

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级

学号: 24520121153201

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

过表达 SNX8 对阿尔茨海默病模型小鼠
表型影响的研究

The effect of overexpressing SNX8 on the phenotype of
Alzheimer's mice

纪成香

指导教师姓名: 许华曦/张云武 教授

专 业 名 称: 微生物学

论文提交日期: 2015 年 5 月

论文答辩时间: 2015 年 5 月

学位授予日期: 2015 年 6 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2015 年 5 月

过表达SIRT6对阿尔茨海默病模型小鼠表型影响的研究

纪成香

指导教师

许华曦
教授
博导

厦门大学

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘 要

阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 是最为常见的神经退行性疾病。神经元胞外 A β (Amyloid β , A β) 聚集形成的淀粉样斑是 AD 的一个重要的病理特征, 而 A β 是由淀粉样前体蛋白 APP (Amyloid Precursor Protein, APP) 经 β -分泌酶 (β -secretase) 和 γ -分泌酶 (γ -secretase) 依次切割后生成的 (即淀粉样蛋白途径), 而 APP 的另一条剪切途径是 α -分泌酶 (α -secretase) 和 γ -分泌酶依次对其进行剪切, 释放有神经保护作用的 sAPP α (即非淀粉样蛋白途径), 此条途径可以抑制 A β 的产生。 α -分泌酶和 β -分泌酶发挥酶活性的部位不同, α -分泌酶对 APP 的剪切主要在细胞膜, 而 β -分泌酶主要在内体和 TGN 等酸性细胞器中, 因此 APP 在胞内的定位对 A β 的产生有重要的作用。

SNX 蛋白家族的主要功能是调控胞内物质的分选与运输, SNX8 是其中的一员。在本文研究中, 我们发现 SNX8 在脑内有表达, 但与其他组织相比水平较低。而在不同类型的神经细胞包括神经元、神经胶质细胞和小胶质细胞中 SNX8 都有表达, 而且在小胶质细胞中表达量最高。我们进一步研究发现 SNX8 与早期内体标志物 Rab5、Rab4 和晚期内体标志物 Rab7 有良好的共定位, 表明 SNX8 主要定位在内体。而且我们发现, 在 AD 小鼠脑组织中 SNX8 表达量减少。在用表达人源 SNX8 的 AAV9 病毒悬液感染神经元时, 我们发现过表达 SNX8 并没有改变 APP、 α -分泌酶 (ADAM10)、 β -分泌酶 (BACE1)、 γ -分泌酶组分 PS1 和突触相关蛋白的表达。将 AAV9 立体定位注射入 APP^{swe}/PSEN1^{dE9} 小鼠海马区, 发现过表达 SNX8 可以降低 A β ₄₀ 和 A β ₄₂ 的表达, 但不影响 APP、ADAM10、BACE1、NMDAR 亚基和突触相关蛋白的表达。动物行为学实验发现: 过表达 SNX8 会在旷场实验中会增加 AD 小鼠在旷场中央的时间; 在高架十字迷宫实验中降低 AD 小鼠在开放臂的时间, 并在 T 迷宫实验中改善 AD 小鼠的自主交替行为缺陷, 表明过表达 SNX8 一方面增加了 AD 小鼠的焦虑, 另一方面也可以改善 AD 小鼠的短期工作记忆。但在条件惊恐实验和 Morris 水迷宫中, 过表达 SNX8 不能改善 AD 小鼠的学习记忆。

总之, 本文研究发现 SNX8 可以调控小鼠行为的变化, 为进一步研究 SNX8

与 AD 的关系提供了方向。

关键词：阿尔茨海默病 SNX8 小鼠行为学

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Alzheimer disease is the most common neurodegenerative disease. Accumulation of extracellular amyloid plaque consisted of Amyloid β ($A\beta$) is one pathological hallmark of Alzheimer disease. $A\beta$ is derived from the amyloid precursor protein (APP) by sequential cleavage of β -secretase (BACE1) and γ -secretase (the amyloidogenic pathway). Alternatively, APP can be cleaved through nonamyloidogenic pathway. In this pathway, APP is cleaved firstly by α -secretase within the $A\beta$ region to release neuroprotective sAPP α . Several studies suggest that APP cleavage by α -secretase is mainly on cell membrane, and cleavage by β -secretase is mainly in acidic organelles such as endosomes and trans-Golgi network(TGN). Therefore appropriate intracellular transport and subcellular localization of APP is important to $A\beta$ generation.

SNX8 is one member of SNX family whose main function is regulating protein trafficking. In this study, we found that SNX8 is relatively lowly expressed in brain tissues including cortex, cerebellum and hippocampus. SNX8 is also expressed in all neural cells including neurons, astrocytes and microglia, and especially mostly abundant in microglia. Further studies suggest SNX8 could colocalize with early endosome marker protein Rab5 and Rab4, and late endosome marker protein Rab7. Consistent with our previous finding that SNX8 level is decreased in AD patient brains, we also found that SNX8 protein level was decreased in AD mouse brain. However overexpression of SNX8 in neuron did not influence the levels of APP, α -secretase(ADAM10), β -secretase (BACE1), γ -secretase components and synapse related proteins. When we stereotaxically injected AAV9-EGFP-SNX8 virus into the hippocampus of APP^{swe}/PSEN1^{dE9} AD model mice, we found that SNX8 overexpression could decrease the level of $A\beta$ ₄₀ and $A\beta$ ₄₂, but does not affect the levels of APP, ADAM10, BACE1, NMDAR subunits and synapse related proteins. We also tested behaviors of treated mice. Overexpression of SNX8 resulted in more time spent in the central area during open field test, less time spent in open arms during high plus maze test, and increased alternative alternation in AD mice, suggesting that overexpression of SNX8 may increase anxiety and improve

short term working memory in AD mice. However, overexpression of SNX8 did not affect AD mouse behaviors during fear conditioning and Morris water maze tests.

In summary, our study reveal that overexpression of SNX8 may affect certain AD mouse behaviors, providing additional foundation to determine the role of SNX8 in AD.

Keywords: Alzheimer disease;SNX8;mouse animal behavior

厦门大学博硕士论文摘要库

目录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
缩略词.....	IX
第一章 前言	1
1.1 阿尔茨海默病	1
1.1.1 阿尔茨海默病概述	1
1.1.2 AD 病理学特征	2
1.2 AD 的发病机理	4
1.3 β -淀粉样斑的产生	6
1.3.1 淀粉样前体蛋白	6
1.3.2 α -分泌酶 (α -secretase)	8
1.3.3 β -分泌酶 (β -secretase)	9
1.3.4 γ -分泌酶 (γ -secretase)	10
1.4 SNX 蛋白家族和 SNX8	12
1.4.1 SNX 蛋白家族	12
1.4.2 PX 结构域	13
1.4.3 SNX 家族蛋白与 AD	14
1.4.4 SNX8	16
1.5 本论文研究的内容及意义	17
第二章 材料与方法	18
2.1 材料	18
2.1.1 培养基、抗体、试剂和化学药品	18
2.1.2 动物、细胞株、菌种及质粒	19
2.1.3 主要试剂配制	19
2.1.4 实验仪器设备	20
2.2 实验方法	22
2.2.1 pCMV-myc-SNX8 载体构建	22

2.2.2 质粒大量提取.....	22
2.2.3 细胞培养.....	23
2.2.4 细胞转染.....	25
2.2.5 蛋白质免疫印迹 (SDS-PAGE) 分析	26
2.2.6 小鼠不同组织总蛋白提取.....	28
2.2.7 总 RNA 提取.....	28
2.2.8 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR)	29
2.2.9 免疫共沉淀.....	30
2.2.10 免疫荧光.....	31
2.2.11 免疫组织化学.....	31
2.2.12 APP ^{swe} /PSEN1 ^{dE9} 转基因小鼠基因型鉴定.....	32
2.2.13 脑立体定位注射腺相关病毒.....	33
2.2.14 小鼠行为学实验	33
第三章 结果与分析	37
3.1 SNX8 在小鼠的各个组织中的表达模式.....	37
3.2 SNX8 定位于早期内体和晚期内体.....	39
3.3 SNX8 在 AD 小鼠中表达量减少	40
3.4 SNX8 不影响 APP、ADAM10、BACE1、PS1 和突触相关蛋白的表达..	41
3.5 SNX8 抑制 APP ^{swe} /PSEN1 ^{dE9} 小鼠海马中淀粉样斑的形成.....	43
3.6 体内过表达 SNX8 不影响 APP、ADAM10、BACE1、NMDAR 和突触相 关蛋白的表达.....	44
3.7 过表达 SNX8 增加了 AD 小鼠的焦虑，但能够改善 AD 小鼠的自主交替行 为缺陷.....	46
第四章 讨论	49
参考文献.....	52
致谢.....	57

Table of Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Abbreviation	IX
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Alzheimer's disease	1
1.1.1 Alzheimer's disease overview	1
1.1.2 The pathological characteristics of Alzheimer's disease	2
1.2 Pathogenesis of Alzheimer's disease	4
1.3 Generation of β-amyloid plaque	6
1.3.1 The amyloid precursor protein.	6
1.3.2 α -secretase	8
1.3.3 β -secretase	9
1.3.4 γ -secretase.	10
1.4 SNX protein family and SNX8	12
1.4.1 SNX protein family	12
1.4.2 PX domain	13
1.4.3 SNX protein family and AD	14
1.4.4 SNX8	16
1.5 Purposes and contents of this research	17
Chapter 2 materials and methods	18
2.1 Materials	18
2.1.1 Culture medium 、 antibodies、 reagents and chemicals	18
2.1.2 Animals、 cell lines 、 bacteria strain and plasmids	19
2.1.3 Reagents preparation	19
2.1.4 Experiment instruments	20
2.2 Experiment methods	22
2.2.1 pCMV-myc-SNX8 plasmid construction	22
2.2.2 Large scale plasmid isolation	22

2.2.3 Cell culture	23
2.2.4 Cell transfection	25
2.2.5 Western blot	26
2.2.6 Total RNA extraction from different tissues.	28
2.2.7 Total RNA extraction	28
2.2.8 Real-time PCR	29
2.2.9 Co-immunoprecipitation.	30
2.2.10 Immunofluorescence	31
2.2.11 Immunohistochemistry	31
2.2.12 Genotyping of APP ^{swe} /PSEN1 ^{dE9} transgenic mice	32
2.2.13 Brain stereotaxic injection of AAV9.	33
2.2.14 Animal behavior test.	33
Chapter 3 Results and analysis.....	37
3.1 Expression pattern of SNX8 in different mouse tissues.....	37
3.2 SNX8 is localized in early and late endosome	39
3.3 SNX8 expression is decreased in the brain of AD mice	40
3.4 Overexpression of SNX8 does not affect levels of APP、ADAM10、 BACE1、PS1 and synapse-related proteins	41
3.5 Overexpression of SNX8 decreases A β levels in the hippocampus of APP ^{swe} /PSEN1 ^{dE9} mice	43
3.6 In vivo overexpressing SNX8 does not affect levels of APP、ADAM10、 BACE1、NMDAR subunits and synapse-related proteins	44
3.7 SNX8 overexpression causes more anxiety , and improves spontaneous alternation in APP ^{swe} /PSEN1 ^{dE9} mice	46
Chapter 4 Discussion	49
Reference.....	52
Acknowledgements	57

缩略词

英文缩写	英文全名
AAV	Adeno-associated virus
AD	Alzheimer's disease
ADAM10	A disintegrin and metalloproteinase 10
AICD	APP intracellular domain
AMPK	AMP- Activated Protein Kinase
APH-1	Anterior pharynx-defective 1
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid Precursor Protein
APP/PS1	APP ^{swe} /PSEN1 ^{dE9}
A β	Amyloid β or Amyloid beta
BACE1	β -site APP cleaving enzyme 1
BACE2	β -site APP cleaving enzyme 2
BAR	Bin/Amphiphysin/Rvs
BSA	Bovine serum albumin
CaMK II	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CDK5	Cyclin-dependent kinase-5
cDNA	Complementary DNA
CTF	C-terminal fragments
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EDTA	Ethylenediamine tetracetic acid
EEA1	Early endosomal antoantigen-1
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
EOAD	Early-onset Alzheimer's disease
ER	Endoplasmic Reticulum
FAD	Familial Alzheimer's disease
FBS	Fetal bovine serum
GSK-3 β	Glycogen synthase kinase 3 β

缩略词

GuHCl	Guanidine hydrochloride
HEK 293T	Human Embryonic Kidney 293T
HIF1	Hypoxia-inducible factor 1
LRP	Low-density lipoprotein receptor-related protein
LTD	Long-term depression
LTM	Long term memory
LTP	Long-term potentiation
MAP	Microtubule associated protein
mRNA	Messenger RNA
NCT	Nicastrin
NFTs	Neurofibrillar tangles
NICD	Notch intracellular domain
NTF	N-terminal fragments
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase chain reaction
PD	Parkinson's disease
PDZ	PSD95/Dlg/ZO-1
PEN-2	Presenilin enhancer 2
PHFs	Paired-helical filament
Phox	Phagocyte NADPH oxidase
PKA	Protein kinase A
PKC	Protein kinase C
PSD-95	Postsynaptic density-95
PtdIns	Phosphoinositol
PtdInsPs	phosphatidylinositol phosphates
PX	Phox homology
SAD	Sporadic Alzheimer's disease
sAPP α	Soluble amyloid precursor protein α
sAPP β	Soluble amyloid precursor protein β
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SH3	Src-homology 3
SNXs	Sorting nexins

缩略词

TACE/ADAM17	Tumor necrosis factor- α (TNF- α)-converting enzyme
TBS	Tris-buffered saline
TGN	Trans Golgi network
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
WT/wt	Wild type
α -CTF/CT83	C-terminal fragment α
β -CTF/CT99	C-terminal fragment β

厦门大学博硕士论文摘要库

第一章 前言

1.1 阿尔茨海默病

1.1.1 阿尔茨海默病概述

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD), 俗称老年痴呆症, 是一种起病隐匿且发展进行性的中枢神经系统退行性疾病, 是痴呆最常见的病因, 在痴呆病例中占 60%-80%。1907 年, 德国医生 Alois Alzheimer 报道了一名叫 Auguste Deter 的妇女的尸检结果, 她的死因是渐进性的行为与认知功能紊乱。并且 Alzheimer 首次报道了该类疾病的神经病理和临床特征, 因此将这种病命名为 Alzheimer's disease (AD)。

在 AD 的发病早期, 患者会丧失记忆力, 思考能力下降, 不能认识周围的亲人及朋友; 而在晚期会逐渐丧失语言、运动、吞咽等行为能力, 不能生活自理, 甚至因此失去生命。AD 被发现报道至今已有 100 多年的历史, 但是对其症状、病因、影响因素还有治疗方法的大规模研究仅有 30 多年, 而且引起 AD 病理变化的真正原因也没有确定。AD 分为早发性 AD (Early-onset Alzheimer's disease, EOAD) 和晚发型 AD (Late-onset Alzheimer's disease, LOAD); 早发型 AD 又称家族性 AD, 具有遗传性, 是一种常染色体显性遗传病, 一般在 40-50 岁就会有较明显的症状, 主要由淀粉样前体蛋白 (Amyloid precursor protein, APP)、早老素 1 (Presenilin 1, PS1) 和早老素 2 (Presenilin 2, PS2) 基因突变或 APP 基因拷贝数增加所致^[1-3], 其中 PS1 的 180 种突变、PS2 的 20 种突变、APP 的 36 种突变都可导致 A β 总量的增加或者 A β 42/ A β 40 比例的增加^[4]。EOAD 在 AD 患者中所占比例约为 5%, 虽然所占比例较少但也是一重要的群体。LOAD 在 65 岁以后发病, 多为散发性, 也称为散发性 AD (Sporadic Alzheimer's disease, SAD), 在 AD 患者中所占比例为 95%。SAD 病因相对复杂, 受个体遗传特征和环境因素共同作用的影响^[5], 如易感因子 apolipoprotein E (ApoE ϵ 4)^[6]、 α 2-macroglobulin^[7,8]、K-variant of butyryl-cholinesterase^[9]和 TREM2 等基因; 此外, 流行病学研究发现, 年龄、性别和心血管疾病等也是影响 AD 发病的影响因素^[10]。

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.