

不同剂量多奈哌齐对 APP/PS1-AD 转基因小鼠学习记忆功能的改善作用

张慧敏 朱文烽 庞晓平 周鹏 陈方亮

【摘要】目的 评价不同剂量多奈哌齐对 APP/PS1-AD 转基因小鼠学习记忆功能的改善作用。**方法** 将 80 只 APP/PS1-AD 转基因小鼠随机分为转基因小鼠对照组、转基因小鼠多奈哌齐 1mg/kg 组、转基因小鼠多奈哌齐 3mg/kg 组和转基因小鼠多奈哌齐 6mg/kg 组,每组 20 只,并以 20 只野生型基因小鼠作为野生型对照组,每周给药 5d,连续给药 12 周后进行 Morris 水迷宫和跳台实验,比较分析各组小鼠之间学习记忆功能的差异。**结果** 在 Morris 水迷宫实验中,APP/PS1-AD 转基因小鼠表现为明显的学习记忆能力缺失,但给予不同剂量多奈哌齐后小鼠学习记忆缺失均无明显改善(均 $P > 0.05$);跳台实验中,不同剂量多奈哌齐均不能缩短转基因小鼠第一次穿越平台的时间,各实验组小鼠的跳台潜伏期与两对照组相比均无统计学差异(均 $P > 0.05$),但跳台错误次数均有减低。**结论** 多奈哌齐不能改善 APP/PS1-AD 转基因小鼠学习记忆功能的缺失。

【关键词】 多奈哌齐 APP/PS1-AD 转基因小鼠 水迷宫实验 跳台实验

Evaluation of donepezil in improving learning and memory deficits in APP/PS1-AD transgenic mice ZHANG Huimin, ZHU Wenfeng, PANG Xiaoping, et al. Department of Pharmacy, Enze Hospital of Zhejiang Enze Medical Center, Taizhou 318000, China

【Abstract】Objective To evaluate the effect of donepezil on learning and memory ability in APP/PS1-AD transgenic mice. **Methods** Eighty 9-month-old transgenic APP/PS1-AD mice were randomly divided into 4 groups with 20 in each group and were treated with 0, 1, 3 or 6mg/kg of donepezil 5d/week for 12 weeks, respectively; while 20 wild type mice were used as control group. The learning and memory function was evaluated with Water maze and platform tests. **Results** In the classical water maze experiment, the APP/PS1-AD transgenic mice showed significant learning and memory deficits, donepezil treatment did not change the learning and memory function in mice ($P > 0.05$). In platform experiment, donepezil treatment groups did not significantly shorten the first time through the platform ($P > 0.05$), and did not significantly change the latency, compared with two control groups. There was a trend of reducing the error numbers in the treatment groups, but it was not statistically significant. **Conclusion** The study shows that treatment with donepezil may not improve learning and memory deficits in APP/PS1-AD transgenic mice.

【Key words】 Donepezil APP/PS1-AD transgenic mice Water maze experiment Platform experiment

阿尔茨海默病(AD)是一种慢性神经退行性疾病,是造成老年人痴呆最主要的原因^[1]。根据 2014 年的报道,全球大约有 4 千多万 AD 患者,预计到 2050 年,患者将增加至 3 倍^[2]。AD 的发生为患者及其家庭造成沉重的精神和经济负担,因此 AD 的预防和治疗成为当下急需解决的医疗和社会问题。各国痴呆诊疗指南均推荐胆碱酯酶抑制剂作为一线治疗药物,而胆碱酯酶抑制剂

也在临床中使用最为广泛,代表性药物为多奈哌齐^[3-4]。APP/PS1-AD 转基因小鼠是目前最常用来评价 AD 治疗药物药效以及考察药物作用机制的动物模型。因此本研究选用 APP/PS1-AD 转基因小鼠,评价不同剂量多奈哌齐对该模型小鼠学习记忆功能的改善作用,为进一步研发新药提供参考。

1 对象和方法

1.1 实验动物 雄性 9 月龄 APP/PS1-AD 转基因小鼠 80 只、同龄野生型小鼠 20 只均购自南京大学模式动物研究所(合格证号:0022834,201400204),并于 SPF 级动物房饲养,光照时间为 8:00~20:00,室温 20~26℃,湿

DOI:10.12056/j.issn.1006-2785.2019.41.12.2018-2045

作者单位:318000 恩泽医疗中心(集团)恩泽医院药剂科(张慧敏、庞晓平、陈方亮);浙江华海药业股份有限公司(朱文烽);浙江省台州医院药剂科(周鹏)

通信作者:陈方亮, E-mail: chenfl5068@enzemed.com

度 40%~70%。饲养期间小鼠自由进食和饮水,手术前后单独饲养。饲料购于中国军事医学科学院实验动物中心[生产许可证号:SCXK-(军)2002-001]。

1.2 仪器及试剂 Morris 水迷宫(安徽正华生物仪器设备有限公司);跳台(BW-YLS-3TB,上海软隆科技发展有限公司);水浴锅(HH.S,上海博迅医疗生物仪器股份有限公司);培养箱(XT5107,杭州雪中炭恒温技术有限公司);光度计(Ultrospec 6300pro,通用电气医疗集团生命科学部);显微镜(NIB900-FL,Nexcope);多奈哌齐(日本卫才制药公司,规格:5mg/片,批号:140355A),其溶液以蒸馏水为溶媒,现用现配,配制终浓度分别为 0.1、0.3、0.6mg/ml,按小鼠每 10g 体重 0.1ml 剂量给药。

1.3 方法

1.3.1 动物分组和给药 小鼠进入实验房适应 1 周后,将 APP/PS1-AD 转基因小鼠随机分为转基因小鼠对照组、转基因小鼠多奈哌齐 1mg/kg 组、转基因小鼠多奈哌齐 3mg/kg 组和转基因小鼠多奈哌齐 6mg/kg 组,每组 20 只,并以 20 只野生型基因小鼠作为野生型对照组。各组小鼠灌胃给药 1 次/d(野生型小鼠对照组、转基因小鼠对照组予等量蒸馏水),每周连续给药 5d,12 周后进行 Morris 水迷宫和跳台实验。在水迷宫和跳台实验前 1h 继续给予实验药物,直至实验结束。实验期间每天观察并记录小鼠的一般状态和饮食情况,实验开始前以及实验开始后每隔 2 周称体重并记录。

1.3.2 Morris 水迷宫实验 Morris 水迷宫由一金属圆柱形水池和自动显示、记录装置,以及安全岛(平台)组成。水池分为 4 个象限(东、南、西、北),平台放置于第二象限的中心。水温保持在(24±2)℃,水中加入牛奶,使水不透明,平台位于水面以下 1.0cm。每只小鼠每天接受 2 次训练,每次分别从两个不同的入水点开始,2 次训练间隔 4h,记录潜伏期(找到平台的时间)。如果小鼠在 60s 内未找到平台,则潜伏期以 60s 计算。无论在 60s 内找到平台与否,均让小鼠在平台上停留 30s。连续训练 6d,最后 1d 训练 24h 后进行探索实验,移去平台,小鼠自由游泳 60s 寻找平台,记录小鼠第一次穿过平台所在位置的时间和穿越平台的次数。

1.3.3 跳台实验 小鼠跳台装置为 1 个长方形反射箱,大小为 10cm×10cm×30cm,用黑色塑料板分隔成为 5 间。底面为不锈钢网栅,网栅间距为 0.5cm。每间左后角放置一高 3.2cm、直径 4.5cm 的橡胶站台。小鼠位于站台上可免受电击,当小鼠跳下站台时,则遭受到 36 伏电击惩罚。本实验连续进行 3d,第 1 天为适应阶段,将小鼠面向墙角轻轻放置于站台上,首先让动物适应环境 5min,网栅不通电。第 2 天为学习阶段,将小鼠面向墙角轻轻放置于站台上,然后通以 36 伏交流电,持续 3min。若动物跳下站台则受电击,其正常反应应该是跳回站台以躲避伤害性刺激,多数动物可能会再次或多次跳至网栅上,受到电击后又迅速跳回站台。记录每只小鼠受到电击的次数(即错误次数)。第 3 天为实验阶段,即记忆保持实验。将小鼠放置于站台上,通电观察,并记录第一次跳下站台的潜伏期和 3min 内的错误次数。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 多奈哌齐对 APP/PS1-AD 转基因小鼠一般状态的影响 给药前后 APP/PS1-AD 转基因小鼠活动良好,饮食正常。体重保持均匀,各组间无统计学差异(均 $P > 0.05$),见表 1。

2.2 多奈哌齐对 APP/PS1-AD 转基因小鼠学习记忆功能的影响

2.2.1 Morris 水迷宫实验 结果显示,随着训练时间延长,各组小鼠寻找到隐蔽平台的潜伏期均逐渐缩短,转基因对照组小鼠与野生型小鼠比较,寻找到隐蔽平台的潜伏期显著延长($P < 0.05$),提示转基因小鼠有明显的学习记忆功能缺失。而多奈哌齐不同剂量给药组的潜伏期均逐渐缩短,但与转基因对照组相比无统计学差异,见表 2。

训练阶段结束后,进行平台探索实验。转基因对照组小鼠第一次穿越原平台所在位置的时间较野生型小鼠明显延长($P < 0.05$),而穿越平台次数比野生型小鼠

表 1 多奈哌齐对 APP/PS1-AD 转基因小鼠体重的影响(g)

组别	第 0 周	第 2 周	第 4 周	第 6 周	第 8 周	第 10 周	第 12 周
野生型小鼠对照组	35.1 ± 2.2	33.6 ± 3.3	34.5 ± 2.7	34.3 ± 2.4	35.7 ± 2.5	34.1 ± 2.5	36.9 ± 2.8
转基因小鼠对照组	32.4 ± 3.6	33.8 ± 2.5	34.6 ± 2.3	35.4 ± 3.2	35.1 ± 2.8	34.8 ± 2.7	35.1 ± 2.3
转基因小鼠多奈哌齐 1mg/kg 组	34.1 ± 2.4	34.7 ± 2.8	35.4 ± 2.6	34.8 ± 3.2	35.6 ± 2.6	35.3 ± 2.4	35.8 ± 2.7
转基因小鼠多奈哌齐 3mg/kg	35.7 ± 2.1	34.8 ± 3.5	35.7 ± 2.8	34.5 ± 2.6	35.1 ± 2.9	35.7 ± 2.6	35.2 ± 2.8
转基因小鼠多奈哌齐 3mg/kg	34.3 ± 2.6	34.8 ± 2.2	35.2 ± 2.5	34.7 ± 2.8	35.9 ± 2.7	35.8 ± 2.6	34.9 ± 2.7

表 2 多奈哌齐对 APP/PS1-AD 转基因小鼠学习记忆功能(潜伏期)影响(s)

组别	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天
野生型小鼠对照组	55.3 ± 1.4	54.3 ± 1.9	40.8 ± 3.3	34.8 ± 2.6	32.5 ± 3.3	30.1 ± 3.3
转基因小鼠对照组	57.7 ± 1.0	52.6 ± 3.1	45.2 ± 3.2	42.9 ± 3.4	44.9 ± 2.7	36.2 ± 3.1
转基因小鼠多奈哌齐 1mg/kg 组	56.4 ± 1.7	52.0 ± 2.3	51.1 ± 2.9	48.0 ± 3.1	41.5 ± 2.8	40.1 ± 3.3
转基因小鼠多奈哌齐 3mg/kg 组	57.8 ± 1.1	50.5 ± 2.6	48.9 ± 2.5	45.6 ± 2.5	40.9 ± 2.7	39.7 ± 3.1
转基因小鼠多奈哌齐 6mg/kg 组	58.1 ± 0.9	56.8 ± 1.4	52.3 ± 2.0	44.7 ± 3.2	41.2 ± 3.1	43.9 ± 3.3

明显减少($P < 0.01$),提示 APP/PS1-AD 转基因小鼠出现空间记忆功能的明显损害。与转基因小鼠对照组比较,无论是在穿越平台时间还是在穿越次数上,多奈哌齐不同剂量给药组均无明显改善,见表 3。

表 3 多奈哌齐对 APP/PS1-AD 转基因小鼠学习记忆功能(穿越平台)影响

组别	第一次穿越平台时间(s)	穿越平台次数(次)
野生型小鼠对照组	23.2 ± 3.7	2.7 ± 0.3
转基因小鼠对照组	39.5 ± 4.2*	0.9 ± 0.2**
转基因小鼠多奈哌齐 1mg/kg 组	36.2 ± 5.5	1.1 ± 0.3
转基因小鼠多奈哌齐 3mg/kg 组	44.1 ± 4.2	1.1 ± 0.3
转基因小鼠多奈哌齐 6mg/kg 组	40.2 ± 5.5	0.9 ± 0.3

注:与野生型小鼠对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

2.2.2 跳台实验 结果发现,野生型对照组与转基因对照组小鼠的潜伏期无统计学差异。多奈哌齐不同剂量给药组的潜伏期与野生型对照组与转基因对照组相比较均无明显改变(见表 4)。野生型对照组的错误次数仅为 0.6 ± 0.2 ,而转基因对照组小鼠的错误次数为 2.6 ± 1.6 ,与野生型小鼠对照组相比具有增加的趋势,但未达到统计学差异($P > 0.05$),提示转基因小鼠有一定程度的记忆缺失。给予多奈哌齐后,小鼠的错误次数均有减低,但个体差异较大,不具有统计学意义。

表 4 多奈哌齐对 APP/PS1-AD 转基因小鼠学习记忆功能(跳台实验)影响

组别	潜伏期(s)	错误次数(次)
野生型小鼠对照组	141.8 ± 13.6	0.6 ± 0.2
转基因小鼠对照组	132.4 ± 17.0	2.6 ± 1.6
转基因小鼠多奈哌齐 1mg/kg 组	150.4 ± 13.2	1.4 ± 0.9
转基因小鼠多奈哌齐 3mg/kg 组	130.4 ± 16.1	1.1 ± 0.3
转基因小鼠多奈哌齐 6mg/kg 组	128.4 ± 17.1	0.6 ± 0.2

3 讨论

AD 是老年人中最常见的认知功能进行性下降的疾病,是发生在中枢神经的一种病因复杂的原发性神经退行性疾病^[9]。由于 AD 的发病是多因素交叉引起,病理及生化的改变是多方面的,众多的学者在研究过程中,

形成了各自不同的假说,其中 A β 淀粉样肽学说是目前大家对 AD 比较公认的发病机制^[6]。而 APP/PS1-AD 转基因小鼠模型是经典的 AD 转基因动物模型之一,此模型可稳定表达人类突变基因 APP 和 PS1,引起细胞外淀粉样蛋白的沉积^[7],其优势是将两个易感基因结合在一起,从而缩短病理变化时间,并使病理特征多样化,能够较好的模拟 AD 患者早期病理和行为特征^[8]以及 AD 患者胆碱能系统的改变。多奈哌齐是目前临床使用较广泛的抗 AD 药物之一^[9],本研究考查多奈哌齐对 APP/PS1-AD 转基因小鼠学习记忆改善作用。

在经典的学习记忆实验-水迷宫实验中,笔者发现 APP/PS1-AD 转基因小鼠具有明显的学习记忆缺失,但多奈哌齐对 APP/PS1-AD 转基因小鼠学习记忆功能缺失无明显改善作用,提示在此动物模型中多奈哌齐治疗 AD 的作用没有达到预期效果。

跳台实验是一种抑制性被动回避实验,在记忆研究中,动物模型最重要的特点是抑制模仿活动或学习习惯。被动回避实验通过动物学会去掉某种特定的行为而逃避某种厌恶的事情。跳台实验中,转基因对照组小鼠第一次穿越原平台的时间较野生型小鼠明显延长($P < 0.05$),而穿越平台次数比野生型小鼠明显减少($P < 0.01$),长期给予多奈哌齐不同剂量给药组均不能缩短转基因小鼠第一次穿越平台的时间;多奈哌齐不同剂量给药组的跳台潜伏期与两对照组相比较均无明显改变,但跳台错误次数均有减低,且个体差异较大,不具有统计学意义。

综上所述,经典行为学实验表明,多奈哌齐并不能改善 APP/PS1-AD 转基因小鼠的空间学习记忆能力。多奈哌齐主要通过增加 AD 患者脑内乙酰胆碱水平而发挥学习记忆改善作用,在东莨菪碱诱导的小鼠痴呆模型中,多奈哌齐显示了良好的学习记忆改善作用^[10]。但 APP/PS1-AD 转基因小鼠的学习记忆缺失主要是由于 APP 和 PS1 基因突变引起的细胞外淀粉样蛋白沉积引起,多奈哌齐可能并不能改善 APP/PS1-AD 转基因小鼠脑内的 A β 淀粉样斑块沉积而发挥抗 AD 作用。但在跳台实验中,多奈哌齐不同剂量给药组的跳台潜伏期与两对照组相比较虽没有明显改变,但跳台错误次数均有减

低,提示 APP/PS1-AD 转基因小鼠可能也伴有胆碱能系统功能的紊乱,但并不是引起 APP/PS1-AD 转基因小鼠 AD 的主要原因。

总之,本实验结果提示多奈哌齐不能改善 APP/PS1-AD 转基因小鼠学习记忆功能缺失。同时,本研究也提示了 AD 的发病是机制的复杂,至今并没有哪一种假说能够完全地解释 AD 的发生、发展。

4 参考文献

- [1] Davies P, Maloney AJ. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease[J]. *Lancet*, 1976, 2(8000):1403. DOI: 10.1016/S0140-6736(76)91936-X.
- [2] Weiner MW, Veitch DP, Aisen PS, et al. 2014 Update of the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: a review of papers published since its inception[J]. *Alzheimers Dement*, 2015, 11: e1-e120. DOI: 10.1016/j.jalz.2011.09.172.
- [3] McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease[J]. *Alzheimers Dement*, 2011, 7(3):263-269. DOI: 10.1016/j.jalz.2011.03.005.
- [4] Hort J, O'Brien JT, Gainotti G, et al. EFNS guidelines for the diagnosis and anagement of Alzheimer's Disease[J]. *Eur J Neurol*, 2010, 17(10):1236-1248. DOI: 10.1111/j.1468-1331.2010.03040.x.
- [5] Arnold SE, Hyman BT, Flory J, et al. The Topographical and Neuroanatomical Distribution of Neurofibrillary Tangles and Neuritic Plaques in the Cerebral Cortex of Patients with Alzheimer's Disease[J]. *Cerebral Cortex*, 2012, 1(1):103. DOI: 10.1093/cercor/1.1.103.
- [6] Gunawardena S, Goldstein LSB. Disruption of Axonal Transport and Neuronal Viability by Amyloid Precursor Protein Mutations in *Drosophila*[J]. *Neuron*, 2001, 32(3):389-401. DOI: 10.1016/S0896-6273(01)00496-2.
- [7] Poisnel G, Moustie O, Dhilly M, et al. Monitoring amyloid plaque deposition in APP/PS1-21 mouse model with [18F]AV-45 [J]. *European Journal of Nuclear Medicine & Molecular Imaging*, 2011, 38:S107-S108. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.12.024.
- [8] Webster SJ, Bachstetter AD, Nelson PT, et al. Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models [J]. *Front Genet*, 2014, 5: 88. DOI: 10.3389/fgene.2014.00088.
- [9] Maynard CJ, Cappai R, Volitakis I, et al. Overexpression of Alzheimer's disease amyloid-beta opposes the age-dependent elevations of brain copper and iron[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(47):44670-44676. DOI: 10.1074/jbc.M204379200.
- [10] Herrmann N, Chau SA, Kircanski I, et al. Current and Emerging Drug Treatment Options for Alzheimer's Disease[J]. *Drugs*, 2011, 71(15):2031-2065. DOI: 10.2165/11595870-000000000-00000.

(收稿日期:2018-08-10)

(本文编辑:严玮雯)

(上接第 1285 页)

4 参考文献

- [1] Tsao CW, Lyass A, Larson MG, et al. Relation of Central Arterial Stiffness to Incident Heart Failure in the Community[J]. *Journal of the American Heart Association*, 2015, 4(11):e002189. DOI: 10.1161/JAHA.115.002189.
- [2] Costanzo L, Pedone C, Battistoni F, et al. Relationship between FEV1 and arterial stiffness in elderly people with chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Aging clinical and experimental research*, 2017, 29(2): 157-164. DOI: 10.1007/s40520-016-0560-3.
- [3] Writing Committee M, Yancy CW, Jessup M, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines[J]. *Circulation*, 2013, 128(16): e240-327. DOI: 10.1161/CIR.0b013e31829e8776.
- [4] Yoshihisa A, Takiguchi M, Shimizu T, et al. Cardiovascular function and prognosis of patients with heart failure coexistent with chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Journal of Cardiology*, 2014, 64(4): 256-264. DOI: 10.1016/j.jjcc.2014.02.003.
- [5] Jankowich MD, Taveira T, Wu WC. Decreased lung function is associated with increased arterial stiffness as measured by peripheral pulse pressure: data from NHANES III[J]. *American Journal of Hypertension*, 2010, 23(6): 614-619. DOI: 10.1038/ajh.2010.37.
- [6] Peng F, Pan H, Wang B, et al. The impact of angiotensin receptor blockers on arterial stiffness: a meta-analysis[J]. *Hypertension Research*, 2015, 38(9): 613-620. DOI: 10.1038/hr.2015.51.
- [7] Mecham RP. Elastin in lung development and disease pathogenesis[J]. *Matrix Biology*, 2018, 73:6-20. DOI: 10.1016/j.matbio.2018.01.005.
- [8] Marti CN, Gheorghiade M, Kalogeropoulos AP, et al. Endothelial dysfunction, arterial stiffness, and heart failure[J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2012, 60(16): 1455-1469. DOI: 10.1016/j.jacc.2011.11.082.
- [9] Wu CF, Liu PY, Wu TJ, et al. Therapeutic modification of arterial stiffness: An update and comprehensive review[J]. *World Journal of Cardiology*, 2015, 7(11): 742-753. DOI: 10.4330/wjc.v7.i11.742.
- [10] Moulakakis KG, Mylonas SN, Kakisis J, et al. Arterial Stiffness Alterations and Inflammatory Response Following Endovascular Aortic Repair: Based on a Presentation at the 2013 VEITH Symposium, November 19-23, 2013 (New York, NY, USA) [J]. *Aorta*, 2015, 3(2): 75-80. DOI: 10.12945/j.aorta.2015.14-071.
- [11] Mikael LR, Paiva AMG, Gomes MM, et al. Vascular Aging and Arterial Stiffness[J]. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 2017, 109(3): 253-258. DOI: 10.5935/abc.20170091.

(收稿日期:2018-07-26)

(本文编辑:沈昱平)