

阿尔茨海默病动物模型的研究进展

盛哲津¹, 李利妹²

(1. 同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092; 2. 同济大学附属东方医院医学转化平台, 上海 200120)

[摘要] 阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是最常见的老年性神经退行性疾病之一, 严重威胁着老年人的健康。目前被批准用于治疗AD的药物只能缓解AD的症状, 不能治愈AD或阻止其恶化。近40年来, 虽然AD的治疗方法层出不穷, 包括阻止脑淀粉样蛋白沉积或清除已有淀粉样蛋白斑块的化合物, 但是它们的临床疗效并不显著。因此, 需要更多的基础和临床研究来深入探讨AD疾病生物学机制。实验动物模型不仅对AD发病机制的研究, 还对AD药物的开发都非常重要。本综述从AD病理组织学特征和遗传因素出发, 论述已有的AD动物模型以及其评价方法。

[关键词] 阿尔茨海默病; 动物模型; 病理组织学特征; 淀粉样蛋白; 评价

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)04-0342-09

Research Progress in Animal Model of Alzheimer's Disease

SHENG Zhejin¹, LI Limei²

(1. School of Life Science and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China; 2. Research Center for Translational Medicine, Shanghai East Hospital, School of Medicine, Tongji University, Shanghai 200120, China)

Correspondence to: LI Limei (ORCID: 0000-0001-7027-4216), E-mail: 13601868653@163.com

[ABSTRACT] Alzheimer's disease (AD) is one of the most common neurodegenerative diseases, which seriously affects the health of the elderly people. The drugs currently approved for the treatment of AD can only reduce the symptoms severity of AD, but can't cure AD or prevent the deterioration of AD. Over the past 40 years, there have been numerous treatments for AD, including compounds that prevent amyloid deposition in the brain or remove existing amyloid plaques, but their clinical curative effects are not significant. Therefore, more basic and clinical studies are needed to improve our understanding of the biological mechanism of AD. Experimental animal models are very important not only for the study of the pathogenesis of AD, but also for the development of AD drugs. This paper reviewed the main histopathological characteristics, genetic factors, the current animal models and model evaluation of AD.

[Key words] Alzheimer's disease; Animal models; Histopathological characteristics; Amyloid; Evaluation

随着社会不断进步、生活水平大幅提高, 全球老龄化日益严重, 随之与年龄有关的疾病正威胁着全世界老年人的健康。阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是最重要、最常见的年龄相关神经退行性疾病之一, 也是痴呆症最常见的病因^[1]。AD患者占年龄相关痴呆诊断病例的60%~80%^[1-2]。根据发病年龄的不同, AD可分为65岁以前发病的早发性痴呆和65岁以后发病的老年性痴呆^[2]。1906年, 阿洛伊斯·阿尔茨海默检查了一位失忆了3年后死亡妇女的大脑, 发现

了一些不寻常的团块 (称淀粉样斑块) 和纤维缠结 (称神经原纤维, 或Tau缠结)^[3]。如今, 大脑中的这些斑块和缠结被认为是AD的主要病理性特征^[2,4]。此外, AD的诊断至少还需要两种临床症状, 包括记忆丧失, 语言、注意力、判断和解决问题等能力受损^[5]。根据AD疾病的主要特征, 目前已开发了几种治疗AD的方法。譬如, 乙酰胆碱酯酶抑制剂和N-甲基-D-天冬氨酸 (N-methyl-D-aspartic acid, NMDA) 受体拮抗剂, 尝试通过恢复大脑中神经递质水平治疗AD, 但临

[第一作者] 盛哲津 (1982—), 男, 硕士, 高级实验师, 研究方向: 实验室管理与模式生物技术。E-mail: zhejinsheng@tongji.edu.cn

[通信作者] 李利妹 (1980—), 女, 博士, 助理研究员, 专业方向为小鼠模型及表皮干细胞的功能研究。E-mail: 13601868653@163.com。ORCID: 0000-0001-7027-4216

床结果显示只能缓解AD患者的症状,并不能真正治愈AD^[6-7]。理论上真正有效治愈AD的策略应该是阻止引起神经退行性病变的发病进程,但目前的治疗都只是降低症状发生率。因此,需要进一步探究AD致病机制及新的更有效的治疗策略。

AD是一种由多病因引起且病理学极其复杂的疾病^[8]。实验动物模型不管是对AD发病机制的研究还是对药物的开发都非常重要。为了帮助阐明AD的致病机制,目前已建立了多种动物模型,包括转基因小鼠、果蝇、鱼和蠕虫等^[9]。利用上述动物模型模拟人类AD组织病理学的各个方面特征,譬如 β -淀粉样蛋白(β -amyloid, A β)异常沉积的斑块和Tau蛋白异常聚集形成的神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFTs),这些模型大大加深了人们对AD发病机制的理解^[10-11]。另外,合适的动物模型也是候选药物进入临床前研究时一个非常重要的工具或条件。本文就AD的主要病理组织学特征、遗传因素、有关动物模型以及其评价指标进行综述。

1 AD的主要病理组织学特征

AD的临床表现以记忆缺陷为主,随后其他认知功能如判断、语言流利性或方向性逐渐减退。尽管上述AD临床症状出现的次序可能会有所不同,但记忆损伤通常是第一个也是最主要的特征^[12]。大量研究发现AD患者的海马结构、大脑皮层联合区和皮质下结构等区域发生了一些神经病理学改变。

1.1 A β 斑块

A β 斑块是AD的组织病理学特征之一^[4]。淀粉样蛋白是一类含有 β -折叠的异质性蛋白质聚集体,对刚果红染料具有很强的亲和力。AD患者体内A β 沉积在脑膜、脑血管周围和灰质,是由淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)经 β -分泌酶和 γ -分泌酶的蛋白水解作用产生,其主要的蛋白质成分是40~42个氨基酸组成的多肽^[13]。A β 40是最常见的亚型;A β 42较不常见,但更容易聚集,且神经毒性更强^[13]。根据“淀粉样蛋白假说”,大脑中A β 的产生引发一系列病理变化,从而导致相应的AD临床症状^[14]。在能够引发A β 产生的转基因小鼠中,记忆障碍的严重程度与A β 斑块数量呈正相关^[15]。主动或被动进行A β 特异免疫可去除A β 斑块,恢复记忆功能^[16]。这些现象表明AD的产生与A β 斑块密切相关。

1.2 Tau蛋白的异常磷酸化与NFTs

AD的第二个病理组织学特征是神经原纤维退行性病变,称为NFTs,主要分布在神经元的胞体和顶端树突中^[4]。NFTs数量与痴呆严重程度之间存在正相关性^[17]。细胞内NFTs的核心蛋白为Tau蛋白,它们异常聚集形成不溶性的斑块。Tau是一种微管相关蛋白,在稳定微管方面起主要作用,还参与信号转导、肌动蛋白细胞骨架形成、细胞内囊泡转运以及磷酸酶和激酶的锚定^[18]。在AD等病理情况下,Tau蛋白被异常过度磷酸化,导致其正常生物功能丧失;而且过度磷酸化的Tau蛋白易于与微管分离,增加了Tau蛋白的可溶性,这可能是Tau长丝组装的第一步^[18]。在AD患者的大脑中,Tau还发生构象改变,可溶性Tau以一种自然未折叠的构象存在^[18]。此外,有研究还发现NFTs大量存在于其他神经退行性疾病中,如进行性核上性麻痹(progressive supranuclear palsy)、皮质基底节变性(corticobasal degeneration)、嗜银颗粒病(arginophilic grain disease)等^[19]。虽然NFTs并不是AD特有的,但是它们与神经退行性疾病密切相关。

此外,A β 斑块和NFTs之间有协同作用。A β 斑块和NFTs经常一起存在于异常的神经突中^[20]。因此,共同表达突变APP和Tau的双转基因动物模型,对研究两种病变的相互作用非常有价值。

1.3 神经炎症

越来越多的研究发现神经炎症反应会造成神经元损伤,加重AD症状,于是人们推测炎症是AD的一个可能致病因素,但直到近年来才将其作为治疗靶点而得到重视^[21-22]。错误折叠/聚集的蛋白质与小胶质细胞或星形胶质细胞上的模式识别受体结合,激活以炎性介质为特征的先天性免疫反应,促进AD疾病的发展。有证据表明,胶质细胞的激活可能通过释放白细胞介素-1和肿瘤坏死因子等细胞因子来驱动AD的慢性炎症^[21]。另外,全身性炎症和肥胖可能会干扰大脑的免疫过程,从而进一步加剧AD疾病的进展^[21]。一些研究表明,常年使用抗炎药治疗类风湿关节炎的患者对痴呆症的发生似乎有抵抗力^[22]。

1.4 与代谢异常的关系

有研究认为AD可以称为“3型糖尿病”,因为某些形式的AD与胰岛素抵抗有关,而胰岛素抵抗是2型糖尿病的主要原因^[23]。2型糖尿病患者患老年痴呆症或血管性痴呆症的风险似乎也更大。上述发现促使研究人员开始寻找血糖紊乱与神经退行性病变的潜在关

系, 而且尝试将控制血糖的药物用于AD的防治中^[24]。

2 AD的遗传因素

在AD的复杂病因中, 除了环境因素外, 遗传因素起主要作用。根据遗传因素, 将AD分为两种类型: 家族性AD (familial AD, FAD) 和散发型AD (sporadic AD, SAD)^[25]。

2.1 FAD

FAD一般在65岁之前发病, 比较罕见, 占有AD病例的1%。该类型的AD通常由3个基因的一个显性突变导致。这3个基因分别为*APP*、早老素1 (presenilin-1, *PSEN1*) 和早老素2 (presenilin-2, *PSEN2*)^[26]。

*APP*基因突变约占FAD的5%。1991年, 在英国一个FAD家族中发现*APP*基因的第一个错义突变, 即171位的缬氨酸被异亮氨酸取代 (V717I), 后被称为“伦敦突变”^[27]。随后, 研究人员发现了更多的等位基因变异, 目前共鉴定出20多种*APP*基因的致病性突变。另外在瑞典的2个FAD家族中发现670位和671位密码子发生双碱基对替换, 导致赖氨酸和蛋氨酸被天冬氨酸和亮氨酸取代 (K670D/M671L), 被称为“瑞典突变”, 简称APP^{sw}^[28]。

1992年, 通过对14号染色体的连锁分析发现了第2个FAD基因座, 通过定位克隆鉴定发现*PSEN1*基因^[29]。进一步通过与*PSEN1*的同源性鉴定, 又找到了位于1号染色体的*PSEN2*^[29]。大多数FAD病例是由*PSEN1*和*PSEN2*基因突变引起。迄今为止, 已经发现了120多个*PSEN1*基因突变, 而*PSEN2*基因突变只有8个。

在FAD中没有发现*Tau*基因突变。但是1998年在17号染色体连锁伴帕金森病的额颞痴呆 (chromosome 17 in families with frontotemporal degeneration and parkinsonism, FTDP-17) 中发现了*Tau*基因突变^[30]。FTDP-17是一种与AD相关的家族性痴呆症。这些发现表明*Tau*的功能异常可导致神经退行性病变, 进而引起痴呆。除了额颞痴呆外, *Tau*突变还可引起多种疾病, 如进行性皮质下胶质增生、皮质基底节变性和苍白球脑桥黑质变性^[31]。

2.2 SAD

SAD大多在65岁以后发病, 称为迟发性AD, 在老年人中较常见, 但无明显家族遗传。FAD与SAD的组织病理学特征难以区分。流行病学研究表明, 大约

30%的SAD患者中至少有一个一级亲属患病的家族病史, 其中10%有明显的常染色体显性遗传^[25]。一些基因位点的多态性可能是导致SAD的危险因素, 但在已经确定的20多个基因中, 确认是SAD风险基因的只有载脂蛋白E (apolipoprotein E, *APOE*) 基因^[32]。

3 AD动物模型

动物模型的建立和研究有助于AD生物学机制的认识, 还可以帮助评估新药物与AD疾病相关表型之间的因果关系^[33]。因此, 动物模型是开发各种治疗药物的必要工具。值得注意的是, 尽管部分动物和人类有着高度相似的生理特性, 但仍然存在物种差异。因此, 验证动物模型是否适用于研究目的是必需的。

啮齿动物 (包括大鼠、小鼠等) 和各种非人灵长类动物是用于研发AD等药物的典型动物。对啮齿动物的行为研究有悠久历史, 已有很多丰富的研究数据库便于参考, 而且成本低。其他物种包括线虫、果蝇、鸡、青蛙、斑马鱼、犬、猫、山羊、狼獾、狐猴、兔、豚鼠、叙利亚仓鼠、绵羊、黑猩猩、北极地松鼠和黑熊也被认为是人类AD/痴呆症的实验模型。但是上述动物或多或少存在一些问题, 譬如有些动物不表现与人类AD疾病相似的行为, 有些动物存在成本、伦理或专利问题, 应用有限。

动物模型必须具有稳定性且可重复。用于研究AD的动物模型可分为自然模型 (natural models)、遗传修饰模型 (genetically modified models) 和诱导模型 (induced models) 三类。这三类模型各有优缺点 (表1)。

3.1 自然模型

失忆是衰老最初的普遍现象。因此, 老年动物可能被用作痴呆和记忆丧失障碍的自然模型。不同的动物 (包括犬、猫、北极熊、绵羊、山羊和一些非人灵长类动物) 可以自发地表现出与AD相关的神经病理特性^[34]。其中, 一些物种 (譬如犬和非人灵长类) 的老年表现与人类的AD特性更为相似。由于自然模型不需要任何人工操作, 是模拟AD自然病理生理学过程的宝贵工具^[34]。

老年啮齿动物 (包括大鼠和小鼠等) 通常不会自发地表现出AD样病理学特征, 但是一些动物可作为人类痴呆的替代模型, 用于评估认知功能障碍。譬如, 快速衰老的SAMP8品系小鼠是研究AD的理想模型^[35]。该品系小鼠不但表现出年龄相关的学习记忆障碍, 而且表现出AD发病机制的大部分特征, 包括抗衰

表1 三类阿尔茨海默病动物模型的优缺点

Table 1 Advantages and disadvantages of three types of Alzheimer's disease (AD) animal models

模型类型 Model type	举例 Example	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
自然模型 Natural models	老年猕猴	与人类的发育相似,自发地表现出明显的AD相关神经病变	造模时间长,且某些个体生殖能力低
遗传修饰模型 Genetically modified models	Tg2576	有 β -淀粉样蛋白斑块、突触丧失及认知功能障碍	每个遗传模型不能显示所有AD相关基因的作用
诱导模型 Induced models	脑室内 β -淀粉样蛋白灌注	表现出部分AD特征,如胆碱能功能丧失	不能显示AD的所有典型特征

老因子、氧化应激、炎症因子异常表达、 $A\beta$ 沉积、Tau 过度磷酸化、内质网应激、自噬活性异常和肠道菌群破坏等^[35]。快速老化痴呆模型小鼠 SAMP8 是快速老化小鼠 (senescence accelerate mouse, SAM) 的一个亚系。SAM 小鼠是日本京都大学培育的一种近交系衰老模型鼠,已广泛用于衰老相关性疾病的研究^[35]。

3.2 遗传修饰模型

AD 遗传修饰模型是根据与 FAD 或 SAD 相关的易感基因设计而成,主要集中在 APP、PSEN1、微管相关蛋白 Tau (microtubule-associated protein Tau, MAPT)、髓样细胞表达触发受体-2 (triggering receptor-2 expressed on myeloid cells, TREM2) 和 APOE^[36-38]。迄今为止,已开发出近 170 个 AD 转基因/敲入/敲除模型 (具体可以参见 ALZForum 数据库: <https://www.alzforum.org/research-models>)。除 TREM2、APOE 外,这些模型几乎完全集中在淀粉样蛋白上,Tau 相关转基因较少。表2列出了 15 种常用的小鼠遗传修饰 AD 模型。

如何从 170 种左右的 AD 动物模式中选出最合适的模型,将是一个比较大的挑战,需要综合考虑。其中必须注意以下几点: (1) 没有一种动物模型能够完全再现人类 AD 发病机制中观察到的所有认知缺陷; (2) 每种小鼠模型都能模拟 AD 相关的某些方面; (3) 不同的小鼠模型之间,其认知缺陷发生的时间和严重程度各不相同; (4) 大多数模型的空间工作记忆的缺陷早于其他认知领域的缺陷; (5) 大多数使用 AD 小鼠模型的研究都集中利用行为学研究 AD 相关的认知缺陷。然而,考虑到 AD 是一种复杂的疾病,各种非认知症状也会对不同的 AD 小鼠模型产生或多或少的影响,因此在评估行为表型时,各种非认知症状应与疾病的认知缺陷一起考虑。

3.3 诱导模型

根据颅内注射化学物质是否直接引起特定脑区诱

发病变的差异,AD 诱导模型可以分为化学诱导模型和损伤诱导模型^[39]。可以经脑部注入特定的物质影响神经递质途径,阻滞神经元,导致动物痴呆,从而建立化学诱导模型,例如 $A\beta$ 或东莨菪碱诱导的遗忘模型。通过外科手术在侧脑室或脑实质内注射微量神经毒物质 (如 NMDA、鹅膏蕈氨酸和胆碱毒素 AF64) 引起脑部病变,可建立损伤诱导模型,该模型有助于了解胆碱能神经支配在认知功能障碍中的作用机制^[38]。表3列出了 AD 诱导模型使用各种兴奋性毒素对胆碱能途径的化学损伤,或者是基于缺氧和 (或) 中风诱导的模型。

4 AD 动物模型的评价指标

AD 动物模型主要从以下几个方面进行评价: (1) 分子病理学或组织病理学特征测试,用于证实 $A\beta$ 斑块、Tau 蛋白的细胞内聚集体、氧化损伤以及大脑皮层和某些大脑皮层下区域的突触和神经元损失; (2) 行为测试,用于评价动物认知缺陷状况。一般利用常规的分子指标分析就可以实现分子病理学或组织病理学测试,如蛋白质印迹、免疫组织化学染色和实时定量 PCR。以下重点介绍动物行为评价和无创检测手段。

4.1 动物行为评价

在评估某种化合物是否具有改善认知功能作用时,行为测试结果通常是衡量指标,因为这些指标的变化与 AD 相关的认知功能障碍直接相关。如何在动物 (如啮齿动物和非人灵长类动物) 中有效地测量 AD 引起的认知障碍,对 AD 发病机制及药物发现都非常重要^[40-41]。表4列举了 5 种对 AD 动物模型进行行为测试的实验方法,主要测试动物的空间记忆行为 (Morris 水迷宫、放射臂迷宫和巴恩斯迷宫)、联想学习 (场景恐惧实验)、新物体再记忆 (新物体识别实验)。

但需要注意的是,与 AD 表型相关的生化指标变化相比,行为测试的结果一致性较差,需要更加严格的

表2 15种常用的小鼠阿尔茨海默病遗传修饰模型

Table 2 15 common genetically modified mouse models of Alzheimer's disease (AD)

模型名称	基因/小鼠类型	神经病理学特征	行为/认知障碍
Name of model	Type of gene/mouse	Characteristics of neuropathology	Behavioral / cognitive disorder
PDAPP	APP [*]	海马、大脑皮层胶质增生(3~4月龄),营养不良性神经突,海马的突触和树突减少	物体识别,空间记忆受损(3月龄),暗示条件恐惧反射受损(11月龄)
APP V717I	APP [*]	A β 斑块(10月龄),脑血管内淀粉样蛋白沉积(15月龄),淀粉样蛋白相关炎症,营养不良性神经突,过度磷酸化的Tau蛋白,无NFTs	空间和非空间定向及记忆障碍(6月龄),焦虑/不安情绪加重(2月龄),多动症和攻击性
G2576	APP [*]	A β 斑块(6~9月龄),氧化脂质损伤、星形胶质细胞增生和小胶质细胞增生(11~13月龄)	空间学习、工作记忆和条件化情景恐惧受损(6月龄),认知功能进行性损伤(12月龄)
APP23	APP [*]	A β 斑块(6月龄),过度磷酸化Tau,无NFTs,营养不良性神经突,海马CA1区神经元丢失,CAA	空间记忆缺陷(3月龄),被动回避的记忆缺陷(25月龄)
J20 (PDGF-APP ^{Sw} , Ind)	APP [*]	A β 斑块,营养不良性神经突,无NFTs,细胞减少丢失,突触的标志物减少,补体免疫反应增加	学习和记忆障碍(4月龄),多动,记忆缺陷(6月龄)
5 $\times$ FAD	APP [*] , PSEN1 [*]	A β 斑块(2月龄),胶质增生和突触变性,大脑皮层V区神经元丢失	记忆和暗示与关联条件恐惧受损(6月龄)
APP (V717I) $\times$ PS1 (A246E)	APP [*] , PSEN1 [*]	可溶性A β 寡聚物(2月龄),A β 斑块(6~9月龄),淀粉样蛋白相关炎症,CAA(8月龄),异常磷酸化Tau蛋白,营养不良性神经突,但无NFTs	空间和非空间定向及记忆障碍(5月龄),联想学习障碍、多动症、焦虑和攻击性
APP ^{Sw} /PSEN1dE9 (line 85)	APP [*] , PSEN1 [*]	A β 斑块(6月龄),神经元中度丢失(8~10月龄),无NFTs,突触标志物减少和补体免疫反应性增加	认知和情境记忆障碍(6月龄),空间学习障碍(12月龄),筑巢、挖洞等自发行行为改变
Tg2576/Tau(P301L) (APP ^{Sw} -Tau)	APP [*] , MAPT [*]	A β 斑块整个皮质、海马体和杏仁核(9月龄),星形细胞和小胶质细胞增多,CAA和NFTs(9~11月龄)	运动障碍(4~6月龄)
PLB1-triple (hAPP/hTau/hPS1)	APP [*] , MAPT [*] , PSEN1 [*]	A β 寡聚体,海马和皮质过度磷酸化Tau蛋白(6月龄),无明显NFTs,脑皮层代谢低下,基底前脑和腹中脑代谢活性增加	认知记忆和空间学习缺陷(5月龄),海马的结构可塑性受损
3 $\times$ Tg	APP [*] , PSEN1 [*] , MAPT [*]	A β 斑块(6月龄),NFTs(12月龄),突触功能障碍,突触可塑性缺陷	记忆缺陷,暗示与关联条件恐惧受损(4~5月龄)
hTau	mMAPT [*] , hMAPT [*]	NFTs(6月龄),NFTs和神经元丢失(15月龄)	工作记忆和空间记忆的缺陷(12月龄)
rTg (TauP301L) 4510	MAPT [*]	无NFTs和神经元丢失(4~6月龄)	空间记忆减退和新物体识别障碍(1.5~4月龄),暗示与关联条件恐惧受损
APOE4 Knock-In [§]	APOE [§]	大脑及血清中APOE水平显著高;禁食6h后,血清胆固醇和三酰甘油升高	无数据
PS1 [£]	PSEN1 [*]	无严重的神经病理学异常(24月龄)	记忆未受影响(24月龄)

注: *转基因; [£]多拷贝转基因; [£]敲除; [§]敲入; [§]表2中除了APOE2 Knock-In模型为家族性AD模型,其他全是散发型AD模型; [£]为该小鼠已用于产生APP (V717I) $\times$ PS1 (A246E)在内的多个双基因小鼠品系。APP为淀粉样前体蛋白; PSEN1/2为早老素1/2; A β 为 β -淀粉样蛋白, NFTs为神经原纤维缠结; CAA为脑淀粉样血管病; MAPT为微管相关蛋白Tau; mMAPT为小鼠MAPT基因; hMAPT为人MAPT基因; APOE为载脂蛋白E。

Note: *Transgenes; [£]Multi-copy transgenes; [£]Knockout; [§]Knock-in; [§]APOE2 Knock-In model is a familial AD model, all the other models are sporadic AD models in Table 2; [£]This mouse has been used to generate several digenic mouse models including APP (V717I) $\times$ PS1 (A246E). APP is amyloid precursor protein; PSEN1/2 is presenilin-1/2; A β is β -amyloid; NFTs is neurofibrillary tangles; CAA is cerebral amyloid angiopathy; MAPT is microtubule-associated protein Tau; mMAPT is mouse microtubule-associated protein Tau gene; hMAPT is human microtubule-associated protein Tau gene; APOE is apolipoprotein E.

实验要求,包括小鼠品系、性别、年龄、是否是同一窝出生的小鼠、实验环境等。即使行为评价模型是标准化的,各种模型之间的行为数据也可能难以比较。

4.2 成像系统

神经成像技术提供了一种非常好的无创性检测方法,在临床前和临床研究中发挥着重要作用^[42-43]。最

表3 常用的阿尔茨海默病诱导模型

Table 3 Common intervention models of Alzheimer's disease (AD)

造模方式 Modeling method	表型 Phenotype
脑室内注射β-淀粉样蛋白	急性或慢性脑室内注射或海马内注射Aβ40、β42或FAB(亚铁淀粉样丁硫氨酸)引起学习和认知障碍
雌性大鼠去卵巢后海马区注射β-淀粉样蛋白片段25-35	短记忆和空间记忆功能恶化,皮质醇水平升高,并伴有葡萄糖、脂质和骨代谢异常,空腹胰岛素抵抗
脑室内注射链脲佐菌素	与AD相似的进行性记忆丧失
脑室内注射软海绵酸	脑室内注射软海绵酸14 d导致p-Tau和Aβ的增加,造成认知障碍
脑室内注射AF64A	胆碱毒素选择性地降低乙酰胆碱、乙酰胆碱酯酶、胆碱乙酰转移酶、乙酰胆碱酯酶、钾离子水平,并可减少哇巴因刺激的乙酰胆碱酯酶释放水平
侧脑室注射192-IgG-saporin	免疫毒素造成持续性损伤,造成胆碱能通路受损,出现认知障碍
鹅膏蕈氨酸和其他兴奋性毒素(NMDA、喹啉酸、红藻氨酸和奎司喹酸)	单独使用兴奋性毒素或与Aβ联用可引起海马胆碱能神经元丢失,出现认知功能障碍
腹腔注射东莨菪碱	学习障碍
缺氧/中风	记忆障碍,血管性痴呆

注: STZ为链脲佐菌素; AF64A为1-乙基-1-(2-羟乙基)-氯化氮丙啶; NMDA为N-甲基-D-天冬氨酸。
Note: STZ is streptozotocin; AF64A is 1-(ethyl)-1-(2-hydroxyethyl) aziridinium chloride; NMDA is N-methyl-D-aspartic acid.

表4 阿尔茨海默病动物模型的行为测试实验

Table 4 Behavioral validation tests for animal models of Alzheimer's disease (AD)

行为测试实验 Behavioral validation test	测试的认知能力 Cognitive domains	注释 Description
Morris水迷宫 Morris water maze	空间参考记忆和工作记忆	根据在水箱外部学习到的视觉线索,测定大鼠或小鼠在装有不透明液体的圆形水箱中找到稳定平台的能力。找到这些平台所需的时间是衡量认知功能的主要指标。该模型是检测海马空间记忆缺陷最常见的行为测试方法之一
放射臂迷宫 Radial arm maze	空间参考记忆和工作记忆	有6~8条手臂从中心空间放射出来的迷宫。其中一只手臂含有动物找到后可以得到的奖励食物
巴恩斯迷宫实验 Barnes maze	空间参考记忆和工作记忆	圆形桌子边缘最多有20个圆孔,每个圆孔都有视觉提示,其中一个下方有一个“逃生箱”,啮齿动物可以通过桌面上相应的孔进入。由于啮齿动物对开放空间厌恶,此模型可以促使动物寻找逃生箱
场景恐惧实验 Cued and contextual fear conditioning	空间参考记忆和背景记忆	将一个特定的无倾向性的条件刺激与一个厌恶的无条件刺激联系起来,让动物表现出条件反应。具体操作如下:啮齿动物被放置在一个调节室中,给予条件刺激(听觉线索)和厌恶的非条件刺激(电击);休息一段时间后,动物暴露在同一个调节室和一个不同形状的环境空间中,出现听觉线索,观察动物出现冻结行为的情况。冻结行为是一种常见的对恐惧情境的反应,可以作为恐惧记忆的衡量指标
新物体识别实验 Novel object recognition	识别记忆	利用啮齿动物自发倾向于探索新物体的本能而建立模型。啮齿动物放置在测试空间探索并适应24 h后,在空间内等距放置两个相同的物体。第2天,这些动物被放在开阔的场地里,面对熟悉的物体和新奇的物体(高度和体积一致,但形状和外观不同),测试它们的长期识别记忆能力

常见的脑成像方法是磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)和正电子发射断层成像(positron emission tomography, PET)。MRI利用磁场和无线电波(不使用放射性示踪剂)能够提供良好的对比度图像。结构磁共振成像(structural MRI, sMRI)可以检测到AD脑组织的大小变化^[44];功能磁共振成像(functional MRI, fMRI)可识别与神经活动相关的血流动力学反应,表征神经系统疾病^[45]。MRI不能直接识

别AD的分子病理学或组织病理学特征,但是PET可以直接检测AD的分子病理学特征^[46-47]。因此,与MRI相比,PET具有更大的优势。PET是一种无创成像技术,可与放射性标记物相结合,评估Aβ在脑部沉积量的情况、代谢负荷以及葡萄糖下降率等。尽管神经影像学方法有许多优点,但也存在局限性^[47],例如PET检测手段成本高、存在放射性污染和对放射性过敏的风险。

5 展望

AD严重影响全世界老年人的健康,是一种多病因、病理学极其复杂的疾病。目前还没有找到AD的真正致病原因,因此也没有能够真正有效治疗的药物。根据AD最主要的神经病理学特征即在大脑部位形成A β 斑块,研究人员提出了淀粉样蛋白假说,已构建了170多种“A β 斑块”动物模型,并利用这些模型测试了许多阻止脑淀粉样蛋白沉积或清除已有淀粉样蛋白斑块的化合物,但是这些化合物一旦进入临床试验阶段均因无临床疗效而不得不放弃^[48]。因此,在大脑中过度表达各种形式的人类淀粉样蛋白的大多数转基因动物更像是一种导致AD的病理学模型。

值得一提的是,最近《科学》杂志发表了一篇详尽的调查报告,称2006年Sylvain Lesné等发表在《自然》杂志上的一篇文章涉嫌造假^[49]。该论文主要证明相对分子质量为56 000的可溶性A β 寡聚物形式(命名为A β *56)在老年AD模型小鼠Tg2576脑部沉积是该小鼠发生记忆缺陷的原因。上述工作是第一次在动物体内纯化获得一种特定的A β 寡聚物形式,并证明了其对神经的毒性,因此,该工作造假会对淀粉样蛋白假说形成一定“冲击”,让一些研究者更加严谨、客观地看待A β 斑块在AD发生中的作用。但A β *56只是A β 寡聚物的一种,并非AD患者脑部表达最多的A β 。目前,AD研究领域公认的是A β 40和A β 42,也是研究最多的两种A β 寡聚形式。因此,上述造假事件可能并不会影响淀粉样蛋白假说,或许针对A β 开发药物的不断失败才真正让人们开始怀疑它的正确性。

有研究表明,在非人灵长类动物AD模型中去除大脑的A β 斑块并没有改善灵长类动物的认知状态^[50]。因此,建议在临床试验前,先在非人灵长类动物模型中测试相关的AD候选药物,以避免临床试验失败带来的巨额成本。但需要注意,目前对非人灵长类动物AD病理特征的研究不多,有些国家存在动物伦理的争议,而且非人灵长类动物成本昂贵,上述因素均需要研究者在采用这类模型时综合考虑。此外,通过行为测试评价认知障碍的结果可能不够精准,需要进一步改善,一般至少需要两个行为测试来评估某化合物是否具有改善行为认知的能力。

总之,虽然目前已经有多达200多种的AD动物模型,但基于淀粉样蛋白假说开发的药物在临床试验中证明失败,提示研究者们需要开发出更多非“A β 斑块”动物模型,譬如更接近人类发病机制的自然模型。

希望这些新开发的模型能帮助人们更好地理解AD疾病的复杂致病机制,并帮助找到真正有效的治疗AD的药物。另外,还需要开发出更多的模型或实验方法来评估行为认知,如嗅觉障碍模型^[51],因为嗅觉障碍是AD的一个关键特征,它可能比Morris水迷宫、放射臂迷宫和巴恩斯迷宫更能反映AD动物的认知情况。

[作者贡献 Author Contribution]

盛哲津检索文献,并制作所有表格;李利妹撰写和修改文稿。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] 张淇,贾杰.阿尔茨海默病功能障碍康复现状[J].中国医刊,2021,56(1):16-18. DOI:10.3969/j.issn.1008-1070.2021.01.005.
ZHANG Q, JIA J. Status of rehabilitation of dysfunction in Alzheimer's disease[J]. Chin J Med, 2021, 56(1):16-18. DOI:10.3969/j.issn.1008-1070.2021.01.005.
- [2] SCHELTENS P, DE STROOPER B, KIVIPERTO M, et al. Alzheimer's disease[J]. Lancet, 2021, 397(10284): 1577-1590. DOI:10.1016/S0140-6736(20)32205-4.
- [3] MÖLLER H J, GRAEBER M B. The case described by Alois Alzheimer in 1911[J]. European Archives of Psychiatry and Clinical Neurosciences, 1998, 248: 111-122. DOI: 10.1007/s004060050027.
- [4] 肖义军,陈莉莉.阿尔茨海默症及其预防措施概述[J].生物学教学,2020,45(10):2-4. DOI:10.3969/j.issn.1004-7549.2020.10.001.
XIAO Y J, CHEN L L. Overview of Alzheimer's disease and its preventive measures[J]. Biol Teach, 2020, 45(10):2-4. DOI:10.3969/j.issn.1004-7549.2020.10.001.
- [5] 刘畅,封海霞,沈萍,等.阿尔茨海默病的症状、诊断及其护理[J].基因组学与应用生物学,2021,40(3):1435-1440. DOI:10.13417/j.gab.040.001435.
LIU C, FENG H X, SHEN P, et al. Symptoms, diagnosis and nursing of Alzheimer's disease[J]. Genom Appl Biol, 2021, 40(3):1435-1440. DOI:10.13417/j.gab.040.001435.
- [6] KIM L D, FACTORA R M. Alzheimer dementia: starting, stopping drug therapy[J]. Cleve Clin J Med, 2018, 85(3):209-214. DOI:10.3949/ccjm.85a.16080.
- [7] ZANNI R, GARCIA-DOMENECH R, GALVEZ-LLOMPART M, et al. Alzheimer: a decade of drug design. why molecular topology can be an extra edge? [J]. Curr Neuropharmacol, 2018, 16(6):849-864. DOI:10.2174/1570159X15666171129102042.
- [8] 唐丽娜,许小明,李艳红.阿尔茨海默病发病机制研究进展[J].中国老年学杂志,2016,36(10):2545-2548. DOI:10.3969/j.issn.1005-9202.2016.10.111.
TANG L N, XU X M, LI Y H. Research progress on pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. Chin J Gerontol, 2016, 36(10): 2545-2548. DOI: 10.3969/j. issn. 1005-9202.2016. 10.111.
- [9] GÖTZ J, ITTNER L M. Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia[J]. Nat Rev Neurosci, 2008, 9(7):

- 532-544. DOI:10.1038/nrn2420.
- [10] GALLARDO G, HOLTZMAN D M. Amyloid- β and tau at the crossroads of Alzheimer's disease[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1184:187-203. DOI:10.1007/978-981-32-9358-8_16.
- [11] 马登磊, 张兰. P301S突变tau转基因动物模型及其应用[J]. *实验动物与比较医学*, 2017, 37(6):491-496. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2017.06.015.
- MA D L, ZHANG L. P301S mutant tau transgenic mouse and their applications[J]. *Lab Animal Comp Med*, 2017, 37(6):491-496. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2017.06.015.
- [12] BASTIN C, DELHAYE E, MOULIN C, et al. Novelty processing and memory impairment in Alzheimer's disease: a review[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2019, 100: 237-249. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2019.02.021.
- [13] 王金秀, 高凡, 孙慧珍, 等. A β 对阿尔茨海默病影响机制的研究进展[J]. *生命科学研究*, 2021, 25(1):53-57, 79. DOI:10.16605/j.cnki.1007-7847.2020.05.0185.
- WANG J X, GAO F, SUN H Z, et al. Research progress on mechanisms of A β effects on Alzheimer's disease[J]. *Life Sci Res*, 2021, 25(1):53-57, 79. DOI:10.16605/j.cnki.1007-7847.2020.05.0185.
- [14] SELKOE D J, HARDY J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years[J]. *EMBO Mol Med*, 2016, 8(6): 595-608. DOI:10.15252/emmm.201606210.
- [15] VASCONCELOS-FILHO F S L, DA ROCHA OLIVEIRA L C, DE FREITAS T B C, et al. Neuroprotective mechanisms of chronic physical exercise via reduction of β -amyloid protein in experimental models of Alzheimer's disease: a systematic review[J]. *Life Sci*, 2021, 275: 119372. DOI: 10.1016/j.lfs.2021.119372.
- [16] TOLAR M, ABUSHAKRA S, SABBAGH M. The path forward in Alzheimer's disease therapeutics: Reevaluating the amyloid cascade hypothesis[J]. *Alzheimer's Dement*, 2019 DOI:10.1016/j.jalz.2019.09.075.
- [17] 李瑞力, 杨明飞. P-tau蛋白在颅脑损伤及相关神经退行性病中的研究进展[J]. *医学研究生学报*, 2017, 30(8):889-892. DOI:10.16571/j.cnki.1008-8199.2017.08.022.
- LI R L, YANG M F. The latest progress of p-tau conformations in traumatic brain injury and relevant neurodegeneration[J]. *J Med Postgrad*, 2017, 30(8):889-892. DOI:10.16571/j.cnki.1008-8199.2017.08.022.
- [18] CANEPA E, FOSSATI S. Impact of tau on neurovascular pathology in Alzheimer's disease[J]. *Front Neurol*, 2021, 11: 573324. DOI:10.3389/fneur.2020.573324.
- [19] GOEDERT M. Tau filaments in neurodegenerative diseases[J]. *FEBS Lett*, 2018, 592(14): 2383-2391. DOI: 10.1002/1873-3468.13108.
- [20] FAN D Y, SUN H L, SUN P Y, et al. The correlations between plasma fibrinogen with amyloid-beta and tau levels in patients with Alzheimer's disease[J]. *Front Neurosci*, 2021, 14: 625844. DOI:10.3389/fnins.2020.625844.
- [21] 张薇, 刘会, 张亚岚, 等. 炎症在阿尔茨海默病中作用机制的研究进展[J]. *生命科学研究*, 2021, 25(2):144-150. DOI:10.16605/j.cnki.1007-7847.2020.09.0248.
- ZHANG W, LIU H, ZHANG Y L, et al. Research progresses on mechanisms of inflammation in Alzheimer's disease[J]. *Life Sci Res*, 2021, 25(2): 144-150. DOI: 10.16605/j.cnki.1007-7847.2020.09.0248.
- [22] DEARDORFF W J, GROSSBERG G T. Targeting neuroinflammation in Alzheimer's disease: evidence for NSAIDs and novel therapeutics[J]. *Expert Rev Neurother*, 2017, 17(1):17-32. DOI:10.1080/14737175.2016.1200972.
- [23] DE LA MONTE S M, WANDS J R. Alzheimer's disease is type 3 diabetes-evidence reviewed[J]. *J Diabetes Sci Technol*, 2008, 2(6):1101-1113. DOI:10.1177/193229680800200619.
- [24] RORBACH-DOLATA A, PIWOWAR A. Neurometabolic evidence supporting the hypothesis of increased incidence of type 3 diabetes mellitus in the 21st century[J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019:1435276. DOI:10.1155/2019/1435276.
- [25] DORSZEWSKA J, PRENDECKI M, OCZKOWSKA A, et al. Molecular basis of familial and sporadic Alzheimer's disease [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2016, 13(9): 952-963. DOI: 10.2174/1567205013666160314150501.
- [26] SHASTRY B S. Molecular genetics of familial alzheimer disease[J]. *Am J Med Sci*, 1998, 315(4):266-272. DOI:10.1016/S0002-9629(15)40324-6.
- [27] GOATE A, CHARTIER-HARLIN M C, MULLAN M, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease[J]. *Nature*, 1991, 349(6311):704-706. DOI:10.1038/349704a0.
- [28] MULLAN M, CRAWFORD F, AXELMAN K, et al. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of β -amyloid[J]. *Nat Genet*, 1992, 1(5):345-347. DOI:10.1038/ng0892-345.
- [29] CAMPION D, DUMANCHIN C, HANNEQUIN D, et al. Early-onset autosomal dominant alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum[J]. *Am J Hum Genet*, 1999, 65(3):664-670. DOI:10.1086/302553.
- [30] HUTTON M, LENDON C L, RIZZU P, et al. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17[J]. *Nature*, 1998, 393(6686):702-705. DOI:10.1038/31508.
- [31] GUO T, NOBLE W, HANGER D P. Roles of tau protein in health and disease[J]. *Acta Neuropathol*, 2017, 133(5):665-704. DOI:10.1007/s00401-017-1707-9.
- [32] SERRANO-POZO A, DAS S, HYMAN B T. APOE and Alzheimer's disease: advances in genetics, pathophysiology, and therapeutic approaches[J]. *Lancet Neurol*, 2021, 20(1):68-80. DOI:10.1016/S1474-4422(20)30412-9.
- [33] 冯荣芳, 冯亚青, 吕佩源. 阿尔茨海默病动物模型研究进展[J]. *脑与神经疾病杂志*, 2008, 16(6):724-726. DOI:10.3969/j.issn.1006-351X.2008.06.025.
- FENG R F, FENG Y Q, LÜ P Y. Research progress of animal models of Alzheimer's disease[J]. *J Brain Nerv Dis*, 2008, 16(6): 724-726. DOI:10.3969/j.issn.1006-351X.2008.06.025.
- [34] SALAZAR C, VALDIVIA G, ARDILES Á O, et al. Genetic variants associated with neurodegenerative Alzheimer disease in natural models[J]. *Biol Res*, 2016, 49(1): 1-9. DOI: 10.1186/s40659-016-0072-9.
- [35] LIU B, LIU J, SHI J S. SAMP8 mice as a model of age-related

- cognition decline with underlying mechanisms in Alzheimer's disease[J]. *J Alzheimers Dis*, 2020, 75(2):385-395. DOI:10.3233/JAD-200063.
- [36] BILKEI-GORZO A. Genetic mouse models of brain ageing and Alzheimer's disease[J]. *Pharmacol Ther*, 2014, 142(2):244-257. DOI:10.1016/j.pharmthera.2013.12.009.
- [37] GÖTZ J, SCHILD A, HOERNDLI F, et al. Amyloid-induced neurofibrillary tangle formation in Alzheimer's disease: insight from transgenic mouse and tissue-culture models[J]. *Int J Dev Neurosci*, 2004, 22(7): 453-465. DOI: 10.1016/j.ijdevneu.2004.07.013.
- [38] AUDRAIN M, HAURE-MIRANDE J V, MLECZKO J, et al. Reactive or transgenic increase in microglial TYROBP reveals a TREM2-independent TYROBP-APOE link in wild-type and Alzheimer's-related mice[J]. *Alzheimers Dement*, 2021, 17(2): 149-163. DOI:10.1002/alz.12256.
- [39] GOODARZI P, PAYAB M, ALAVI-MOGHADAM S, et al. Development and validation of Alzheimer's disease animal model for the purpose of regenerative medicine[J]. *Cell Tissue Bank*, 2019, 20(2): 141-151. DOI: 10.1007/s10561-019-09773-8.
- [40] DAVIS S, LAROCHE S. What can rodent models tell us about cognitive decline in Alzheimer's disease? [J]. *Mol Neurobiol*, 2003, 27(3):249-276. DOI:10.1385/MN: 27:3: 249.
- [41] MASUDA A, KOBAYASHI Y, ITOHARA S. Automated, long-term behavioral assay for cognitive functions in multiple genetic models of Alzheimer's disease, using IntelliCage[J]. *J Vis Exp*, 2018(138):58009. DOI:10.3797/58009.
- [42] SCARFE L, BRILLANT N, KUMAR J D, et al. Preclinical imaging methods for assessing the safety and efficacy of regenerative medicine therapies[J]. *Npj Regen Med*, 2017, 2: 28. DOI:10.1038/s41536-017-0029-9.
- [43] SALMON E, BERNARD IR C, HUSTINX R. Pitfalls and limitations of PET/CT in brain imaging[J]. *Semin Nucl Med*, 2015, 45(6):541-551. DOI:10.1053/j.semnucmed.2015.03.008.
- [44] FRISONI G B, FOX N C, JACK C R, et al. The clinical use of structural MRI in Alzheimer disease[J]. *Nat Rev Neurol*, 2010, 6(2):67-77. DOI:10.1038/nrneurol.2009.215.
- [45] AGOSTA F, CANU E, FILIPPI M. Virtual reality and real-time neurofeedback functional MRI: a breakthrough in foreseeing Alzheimer's disease? [J]. *Brain*, 2020, 143(3): 722-726. DOI: 10.1093/brain/awaa038.
- [46] MARCUS C, MENA E, SUBRAMANIAM R M. Brain PET in the diagnosis of Alzheimer's disease[J]. *Clin Nucl Med*, 2014, 39(10): e413-e422; quiz e423-6. DOI: 10.1097/RLU.0000000000000547.
- [47] REIMAN E M, JAGUST W J. Brain imaging in the study of Alzheimer's disease[J]. *NeuroImage*, 2012, 61(2):505-516. DOI: 10.1016/j.neuroimage.2011.11.075.
- [48] KARRAN E, DE STROOPER B. The amyloid cascade hypothesis: are we poised for success or failure? [J]. *J Neurochem*, 2016, 139(Suppl 2):237-252. DOI:10.1111/jnc.13632.
- [49] LESNE S, KOH M T, KOTILINEK L, et al. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory[J]. *Nature*, 2006, 440(7082):352-357. DOI:10.1038/nature04533.
- [50] RICCIARELLI R, FEDELE E. The amyloid cascade hypothesis in Alzheimer's disease: it's time to change our mind[J]. *Curr Neuropsychopharmacol*, 2017, 15(6): 926-935. DOI: 10.2174/1570159X15666170116143743.
- [51] ROBERTS R O, CHRISTIANSON T J H, KREMERS W K, et al. Association between olfactory dysfunction and amnesic mild cognitive impairment and alzheimer disease dementia [J]. *JAMA Neurol*, 2016, 73(1):93-101. DOI:10.1001/jamaneurol.2015.2952.
- (收稿日期:2021-07-19 修回日期:2021-11-17)
(本文编辑:富群华,张俊彦,余儒洋)

《实验动物与比较医学》有关作者投稿必备信息和材料的说明

《实验动物与比较医学》是我国实验动物科学与比较医学领域创刊最早的一本专业性学术期刊,执行严格的同行评议和三审三校制度。为提高稿件审理效率,以及规范作者投稿行为,本刊加大初审力度。作者从本刊官网(<http://www.slarc.org.cn/dwyx>)投稿时,除提交Word格式的完整论文外,还需提供以下必备信息和材料:

1. 所有署名作者的信息,包括最高学历、职称、研究方向、E-mail和电话等。
2. 第一作者单位盖章的论文审查表或介绍信扫描件,需承诺本文符合科研诚信要求。
3. 涉及动物实验的研究性文章还需提供实验动物的生产许可证和质量合格证、实验场所的实验动物使用许可证、该研究的实验动物福利伦理审查表的扫描件。文中注明以上三证一表的准确编号。
4. 填写作者贡献及利益冲突声明表,并在文末说明。
5. 研究如有基金资助,请提供与本文内容相符的基金立项证明。

以上2~5材料均请打包后,作为附件上传本刊投审稿系统。若材料不齐(特殊情况须备注说明)或信息造假,编辑部将直接退稿。详情可见本刊官网首页的“政策指南”-“投稿指南”和“政策细则”-“稿件要求细则”。相关模板可至“政策细则”-“附件模板下载”获取。

《实验动物与比较医学》编辑部