基础研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001103

AQP9在APP/PS1双转基因小鼠海马中的表达变化

陆蔚天，黄 娟，李 昱，孙善全
（重庆医科大学神经科学研究中心，重庆 400016）

【摘 要】**目的**：研究水通道蛋白9（aquaporin-9，AQP9）在阿尔茨海默病（Alzheimer's disease，AD）模型小鼠海马中的表达变化。**方法**：9月龄APPswe/PS1dE9双转基因雄性小鼠和C57野生型雄性小鼠各12只，分别为AD模型组和对照组，采用水迷宫实验检测2组小鼠学习记忆能力，采用免疫组化、免疫印迹和qRT-PCR方法检测AQP9蛋白及其mRNA在以上2种小鼠海马中的表达。**结果**：水迷宫实验显示，与对照组比较，模型组小鼠找到平台的潜伏期显著加长，穿越平台次数明显减少（t=7.064，P=0.000）。免疫组化、免疫印迹和qRT-PCR结果分别显示：与对照组比较，AQP9的吸光度（absorbance，A）值在海马不同区域均增加（CA1：t=7.373，P=0.000；CA2：t=3.1，P=0.011；CA3：t=4.428，P=0.001；齿状回：t=5.285，P=0.000）；AQP9蛋白表达增高（t=5.305，P=0.003）；AQP9 mRNA表达水平增高（t=3.646，P=0.045）。**结论**：在APPswe/PS1dE9双转基因AD模型小鼠海马中，AQP9表达上调。

【关键词】水通道蛋白9；阿尔茨海默病；APPswe/PS1dE9转基因小鼠；海马
【中图分类号】R741.02 【文献标志码】A 【收稿日期】2015-10-22

Changes in expression of Aquaporin-9 in the hippocampus of APP/PS1 double transgenic mouse model of Alzheimer's disease

Lu Weitian, Huang Juan, Li Yu, Sun Shanquan
(*Institute of Neuroscience, Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To investigate the changes in expression of Aquaporin-9 (AQP9) in the hippocampus of mouse model of Alzheimer's disease (AD). ***Methods***: APPswe/PS1dE9 double transgenic male mice aged 9 months (n=12) and C57 wild-type (WT) male mice aged 9 months (n=12) were used as model of AD and control, respectively. Morris water maze tests were used to assess the learning and memory abilities of animals. Immunohistochemical staining, Western blot and qRT-PCR were applied to exam the expression of AQP9 protein and its mRNA in the hippocampus of the AD model and WT mice. ***Results***: The water maze test showed that AD model mice took longer latency and had significantly less platform-passing times than WT mice (t=7.064, P=0.000). The results of immunohistochemical staining showed that the absorbance (A) value of AQP9 immunoreactivity in different hippocampus areas were increased in the hippocampus of the AD model mice compared with in that of the WT mice (CA1: t=7.373, P=0.000; CA2: t=3.1, P=0.011; CA3: t=4.428, P=0.001; girus: t=5.285, P=0.000). The results of Western blot showed that the expression of AQP9 protein were increased compared with in that of the WT mice (t=5.305, P=0.003). The qRT-PCR showed that AQP9 mRNA were increased in the hippocampus of the AD model mice compared with in that of the WT mice (t=3.646, P=0.045). ***Conclusion***: AQP9 protein and its mRNA are upregulated in the hippocampus of the APPswe/PS1dE9 double transgenic mice model of AD.

【Key words】aquaporin-9; Alzheimer's disease; APPswe/PS1dDE9 double transgenic mice; hippocampus

作者介绍：陆蔚天，Email：weitianlu@cqmu.edu.cn，研究方向：退行性疾病的发病机制研究。
通信作者：孙善全，Email：sunsq2151@cqmu.edu.cn。

基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：81601051）；重庆市基础与前沿研究计划资助项目（编号：cstc2016jcyjA0172）；重庆市教委科学技术研究资助项目（编号：KJ1600222）；重庆市渝中区科技计划资助项目（编号：20140115）；重庆医科大学2015年度国家自然科学基金预研资助项目（编号：NSFYY201525）。
优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20161215.1555.072.html（2016-12-15）

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)是一类常见的中枢神经系统退行性疾病,以进行性记忆减退和认知功能障碍为主要临床症状[1]。目前,AD的病因和发病机制并不明确。已有的研究表明脑内血管病变和能量代谢障碍与 AD 的起病及进展相关。

AD 相关的血管病变包括慢性低灌注、血管内皮炎症反应、血管新生及血管网异常、神经血管单元对淀粉样蛋白(β-amyloid protein,Aβ)的转运异常等[2]。这些血管病变提示在 AD 的发生发展过程中,可能出现脑内水和其他物质的转运异常。

大量文献表明[3-4],脑内能量代谢障碍也与 AD 的发病相关。有研究发现能量代谢改变要先于 AD 的病理变化和临床症状发生,并且能够引起 tau 蛋白过度磷酸化、线粒体功能障碍和患者认知功能障碍等 AD 相关病理变化和症状[5-6]。

水通道蛋白(aquaporins,AQPs)是一组分布于细胞膜,与水转运相关的蛋白。人类已经从哺乳动物体内分离克隆出 13 种 AQPs(AQP0~AQP12),其中在脑组织中明确检测到的 AQPs 有 3 种:AQP1、AQP4 和 AQP9[8]。研究发现,AD 患者脑内 AQP1 和 AQP4 表达发生变化[9-10]。这些结果与之前所述 AD 脑内的血管病变提示 AD 的发生发展可能与脑内水转运异常相关。然而,对于 AQP9 在 AD 动物模型和患者脑内的表达情况目前鲜见报道。

AQP9 不仅对水具有通透性,同时还可以转运甘油、乳酸和尿素等物质[11],而甘油和乳酸可以作为神经元的能量底物[12-13]。由于 AD 脑内能量代谢发生变化,与能量底物转运相关的 AQP9 的表达也有可能发生改变。

AD 的发病与脑内水转运异常和能量代谢改变相关,而 AQP9 可以作为脑内水和能量底物的通道蛋白。因此本研究在 APPswe/PS1dE9 双转基因 AD 小鼠模型的海马中检测了 AQP9 的表达变化情况,以期为 AD 发病机制的研究提供新线索。

1 材料与方法

1.1 实验动物

APPswe/PS1dDE9 双转基因 AD 模型小鼠购自南京模式动物研究中心,C57 小鼠购自重庆医科大学动物实验中心。动物购买后饲养于重庆医科大学动物实验中心 SPF 级动物房进行繁殖,自由摄食和饮水,饲养至 9 月龄,体质量 27~32 g,取 APPswe/PS1dE9 双转基因 AD 模型和 C57 雄性小鼠各 12 只进行实验。

1.2 Morris 水迷宫实验

Morris 水迷宫装置由直径为 150 cm 的圆形水池及直径为 9.5 cm 的平台组成。水池中放入不透明染料。Morris 水迷宫实验由两部分构成。①隐蔽平台实验。平台放置于水池中某一固定点,低于水面 1 cm。小鼠从水池 4 个不同象限的点放入水中。记录小鼠在 60 s 内找到平台的时间及所经过的路程。如果小鼠在 60 s 内未找到平台,则由实验者将其引导至平台上并停留 10 s。将小鼠找到平台的时间作为逃避潜伏期(escape latency)。实验连续进行 6 d,每天 4 次,每次间隔 1 h。②空间探索实验。隐蔽平台实验结束 24 h 后,撤走平台,使小鼠在水池内搜索平台 60 s,记录其在目标象限停留的时间及穿越平台位置的次数。

1.3 免疫组织化学

小鼠在 Morris 水迷宫实验结束后,3.5%水合氯醛麻醉,断头,冰上取脑后用 4% 多聚甲醛固定 72 h,常规 70%酒精脱水,石蜡包埋,冠状位切片,厚度 4 μm。二甲苯脱蜡,PBS 冲洗,于 95 ℃枸橼酸钠修复抗原,3% H_2O_2 处理 8 min 封闭内源性过氧化物酶,5% BSA 处理 1 h 封闭非特异性抗原,加入兔抗 AQP9(1:200),4 ℃过夜,PBS 冲洗 3 次,滴加辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HPR)结合的羊抗兔二抗,于 37 ℃孵育 30 min,PBS 冲洗 3 次。二氨基联苯胺(diaminobenzidine,DAB)显色,梯度酒精脱水,二甲苯透明,封片,光镜下观察。

1.4 免疫印迹检测

冰上取各组鼠脑中海马,细胞裂解液提取蛋白;BCA 法测定蛋白浓度,调节蛋白浓度一致,取等量蛋白样品(30 μg),SDS-PAGE 电泳分离蛋白,湿转将蛋白条带转移至 PVDF 膜上。Western 封闭液封闭 1 h;1:500 兔抗 AQP9 多克隆抗体 4 ℃过夜,1:3 000 HRP 标记的羊抗兔 IgG 37 ℃孵育 1 h;1:1 000 小鼠抗 β-actin 单克隆抗体 4 ℃过夜,1:3 000 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 37 ℃孵育 1 h; DAB 显色。应用 Quantity one 软件半定量分析,结果以 AQP9 和 β-actin 的比值表示。

1.5 qRT-PCR

用 TRIzol 法提取海马总 RNA,Nanodrop2000 微量紫外分光光度计检测浓度和纯度,逆转录为 cDNA,逆转录的条件按照说明书设定。采用 SYBR Green 染料法进行 qRT-PCR 扩增,每个样品设复孔,以 β-actin 为内参。AQP9 引物序列,上游:5'-TCCCAGGCTCTTCACTGCA-3',下游:5'-ACCCACGACAGGTATCCACC-3';β-actin 引物序列,上游:5'-AACCCTAAGGCCAACCGTGAAAAG-3',下游:5'-TCATGAGGTAGTCTGTCAGGT-3'。反应条件:95℃起始 30 s,95 ℃变性 10 s,60 ℃退火 15 s,72 ℃延伸 15 s,循环 35 次,60 ℃ 15 s,4 ℃降温。CFX connect™ qRT-PCR 系统检测各样本的荧光阈值循环数(Ct)值。熔解曲线分析以确保 PCR 的特异性。$2^{-\Delta\Delta G}$ 法来计算目的基因 mRNA 的相对值。

1.6 统计分析

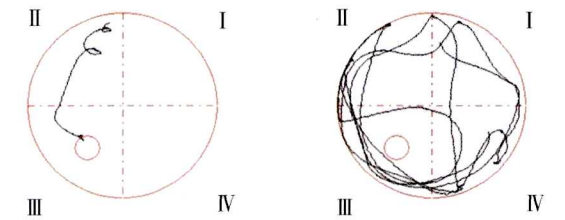
采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,数据以均数 ± 标

准差（$\bar{x} \pm s$）表示。对 Morris 水迷宫的数据采用重复测量方差分析，对其余实验数据进行两样本均数比较的 t 检验。检验标准 α=0.05（双侧）。

2 结 果

2.1 Morris 水迷宫结果

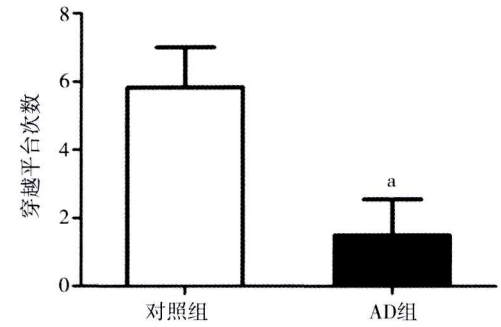
在隐蔽平台实验中，AD 模型小鼠和对照小鼠寻找平台的潜伏期均呈现逐渐缩短的趋势（表 1）；在隐蔽平台实验第 2~6 天，AD 模型小鼠找到平台的潜伏期明显长于对照小鼠（表 1），且主要沿池壁游泳（图 1）。在空间探索实验中 60 s 内 AD 模型小鼠穿越平台次数为（1.000 ± 0.258）次，明显低于对照组[（4.833 ± 0.477）次（图 2），t=7.064，P=0.000]。



A. 对照组小鼠寻找平台的游泳轨迹图　　A. AD 模型组小鼠寻找平台的游泳轨迹图

图 1 对照组和 AD 模型组小鼠寻找平台的的游泳轨迹

Fig.1 Finding platform courses of mice in control group and AD model group



a：与对照组相比，P=0.000

图 2 对照组和 AD 模型组小鼠穿越平台次数（$\bar{x} \pm s$，n=6）

Fig.2 Comparison of times of passing platform between control group and AD model group mice（$\bar{x} \pm s$，n=6）

2.2 免疫组织化学结果

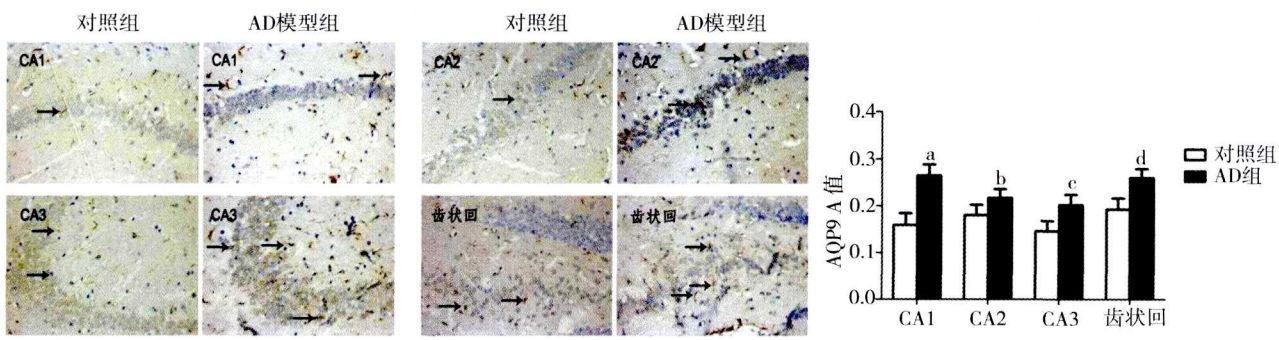
免疫组化结果显示：在对照小鼠和 AD 模型小鼠海马的 CA1、CA2、CA3 和齿状回区域均有 AQP9 表达；图像分析结果显示，对照组小鼠中 AQP9 表达的吸光度（absorbance，A）值分别为：CA1（0.159 ± 0.010）；CA2（0.180 ± 0.009）；CA3（0.146 ± 0.009）；齿状回（0.192 ± 0.010）；AD 模型组中 AQP9 表达的 A 值分别为：CA1（0.264 ± 0.098）；CA2（0.217 ± 0.008）；CA3（0.202 ± 0.009）；齿状回（0.259 ± 0.008）。在海马的以上区域，AD 模型小鼠中 AQP9 表达的 A 值较对照组增高，差异具有统计学意义（CA1：t=7.373，P=0.000；CA2：t=3.1，P=0.011；CA3：t=4.428，P=0.001；齿状回：t=5.285，P=0.000），如图 3 所示。

表 1 对照组和 AD 模型组小鼠在隐蔽平台实验中寻找平台潜伏期的比较（$\bar{x} \pm s$，n=6）

Tab.1 Comparison of escape latency between the control group and AD model group mice under hidden platform test（$\bar{x} \pm s$，n=6）

组别	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天
对照组	51.830 ± 3.518	42.880 ± 1.173	33.290 ± 1.271	29.160 ± 1.424	23.100 ± 0.763	20.780 ± 0.900
AD模型组	55.750 ± 1.692	55.360 ± 1.656	54.220 ± 2.471	50.640 ± 2.295	49.040 ± 0.690	44.370 ± 1.130
P 值	0.339	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注：组间效应 F=150.551，P=0.000；时间效应 F=52.426，P=0.000；交互效应 F=13.853，P=0.000



注："→" 表示 AQP9 阳性表达部位

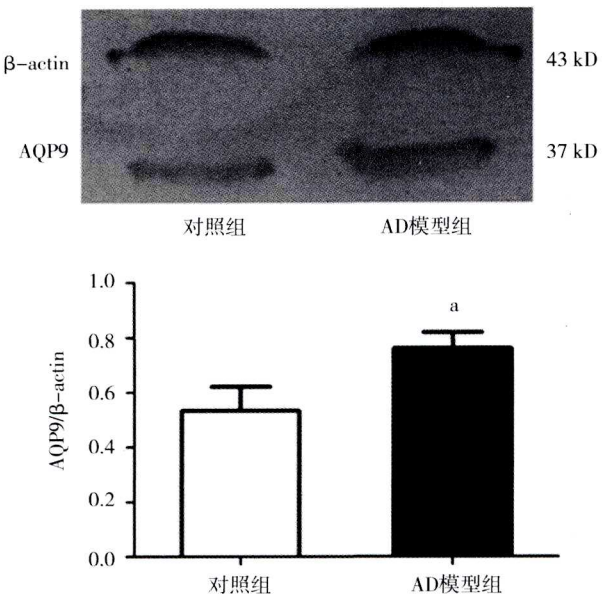
a：与对照组相比，P=0.000；b：与对照组相比，P=0.011；c：与对照组相比，P=0.001；d：与对照组相比，P=0.000

图 3 对照组和 AD 模型组小鼠海马各区域 AQP9 表达的比较（$\bar{x} \pm s$，n=6）

Fig.3 Comparison on the expression of AQP9 in the hippocampus between control group and AD model group mice（$\bar{x} \pm s$，n=6）

2.3 免疫印迹结果

AD 模型组小鼠海马中 AQP9 相对表达量(0.760 ± 0.024)较对照组(0.533 ± 0.036)增加，差异具有统计学意义(t=5.305，P=0.003)，如图 4 所示。



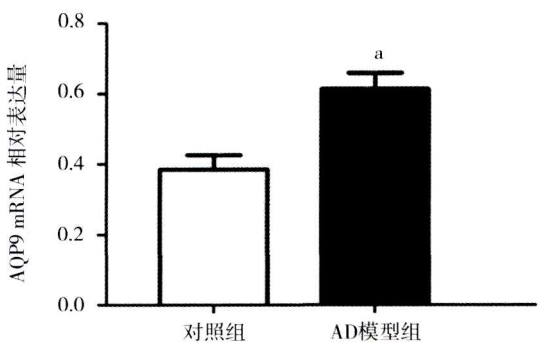
a：与对照组相比，P=0.003

图 4 对照组和 AD 模型组小鼠海马中 AQP9 蛋白表达量的比较（$\bar{x} \pm s$，n=6）

Fig.4 Comparison on the expression of AQP9 protein in the hippocampus between control group and AD model group mice（$\bar{x} \pm s$，n=6）

2.4 qRT-PCR 结果

qRT-PCR 结果显示：AD 模型小鼠海马中 AQP9 mRNA 表达量(0.612 ± 0.115)高于对照组(0.385 ± 0.101)，差异具有统计学意义(t=3.646，P=0.045，图 5)。



a：与对照组相比，P=0.045

图 5 对照组和 AD 模型组小鼠海马中 AQP9 mRNA 相对表达量的比较（$\bar{x} \pm s$，n=6）

Fig.5 Comparison on the relative expression of AQP9 mRNA in the hippocampus between control group and AD model group mice（$\bar{x} \pm s$，n=6）

3 讨 论

AQP9 在脑内主要分布于 3 类细胞[14]：①胶质细胞：在第三脑室周围的室管膜细胞和胶质界膜及白质的星形胶质细胞中尤为明显；②软膜血管的内皮细胞；③特定的神经元：儿茶酚胺类神经元。Badaud 等[14]讨论了 AQP9 在不同类型脑细胞中的作用：在胶质细胞中的 AQP9 与脑实质和脑血管/脑室之间的水转运密切相关。而由于儿茶酚胺类神经元与脑内能量代谢调节相关，在神经元上分布的 AQP9 可能与脑内能量底物的转运相关。本实验在 AD 模型鼠的海马中观察到 AQP9 的表达上调。这一现象从新的角度进一步揭示了 AD 的发生发展与脑内水的转运异常和能量代谢变化相关。

3.1 AQPs 表达变化介导的水转运异常与 AD 发病

脑内 Aβ 沉积是 AD 的典型病理特征之一。大量在体和离体研究显示，Aβ 沉积与脑内 AQPs 的表达变化密切相关。有研究者发现在早期 AD 患者大脑皮质中，Aβ 可以活化星形胶质细胞，引起 Aβ 沉积部位附近的星形胶质细胞 AQP1 表达明显增高[15]。Wilcock 等[16]报道，在尸检报告存在 Aβ 沉积的 AD 患者脑内和有 Aβ 沉积的转基因 AD 鼠模型中，AQP4 的表达明显下降。在转染 AQP1 和 $A\beta_{1\text{-}42}$ 的 HEK293 细胞系中，AQP1 和 $A\beta_{1\text{-}42}$ 在细胞膜和其他的细胞质中表达的部位一致[17]。以上研究结果中 AQPs 与 Aβ 的相关性提示 AD 的主要病理变化之一（脑内 Aβ 沉积）可能与 AD 脑内水转运异常相关。最近更有研究者在 AD 模型鼠中，用一种能够追踪水分子的分子影像技术找到了用来证明水转运异常在 Aβ 沉积中发挥关键作用的直接证据[18]。在本研究中观察到 AD 模型鼠海马中 AQP9 的表达异常，为从脑内水平衡紊乱这一角度来研究 AD的发病机制提出了一系列新问题。AD 脑内 AQP9 表达增高如何影响脑内水的转运？AQP9 表达增高是否也与脑内 Aβ 沉积相关？AQP9 的表达增高是否还与 AD 的其他病理变化（如神经元丢失、tau 蛋白过度磷酸化）相关？这些问题的解答都需要我们今后做出更深入的研究。

3.2 AQP9 表达变化介导的能量代谢改变与 AD 发病

Badaut 等[14]发现脑缺血后，缺血周边区域AQP9

表达增高。他们认为缺血后脑内乳酸含量增加，软脑膜和微血管周围的内皮细胞中 AQP9 表达增高将有利于聚集在细胞外间隙的乳酸和甘油等物质的清除。与此类似，本研究推测在 AD 小鼠模型中AQP9 表达增高，将会增加乳酸和甘油等能量底物从脑实质向血液和脑脊液中转运，导致神经元可利用能量底物减少，从而引起脑内能量代谢下降。因此，AQP9 作为乳酸和甘油等神经元能量底物的转运通道，在 AD 模型鼠中表达增高，这一现象有可能是引起 AD 脑内能量代谢下降的原因。

AQP9 在 AD 模型鼠中表达增高也有可能是 AD 脑内能量代谢下降引起的结果。有文献报道，在 AD 动物脑内，与能量代谢相关的胰岛素信号通路下调[19]，而 AQP9 基因在-496/-502 的启动子中包含一个负性胰岛素反应元件 TGTTTTC[20]。因此，AQP9 表达增高有可能是下调的胰岛素信号通路对 AQP9 启动子区域的负性调控作用减弱引起的。

无论 AQP9 表达增高是 AD 能量代谢障碍的原因还是结果，都表明 AQP9 的表达变化与 AD 脑内的能量代谢改变有关。研究 AD 模型鼠中 AQP9 的表达变化为研究从能量代谢角度来研究 AD 的发病机制提供了新的切入点。

总之，本研究在 APPswe/PS1dE9 双转基因 AD 小鼠模型的海马中检测到 AQP9 的表达增高，这一现象可以为 AD 发病机制的研究提供新的思路和线索。

参 考 文 献

[1] Forlenza OV, Diniz BS, Gattaz WF. Diagnosis and biomarkers of predementia in Alzheimer's disease[J]. BMC Med, 2010, 8: 89.

[2] 田冰洁，魏文石. 阿尔茨海默病发病机制中血管因素的作用[J]. 中国临床神经科学，2014，22(4)：445-451.

[3] Kroner Z. The relationship between Alzheimer's disease and diabetes: type 3 diabetes?[J]. Altern Med Rev, 2009, 14(4): 373-379.

[4] Mosconi L, De Santi S, Li J, et al. Hippocampal hypometabolism predicts cognitive decline from normal aging[J]. Neurobiol Aging, 2008, 29(5): 676-692.

[5] Mosconi L, Mistur R, Switalski R, et al. FDG-PET changes in brain glucose metabolism from normal cognition to pathologically verified Alzheimer's disease[J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2009, 36(5): 811-822.

[6] Cunnane S, Nugent S, Roy M, et al. Brain fuel metabolism, aging, and Alzheimer's disease[J]. Nutrition, 2011, 27(1): 3-20.

[7] Gonen T, Walz T. The structure of aquaporins[J]. Quarterly Reviews of Biophysics, 2006, 39(4): 361-396.

[8] Arciénegaa II, Brunet JF, Bloch J, et al. Cell locations for AQP1, AQP4 and 9 in the non-human primate brain[J]. Neuroscience, 2010, 167(4): 1103-1114.

[9] Moftakhar P, Lynch MD, Pomakian JL, et al. Aquaporin expression in the brains of patients with or without cerebral amyloid angiopathy[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2010, 69(12): 1201-1209.

[10] Pérez E, Barrachina M, Rodriguez A, et al. Aquaporin expression in the cerebral cortex is increased at early stages of Alzheimer disease [J]. Brain Research, 2007, 1128(1): 164-174.

[11] Badaut J. Aquaglyceroporin 9 in brain pathologies[J]. Neuroscience, 2010, 168(4): 1047-1057.

[12] Rotta LN, Valle SC, Schweigert I, et al. Utilization of energy nutrients by cerebellar slices[J]. Neurochemical Research, 2002, 27(3): 201-206.

[13] Nguyen NH, Brathe A, Hassel B. Neuronal uptake and metabolism of glycerol and the neuronal expression of mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase[J]. J Neurochem, 2003, 85(4): 831-842.

[14] Badaut J, Regli L. Distribution and possible roles of aquaporin 9 in the brain[J]. Neuroscience, 2004, 129(4): 971-981.

[15] Misawa T, Arima K, Mizusawa H, et al. Close association of water channel AQP1 with amyloid-beta deposition in Alzheimer disease brains[J]. Acta neuropathologica, 2008, 116(3): 247-260.

[16] Wilcock DM, Vitek MP, Colton CA. Vascular amyloid alters astrocytic water and potassium channels in mouse models and humans with Alzheimer's disease[J]. Neuroscience, 2009, 159(3): 1055-1069.

[17] Dohke Y, Turner RJ. Evidence that the transmembrane biogenesis of aquaporin 1 is cotranslational in intact mammalian cells [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(17): 15215-15219.

[18] Igarashi H, Suzuki Y, Kwee IL, et al. Water influx into cerebrospinal fluid is significantly reduced in senile plaque bearing transgenic mice, supporting beta-amyloid clearance hypothesis of Alzheimer's disease[J]. Neurological Research, 2014, 36(12): 1094-1098.

[19] Rönnemaa E, Zethelius B, Sundelof J, et al. Impaired insulin secretion increases the risk of Alzheimer disease[J]. Neurology, 2008, 71(14): 1065-1071.

[20] Kuriyama H, Shimomura I, Kishida K, et al. Coordinated regulation of fat-specific and liver-specific glycerol channels, aquaporin adipose and aquaporin 9[J]. Diabetes, 2002, 51(10): 2915-2921.

（责任编辑：冉明会）