/PKA/CREB 信号通路的下调^[38-40]。此外，AD 小鼠中 A β 的积聚也会使磷酸化的 CREB 水平降低。脑内给予外源性 A β 1-42 时，磷酸化 CREB 的表达受到抑制，并直接影响到 CREB/CRE 编码的下游基因 BDNF，二者的影响促发了 AD 早期的认知障碍和加剧了 AD 后期的病程

进展^[41]。由此我们推测, Triagonist 对 3xTg-AD 小鼠认知行为的神经保护作用可能与脑内磷酸化 CREB 水平的调节有关。本研究 Western blot 实验结果显示, 3xTg-AD 小鼠海马内的 cAMP、PKA、p-CREB 水平与正常对照相比均是下降的, 而给予三受体激动剂后这三个蛋白的水平均有所上升。GLP-1/GIP/Gcg 三受体激动剂作用的三个受体 (GLP-1 受体、GIP 受体和 Gcg 受体) 均为 G 蛋白偶联受体, 经 AC 介导后, 可使第二信使 cAMP 含量增加^[17], 随之激活 PKA, 并进一步调节其下游的 CREB, 使其磷酸化水平增加, 从而对 3xTg-AD 小鼠的学习记忆起到一定的保护作用。

总之, 本研究采用 GLP-1/GIP/Gcg 三受体激动剂在三转基因 AD 动物的行为学、病理学和分子生物学研究结果表明, Triagonist 有助于改善 AD 动物的认知行为、逆转部分病理特征; 这些神经保护作用可能与 cAMP/PKA/CREB 通路的激活有关。

致谢: 本课题受国家自然科学基金面上项目及教育部高等学校博士学科点专项科研基金资助。This work was supported by: (1) the National Natural Science Foundation of China (No. 31471080); (2) the Special Foundation for the Doctoral Program of Higher Education of Ministry of Education, China (No.2010141711000)

参考文献

- 1 Prof Martin Prince PAW, et al. WorldAlzheimerReport2015-The Global Impact of Dementia. 2015.
- 2 Liu XJ, Yuan L, Yang D, Han WN, Li QS, Yang W, Liu QS, Qi JS. Melatonin protects against amyloid-beta-induced impairments of hippocampal LTP and spatial learning in rats. *Synapse* 2013; 67(9): 626-636.
- 3 Holscher C. Development of beta-amyloid-induced neurodegeneration in Alzheimer's disease and novel neuroprotective strategies. *Rev Neurosci* 2005; 16(3): 181-212.
- 4 Cai HY, Wang ZJ, Holscher C, Yuan L, Zhang J, Sun P, Li J, Yang W, Wu MN, Qi JS. Lixisenatide attenuates the detrimental effects of amyloid beta protein on spatial working memory and hippocampal neurons in rats. *Behav Brain Res* 2016; 318: 28-35.
- 5 Cheng L, Zhang J, Li XY, Yuan L, Pan YF, Chen XR, Gao TM, Qiao JT, Qi JS. A Novel Antibody Targeting Sequence 31-35 in Amyloid beta Protein Attenuates Alzheimer's Disease-Related Neuronal Damage. *Hippocampus* 2016.
- 6 Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM. Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles. *Neuron* 2003; 39(3): 409-421.
- 7 Ding L, Meng Y, Zhang HY, Yin WC, Yan Y, Cao YP. Active immunization with the peptide epitope vaccine Aβ₃₋₁₀-KLH induces a Th₂-polarized anti-Aβ antibody response and decreases

- amyloid plaques in APP/PS1 transgenic mice. *Neurosci Lett* 2016; 634: 1-6.
- 8 Munch G, Robinson SR. Potential neurotoxic inflammatory responses to Abeta vaccination in humans. *J Neural Transm (Vienna)* 2002; 109(7-8): 1081-1087.
- 9 von Bernhardi R. Immunotherapy in Alzheimer's disease: where do we stand? Where should we go? *J Alzheimers Dis* 2010; 19(2): 405-421.
- 10 Janson J, Laedtke T, Parisi JE, O'Brien P, Petersen RC, Butler PC. Increased risk of type 2 diabetes in Alzheimer disease. *Diabetes* 2004; 53(2): 474-481.
- 11 Li L, Holscher C. Common pathological processes in Alzheimer disease and type 2 diabetes: a review. *Brain Res Rev* 2007; 56(2): 384-402.
- 12 Holscher C. Insulin, incretins and other growth factors as potential novel treatments for Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Biochem Soc Trans* 2014; 42(2): 593-599.
- 13 Sebastiao I, Candeias E, Santos MS, de Oliveira CR, Moreira PI, Duarte AI. Insulin as a Bridge between Type 2 Diabetes and Alzheimer Disease - How Anti-Diabetics Could be a Solution for Dementia. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2014; 5: 110.
- 14 Kroner Z. The relationship between Alzheimer's disease and diabetes: Type 3 diabetes? *Altern Med Rev* 2009; 14(4): 373-379.
- 15 Wang XH, Yang W, Holscher C, Wang ZJ, Cai HY, Li QS, Qi JS. Val(8)-GLP-1 remodels synaptic activity and intracellular calcium homeostasis impaired by amyloid beta peptide in rats. *J Neurosci Res* 2013; 91(4): 568-577.
- 16 Talbot K. Brain insulin resistance in Alzheimer's disease and its potential treatment with GLP-1 analogs. *Neurodegener Dis Manag* 2014; 4(1): 31-40.
- 17 Han WN, Holscher C, Yuan L, Yang W, Wang XH, Wu MN, Qi JS. Liraglutide protects against amyloid-beta protein-induced impairment of spatial learning and memory in rats. *Neurobiol Aging* 2013; 34(2): 576-588.
- 18 Candeias EM, Sebastiao IC, Cardoso SM, Correia SC, Carvalho CI, Placido AI, Santos MS, Oliveira CR, Moreira PI, Duarte AI. Gut-brain connection: The neuroprotective effects of the anti-diabetic drug liraglutide. *World J Diabetes* 2015; 6(6): 807-827.
- 19 Groeneveld ON, Kappelle LJ, Biessels GJ. Potentials of incretin-based therapies in dementia and stroke in type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Investig* 2016; 7(1): 5-16.
- 20 Aviles-Olmos I, Dickson J, Kefalopoulou Z, Djamshidian A, Ell P, Soderlund T, Whitton P, Wyse R, Isaacs T, Lees A, Limousin P, Foltynie T. Exenatide and the treatment of patients with Parkinson's disease. *J Clin Invest* 2013; 123(6): 2730-2736.
- 21 Finan B, Yang B, Ottaway N, Smiley DL, Ma T, Clemmensen C, Chabenne J, Zhang L, Habegger KM, Fischer K, Campbell JE, Sandoval D, Seeley RJ, Bleicher K, Uhles S, Riboulet W, Funk J, Hertel C, Belli S, Sebokova E, Conde-Knape K, Konkar A, Drucker DJ, Gelfanov V, Pfluger PT, Muller TD, Perez-Tilve D, DiMarchi RD, Tschop MH. A rationally designed monomeric peptide triagonist corrects obesity and diabetes in rodents. *Nat Med* 2015; 21(1): 27-36.
- 22 Kovalenko IL, Galyamina AG, Smagin DA, Michurina TV, Kudryavtseva NN, Enikolopov G. Extended effect of chronic social defeat stress in childhood on behaviors in adulthood. *PLoS One* 2014; 9(3): e91762.
- 23 Yamada K, Noda Y, Hasegawa T, Komori Y, Nikai T, Sugihara H, Nabeshima T. The role of nitric oxide in dizocilpine-induced impairment of spontaneous alternation behavior in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 276(2): 460-466.
- 24 Hritcu L, Clicinschi M, Nabeshima T. Brain serotonin depletion impairs short-term memory, but not

- long-term memory in rats. *Physiol Behav* 2007; 91(5): 652-657.
- 25 Shang Y, Wang X, Shang X, Zhang H, Liu Z, Yin T, Zhang T. Repetitive transcranial magnetic stimulation effectively facilitates spatial cognition and synaptic plasticity associated with increasing the levels of BDNF and synaptic proteins in Wistar rats. *Neurobiol Learn Mem* 2016; 134 Pt B: 369-378.
- 26 Gengler S, McClean PL, McCurtin R, Gault VA, Holscher C. Val(8)GLP-1 rescues synaptic plasticity and reduces dense core plaques in APP/PS1 mice. *Neurobiol Aging* 2012; 33(2): 265-276.
- 27 Faivre E, Holscher C. Neuroprotective effects of D-Ala(2)GIP on Alzheimer's disease biomarkers in an APP/PS1 mouse model. *Alzheimers Res Ther* 2013; 5(2): 20.
- 28 Nie T, McDonough CB, Huang T, Nguyen PV, Abel T. Genetic disruption of protein kinase A anchoring reveals a role for compartmentalized kinase signaling in theta-burst long-term potentiation and spatial memory. *J Neurosci* 2007; 27(38): 10278-10288.
- 29 Barco A, Alarcon JM, Kandel ER. Expression of constitutively active CREB protein facilitates the late phase of long-term potentiation by enhancing synaptic capture. *Cell* 2002; 108(5): 689-703.
- 30 Meyer CJ, Alenghat FJ, Rim P, Fong JH, Fabry B, Ingber DE. Mechanical control of cyclic AMP signalling and gene transcription through integrins. *Nat Cell Biol* 2000; 2(9): 666-668.
- 31 Kang H, Sun LD, Atkins CM, Soderling TR, Wilson MA, Tonegawa S. An important role of neural activity-dependent CaMKIV signaling in the consolidation of long-term memory. *Cell* 2001; 106(6): 771-783.
- 32 Skalhogg BS, Tasken K. Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front Biosci* 2000; 5: D678-693.
- 33 Taylor SS, Ilouz R, Zhang P, Kornev AP. Assembly of allosteric macromolecular switches: lessons from PKA. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13(10): 646-658.
- 34 Kandel ER. The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB. *Mol Brain* 2012; 5: 14.
- 35 Gonzalez GA, Montminy MR. Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* 1989; 59(4): 675-680.
- 36 Barco A, Pittenger C, Kandel ER. CREB, memory enhancement and the treatment of memory disorders: promises, pitfalls and prospects. *Expert Opin Ther Targets* 2003; 7(1): 101-114.
- 37 Yamamoto-Sasaki M, Ozawa H, Saito T, Rosler M, Riederer P. Impaired phosphorylation of cyclic AMP response element binding protein in the hippocampus of dementia of the Alzheimer type. *Brain Res* 1999; 824(2): 300-303.
- 38 Puzzo D, Vitolo O, Trinchese F, Jacob JP, Palmeri A, Arancio O. Amyloid-beta peptide inhibits activation of the nitric oxide/cGMP/cAMP-responsive element-binding protein pathway during hippocampal synaptic plasticity. *J Neurosci* 2005; 25(29): 6887-6897.
- 39 Liang Z, Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX. Down-regulation of cAMP-dependent protein kinase by over-activated calpain in Alzheimer disease brain. *J Neurochem* 2007; 103(6): 2462-2470.
- 40 Xie S, Jin N, Gu J, Shi J, Sun J, Chu D, Zhang L, Dai CL, Gu JH, Gong CX, Iqbal K, Liu F. O-GlcNAcylation of protein kinase A catalytic subunits enhances its activity: a mechanism linked to learning and memory deficits in Alzheimer's disease. *Aging Cell* 2016; 15(3): 455-464.
- 41 Lu B, Chow A. Neurotrophins and hippocampal synaptic transmission and plasticity. *J Neurosci Res* 1999; 58(1): 76-87.

Figures and Figure legends:

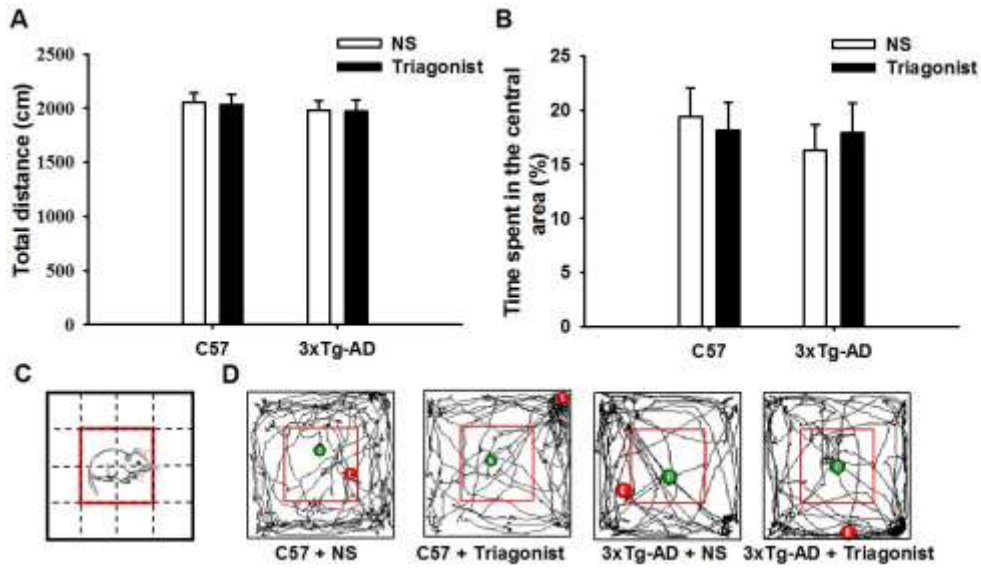


图 1. Triagonist 不影响 3×Tg-AD 和 C57 小鼠的自主运动和探索能力

Fig. 1. Triagonist did not affect the locomotor and exploratory performance of 3×Tg-AD mice and C57 age-matched mice. (A and B) Histograms showing the total distance moved in the open field (A) and running time spent in the central area (B) of mice in 5 min, without any significantly difference between groups ($P > 0.05$). (C) A diagram showing the open field with animal. Red color squares were defined as central area (D) Representative running traces of mice in different groups. Green circles and red circles represent initial position and stop position of mice, respectively.

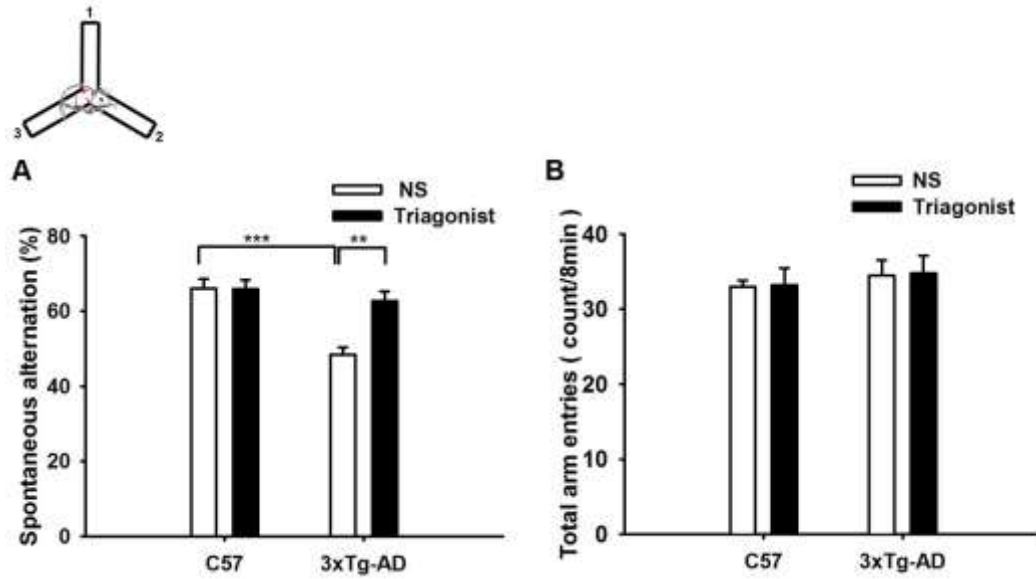


图 2. Triagonist 改善了 3×Tg-AD 小鼠在 Y 迷宫中的工作记忆

Fig. 2. Triagonist improved the working memory of 3×Tg-AD mice in Y-maze. (A) Histograms showing the percentage of correct spontaneous alternation of different groups of mice in Y maze test, with a significant decrease only in the 3×Tg-AD + NS group. ** P<0.01, *** P<0.001. (B) Histograms showing the total arm entries of mice in 8 min, without any significant difference between groups.

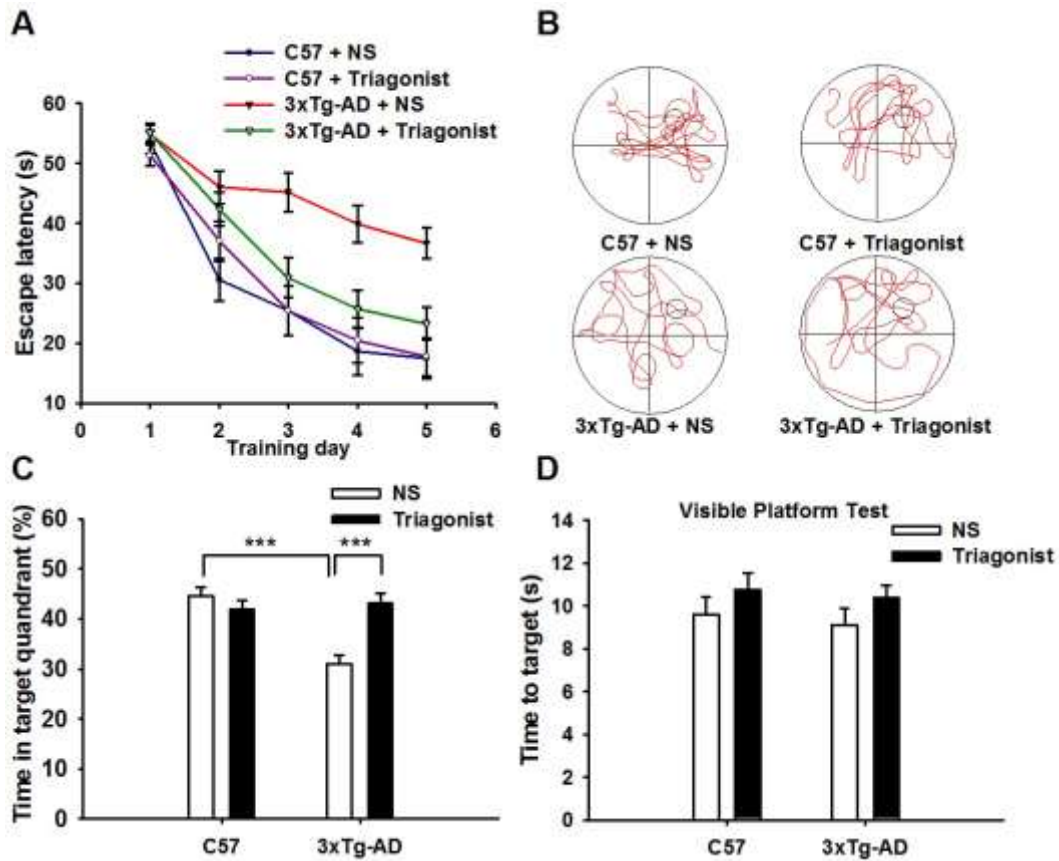


图 3. Triagonist 对 3xTg-AD 小鼠空间学习和记忆的影响

Fig. 3. The effects of triagonist on the spatial learning and memory of 3xTg-AD mice. (A) Plots showing the mean escape latencies of mice in hidden platform test from 1st-5th day. (B) Sample swimming traces of mice in different groups in probe test. (C) Histograms showing the swimming time percentage of mice in target quadrant in the probe test on 6th day. *** $P < 0.001$ (D) Swimming time (sec) of mice to target in visible platform test.

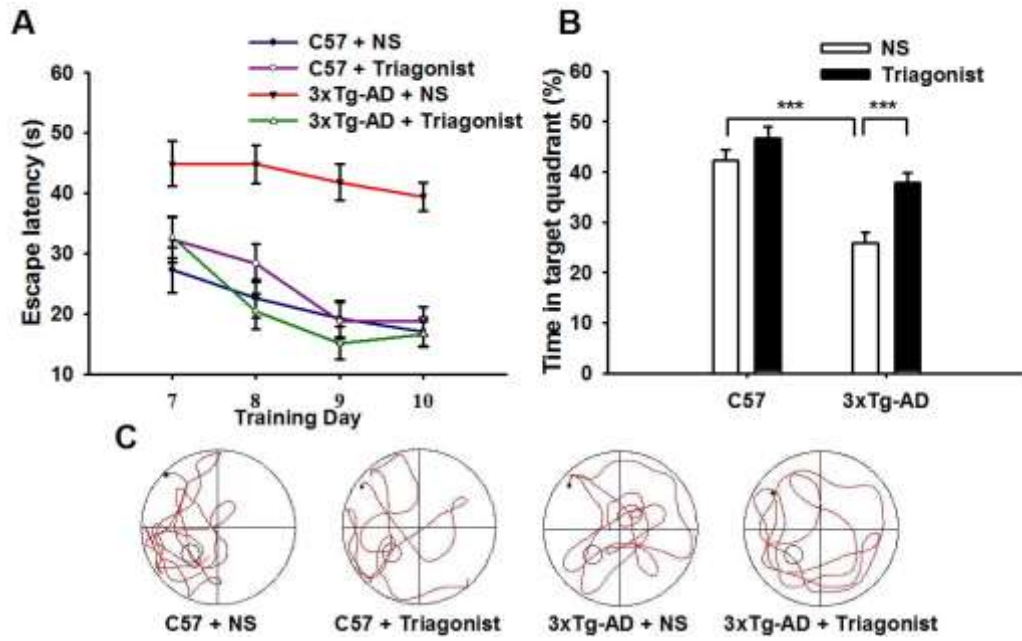


图 4. 小鼠在对位水迷宫中逃避潜伏期和游泳时间百分比的观察

Fig. 4. Observation of the escape latency and swimming time percentage of mice in reverse MWM test. (A) Plots showing the escape latency of mice in hidden platform test from 7th-10th day. (B) Histograms showing swimming time percentage of mice in probe test on 11th day. *** $P < 0.001$. (C) Sample swimming traces of mice in different groups in probe test.

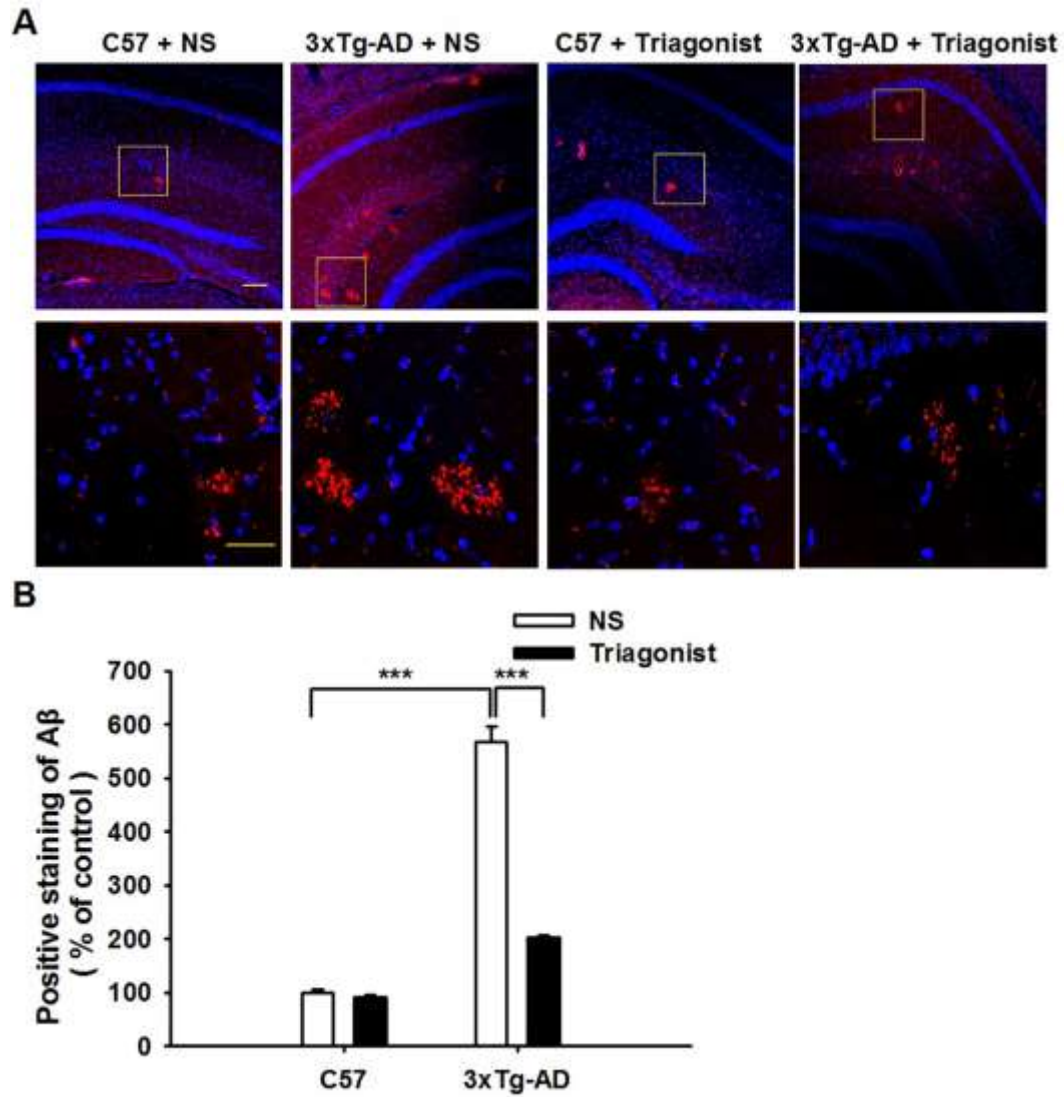


图 5. C57 和 3xTg-AD 小鼠海马组织中 A β 斑块的免疫荧光测定

Fig. 5. Immunofluorescence measurements of A β plaques in the hippocampus of C57 and 3xTg-AD mice. (A) Microphotographs showing A β positive plaques in the hippocampus of mice in four groups. A β positive plaques (red) were recognized and stained with specific 6E10 antibody, and cell nucleus (blue) were stained by DAPI. The scale bars in the first and second row are 100 μ m and 50 μ m. (B) Histograms comparing the percentage of A β positive staining plaques, with a significant increase in 3xTg-AD + NS group and a prominent recovery in 3xTg-AD + Triagonist group.

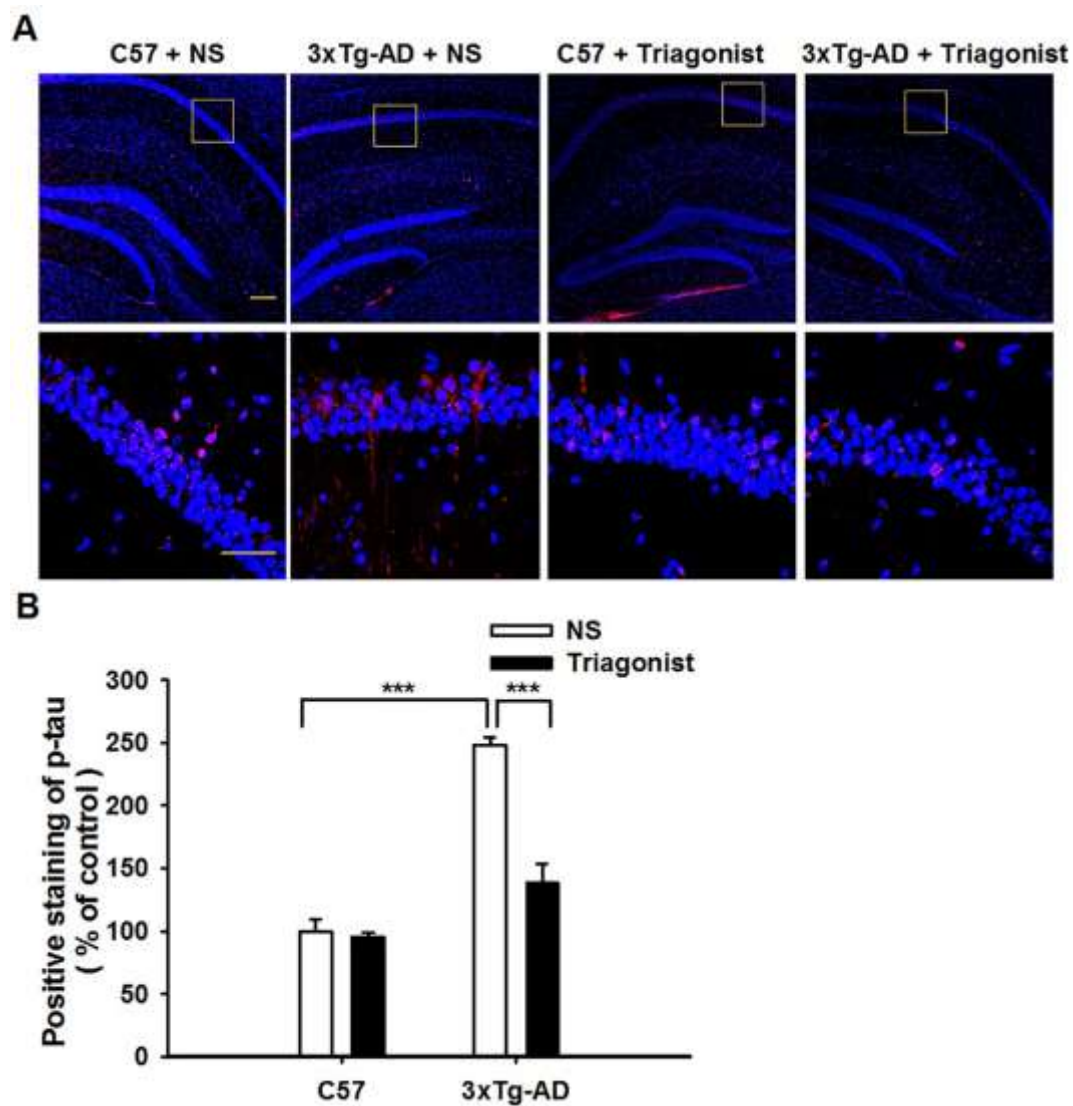


图 6. C57 和 3xTg-AD 小鼠海马组织中磷酸化 tau 蛋白的免疫荧光测定

Fig. 6. Immunofluorescence measurements of phosphorylated tau in the hippocampus of C57 and 3xTg-AD mice. (A) Microphotographs showing the distribution of positive phosphorylated tau staining in the hippocampus of mice in different groups. Phosphorylated tau positive stainings (red) were recognized with specific AT8 antibody, and cell nucleus (blue) were stained with DAPI. The scale bars in the first and second row are 100 μ m and 50 μ m, respectively. (B) Histograms comparing the percentages of positive staining of phosphorylated tau in the four groups, with a significant increase in the 3xTg-AD + NS group, and a recovery in the 3xTg-AD + Triagonist groups.

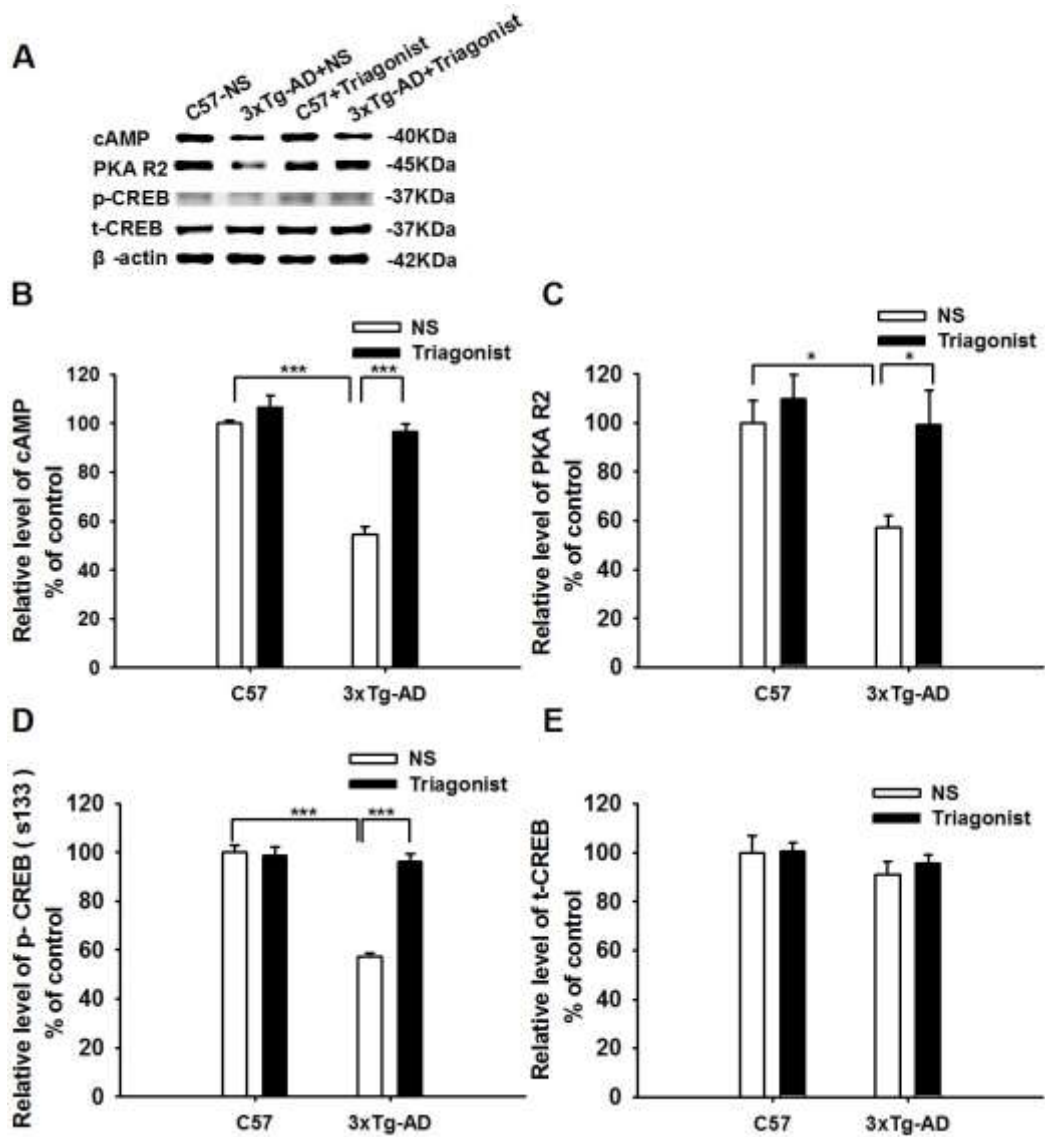


图 7. C57 和 3xTg-AD 小鼠海马组织内 cAMP、PKA、p-CREB 和 t-CREB 的 Western blot 定量分析

Fig. 7. Western blot quantitative analysis for the levels of cAMP, p-PKA, p-CREB and t-CREB in the hippocampus of C57 and 3xTg-AD mice. (A) Representative western blot images in different groups. (B, C, D, E) Histograms showing the quantitative analyses of cAMP, PKA R2, p-CREB and t-CREB. All data are expressed as the percentage of value in control (n=4-6).

Tables:

表 1. 转基因和 Triagonist 对小鼠在 Morris 水迷宫定位航行试验中逃避潜伏期（秒）的影响

Table 1. Effects of transgenic and triagonist on the escape latency (sec) of mice in hidden platform test. ** P<0.01, *** P<0.001 vs C57+NS; ## P<0.01 vs 3xTg-AD+NS.

训练 天数	C57 + NS (n=9)	C57 + Triagonist (n=9)	AD + NS (n=9)	AD + Triagonist (n=11)
第 1 天 (s)	53.6±1.9	51.3±1.8	54.9±1.5	55.1±1.5
第 2 天 (s)	30.6±3.5	37.0±3.3	46.0±2.7**	42.3±2.8
第 3 天 (s)	25.5±4.1	25.5±4.4	45.1±3.2***	31.0±3.3##
第 4 天 (s)	18.6±4.0	20.5±3.8	39.9±3.1***	25.7±3.2##
第 5 天 (s)	17.6±3.4	17.7±3.2	36.7±2.6***	23.3±2.7##

表 2. 各组小鼠在对位水迷宫试验中逃避潜伏期（秒）的比较

Table 2. Comparison of the escape latency (sec) of mice in reverse Morris water maze test. ** P<0.01, *** P<0.001 vs C57+NS; # P<0.05, ### P<0.001 vs 3xTg-AD+NS.

训练 天数	C57 + NS (n=9)	C57 + Triagonist (n=9)	AD + NS (n=9)	AD + Triagonist (n=11)
第 7 天 (s)	27.3±3.7	32.3±3.6	44.9±3.8**	32.7±3.4#
第 8 天 (s)	22.6±3.2	28.4±3.2	44.8±3.2***	20.4±2.9###
第 9 天 (s)	19.2±2.9	18.8±2.9	41.8±3.0***	15.1±2.7###
第 10 天 (s)	17.0±2.2	18.7±2.2	39.5±2.4***	16.6±2.1###