XXXX DOI:

阿尔茨海默病APP/PS1小鼠模型的认知障碍与海马蛋白质组学变化的关联研究

易祯禛[1],戴佳琳[1],安小琼[3],王 健[2],熊 玲[2],范忠豪[2],汪家文[1]
(1.贵州医科大学法医学院,贵阳 550004;2.赣南医科大学基础医学院,赣州 341000;
3.贵州医科大学基础医学院,贵安 561113)

【摘 要】目的:阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)是一种以进行性认知功能衰退为特征的神经退行性疾病,其发病机制主要包括β淀粉样蛋白(amyloid β-protein,Aβ)沉积、神经炎症和突触功能障碍等多种病理过程。本研究旨在通过整合蛋白质组学和行为学分析,揭示淀粉样前体蛋白/早老素1(Amyloid Precursor Protein/Presenilin 1,APP/PS1)双转基因的AD小鼠模型中关键分子的变化。**方法:**采用4D无标记定量液相色谱-串联质谱(Four-dimensional Label-free Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry,4D Label-free LC-MS/MS)技术对6月龄APP/PS1小鼠海马组织进行蛋白质组学分析,结合Morris水迷宫行为学评估(结果显示该模型存在显著空间记忆障碍)和生物信息学方法。**结果:**共鉴定出5803个蛋白质,其中73个差异表达蛋白(39个上调和34个下调)。功能富集分析表明这些蛋白显著参与神经系统发育、免疫反应、溶酶体通路和Notch信号通路等与AD相关的生物学过程。关键蛋白对应基因分析发现,与神经炎症和凋亡相关的基因表达上调,如组织蛋白酶S(Cathepsin S,Ctss)、补体C1q B链(complement C1q B chain,C1qb)、棕榈酰蛋白硫酯酶1(palmitoyl-protein thioesterase 1,Ppt1)等基因;而神经保护因子等下调,如核受体亚家族3C组成员1(nuclear receptor subfamily 3 group C member 1,Nr3c1)、CDK5调控亚基相关蛋白3(CDK5 regulatory subunit associated protein 3,Cdk5rap3)等基因。蛋白质印迹(Western blot,WB)验证结果与质谱数据一致。染色体定位分析进一步揭示了这些基因的基因组分布特征,提示其可能存在协同调控机制。**结论:**本研究系统揭示了APP/PS1小鼠海马区的蛋白质组特征,发现溶酶体功能障碍和补体系统激活可能促进AD相关病理过程。上述结果不仅为AD的早期诊断提供了潜在生物标志物(如Ctss和C1qb),也为靶向神经炎症和蛋白质代谢紊乱的多靶点治疗策略的制定奠定了理论基础。

【关键词】阿尔茨海默病;淀粉样前体蛋白/早老素1双转基因小鼠;认知功能损害;蛋白质组学;基因本体;通路分析
【中图分类号】R749.16 **【文献标志码】**A

Association between cognitive impairment and hippocampal proteomic alterations in an APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease

Yi Zhenzhen[1], Dai Jialin[1], An Xiaoqiong[3], Wang Jian[2], Xiong Ling[2], Fan Zhonghao[2], Wang Jiawen[1]
(*1.School of Forensic Medicine, Guizhou Medical University; 2.School of Basic Medicine, Gannan Medical University; 3.School of Basic Medicine, Guizhou Medical University*)

【Abstract】*Objective*: Alzheimer's disease(AD) is a neurodegenerative disease characterized by progressive cognitive decline, and its pathogenesis involves various pathological processes such as β-amyloid(Aβ) deposition, neuroinflammation, and synaptic dysfunction. This study aims to investigate key molecular changes in an APP/PS1 transgenic mouse model of AD by integrating proteomic and behavioral analyses. ***Methods*:** The 4D Label-free LC-MS/MS technique was used to perform a proteomic analysis on the hippocampal tissue of APP/PS1 mice aged 6 months, and the Morris water maze test was used for behavioral assessment (the results showed significant spatial memory impairment in this model). Bioinformatics methods were also applied. ***Results*:** A total of 5803 proteins were identified, including 73 differentially expressed proteins(39 upregulated proteins and 34 downregulated proteins). The functional enrichment analysis showed that these proteins were significantly involved in AD-related biological processes such as nervous system development, immune response, lysosomal pathway, and the Notch signaling pathway. The key gene analysis showed that the genes related to neuroinflammation and apoptosis(such as Ctss, C1qb, and Ppt1) were upregulated, while neuroprotective factors (such as Nr3c1 and Cdk5rap3) were downregulated. The results of Western blot validation were consistent with mass spectrometry data. The chromosomal localization analysis further revealed the genomic distribution characteristics of these genes, suggesting the presence of potential co-regulatory mechanisms. ***Conclusion*:** This study systematically re-

作者介绍:易祯禛,Email:757343897@qq.com,
研究方向:法医学。
通信作者:汪家文,Email:wjwwfs@126.com。
基金项目:贵州省科技计划资助项目(编号:黔科合基础MS(2025)026)。

ports the proteomic characteristics of the hippocampal region in APP/PS1 mice, and the results show that lysosomal dysfunction and complement system activation may be involved in AD-related pathological processes. The above results not only provide potential biomarkers (such as Ctss and C1qb) for the early diagnosis of AD, but also lay a theoretical foundation for the development of multi-target therapeutic strategies for neuroinflammation and protein metabolic disorders.

【Key words】Alzheimer's disease; APP/PS1 transgenic mice; cognitive impairment; proteomics; gene ontology; pathway analysis

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种进行性神经退行性疾病,以认知功能衰退和行为障碍为主要临床特征,严重损害患者的日常生活能力[1-2]。随着全球人口老龄化进程加剧,AD的患病率持续攀升,而早期诊断与有效治疗对改善患者的预后至关重要[3]。目前,AD的诊断主要基于临床症状和影像学检查,现有治疗手段以缓解症状为主,尚无法逆转该疾病进程[4-5]。因此,深入探索其潜在的分子机制并寻找有效的治疗靶点,已成为该领域研究的重要方向。

现有研究表明,AD的发病机制复杂,涉及神经炎症、凋亡和自噬等多种生物学过程[6-8]。其中,β淀粉样蛋白(amyloid β-protein, Aβ)沉积与tau蛋白异常磷酸化被视为AD的核心病理标志,而神经炎症则可能进一步加剧神经元的损伤[9-10]。尽管已有诸多研究逐步揭示了上述机制,但由于AD具有显著的异质性,其具体的分子基础及各机制间的相互作用仍需深入探索,旨在为寻找新的生物标志物和治疗靶点提供方向[11-12]。

本研究采用4D无标记(Four-dimensional Label-free, 4D Label-free)蛋白质组学定量技术,对AD模型小鼠海马组织进行蛋白质组学分析,重点关注与神经炎症、凋亡和自噬相关的蛋白质。该方法具有高灵敏度与高通量的特点,能够全面覆盖低丰度蛋白质[13-15],这为系统探究AD的发病机制提供了有效手段。本研究通过对差异表达蛋白进行筛选及功能富集分析,旨在阐明这些差异蛋白在AD发生发展中的具体作用,以期为早期诊断和靶向治疗提供理论依据。

本研究旨在通过行为学实验与生物信息学方法相结合,系统分析并验证AD相关的关键蛋白质。借助4D无标记蛋白质组学定量技术,可对海马组织差异表达蛋白进行系统鉴定,为深入解析AD的病理机制奠定基础[16-17]。

综上所述,AD研究亟需采用多组学整合分析策略,以揭示其复杂的分子调控网络。本研究运用高灵敏度蛋白质组学技术并结合生物信息学分析,有望为AD的早期诊断与靶向治疗提供新的方向与理论支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料

组织蛋白酶S(Cathepsin S, Ctss)抗体(上海爱必信生物科技有限公司, abs111068)1∶1000、补体C1q B链(complement C1q B chain, C1qb)抗体(上海爱必信生物科技有限公司, abs174173)1∶1 000、抗核受体亚家族3C组成员1(nuclear receptor subfamily 3 group C member 1, Nr3c1)抗体(上海爱必信生物科技有限公司, abs100327)1∶1 000、抗CDK5调控亚基相关蛋白3(CDK5 regulatory subunit associated protein 3, Cdk5rap3)抗体(上海爱必信生物科技有限公司, abs159129)1∶1 000、棕榈酰蛋白硫酯酶1(palmitoyl-protein thioesterase 1, Ppt1)抗体(上海爱必信生物科技有限公司, abs100418)1∶1000及抗β-肌动蛋白(β-Actin)抗体(上海爱必信生物科技有限公司, abs830031)1∶2 000,增强型化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)试剂(Proteintech, PK10011)。

1.2 动物实验

本研究中的所有动物实验方案均经赣南医科大学生物医学研究伦理委员会批准,编号:2025-557。实验所用的6月龄雄性C57BL/6J小鼠及APP/PS1双转基因小鼠购自上海SLAC实验动物有限公司。动物饲养于温度(21±2)℃、湿度(60%~75%)可控环境中,维持12 h/12 h光暗周期,自由摄食饮水。为评估小鼠认知功能,实验结束前进行了行为学测试。测试结束后,小鼠禁食过夜(期间自由饮水)。随后称重,并通过颈椎脱位法实施安乐死。每组实验均包含6只雄性小鼠,全部用于蛋白质组学分析。安乐死由经验丰富的人员实施,并采用温和的麻醉技术,以最大限度地减轻动物痛苦。安乐死后立即分离双侧海马组织,用于后续实验。

1.3 方法

1.3.1 行为学评估 本研究利用Morris水迷宫实验测试小鼠的空间学习与记忆能力,包括空间探索和导航测试。定位导航实验共进行5 d,其中前4 d为训练阶段,第5天为正式测试。训练期间,每天在固定时间段进行多次测试,每次将小鼠随机从水池周边的4个入水点放入水中,允许其在90 s内寻找隐藏平台。每次训练间隔15 min,期间小鼠被安置于配有加热灯的干燥鼠笼里。若小鼠在90 s内未能找到平台,则用引导棒轻轻引导至平台上。第5天完成定位导航实验后,移除平台,进行空间探索实验。选择距离原平台位置最远的象限作为入水点。实验中记录以下参数:小鼠在各象限停留时间、穿越原平台位置的次数、总游泳距离以及找到平台的潜伏期。实验过程中,通过视频跟踪系统记录小鼠游泳轨迹,并使用SMART V3.0软件进行分析。

1.3.2 蛋白质的提取 样品在液氮中研磨成粉末后转移至5 mL离心管中，加入适量的裂解液，并在冰上进行高强度超声处理（重复3次）。随后，于4 ℃、12000×*g*条件下离心10 min，上清液用于后续蛋白定量。采用二喹啉甲酸（Bicinchoninic Acid，BCA）蛋白测定试剂盒对上清液中的蛋白质含量进行定量分析。

1.3.3 液相色谱-串联质谱分析 采用液相色谱-串联质谱法（Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry，LC-MS/MS）进行分析。肽段溶解于液相色谱溶剂A（含0.1%甲酸、2%乙腈），超高效液相色谱系统（EASY-nLC 1200）进行分离。梯度洗脱条件如下：0~68 min，溶剂B（含0.1%甲酸、90%乙腈）由6%线性上升至23%；68~82 min，升至32%；82~86 min，升至80%；86~90 min，维持80%溶剂B；流速500 nL/min。经色谱分离后的肽段通过ESI离子源电离，进入质谱仪（Orbitrap Exploris™ 480）检测。离子源电压2.3 kV，补偿电压-45 V。一级扫描在Orbitrap上进行，质量范围m/z 400~1200，分辨率60000。选取信号最强的25个母离子通过高能碰撞解离进行碎裂（碎裂能量为27%）。碎片离子以固定m/z 110为起点进行二级扫描，分辨率15 000。数据采集为数据依赖模式，动态增益控制（Automatic gain contro，AGC）目标设为100%，离子信号阈值50000 counts/s，最大注入时间自动优化，并启用20 s动态排除。蛋白质谱定量（Turbo Tandem Mass Tag，Turbo TMT）功能处于关闭状态。

1.3.4 数据库搜索及选定蛋白质的定量分析 本研究采用以下流程对质谱数据进行分析：首先，使用MaxQuant搜索引擎（v.1.6.15.0）处理MS/MS数据，数据库为小鼠Mus musculus蛋白数据库。初步搜索的前体离子质量容差为20 ppm，主搜索容差降至5 ppm，碎片离子质量容差0.02 Da。固定修饰为半胱氨酸的氨基甲酰基，可变修饰包括蛋白质N-末端乙酰化和甲硫氨酸氧化。在此阶段，将假发现率（False Discovery Rate，FDR）控制在1%以下以进行初步筛选。质谱原始数据在完成数据库检索后，需执行严格的质量控制评估，以确保分析结果符合既定标准；关键评估维度涵盖肽段长度分布、肽段数量统计、蛋白质序列覆盖率以及蛋白质相对分子质量分布。随后，为进一步分析，本研究使用Proteome Discoverer（v2.4.1.15）软件对二级质谱数据进行再次搜索，并添加诱饵数据库以计算FDR。搜索参数设定为：最小肽长度6，最大肽修饰数3，一级母离子质量容差10 ppm，二级碎片离子容差0.02 Da。固定修饰为半胱氨酸的氨基甲酰化，可变修饰包括乙酰化、甲硫氨酸氧化及其组合。在此次鉴定中，对蛋白质、肽段和肽段-谱图匹配（Peptide-Spectrum Match，PSM）均设置1%的FDR阈值，并要求蛋白质至少由一个独特肽段鉴定。

1.3.5 生物信息学数据的可视化 为了系统阐明已识别蛋白质的功能特性，本研究进行了系统的功能注释分析，涵盖基因本体（gene ontology，GO）分类、蛋白质结构域鉴定、京都基因和基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG）通路注释以及基因集富集分析（gene set enrichment analysis，GSEA）。随后，利用R语言中的pheatmap软件包绘制热图，直观呈现蛋白质功能的聚类结果。最后，为进一步展示不同生物过程与通路中基因的表达变化，本课题组借助ggplot2包（v3.3.6）绘制了GO与KEGG气泡图，从而在GO和KEGG框架下实现对基因集表达模式的深入解析。此外，通过circlize包（v0.4.15）将差异蛋白对应基因进行了染色体定位可视化，以展示基因在染色体上的分布及其与遗传特征间的潜在关联。

1.3.6 蛋白质印迹（Western blot，WB）实验 使用含蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液从组织中提取总蛋白。采用BCA法测定蛋白浓度。等量的蛋白质通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis，SDS-PAGE）进行分离，随后转印至聚偏二氟乙烯（Polyvinylidene Fluoride Membrane，PVDF）膜上。用5%脱脂牛奶在室温下封闭1 h后，将膜与以下一抗在4 ℃下孵育过夜：抗Ctss抗体1∶1 000（上海爱必信生物科技有限公司，abs111068）、抗C1qb抗体1∶1000（上海爱必信生物科技有限公司，abs174173）、抗Nr3c1抗体1∶1000（上海爱必信生物科技有限公司，abs100327）、抗Cdk5rap3抗体1∶1000（上海爱必信生物科技有限公司，abs159129）、抗Ppt1抗体1∶1000（上海爱必信生物科技有限公司，abs100418）以及抗β-Actin抗体1∶2000（上海爱必信生物科技有限公司，abs830031）。洗膜后，将膜与二抗（上海爱必信生物科技有限公司，1∶5 000）在室温下孵育1 h。使用ECL底物显影条带，并通过化学发光检测系统成像。使用Image J软件对条带强度进行定量分析，并以β-Actin为内参进行标准化。

1.4 统计学处理

使用GraphPad Prism 9.0软件（GraphPad Software，USA）进行统计分析。计量资料经Shapiro-Wilk检验评估正态性，符合正态分布者以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示；两组间比较采用独立样本t检验（方差齐性经Levene检验确认）。对于测序及蛋白质组学数据，组间差异比较采用Bonferroni法进行多重比较校正，校正后显著性阈值设为$\alpha'=0.05/m$（m为比较次数）。所有检验均为双侧，检验水准$\alpha=0.05$。

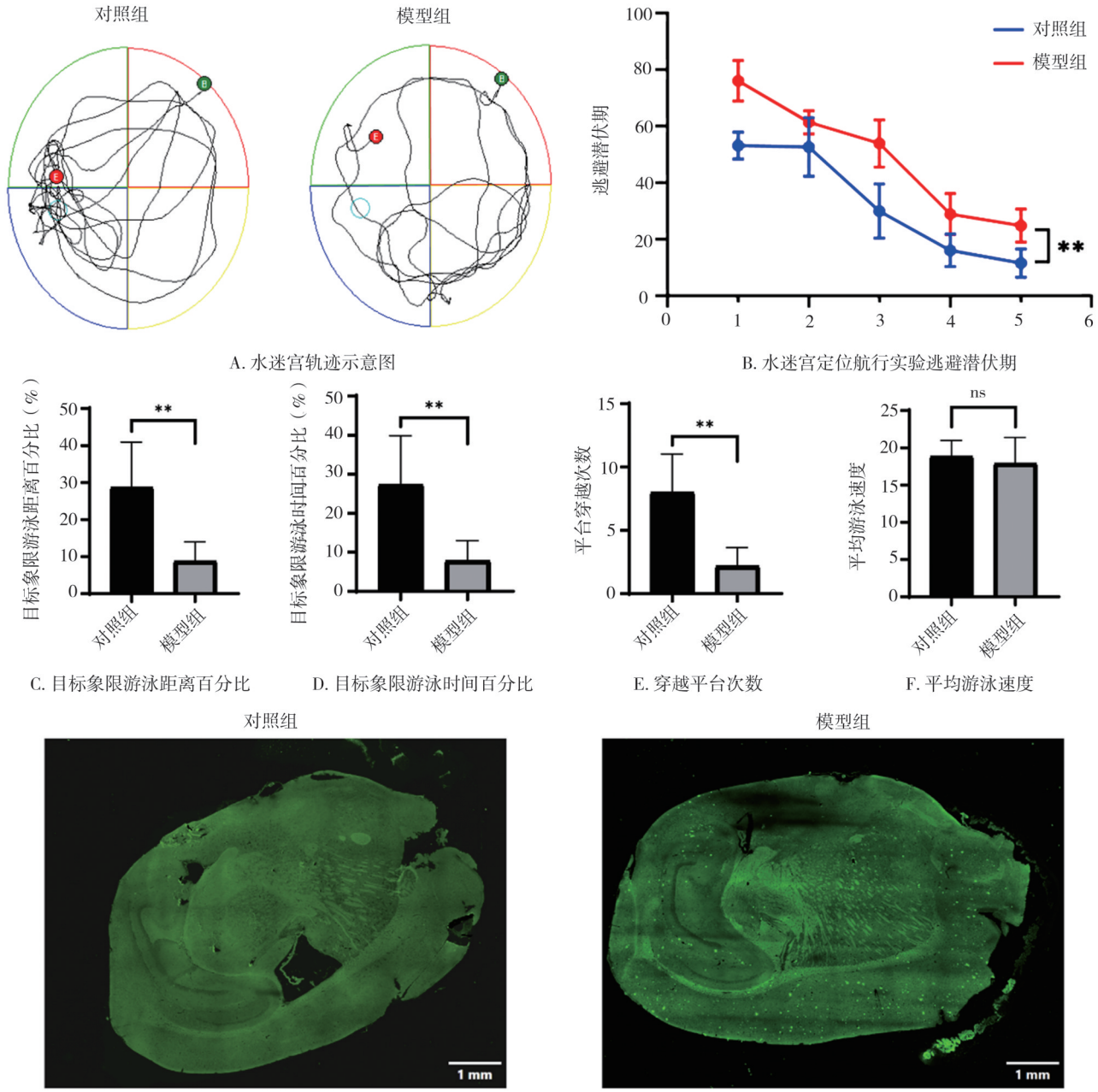
2 结 果

2.1 行为学评估APP/PS1转基因小鼠的认知功能

在开展4D无标记蛋白质组学分析前，本课题组首先通过水迷宫测试评估了6月龄APP/PS1转基因小鼠与野生型（wild type，WT）小鼠的学习与记忆能力。结果显示，APP/PS1小鼠的平均逃避潜伏期显著长于对照组（图1B）。同时，与对照组相比，APP/PS1小鼠在目标象限停留的时间与距离均更短，穿越原平台位置的次数也显著减少（图1A、C~E）。两组小鼠在游泳速度上无显著差异（图1F），表明其运动能力未受影响。上述行为学结果提示APP/PS1小鼠存在明显的学习与认知障碍。进一步组织学检测显示，APP/PS1转基因小鼠脑内的Aβ沉积显著高于对照组（图1G）。

2.2 APP/PS1小鼠海马组织中蛋白表达的鉴定

为全面了解APP/PS1小鼠海马区域的蛋白质组成，本课题组基于所有已鉴定的蛋白质进行样本聚类分析。首先，通过考察重复实验中相对标准偏差（relative standard deviation，RSD）的分布，评估了实验的重复性与准确性（图2A）。绝大多数蛋白质均通过2个以上肽段进行鉴定，从而提升了定量



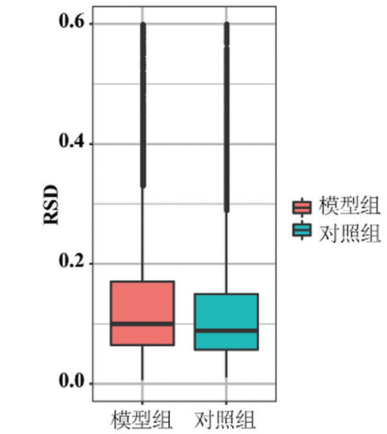
注：

图1 APP/PS1小鼠的行为学评估与Aβ沉积分析

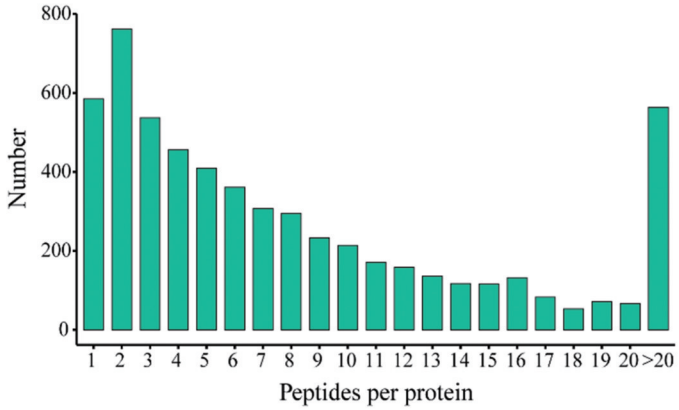
结果的准确度与可靠性(图2B)。此外,大部分蛋白质的序列覆盖率低于30%(图2C)。鉴定到的蛋白质分子量分布于10~200 kDa(图2D),而肽段长度则集中分布在7~20个氨基酸范围内(图2E)。在本研究中,共采集到1 338 489张质谱图,匹配谱图数625 036张,鉴定到50 525条肽段及5 803个蛋白质,其中可定量蛋白质为5 037个(图2F)。基于Pearson相关系数分析,定量数据在各重复间表现出良好的统计一致性(图2G)。

2.3 对照组与模型组之间的差异蛋白鉴定

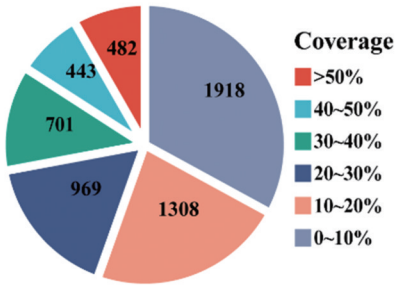
为了鉴定WT与APP/PS1转基因小鼠海马组织中的差异表达蛋白,本研究采用4D无标记蛋白质组学技术进行分析。该分析旨在识别在AD模型中被上调或下调的特定蛋白质,从而为揭示AD潜在的分子机制提供线索。实验共检测到5 803种蛋白质,其中5037种蛋白质的表达量可进行定量分析(图3A)。进一步比较对照组和模型组中的蛋白质表达谱,根据筛选条件|log2FC|>0.58,P<0.05,共鉴定出73种差异表达蛋白质,与对照组相比,模型组中有39种表达上调,34种表达下调。这些差异表达蛋白用热图(图3B)和火山图(图3C)进行了可视化展示。图3D展示了表达变化超过2倍的蛋白质。表1列出变化倍数较大的21种蛋白质。其中,表达上调最为显著的5种蛋白质依次为Ctss、透明质酸与蛋白聚糖连接蛋白2(Hyaluronan and Proteoglycan Link Protein 2,



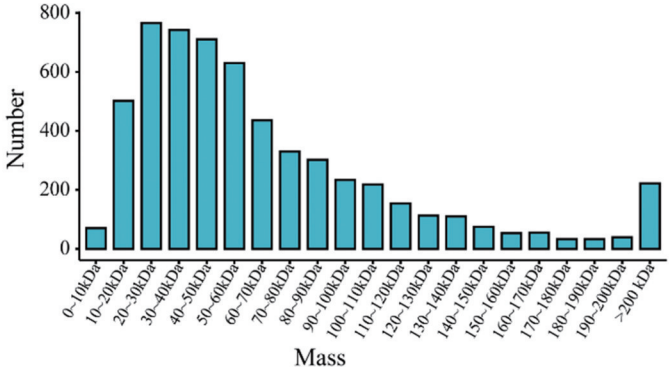
A. 重复样本间相对标准偏差（RSD）的分布



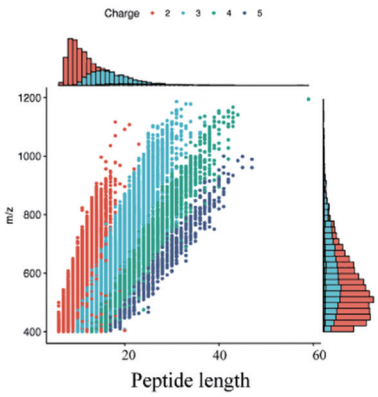
B. 蛋白肽段分布模式



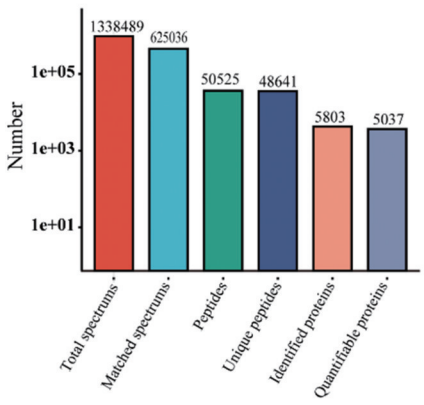
C. 蛋白质覆盖度分布



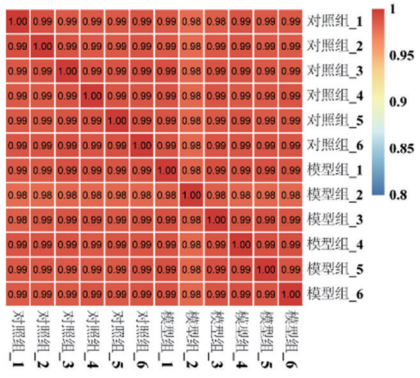
D. 蛋白质分子量分布



E. 鉴定肽段的长度分布



F. 串联质谱数据库检索与分析总结



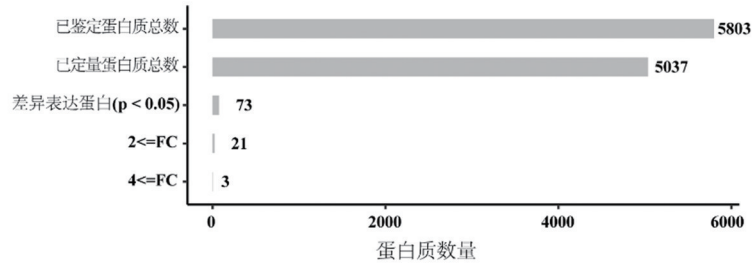
G. 定量结果的Pearson相关性分析

图2　定量蛋白质组学分析及质量控制验证

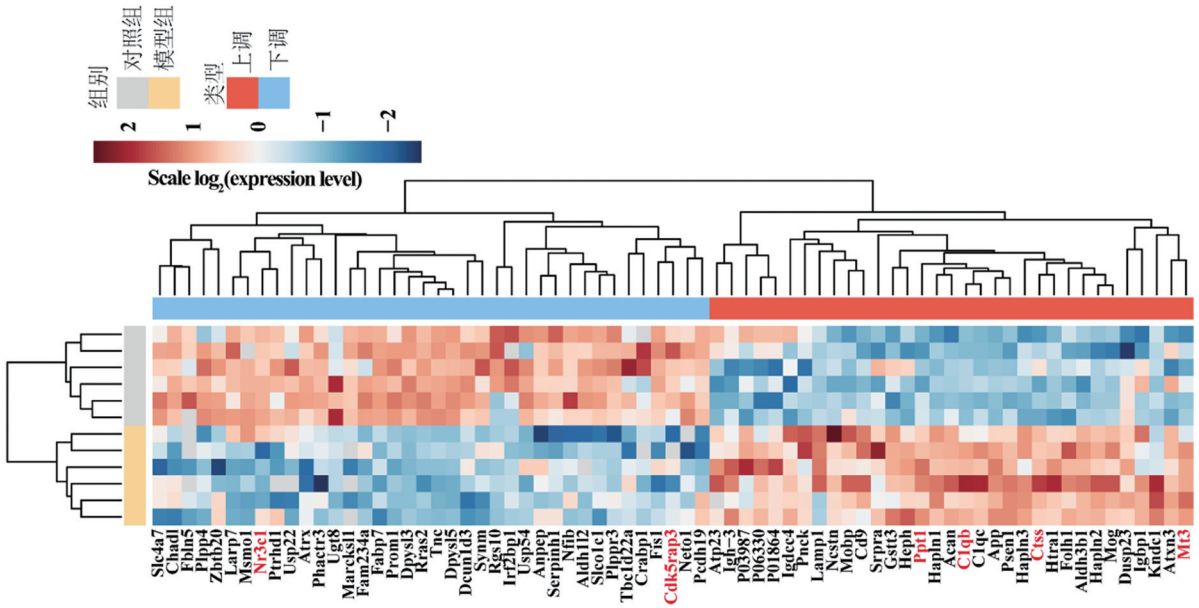
Hapln2）、高温需要A蛋白家族丝氨酸蛋白酶1（High Temperature Requirement A Serine Peptidase 1，Htra1）、免疫球蛋白γ-1重链恒定区（Immunoglobulin Heavy Constant Gamma 1，Ighg1）和溶酶体相关膜蛋白1（Lysosomal Associated Membrane Protein 1，Lamp1）；表达下调最为显著的5种蛋白质分别为甲基固醇单加氧酶1（Methylsterol Monooxygenase 1，Msmo1）、干扰素调节因子2结合蛋白1（Interferon Regulatory Factor 2 Binding Protein 1，Irf2bp1）、微纤维蛋白5（Fibulin 5，Fbln5）、细胞视黄酸结合蛋白1（Cellular Retinoic Acid Binding Protein 1，Crabp1）和G蛋白信号调节因子10（Regulator of G-protein Signaling 10，Rgs10）。

2.4　差异表达蛋白的功能富集分析

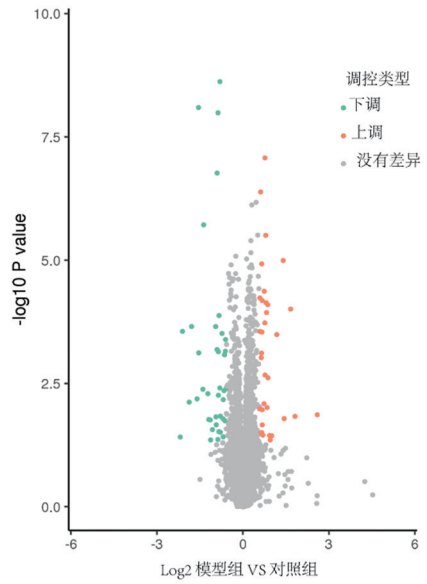
为探究对照组与模型组之间差异表达蛋白的潜在功能，本研究对相应差异蛋白进行了GO功能注释与KEGG通路富集分析。GO分析结果显示，在生物过程（BP）中，差异蛋白显著富集于神经系统发育、中枢神经系统发育及免疫反应的正向调控等过程（图4A）。在细胞组分（CC）层面，主要富集于质膜、细胞外区域等结构（图4B）。分子功能（MF）层面，则与肽酶活性、糖胺聚糖结合、羧酸结合及内肽酶活性等功能密切相关（图4C）。KEGG通路分析提示，差异蛋白在“线



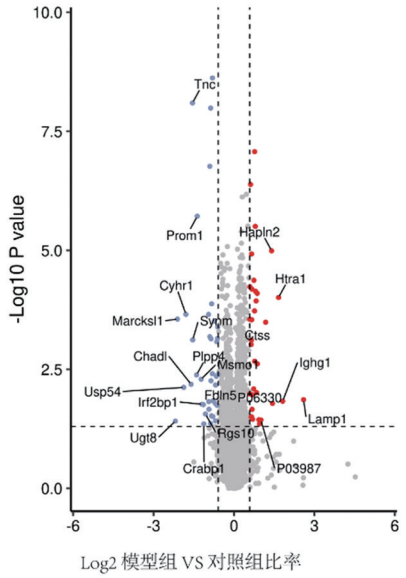
A. 共鉴定到5 803种蛋白质，并根据其在对照组和模型组中的表达水平进行后续分析



B. 对照组和模型组间蛋白质表达差异的热图展示



C. 模型组海马组织蛋白质组学结果的火山图（红色代表上调蛋白；绿色代表下调蛋白）



D. 表达量变化达到2倍以上的蛋白质火山图

图3　小鼠海马组织的蛋白质组学分析结果

粒体自噬”、“Notch信号通路”、“溶酶体”、“药物代谢-细胞色素P450”以及“异源物质代谢”等通路中具有显著富集(图4D)。进一步通过蛋白质结构域分析发现，差异蛋白主要涉及免疫球蛋白样结构域及细胞外连接结构域等功能模块(图4E)。以上结果表明，相关结构域所对应的蛋白可能通过结构差异，参与调节其在AD中的功能。

表1 21种差异表达蛋白的详细信息

蛋白质编号	蛋白质描述	基因名称	模型组/对照组比率	*P*值	调控类型
Q64676	2-羟基酰基鞘氨醇1-β-半乳糖基转移酶	*Ugt8*	0.220	0.03863	下调
P28667	MARCKS相关蛋白	*Marcksl1*	0.232	0.000278	下调
Q8BL06	无活性泛素羧基末端水解酶54	*Usp54*	0.273	0.007586	下调
Q9QXA1	富半胱氨酸组氨酸蛋白1	*Cyhr1*	0.289	0.000222	下调
E9Q7T7	软骨黏附素样蛋白	*Chadl*	0.330	0.006514	下调
Q80YX1	韧黏蛋白	*Tnc*	0.342	8.03E-09	下调
Q70IV5	联丝蛋白	*Synm*	0.344	0.000759	下调
Q0VBU9	磷脂磷酸酶4	*Plpp4*	0.380	0.00415	下调
O54990	Prominin-1(CD133)	*Prom1*	0.387	1.92E-06	下调
Q9CRA4	甲基固醇单加氧酶1	*Msmo1*	0.428	0.005101	下调
Q8R3Y8	干扰素调节因子2结合蛋白1	*Irf2bp1*	0.438	0.017145	下调
Q9WVH9	微纤维蛋白-5(小鼠源)	*Fbln5*	0.453	0.017419	下调
P62965	细胞视黄酸结合蛋白1	*Crabp1*	0.458	0.044242	下调
Q9CQE5	G蛋白信号调节因子10	*Rgs10*	0.478	0.027428	下调
P03987	免疫球蛋白γ-3链C区	*IgH-γ3*	2.006	0.036424	上调
O70370	组织蛋白酶S	*Ctss*	2.27	0.000323	上调
Q9ESM3	透明质酸与蛋白聚糖连接蛋白2	*Hapln2*	2.649	1.02E-05	上调
P06330	免疫球蛋白重链V区AC38 205.12	*IGHV*	2.709	0.016417	上调
Q9R118	丝氨酸蛋白酶HTRA1	*Htra1*	3.169	9.79E-05	上调
P01869	免疫球蛋白γ-1链C区(膜结合型)	*Ighg1*	3.524	0.014768	上调
P11438	溶酶体相关膜糖蛋白1(LAMP-1)	*Lamp1*	6.041	0.013724	上调

2.5 基因集富集分析

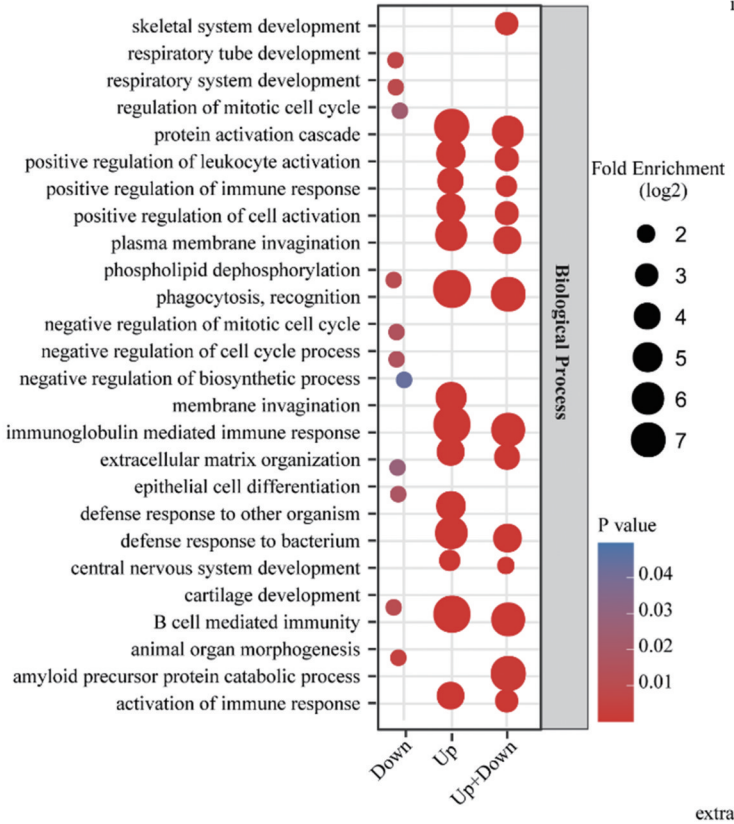
GSEA不同于传统的富集分析,其分析对象不仅限于差异表达基因,还能够捕获那些表达差异幅度较小(如倍数变化较低),但在疾病进程中具有重要生物学意义的基因[18]。因此,本研究对对照组和模型组中的所有已鉴定蛋白质进行了GSEA分析,以更全面地揭示这些蛋白的潜在功能。GSEA揭示了对照组与模型组之间显著富集的通路(图5A)。GSEA富集图谱进一步清晰地展示了相关通路变化,包括阿尔茨海默病、溶酶体功能及氧化磷酸化作用等(图5B)。

2.6 关键基因的可视化分析

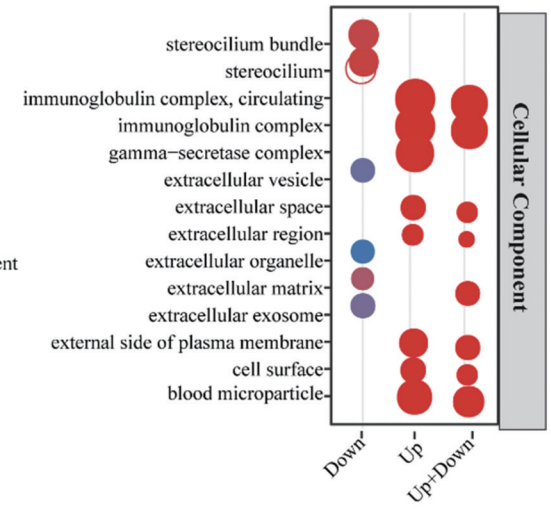
在筛选出的差异蛋白中,本课题组重点关注与凋亡、自噬和神经炎症相关的蛋白(Ctss、C1qb、Nr3c1、Cdk5rap3、Ppt1)。为进一步探讨这些蛋白与AD相关生物表型或疾病进程之间的关联,借助R语言中的ggplot2包进行GO功能注释与KEGG通路富集分析,并使用条形图的形式对结果进行可视化展示。如图6C所示,分析显示,Ctss、C1qb、Nr3c1、Cdk5rap3和Ppt1在与神经元凋亡调节相关的生物功能中显著富集,提示这些基因可能在调控神经元凋亡过程中的潜在作用。在GeneFriends分析(图6A)中,基因根据与基因集内其他基因的平均相似性降序排列,排名靠前的基因代表相似度最高,因此被识别为关键基因。在本课题组的分析中,Ppt1位于排名顶部,提示其可能在特定生物过程的调节(如细胞凋亡)的调控中发挥重要作用。通过R语言的circlize包,对几个关键基因进行染色体定位分析,并将其结果可视化(图6B)。其中,Nr3c1基因定位于18号染色体,编码一种参与应激反应及其他生理过程的核受体[19]。已有研究表明,Nr3c1的过表达可以调节与炎症相关基因的表达和可变剪接,这一机制与AD相关的炎症病理过程密切相关。Cdk5rap3基因定位于11号染色体,该基因与神经元发育及功能密切相关,其编码蛋白与细胞周期蛋白依赖性激酶5(Cyclin-Dependent Kinase 5,CDK5)相互作用——CDK5是调控细胞凋亡和存活的重要因子,其功能异常可能加速AD中的神经退行性进程。Ctss基因则定位于3号染色体,编码一种参与免疫反应和抗原呈递的酶,在免疫调节中发挥作用,对揭示AD相关炎症机制具有意义。至于Ppt1和C1qb基因,其分别参与溶酶体功能和先天免疫反应,后者还是补体系统的关键组分,这两个基因均定位于4号染色体上。这两者在染色体上的邻近性提示它们可能受共同的调控机制或遗传变异影响,从而可能在阿尔茨海默病的病理过程中产生协同作用。

2.7 关键蛋白的Western blot验证

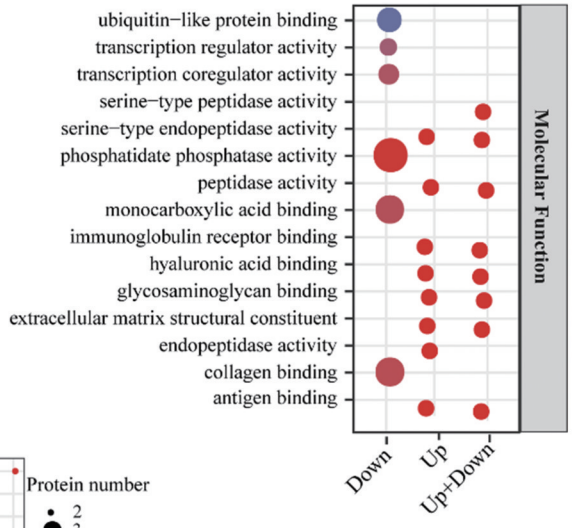
为了验证关键蛋白的表达,本课题组采用Western blot技术分析Ctss、C1qb、Nr3c1、Cdk5rap3和Ppt1的蛋白表达水平。这些蛋白在调控凋亡、自噬和神经退行性过程中发挥重要作用。Western blot结果进一步在蛋白水平上验证了这些蛋白的表达变化(图7A)。与对照组相比,模型组中的Ctss、C1qb和Ppt1的表达显著上调,而Nr3c1和Cdk5rap3的表达显著下调,这与蛋白质组学分析结果一致(图7B)。



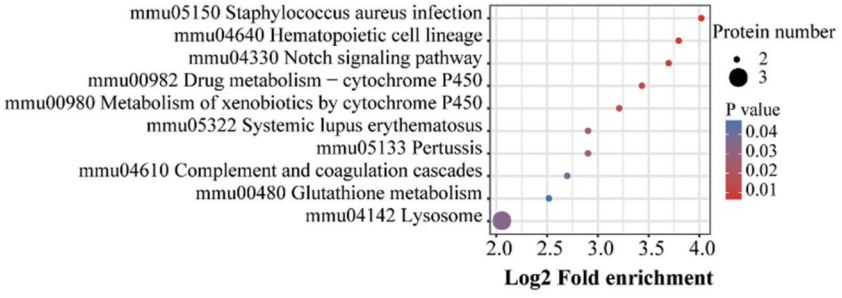
A. GO富集分析的生物过程



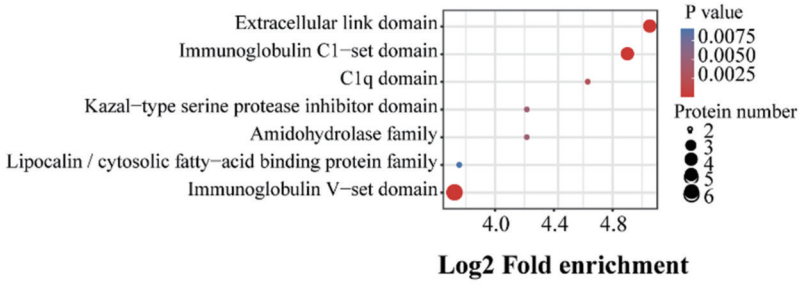
B. GO富集分析的细胞组分



C. GO富集分析的分子功能

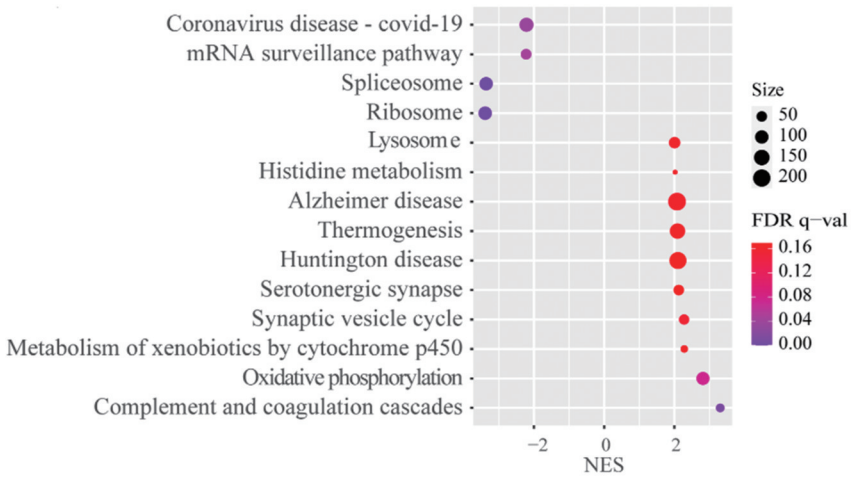


D. KEGG通路富集分析



E. 蛋白质结构域分类

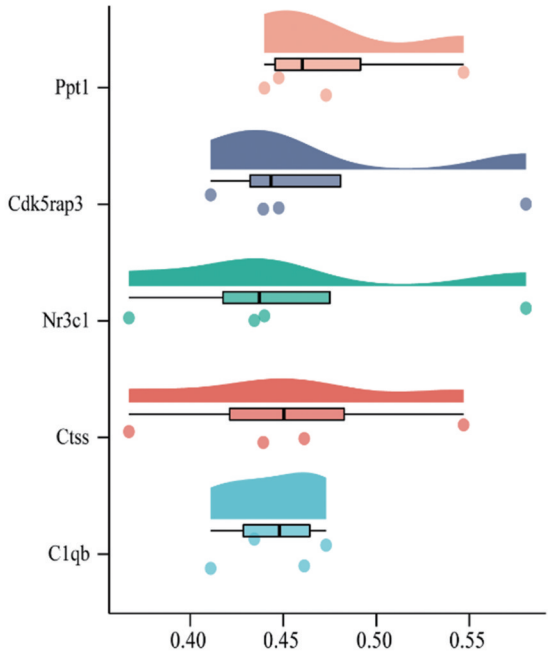
图4 模型组与对照组之间差异蛋白的GO和KEGG富集分析



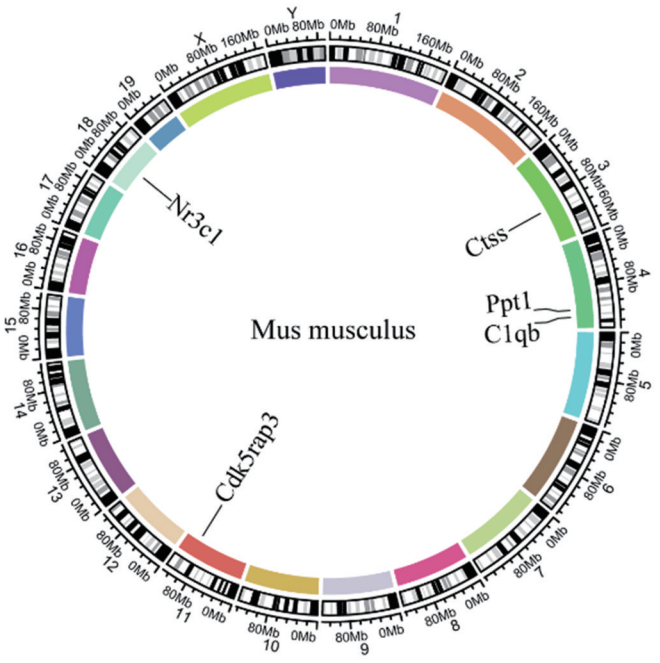
A. 条形图显示基于GSEA的KEGG富集通路（|NES|>2，*P*值<0.05）。纵坐标表示KEGG通路名称。横坐标表示NES值。

B. 模型组与对照组相比显著上调或下调的通路的GSEA富集图

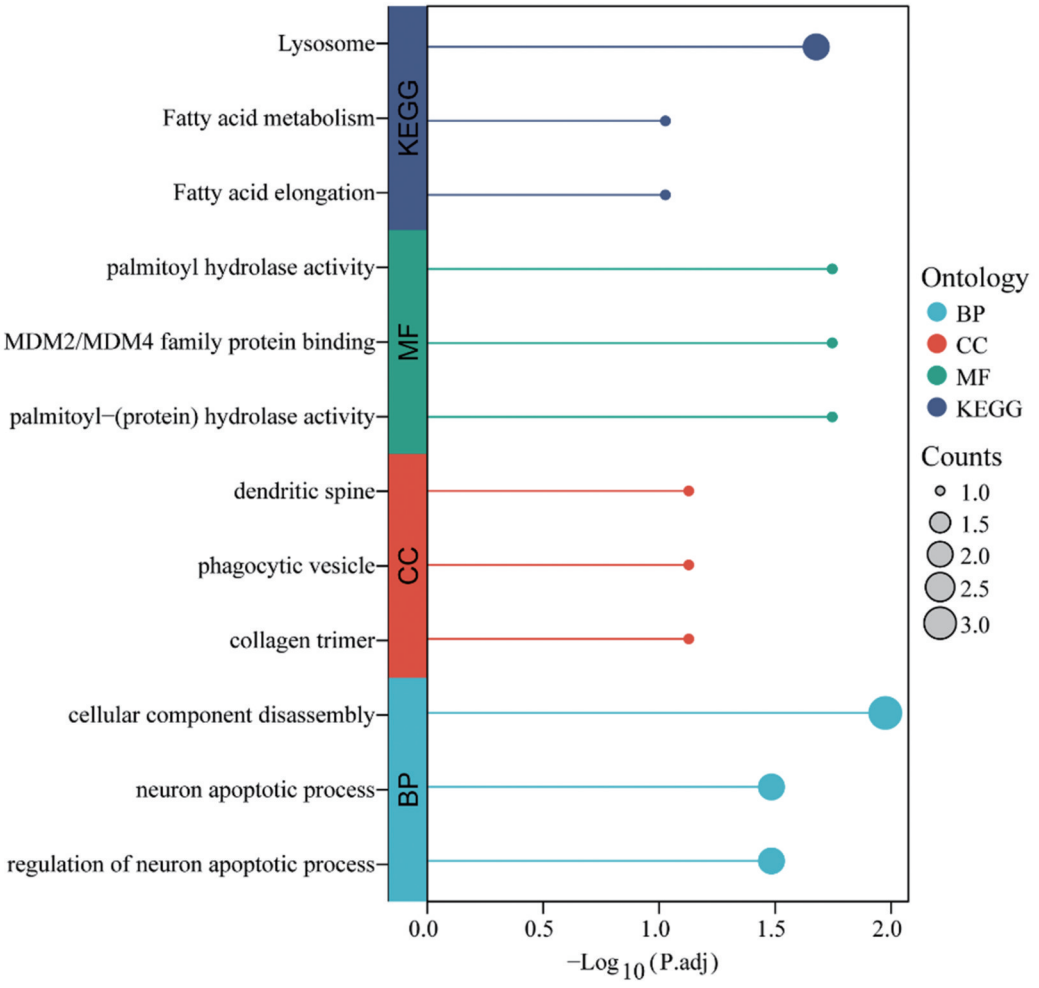
图5　GSEA揭示了在模型组与对照组中差异富集的蛋白相关通路



A. 关键基因的Friends分析

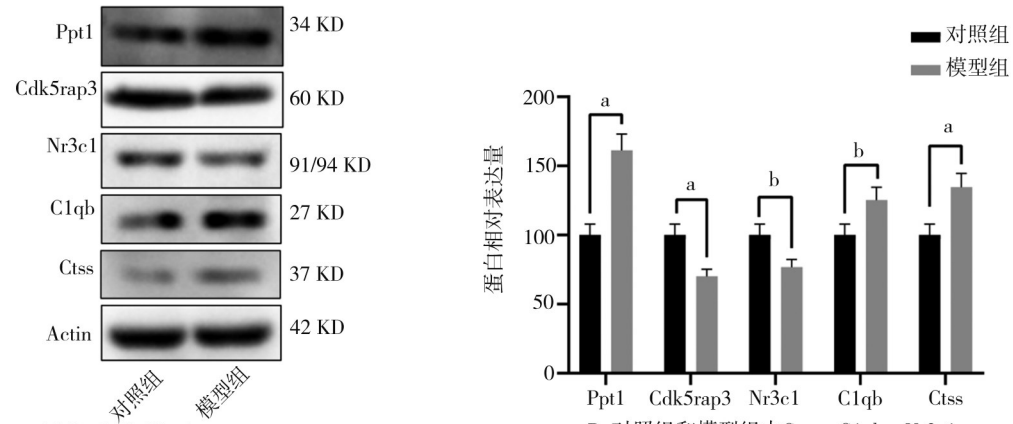


B. 关键基因的染色体定位



C. 关键基因的GO、KEGG棒图

图6 关键基因的可视化分析



A. 对照组和模型组中Ctss、C1qb、Nr3c1、Cdk5rap3和Pptl的蛋白表达

B. 对照组和模型组中Ctss、C1qb、Nr3c1、Cdk5rap3和Ppt1的蛋白相对表达量

注：a，与对照组比较，$P<0.05$；b：与对照组比较，$P<0.01$

图7 Western blot验证关键蛋白的差异表达

3 讨 论

随着全球人口老龄化进程的不断加剧，AD的患病率显著上升，已成为亟待关注的重大公共卫生问题[20-22]。目前，临床上缺乏有效的治疗手段，现有药物仅能缓解症状而无法逆转病程进展。因此，深入研究AD的发病机制，探索新的生物标志物和治疗靶点显得尤为迫切[23-24]。本研究以APP/PS1转基因小鼠为模型，采用4D无标记蛋白质组学技术对其海马组织进行分析，旨在筛选与神经炎症、凋亡及自噬相关的关键差异表达蛋白，并通过系统筛选和功能富集分析，揭示AD潜在分子机制。结果显示，在WT与APP/PS1小鼠之间共鉴定出73个差异表达蛋白，为阐明AD的病理机制提供了新的线索。

进一步生物信息学分析显示，这73种差异表达蛋白可能在AD的发病过程中发挥重要作用。其中，Ctss、Hapln2和Lamp1显著上调，并与神经炎症和细胞凋亡密切相关，提示它们可能在AD病理过程中发挥关键作用[25-26]。Ctss作为一种溶酶体半胱氨酸蛋白酶，在调节神经炎症和细胞死亡中具有重要功能，其表达水平的上升可能反映了AD小鼠神经系统中炎症反应的加剧[27]。Lamp1作为溶酶体膜蛋白，其上调可能与Aβ沉积和溶酶体功能障碍相互作用，进一步加剧神经元损伤[28]。

KEGG富集结果显示，差异表达蛋白显著富集于神经系统发育、免疫反应及溶酶体通路。这些通路的异常变化不仅揭示了AD中多系统失调的分子基础，也为识别潜在治疗靶点提供了重要线索。例如，Notch信号通路的上调可能在促进神经元存活和突触可塑性调节中发挥双重作用，这为未来的治疗策略提供了新的视角[29-31]。Western blot实验进一步确认了关键蛋白的表达变化，验证了蛋白质组学数据的可靠性。结果显示Ctss和C1qb在AD模型小鼠中表达上调，提示其可能作为AD的新型生物标志物。综上，本研究通过系统的蛋白质组学分析，揭示了AD小鼠模型中关键蛋白的动态变化及其潜在机制，这为阐明AD的病理过程提供了新思路，并为靶向治疗策略的研发奠定了基础。

本研究的局限性包括样本量较小（每组仅6只小鼠），可能影响结果的统计效能。此外，缺乏临床样本的验证限制了研究结果向临床的转化应用。蛋白质组学数据可能受到批次效应的影响，需在后续研究中进一步标准化。此外，实验验证仅采用Western blot，缺乏如基因敲除或细胞培养等更为深入的功能实验，限制了结果的验证深度和进一步的机制探究。

综上所述，本研究通过整合蛋白质组学、生物信息学与实验验证方法，解析了APP/PS1小鼠海马组织中的差异表达蛋白及其富集通路，凸显了神经炎症、溶酶体功能与信号转导在AD发病机制中的重要作用。这些发现为深入阐明AD的分子机制提供了新的视角，也为开发早期诊断相关的潜在分子及靶向治疗策略奠定了基础，最终有望改善AD患者的预后与生活质量。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

作者贡献声明 易祯禛：实验设计，研究实施，论文撰写；戴佳琳：动物实验，数据收集；安小琼：实验设计，数据分析；王 健：动物实验；熊玲：实验技术指导；范忠豪：数据整理；汪家文：研究方案设计、论文修改与审阅

参 考 文 献

[1] Zheng QY, Wang X. Alzheimer's disease: insights into pathology, molecular mechanisms, and therapy[J]. Protein Cell, 2025, 16(2): 83-120.

[2] Leng FD, Edison P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here?[J]. Nat Rev Neurol, 2021, 17(3): 157-172.

[3] Kale M, Wankhede N, Pawar R, et al. AI-driven innovations in Alzheimer's disease: Integrating early diagnosis, personalized treatment, and prognostic modelling[J]. Ageing Res Rev, 2024, 101: 102497.

[4] Graff-Radford J, Yong KXX, Apostolova LG, et al. New insights into atypical Alzheimer's disease in the era of biomarkers[J]. Lancet Neurol, 2021, 20(3): 222-234.

[5] Dong Y, Song X, Wang X, et al. The early diagnosis of Alzheimer's disease: Blood-based panel biomarker discovery by proteomics and metabolomics[J]. CNS Neurosci Ther, 2024, 30(11): e70060.

[6] Thakur S, Dhapola R, Sarma P, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: current progress in molecular signaling and therapeutics[J]. Inflammation, 2023, 46(1): 1-17.

[7] Kumari S, Dhapola R, Reddy DH. Apoptosis in Alzheimer's disease: insight into the signaling pathways and therapeutic avenues[J]. Apoptosis, 2023, 28(7): 943-957.

[8] Zhang ZG, Yang XF, Song YQ, et al. Autophagy in Alzheimer's disease pathogenesis: Therapeutic potential and future perspectives[J]. Ageing Res Rev, 2021, 72: 101464.

[9] Zhang HQ, Wei W, Zhao M, et al. Interaction between aβ and tau in the pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. Int J Biol Sci, 2021, 17(9): 2181-2192.

[10] Kakkar A, Singh H, Singh BK, et al. Neuroinflammation and Alzheimer's disease: Unravelling the molecular mechanisms[J]. J Alzheimers Dis, 2025, 108(1): 19-41.

[11] Scheltens P, Blennow K, Breteler MMB, et al. Alzheimer's disease[J]. Lancet, 2016, 388(10043): 505-517.

[12] Mielke MM, Anderson M, Ashford JW, et al. Recommendations for clinical implementation of blood-based biomarkers for Alzheimer's disease[J]. Alzheimers Dement, 2024, 20(11): 8216-8224.

[13] Tang M, Huang HJ, Li SM, et al. Hippocampal proteomic changes of susceptibility and resilience to depression or anxiety in a rat model of chronic mild stress[J]. Transl Psychiatry, 2019, 9: 260.

[14] Zhou XR, Zhou L, Ge XN, et al. Quantitative proteomic analysis of porcine intestinal epithelial cells infected with porcine deltacoronavirus using iTRAQ-coupled LC-MS/MS[J]. J Proteome Res, 2020, 19(11): 4470-4485.

[15] Zhuan QR, Du XZ, Bai JC, et al. Proteomic profile of mouse oocytes after vitrification: A quantitative analysis based on 4D label-free technique[J]. Theriogenology, 2022, 187: 64-73.

[16] Moulder R, Bhosale SD, Goodlett DR, et al. Analysis of the plasma proteome using iTRAQ and TMT-based Isobaric labeling[J]. Mass Spectrom Rev, 2018, 37(5): 583-606.

[17] Lin HM, Zhang W, Xu YS, et al. 4D label-free quantitative proteomics analysis to screen potential drug targets of Jiangu Granules treatment for postmenopausal osteoporotic rats[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 1052922.

[18] Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(43): 15545-15550.

[19] Palma-Gudiel H, Córdova-Palomera A, Leza JC, et al. Glucocorticoid receptor gene (*NR3C1*) methylation processes as mediators of early adversity in stress-related disorders causality: A critical review[J]. Neurosci Biobehav Rev, 2015, 55: 520-535.

[20] Titze-de-Almeida SS, Marina CL, Ramos MV, et al. Exosomal Non-Coding RNAs as Potential Biomarkers for Alzheimer's Disease: Advances and Perspectives in Translational Research[J]. Int J Mol Sci, 2025, 26(17): 1-27.

[21] Liu W, Deng W, Gong XH, et al. Global burden of Alzheimer's disease and other dementias in adults aged 65 years and over, and health inequality related to SDI, 1990 - 2021: analysis of data from GBD 2021[J]. BMC Public Health, 2025, 25(1): 1256.

[22] Hao M, Chen JJ. Trend analysis and future predictions of global burden of Alzheimer's disease and other dementias: a study based on the global burden of disease database from 1990 to 2021[J]. BMC Med, 2025, 23(1): 378.

[23] Briggs R, Kennelly SP, O'Neill D. Drug treatments in Alzheimer's disease[J]. Clin Med, 2016, 16(3): 247-253.

[24] Dubois B, von Arnim CAF, Burnie N, et al. Biomarkers in Alzheimer's disease: role in early and differential diagnosis and recognition of atypical variants[J]. Alzheimers Res Ther, 2023, 15(1): 175.

[25] Castillo E, Leon J, Mazzei G, et al. Comparative profiling of cortical gene expression in Alzheimer's disease patients and mouse models demonstrates a link between amyloidosis and neuroinflammation[J]. Sci Rep, 2017, 7: 17762.

[26] Nakanishi H. Cathepsin regulation on microglial function[J]. Biochim Biophys Acta BBA Proteins Proteom, 2020, 1868(9): 140465.

[27] Chaudhry N, Sica M, Surabhi S, et al. Lamp1 mediates lipid transport, but is dispensable for autophagy in *Drosophila*[J]. Autophagy, 2022, 18(10): 2443-2458.

[28] Song CH, Huang WY, Zhang PG, et al. Critical role of ROCK1 in AD pathogenesis *via* controlling lysosomal biogenesis and acidification[J]. Transl Neurodegener, 2024, 13(1): 54.

[29] Zhou BH, Lin WL, Long YL, et al. Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics[J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7: 95.

[30] Kapoor A, Nation DA. Role of Notch signaling in neurovascular aging and Alzheimer's disease[J]. Semin Cell Dev Biol, 2021, 116: 90-97.

[31] Alberi L, Hoey SE, Brai E, et al. Notch signaling in the brain: in good and bad times[J]. Ageing Res Rev, 2013, 12(3): 801-814.

(收稿:2026-02-24;修回:2026-05-20;录用:2026-05-20)

(责任编辑:周一青)

本文引用格式:

易祯 ,戴佳琳,安小琼,等.阿尔茨海默病APP/PS1小鼠模型的认知障碍与海马蛋白质组学变化的关联研究[J].重庆医科大学学报,XXXX,XX(XX):1-12.