DOI:10.16016/j.1000-5404.202011150

# pBDNF 过表达对转基因阿尔茨海默病鼠学习记忆功能的影响

许曼玉,张 园,易 旭,许志强 400042 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)大坪医院神经内科

[**摘要**] **目的** 探讨海马注射携带脑源性神经营养因子前肽(pBDNF)基因的腺相关病毒基因整合载体(AAV-pBDNF)对阿尔茨海默病鼠(AD 鼠)学习记忆功能的影响及可能机制。**方法** 选用 18 只 6 月龄 APP/PS1 转基因 AD 小鼠,采用抛硬币法随机分为空载体对照组、AAV-pBDNF 组、AAV-pBDNF+p75NTR 抗体组,每组 6 只。空载体对照组右侧海马注射 AAV-GFP(2 μL,$1\times10^{12}$ vg/mL),AAV-pBDNF 组右侧海马注射 AAV-pBDNF(2 μL,$1\times10^{12}$ vg/mL),AAV-pBDNF+p75NTR 抗体组右侧海马注射 AAV-pBDNF(2 μL,$1\times10^{12}$ vg/mL)和 p75NTR 抗体(2 μL,10 μg/mL)。海马注射 4 周后行 Morris 水迷宫实验检测 AD 鼠学习记忆能力的变化。免疫荧光检测 AAV-pBDNF 在 AD 鼠脑内转染情况。Western blot 检测海马突触后致密蛋白-95(postsynaptic density protein 95, PSD-95)的表达。**结果** 水迷宫实验结果显示:各组小鼠的运动速度无明显差异。第 5 天时,对照组与 AAV-pBDNF+p75NTR 抗体组小鼠的逃避潜伏期均较第 1 天有明显下降($P<0.05$),而 AAV-pBDNF 组 AD 鼠的逃避潜伏期虽然也较第 1 天有所缩短,但差异无统计学意义。AAV-pBDNF 组 AD 小鼠穿越平台次数较其余两组少($P<0.05$)。免疫荧光检测结果发现:AAV-pBDNF 转染之后,在脑内神经元成功表达 pBDNF,而胶质细胞不表达 pBDNF。Western blot 结果显示:AAV-pBDNF 组 AD 鼠的 PSD-95 表达量低于对照组和 AAV-pBDNF+p75NTR 抗体组($P<0.05$)。**结论** pBDNF 可能通过 p75NTR 受体信号通路下调海马 PSD-95 的表达,降低 AD 鼠的学习记忆能力。

[**关键词**] 脑源性神经营养因子前肽;阿尔茨海默病;学习记忆;海马突触后致密蛋白-95
[**中图法分类号**] R338.64; R341; R745.7 [**文献标志码**] A

# Exogenetic over-expression of pBDNF affects learning and memory in APPswePS1dE9 transgenic mice

XU Manyu, ZHANG Yuan, YI Xu, XU Zhiqiang Department of Neurology, Daping Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400042, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the effect and possible machanism of recombinant adeno-associated virus (rAAV) vector containing brain-derived neurotrophic factor propeptide (AAV-pBDNF) on learning and memory in APPswePS1dE9 transgenic mice (Alzheimer's disease, AD). **Methods** A total of 18 APPswePS1dE9 transgenic mice were randomly and equally divided into control group, AAV-pBDNF group and AAV-pBDNF+p75NTR antibody group. Recombinant AAV-pBDNF vector (2 μL, $1\times10^{12}$ vg/mL) were stereotaxically injected into the right side of the hippocampus in AAV-pBDNF group, AAV-GFP (2 μL, $1\times10^{12}$ vg/mL) into that of the control group, and same amount of AAV-pBDNF and p75NTR antibody (2 μL, 10 μg/mL) into that of the AAV-pBDNF+p75NTR antibody group. There were 6 mice in each group. Morris water maze test was performed in 4 weeks after hippocampal injection to detect the changes of learning and memory abilities in AD rats. Immunofluorescence assay was used to observe the transfection ofAAV-pBDNF in the brain. Western blotting was employed to measure the expression of postsynaptic density protein 95 (PSD-95) in the hippocampus. **Results** The results of Morris water maze showed that no significant difference was

[**基金项目**] 重庆市基础研究与前沿探索项目(CSTC2018jcyjAX0664)
[**通信作者**] 许志强,E-mail:xzq881@163.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

seen in the movement speed of each group ($P>0.05$); the escape incubation period on day 5 in the control group and AAV-pBDNF+p75NTR antibody group was significantly shorter than that of day 1 ($P<0.05$); similar result was seen in the pBDNF group though no statistical difference ($P>0.05$); and less platforms were crossed in the AD mice of the pBDNF group than those in the other 2 groups on day 6 in space exploration experiment ($P<0.05$). Immunofluorescence assay showed that after transfection, pBDNF was expressed in the neurons, but not glial cells in the hippocampus. Western blotting results indicated that the expression of PSD-95 was obviously lower in the AAV-pBDNF group than the other 2 groups ($P<0.05$). **Conclusion** pBDNF inhibits the learning and memory abilities of AD mice by down-regulating hippocampal expression of PSD-95.

[**Key words**] brain-derived neurotrophic factor propeptide; Alzheimer's disease; learning and memory; postsynaptic density protein 95

Supported by the Project of Basic Research and Frontier Exploration of Chongqing (CSTC2018jcyjAX0664). Corresponding author: XU Zhiqiang, E-mail: xzq881@163.com

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是中老年常见神经系统退行性疾病,也是痴呆发生的最常见原因[1]。AD的致病原因和发病机制目前还不清楚,缺乏有效干预措施[2]。脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor,BDNF)在AD发生、发展过程中的作用越来越受到重视[3]。BDNF首先是以脑源性神经营养因子前体蛋白(precursor of brain-derived neurothrophic factor,proBDNF)的形式由细胞合成和分泌。proBDNF裂解后产生脑源性神经营养因子前肽(BDNF propeptide, pBDNF)和成熟BDNF(mature BDNF,mBDNF)。BDNF能起到促进细胞增殖、分化和存活,促进长时程增强(long-term potentiation, LTP),促进突触生长、突触传递以及可塑性的作用,改善AD鼠的认知功能[4-5],而proBDNF能够加剧AD鼠脑内β淀粉样蛋白(Aβ)沉积[6],抑制海马神经元增殖,促进细胞凋亡,降低突触可塑性,从而降低小鼠的学习与记忆功能[7]。近期研究表明:在AD患者的海马标本中,pBDNF水平是健康人的16倍,而pBDNF/BDNF比值是健康人的30倍;pBDNF能够与Aβ蛋白一起在AD的发生、发展中发挥协同毒性作用[8]。但有关pBDNF在AD发病中的作用及机制尚不明确,因此,本研究采用AD鼠海马注射携带pBDNF基因的腺相关病毒基因整合载体(AAV-pBDNF),观察内源性pBDNF对AD鼠学习与记忆功能以及海马突触后致密蛋白-95(postsynaptic density protein 95,PSD-95)表达的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与分组

采用阿尔茨海默病模型转基因小鼠为实验动物,购自江苏集萃药康生物科技有限公司(APPswePS1dE9,18只,雄性,4月龄,体质量28~32 g),饲养于本院实验动物中心。当AD鼠长至6月龄时,采用抛硬币法随机分为空载体对照组、AAV-pBDNF组、AAV-pBDNF+p75NTR抗体组,每组6只。空载体对照组右侧海马注射AAV-GFP(2 μL,$1\times10^{12}$ vg/mL,和元生物,中国),pBDNF组右侧海马注射AAV-pBDNF(2 μL,$1\times10^{12}$ vg/mL,和元生物,中国),pBDNF+p75NTR抗体组右侧海马注射AAV-pBDNF(2 μL,$1\times10^{12}$ vg/mL)和p75NTR抗体(2 μL,10 μg/mL,Alomone,以色列)。AAV-pBDNF和AAV-GFP血清型皆为AAV8,对神经系统靶向性强。

### 1.2 右侧海马药物注射

6%水合氯醛腹腔注射麻醉小鼠,固定于立体定位仪,头部剃毛,从小鼠头部中缝处剪开皮肤,把囟门作为中心点,坐标点的定位坐标值为:前后-1.75 mm,右侧旁开2.3 mm。然后用小电钻在颅骨上钻1个小孔。再次定位后穿刺1.5 mm深,此时针尖到达右侧海马部位,采用微量注射器以0.5 μL/mL的速度进行注射。注射完毕后针头停留5 min再缓慢拔针,防止注射药物溢出。缝皮、固定,手术之后安静放置,注意保暖,观察30 min,小鼠没有异常后,1只/笼继续饲养。

### 1.3 水迷宫实验检测AD鼠的学习记忆功能

所有小鼠于海马注射4周后进行Morris水迷宫实验。将圆形游泳池分为4个象限,在第3象限内放置1个20 cm高的平台,加入自来水至水面约高于平台2 cm。小鼠先学习训练5 d:将小鼠从1、2、4象限分别3次放入游泳池中,若小鼠在1 min内找到平台,并在平台上停留>3 s,则系统自动停止录像;若1 min后仍没找到平台,则引导它停留在平台上10 s;接下来另外2个象限重复实验。到第6天时,撤去平台,记录小鼠在第3象限内的时间和穿越平台的次数。

### 1.4 免疫荧光检测AAV-pBDNF在AD鼠脑内转染情况

水迷宫检测完毕后,次日处死小鼠并取材,右侧半

脑组织用于免疫组化,左侧半脑组织用于 Western blot 实验。右侧半脑组织固定、脱水后冰冻切片,每片约 35 μm。每组动物分别取 2 组脑片,清洗、打孔、封闭。然后其中 1 组脑片加入鼠来源 NeuN 抗体(1∶500,Abcam,英国),另 1 组脑片加入鼠来源 GFAP 抗体(1∶1 000,Abcam,英国),4 ℃过夜。PBST 清洗脑片后加入 Cy3 鼠来源抗体(1∶500,Abcam,英国),37 ℃孵箱避光孵育 1 h。贴片,荧光显微镜下拍照,观察 AAV-pBDNF 的转染情况。

### 1.5　Western blot 检测 AD 鼠脑内 PSD-95 表达水平

取左侧半脑组织,裂解、取上清,制成样本后放入冰箱保存待用。免疫印迹法跑电泳,转膜后牛奶封闭 1 h,一抗 4 ℃过夜,加一抗为兔来源 PSD-95 抗体(1∶500,CST,美国)和小鼠来源 β-actin(1∶1 000,Sigma,美国)。再加二抗为兔来源 IRDye 800CW 荧光抗体和小鼠来源 IRDye 800CW(1∶1 000,LI-COR,美国)。再加二抗避光室温 1 h。洗膜后显影,Image J 软件计算各个目的条带的灰度值,用 PSD-95/β-actin 值来表示 PSD-95 的相对蛋白表达量。

### 1.6　统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0 统计与制图,所有计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,水迷宫实验前 5 d 各组之间的游泳速度比较应用双因素方差分析,其他指标:两组间比较采用独立样本 $t$ 检验,多组间比较采用单因素方差分析。检验水准:$\alpha=0.05$。

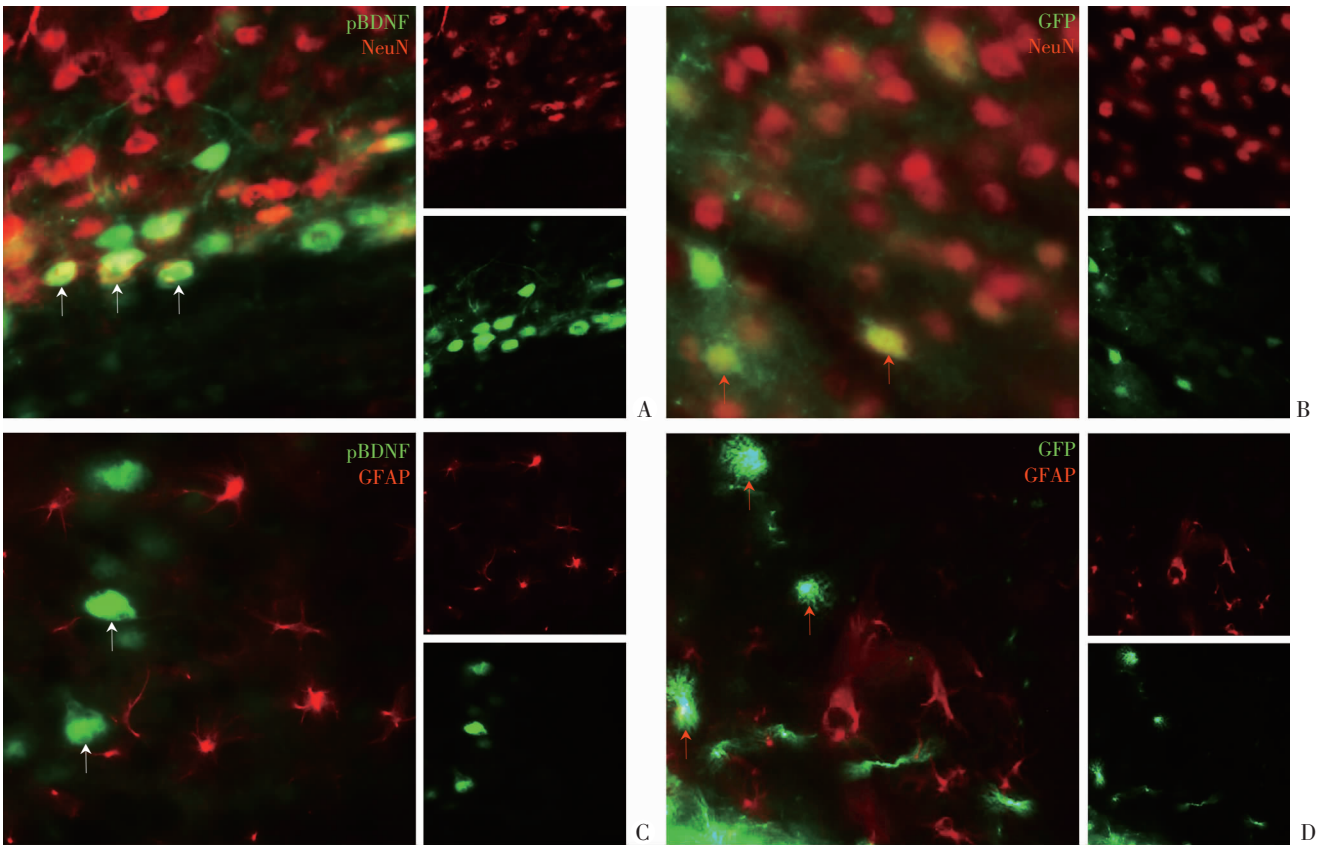
## 2　结果

### 2.1　AAV-pBDNF 在 AD 鼠脑内转染情况

免疫荧光检测结果发现:AAV-pBDNF 和 AAV-GFP 集中表达于神经元内,而胶质细胞内未见 pBDNF 或者 GFP 表达(图 1)。

### 2.2　AAV-pBDNF 对 AD 鼠学习记忆能力的影响

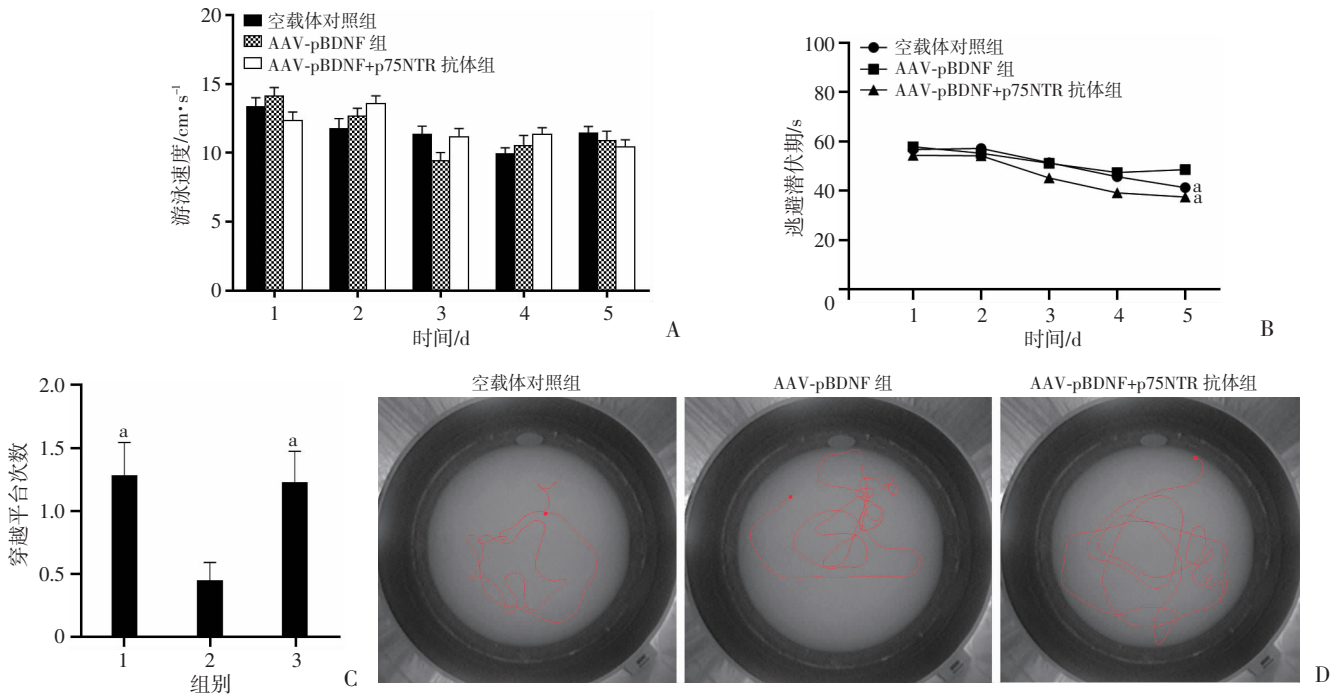
水迷宫实验结果显示:在水迷宫实验前 5 d,同 1 d 内各组小鼠的运动速度无明显差异。第 5 天时,对照组($P=0.004\ 5$,$F=4.054$)与 AAV-pBDNF+p75NTR 抗体组($P=0.002\ 4$,$F=4.504$)的逃避潜伏期均较第 1 天有明显下降,而 pBDNF 组 AD 鼠的逃避潜伏期虽然也较第 1 天有所缩短,但差异无统计学意义。在空间探索实验中,AAV-pBDNF 组 AD 小鼠穿越平台次数较其余两组少($P=0.020\ 1$,$F=4.225$),而 AAV-pBDNF+p75NTR 抗体组小鼠平台穿越次数与对照组相比无明显差异(图 2)。




白色箭头示 pBDNF 阳性细胞;红色箭头示 GFP 阳性细胞

A:pBDNF 与 NeuN 共染;B:GFP 与 NeuN 共染;C:pBDNF 与 GFAP 共染;D:GFP 与 GFAP 共染

**图 1　AAV-pBDNF 在 AD 鼠脑内转染情况**　(×40)



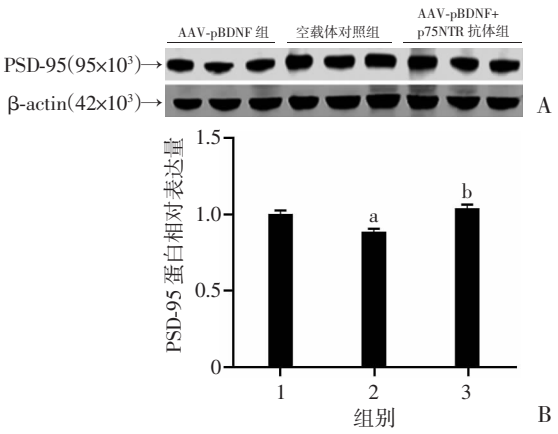

a:$P<0.05$,与 AAV-pBDNF 组比较

A:各组小鼠的游泳速度;B:各组小鼠找到平台的潜伏期;C:各组小鼠穿越平台次数 1:空载体对照组;2:AAV-pBDNF 组;3:AAV-pBDNF+p75NTR 抗体组;D:各组小鼠游泳轨迹图

**图 2 AAV-pBDNF 对 AD 鼠学习记忆能力的影响**

### 2.3 AAV-pBDNF 对 AD 鼠脑内 PSD-95 表达的影响

Western blot 检测结果显示:AAV-pBDNF 组 PSD-95 表达量低于对照组和 pBDNF+p75NTR 抗体组($P<0.05$),而 AAV-pBDNF+p75NTR 抗体组 PSD-95 表达量与对照组比较差异无统计学意义(图 3)。




A:Western blot 检测;B:半定量分析 1:空载体对照组;2:AAV-pBDNF 组;3:AAV-pBDNF+p75NTR 抗体组;a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.01$,与 AAV-pBDNF 组比较

**图 3 AAV-pBDNF 对 AD 小鼠 PSD-95 表达的影响**

## 3 讨论

BDNF 是神经营养因子家族中重要的一员,BDNF 首先是以前体蛋白 proBDNF 的形式由细胞合成和分泌,proBDNF 在细胞内被弗林酶、前体蛋白转化酶,或者被分泌到细胞外并被血浆纤维溶酶和基质金属蛋白酶-9 等蛋白裂解酶裂解,释放出 pBDNF 和 mBDNF,pBDNF、proBDNF、mBDNF 三者共同存在于中枢神经系统中[9-10]。在生理状态下,海马部位 pBDNF 与 mBDNF 等摩尔存在,但含量比 proBDNF 高 10 倍以上[11]。pBDNF 分子质量约为 $17\times10^3$,是 proBDNF 的 N 端片段[12]。既往认为 pBDNF 只是参与 BDNF 的修饰及转运,其本身无生物学活性且很快被降解,近年的研究表明 proBDNF 裂解后产生的 pBDNF 本身有着重要作用[1]。Met-pBDNF 可改变神经元形态,抑制培养海马神经元生长锥;Val-pBDNF 促进海马长时程抑制,而 Met-pBDNF 抑制海马长时程抑制;Val-pBDNF 还可抑制短粗树突的生长,降低树突棘数量[13]。临床研究表明重度抑郁症患者脑脊液内 pBDNF 水平降低,尤其是男性患者下降更为明显[14-15],同时还发现 Met-

pBDNF 可以降解树突棘进而减少海马神经元的突触形成,从而改变了恐惧消退的路径[16]。在 1 项尸检研究中发现:抑郁症患者的顶叶皮层中 mBDNF 水平较低,而 pBDNF 水平较高[17]。说明 pBDNF 参与了神经精神疾病的发生、发展。

本研究采用转基因 AD 鼠海马注射携带 pBDNF 基因的腺相关病毒基因整合载体(AAV-pBDNF),免疫组化结果表明:AAV-pBDNF 集中表达于神经元内,而胶质细胞内未见 pBDNF,说明 AAV-pBDNF 在神经元成功转染。水迷宫实验结果表明:海马注射 AAV-pBDNF 及 p75NTR 抗体对 AD 鼠的运动速度无明显影响。海马注射 AAV-pBDNF 后 AD 鼠学习及记忆能力均明显下降,而海马同时注射 AAV-pBDNF 和 p75NTR 抗体(中和 p75NTR 受体)后,AD 鼠学习及记忆能力与对照组比较无明显差异,说明 pBDNF 可能通过 p75NTR 信号通路降低 AD 鼠的学习记忆能力。

PSD-95 是兴奋性突触后致密区核心构架蛋白,具有调节、聚合受体,稳定突触连接结构以及传导膜受体信号的作用,主要参与调控突触可塑性及皮质和海马神经元长时程增强效应(LTP),在记忆形成和信息传递中发挥重要的调控作用[10,18-19]。本研究结果表明:AD 鼠海马注射 AAV-pBDNF 后 AD 鼠脑内 PSD-95 含量较 AAV-GFP 组降低,提示其神经突触后兴奋性传递水平下降,pBDNF 使 PSD-95 表达下降,提示这也许是 AD 鼠学习记忆功能下降的原因之一。而海马同时注射 AAV-pBDNF 和 p75NTR 抗体后,PSD-95 含量与对照组无明显差异,说明 p75NTR 抗体中和 p75NTR 后能够拮抗 pBDNF 的作用,pBDNF 可能通过 p75NTR 信号通路降低 PSD-95 的表达。

本研究结果显示:AD 鼠海马注射 AAV-pBDNF 后穿越平台次数减少、逃避潜伏期无明显缩短、学习记忆能力下降、PSD-95 的表达降低,而 p75NTR 抗体能够拮抗 AAV-pBDNF 上述作用,说明 pBDNF 可能通过 p75NTR 信号通路降低 PSD-95 的表达,导致 AD 鼠的学习记忆能力下降。本研究初步发现 BDNF 代谢过程中产生的 pBDNF 可能参与了 AD 的发病,为进一步了解 pBDNF 在神经精神疾病中的作用提供参考。但本研究仍然存在一定的局限性。例如,p75NTR 抗体可能还通过阻断其他信号通路来促进 AD 鼠的学习记忆功能与 PSD-95 表达;p75NTR 是否作为 pBDNF 主要受体传导信号,影响其功能;AD 鼠突触可塑性功能的变化还需要更多的实验进行验证。因此,在未来的研究中,可以进一步研究 pBDNF 对 AD 鼠脑内其他蛋白表达以及神经功能的影响,以及 p75NTR 具体是如何调控 pBDNF 作用的。

**参考文献:**


[1] 许曼玉, 许志强. 不同形态脑源性神经营养因子与阿尔茨海默病关系研究进展[J]. 重庆医学, 2019, 48(6): 1025-1028.
XU M Y, XU Z Q. Research progress on the relationship between different forms of brain-derived neurotrophic factors and Alzheimer's disease[J]. Chongqing Med, 2019, 48(6): 1025-1028.

[2] JOE E, RINGMAN J M. Cognitive symptoms of Alzheimer's disease: clinical management and prevention[J]. BMJ Clin Res Ed, 2019, 367: l6217. DOI:10.1136/bmj.l6217.

[3] FOLTRAN R B, DIAZ S L. BDNF isoforms: a round trip ticket between neurogenesis and serotonin? [J]. J Neurochem, 2016, 138(2): 204-221. DOI:10.1111/jnc.13658.

[4] HARWARD S C, HEDRICK N G, HALL C E, *et al*. Autocrine BDNF-TrkB signalling within a single dendritic spine[J]. Nature, 2016, 538(7623): 99-103. DOI:10.1038/nature19766.

[5] KUIPERS S D, TRENTANI A, TIRON A, *et al*. BDNF-induced LTP is associated with rapid Arc/Arg3.1-dependent enhancement in adult hippocampal neurogenesis[J]. Sci Rep, 2016, 6: 21222. DOI:10.1038/srep21222.

[6] CHEN J, ZHANG T, JIAO S, *et al*. proBDNF accelerates brain amyloid-β deposition and learning and memory impairment in APPswePS1dE9 transgenic mice[J]. J Alzheimers Dis, 2017, 59(3): 941-949. DOI:10.3233/jad-161191.

[7] CHEN J, LI C R, YANG H, *et al*. proBDNF attenuates hippocampal neurogenesis and induces learning and memory deficits in aged mice[J]. Neurotox Res, 2016, 29(1): 47-53. DOI:10.1007/s12640-015-9568-2.

[8] LIM J Y, REIGHARD C P, CROWTHER D C. The pro-domains of neurotrophins, including BDNF, are linked to Alzheimer's disease through a toxic synergy with Aβ[J]. Hum Mol Genet, 2015, 24(14): 3929-3938. DOI:10.1093/hmg/ddv130.

[9] GUO J, JI Y, DING Y, *et al*. BDNF pro-peptide regulates dendritic spines *via* caspase-3[J]. Cell Death Dis, 2016, 7: e2264. DOI:10.1038/cddis.2016.166.

[10] 许曼玉, 陈甲, 许志强. AAV-proBDNF 对阿尔茨海默病

鼠海马 DCX 阳性细胞数及 PSD-95 表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2019, 41(2): 95-99. DOI:10.16016/j.1000-5404.201808088.
XU M Y, CHEN J, XU Z Q. Effects of AAV-proBDNF on hippocampal DCX positive cells and PSD-95 expression in Alzheimer's disease mice[J]. J Third Mil Med Univ, 2019, 41(2): 95-99. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201808088.

[11] ANASTASIA A, DEINHARDT K, CHAO M V, *et al*. Val66Met polymorphism of BDNF alters prodomain structure to induce neuronal growth cone retraction[J]. Nat Commun, 2013, 4: 2490. DOI:10.1038/ncomms3490.

[12] HASHIMOTO K. Regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its precursor proBDNF in the brain by serotonin[J]. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci, 2016, 266(3): 195-197. DOI:10.1007/s00406-016-0682-9.

[13] ZANIN J P, UNSAIN N, ANASTASIA A. Growth factors and hormones pro-peptides: the unexpected adventures of the BDNF prodomain[J]. J Neurochem, 2017, 141(3): 330-340. DOI:10.1111/jnc.13993.

[14] KOJIMA M, MATSUI K, MIZUI T. BDNF pro-peptide: physiological mechanisms and implications for depression [J]. Cell Tissue Res, 2019, 377(1): 73-79. DOI:10.1007/s00441-019-03034-6.

[15] MIZUI T, HATTORI K, ISHIWATA S, *et al*. Cerebrospinal fluid BDNF pro-peptide levels in major depressive disorder and schizophrenia[J]. J Psychiatr Res, 2019, 113: 190-198. DOI:10.1016/j.jpsychires.2019.03.024.

[16] GIZA J I, KIM J, MEYER H C, *et al*. The BDNF Val66Met prodomain disassembles dendritic spines altering fear extinction circuitry and behavior[J]. Neuron, 2018, 99(1): 163-178.e6. DOI:10.1016/j.neuron.2018.05.024.

[17] YANG B, REN Q, ZHANG J C, *et al*. Altered expression of BDNF, BDNF pro-peptide and their precursor proBDNF in brain and liver tissues from psychiatric disorders: rethinking the brain-liver axis[J]. Transl Psychiatry, 2017, 7(5): e1128. DOI:10.1038/tp.2017.95.

[18] LISEK M, FERENC B, STUDZIAN M, *et al*. Glutamate deregulation in ketamine-induced psychosis-A potential role of PSD95, NMDA receptor and PMCA interaction[J]. Front Cell Neurosci, 2017, 11: 181. DOI:10.3389/fncel.2017.00181.

[19] HORGUSLUOGLU-MOLOCH E, NHO K, RISACHER S L, *et al*. Targeted neurogenesis pathway-based gene analysis identifies ADORA2A associated with hippocampal volume in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease[J]. Neurobiol Aging, 2017, 60: 92-103. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2017.08.010.

(**收稿**:2020-11-17;**修回**:2020-12-19)

(编辑 吴培红)