



Tau 蛋白高度磷酸化致阿尔茨海默病动物模型研究进展

杨翠翠, 李 林, 张 兰

(首都医科大学宣武医院药物研究室, 神经变性病教育部重点实验室, 北京 100053)

【摘要】 阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是老年人中最常见的神经退行性疾病,以过度磷酸化 tau 蛋白为核心形成的神经原纤维缠结为 AD 的主要病理特征之一。近年来对 tau 蛋白磷酸化的研究备受关注。在 AD 的实验研究中,探索理想的 AD 动物模型对于明确 AD 的病因、发病机制及药物的研发等方面起关键作用。本文对 Tau 蛋白磷酸化致 AD 主要动物模型的研究进展进行了综述,包括 Tau 转基因动物模型、激酶和磷酸化酶系统失衡致 Tau 蛋白过度磷酸化损伤模型、降低 Tau 蛋白糖基化致 Tau 过度磷酸化模型等。

【关键词】 Tau 蛋白磷酸化; 阿尔茨海默病; 模型; 动物

【中图分类号】R33 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1671-7856(2013)06-0071-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2013.006.016

Advances in research of animal models of Alzheimer's disease induced by hyperphosphorylated tau

YANG Cui-cui, LI Lin, ZHANG Lan

Department of Pharmacology, Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Key Laboratory for Neurodegenerative Diseases of Ministry of Education, Beijing 100053, China.

【Abstract】 Alzheimer's disease (AD) is a progressive and fatal neurodegenerative disorder. The aggregation of hyperphosphorylated tau into neurofibrillary tangles (NFT) is a hallmark in the histopathology of AD. A number of mouse models have been created to study the major neuropathological mechanism and the drug research. We provide here some considerations for selecting a mouse model of AD, including tau transgenic mice, hyperphosphorylated tau animal model induced by imbalance of the activities of kinases and phosphatases, and animal model of hyperphosphorylated tau induced by decreasing O-GlcNAcylation.

【Key words】 Hyperphosphorylated tau, Alzheimer's disease, Animal model

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)为老年人中最常见的中枢神经系统退行性疾病,全世界超过 3700 万人罹患 AD^[1]。其临床表现为持续性、进行性的记忆力减退和智力下降。AD 的主要神经病

理特征包括:神经细胞外以 β -淀粉样蛋白(β -amyloid, A β)沉积为核心形成的老年斑(senile plaques, SP),神经细胞内以过度磷酸化的 Tau 蛋白为核心形成的神经原纤维缠结(neurofibrillary

基金项目 国家自然科学基金(No. 81274120),北京市自然科学基金(No. 7132110),首都卫生发展科研专项(No. 2011-4001-05)北京市中医管理局重点项目(No. KJTS2011-04),北京市新世纪百万人才工程项目(No. 008-0014)。

作者简介 杨翠翠(1985-),女,博士,研究方向:神经药理学、中药药理学。E-mail: ycctmg@126.com。

通讯作者 张兰(1972-),女,药理学副教授,研究方向:神经药理学、中药药理学;E-mail: lanizhg@hotmail.com

tangles, NFTs) 和特定脑区神经元大量丢失^[1]。由于 AD 病因病理的多样性和复杂性,动物模型的建立面临巨大的困难和挑战,因此探索和应用理想的动物模型成为 AD 研究中的重要内容。由于以 A β 为靶标的药物研发多年来无突破,例如 tramiprosate 和 semagacestat 在临床试验阶段对 AD 的治疗无有效作用^[2],因此以拮抗 tau 蛋白磷酸化为靶标的药物研究越来越引起关注。动物模型是进行 AD 机制研究的一个重要方面,近年来研究者采用多种方法开展 AD 模型的研制与应用,并取得了一定成果。本文主要对 tau 蛋白磷酸化致 AD 主要动物模型进行综述。

1 Tau 转基因动物模型

Tau 蛋白正常状态下可促进微管蛋白组成,并维持已形成微管的稳定性。由于 tau 蛋白某些位点的过度磷酸化,导致 tau 蛋白转化为 PHF-Tau (paired helical filament, PHF) 蛋白后出现微管稳定性下降,微管相关的轴突运输障碍以及相应神经元的活性降低,最终导致 AD 发病。过度表达 APP (Amyloid precursor protein, APP) 或者 PS (presenilin, PS) 的转基因动物模型只出现 A β 的沉积,没有 NFT 的形成或者 tau 高度磷酸化的出现。因此为了阐明 tau 蛋白在 AD 病理过程中的发生机制,一些学者构建了转人类 tau 蛋白基因的转基因动物。

1.1 JNPL3 与 rTg4510 转基因小鼠

JNPL3 与 rTg4510 转基因小鼠均为 P301L 突变的 tau 转基因小鼠,前者转基因动物品系为 C57BL/6J-DAB/2 或 Swiss-Webster,后者为 129S6 或 FVB/N。P301L 突变是 tau 的 10 号外显子的错义突变,从而导致 301 位的脯氨酸(P)变为亮氨酸(L),降低 tau 蛋白与微管的结合能力,使微管解聚,失去功能,而 tau 蛋白进一步沉积形成 NFTs,导致神经元死亡^[3,4]。JNPL3 不会出现 A β 淀粉样斑块和认知障碍,但是在 6.5 个月会出现神经元丢失,9 个月出现 NFTs 的病理变化,10 月龄时 90% 的动物会出现轻度运动功能障碍,此时在脑干、小脑和脊髓均可见 NFTs。这是第一个能够证明 tau 蛋白能够导致神经元损伤和细胞丢失的转基因动物模型。rTg4510 也没有 A β 淀粉样斑块,但是与 JNPL3 相比,rTg4510 小鼠在 1.5~2.5 个月时出现认知障碍,并

随年龄增长加剧。而且 rTg4510 小鼠出现神经元丢失和 NFTs 的时间较早。4 个月出现 NFTs,5.5 个月出现神经元丢失。研究发现抑制 tau 突变基因的高表达后,尽管 NFT 仍继续蓄积,但小鼠记忆功能恢复,脑内神经元数量保持不变,此研究结果提示溶解的 tau 蛋白比 NFT 更具神经毒性^[5]。

1.2 转人类野生型 tau 基因小鼠(Htau)

最早的 tau 小鼠模型中神经元表达长的野生型 tau 同型体-htau40,可以观察到神经纤维前缠结和过度磷酸化的 tau 蛋白,在此种小鼠中没有观察到 NFTs 的形成。另一种转基因小鼠 htau44 也有相似的结果。这些人类野生型 tau 基因小鼠显示出与 AD 相关疾病中 NFT 损害的早期改变,但不能产生 NFT,并缺乏明显的神经病学症状。Ishihara 等^[6]在过表达人类最小 tau 蛋白片段转基因小鼠的海马、扁桃体和内嗅皮质形成 congophilic tau,并首次检测出类 NFT 的特定与 β 折叠片层结构结合的包涵物。Andorfer 在过表达人类 tau 蛋白片段转基因小鼠(tau 蛋白基因敲除)中发现,6 个月时在皮层和海马部位出现 tau 蛋白磷酸化和 NFTs,在纹状体、小脑和脊髓中出现较少或者无 tau 蛋白磷酸化和 NFTs 的产生,这与人类 AD 的病理变化相似。此鼠 15 个月出现神经元丢失,与 P301L 不同的是不出现运动功能的变化^[7]。

1.3 TAPP 转基因小鼠

TAPP 双转基因小鼠由 Tg2576 小鼠和 tauP301L (JNPL3) 小鼠杂交而来,同时具有 A β 沉积和 NFTs 的形成。其行为学的发病方式及出现时间与 JNPL3 相似,如进行性后肢萎缩,呈弯腰驼背姿势,体重减轻,发音及睁眼困难。A β 沉积与 Tg2576 小鼠相同,9 个月会出现 A β 沉积和 NFTs 的形成,NFT 大量出现在边缘系统和嗅觉皮质区^[8]。

1.4 3xTgAD 小鼠

3xTgAD 三转基因小鼠包括 3 种基因:A β 前体蛋白 (APPswe),presenilin-1 (PS1M146V),和 tauP301L。Oddo 等分别把 2 种突变基因 APPSwe 和 tauP301L 显微注射入单转 PS1M146V 基因鼠纯合子的胚胎干细胞,得到的小鼠经筛选得到纯合子或杂合子。该三转基因小鼠脑会出现 AD 主要的神经病理学过程和行为学特征,包括 A β 沉积,胶质细胞增多,突触损伤,神经退行性病变和记忆损伤。此类三转基因小鼠在 6 个月时,出现神经元内 A β 沉积

(出现在 NFTs 之前),而在 12 个月时可见细胞外 A β 沉积,首先沉积在皮层,然后在海马。12 个月时可出现 NFT,出现的顺序是先海马后皮层。突触损伤包括随年龄增长而逐渐下降的长时程增强电位出现在 SP 和 NFT 形成之前。这类多种转基因组合方法成功地模拟了 AD 病理变化和行为学改变的主要特征,可能会成为研究 AD 的主流动物模型^[10-11]。

2 激酶和磷酸化酶系统失衡致 Tau 蛋白过度磷酸化损伤模型

AD 患者 tau 蛋白如何发生异常过度磷酸化尚不完全清楚,理论上认为可能是 tau 蛋白激酶上调或 tau 磷酸酶下调所致。糖原合成酶激酶-3 (glycogen synthase kinase-3, GSK-3)、周期蛋白依赖性激酶-5 (cyclin dependent kinase-5, cdk-5)、蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 及钙调蛋白依赖性蛋白激酶-2 (calmodulin kinase IV, CaMK-II) 等蛋白激酶可促进 tau 蛋白发生过度磷酸化; 蛋白磷酸酶 (protein phosphatases, PPs) 可催化 Tau 蛋白脱磷酸基,哺

乳动物丝/苏氨酸蛋白磷酸酶有 5 种,即 PP-1、PP-2A、PP-2B、PP-2C 和 PP-5。蛋白磷酸酶 PP-2A 和 PP-2B 在抑制 AD 患者脑中 Tau 蛋白过度磷酸化方面起关键作用,特别是 PP-2A 活性占总活性 70%^[13]。

2.1 抑制 tau 蛋白磷酸酶所致 tau 蛋白磷酸化模型

冈田酸 (okadaic acid, OA) 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酯酶抑制剂,是蛋白磷酸酶 PP1 和 PP2A 的抑制剂,目前被广泛应用于诱导 tau 蛋白的过度磷酸化,模拟 AD 患者大脑中 tau 蛋白的异常磷酸化改变^[14]。

体外实验发现 OA 与大鼠脑片或细胞共同孵育数小时后可出现 tau 蛋白的磷酸化,如 Ser 473、ser202^[15-16]。体内实验中,Tian 等向 SD 大鼠双侧基底核注射 5 μ L OA (0.2 μ mol/L),24 h 后 Meynert 基底核则出现 tau 蛋白 ser199/202 位点的高度磷酸化,非磷酸化蛋白的表达降低,空间记忆力显著下降^[17]。Yin 等向 SD 大鼠双侧海马注射 OA (0.2 μ mol/L, 3 μ L),48 h 后出现 tau 蛋白 ser396、ser262、ser214 过度磷酸化,非磷酸化 tau 减少,大鼠记忆力明显下降^[18]。白娟等人通过向 Wistar 大鼠

海马注射 5 μ L OA (0.4 mmol/L),隔日注射 1 次,共 4 次,2 周后发现大鼠空间记忆力明显下降,GSK-3 β 和 P-tau (phosphorylated tau) 表达增加^[19]。海马背侧注射 100 ng OA,1 周后引起空间参考记忆和工作记忆明显低于假手术组^[20]。李永坤等^[21]表明向海马背侧定位注射 1.5 mL OA (0.392 mM),48 h 后取材测定海马中 tau 蛋白的含量及 PP2A 活性,发现神经元中 Thr231 和 Ser396 位点磷酸化的 tau 蛋白和总 tau 蛋白增加,PP2A 活性明显下降。Li 等向大鼠侧脑室注射 200 ng OA,1 周后海马 PP2A 活性明显下降,tau 蛋白在 ser396、ser199/202、ser404 等位点的磷酸化明显增加^[22]。

总之,OA 能够引起细胞或动物组织 PP2A 活性降低,导致 tau 蛋白在多个位点磷酸化,而且能够引起实验大鼠空间记忆障碍。

2.2 激活 tau 蛋白激酶所致 tau 蛋白磷酸化

Forskolin 是一种 cAMP-依赖性蛋白激酶 A (cAMP dependent protein kinase, PKA) 的特异性激动剂。向大鼠侧脑室注射 forskolin 后,在 24 h 时引起 tau 蛋白过度磷酸化和大鼠空间记忆障碍,并且 Forskolin 引起大鼠海马 tau 蛋白过度磷酸化和空间记忆保留障碍的改变趋势存在一定的相关性^[23]。Wortmannin 能够抑制磷脂酰肌醇 3 激酶抑制剂 (PI3K) 的活性,从而抑制 GSK-3 β 在 ser9 位点的磷酸化而导致 GSK-3 β 活性增高。有研究表明,Wortmannin 与细胞共孵育后,1 h 之内可以导致 GSK-3 β 活性短暂增加,导致 tau 蛋白在 ser396/ser404 和 ser199/ser202 的磷酸化磷酸化;之后由于蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 活性上调后引起 GSK-3 β 在 ser9 位点的磷酸化而致 GSK-3 β 活性降低,因此联合使用 wortmannin 和 GF-109203X (PKC 的抑制剂) 造模,可以导致 GSK-3 β 活性增加 (> 12 h),tau 蛋白在 ser396/ser404 和 ser199/ser202 等位点的磷酸化^[24,25]。

3 降低 tau 蛋白糖基化致 tau 过度磷酸化模型

tau 除了能被磷酸化修饰之外,还能被 O-连接的 β -N-乙酰葡萄糖胺 (O-GlcNAc) 糖基化所修饰,而且 tau 的 O-GlcNAc 糖基化可以反过来调节 tau 的磷酸化。由于蛋白质的 O-GlcNAc 糖基化受糖代谢调节,以上发现提示一种可能性,即大脑中葡萄糖的利用降低可能会因减少 tau 的 O-GlcNAc 糖基化,进而促进 tau 的过度磷酸化而促使 AD 形成^[26,27]。

小鼠禁食引起神经细胞对葡萄糖的摄入和利用降低,从而导致细胞内 tau 蛋白的 N-乙酰氨基葡萄糖糖基化水平降低,游离出潜在的磷酸化位点。Tau 蛋白更易磷酸化,过度磷酸化改变了 tau 蛋白的结构和构象,最终引起微管结构崩解,形成大量的 NFT 结构。此类模型可通过控制血糖水平间接恢复小鼠记忆能力;使用胰岛素抑制剂来逆转 O-GlcNAc 糖基化水平的下调,从而减轻 tau 蛋白的过度磷酸化,减少 NFT 的形成^[28]。

参考文献:

- [1] Salloway S. Introduction: the prevalence of Alzheimer's disease—a growing crisis. *CNS Spectr*, 2008, 13 (3 Suppl 3): 1.
- [2] Rafii MS, Aisen PS. Recent developments in Alzheimer's disease therapeutics [J]. *BMC Med*, 2009, 7: 7.
- [3] Herrmann N, Chau SA, Kircanski I, et al. Current and emerging drug treatment options for Alzheimer's disease: a systematic review [J]. *Drugs*, 2011.
- [4] 王艳艳,陈汝筑,朱小南,等. 含 P301L 突变的 Tau 转基因小鼠纯合子品系的建立及鉴定 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2012, 28(3): 221–224.
- [5] Mustroph ML, King MA, Klein RL, et al. Adult-onset focal expression of mutated human tau in the hippocampus impairs spatial working memory of rats [J]. *Behav Brain Res*, 2012, 233: 141–148.
- [6] Santaacruz K, Lewis J, Spire T, et al. Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function [J]. *Science*, 2005, 309 (5733): 476–481.
- [7] Ishihara T, Zhang B, Higuchi M, et al. Age-dependent induction of congophilic neurofibrillary tau inclusions in tau transgenic mice [J]. *Am J Pathol*, 2001, 158(2): 555–562.
- [8] Andorfer C, Kress Y, Espinoza M, et al. Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms [J]. *J Neurochem*, 2003, 86: 582–590.
- [9] Lewis J, Dickson DW, Lin WL, et al. Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP [J]. *Science*, 2001, 293: 1487–1491.
- [10] Howlett DR, Richardson JC. The pathology of APP transgenic mice: a model of Alzheimer's disease or simply overexpression of APP? [J]. *Histol Histopathol*, 2009, 24: 83–100.
- [11] Barnes B, Arendt T. The physiological link between metabolic rate depression and tau phosphorylation in mammalian hibernation [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6: e14530.
- [12] 梁春联,朱华,黄澜,等. MicroRNA-153 对靶基因下游信号分子 GSK-3 β 表达水平及细胞抗损伤能力的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2011, 21(8): 16–18.
- [13] Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, et al. Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation [J]. *Eur J Neurosci*, 2005, 22: 1942–1950.
- [14] 褚燕琦,张兰,李林,等. 人参皂苷对蛋白磷酸酶抑制剂冈田酸拟阿尔茨海默病细胞模型的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2005, 24(7): 79–84.
- [15] Qian W, Shi JH, Yin XM, et al. PP2A regulates tau phosphorylation directly and also indirectly via activating GSK-3 β [J]. *J Alzheimer's Dis*, 2010, 19: 1221–1229.
- [16] Liu R, Pei JJ, Wang XC, et al. Acute anoxia induces tau dephosphorylation in rat brain slices and its possible underlying mechanisms [J]. *J Neurochem*, 2005, 94: 1225–1234.
- [17] Tian Q, Lin ZQ, Wang XC, et al. Injection of okadaic acid into the Meynert nucleus basalis of rat brain induces decreased acetylcholine level and spatial memory deficit [J]. *Neuroscience*, 2004, 126: 277–284.
- [18] Yin YY, Liu H, Cong XB, et al. Acetyl-L-carnitine attenuates okadaic acid induced tau hyperphosphorylation and spatial memory impairment in rats [J]. *J Alzheimer's Dis*, 2010, 19: 735–746.
- [19] 白娟,张生林,杨宁宁,等. 吡格列酮对 AD 大鼠模型学习记忆及 GSK-3 β 、p-tau 蛋白的影响 [J]. *中国医疗前沿*, 2010, 5(21): 28–29.
- [20] He J, Yang Y, Xu HY, et al. Olanzapine attenuates the okadaic acid-induced spatial memory impairment and hippocampal cell death in rats [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2005, 30: 1511–1520.
- [21] 李永坤,陈晓春,朱元贵,等. 人参皂甙 Rb1 减轻冈田酸诱导的大鼠海马神经元 Tau 蛋白过度磷酸化 [J]. *生理学报*, 2005, 5(2): 154–160.
- [22] Li L, Liu JF, Yan XD, et al. Protective effects of ginsenoside Rd against okadaic acid-induced neurotoxicity in vivo and in vitro [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 138: 135–141.
- [23] 张军霞. 经侧脑室单次注射 Forskolin 对大鼠海马 tau 蛋白磷酸化和空间记忆能力的影响及二者之间的关系 [D]. 出版地: 华中科技大学, 2008:
- [24] Elliott E, Atlas R, Lange A, et al. Brain-derived neurotrophic factor induces a rapid dephosphorylation of tau protein through a PI-3 kinase signaling mechanism [J]. *Eur J Neurosci*, 2005, 22(5): 1081–1089.
- [25] Xu GG, Deng YQ, Liu SJ, et al. Prolonged Alzheimer-like tau hyperphosphorylation induced by simultaneous inhibition of phosphoinositol-3 kinase and protein kinase c in N2a cells [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2005, 37(5): 349–354.
- [26] 石俊,李旭,卢芬,等. 饥饿对小鼠脑中 tau 蛋白磷酸化和 O-GlcNAc 糖基化的影响 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2006, 33(7): 647–652.
- [27] Yao PJ, Coleman PD. Reduced O. Glycosylated clathrin assembly protein APL80: implication for synaptic vesicle recycling dysfunction in Alzheimer's disease [J]. *Neurosci Lett*, 1998, 252(1): 33–36.
- [28] Li X, Lu F, Wang JZ, et al. Concurrent alterations of O-GlcNAcylation and phosphorylation of tau in mouse brains during fasting [J]. *Eur J Neurosci*, 2006, 23(8): 2078–2086.

(修回日期)2013-04-12