

小鼠海马区 PDK1 基因敲除对海马依赖的学习记忆功能的影响

许敏¹, 韩潇宁², 杨中州³, 赵春杰², 高隽^{1*}

(¹南京医科大学神经生物学系, 江苏 南京 211166; ²东南大学医学院组织胚胎学系, 江苏 南京 210009; ³南京大学模式动物研究所, 江苏 南京 210061)

[摘要] 目的:探索 3-磷酸肌醇依赖的蛋白激酶-1(3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1, PDK1)在海马依赖的学习记忆中的作用。方法:采用 Cre/Loxp 系统条件性敲除了表达在背侧端脑中 Emx1(empty spiracles homeobox 1)阳性神经细胞中的 PDK1,利用聚合酶链式反应及行为学实验 Morris 水迷宫对 PDK1 敲除小鼠进行研究。结果:该系统确实能敲除海马中的 PDK1,且敲除后的小鼠学习记忆能力明显下降。结论: PDK1 敲除后影响了小鼠的学习记忆能力, PDK1 在海马介导的学习记忆过程中有重要作用。

[关键词] 海马; PDK1; 学习记忆

[中图分类号] R741.02

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)09-1159-04

doi:10.7655/NYDXBNS20170917

Deletion of PDK1 impairs the hippocampus-dependent learning and memory in mice

Xu Min¹, Han Xiaoning², Yang Zhongzhou³, Zhao Chunjie², Gao Jun^{1*}

(¹Department of Neurobiology, NJMU, Nanjing 211166; ²Department of Histology and Embryology, School of Medicine, Southeast University, Nanjing 210009; ³Model Animal Research Center of Nanjing University, Nanjing 210061, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the function of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1(PDK1) in the hippocampus dependent learning and memory. **Methods:** We used the Cre-Loxp to knock out PDK1 in empty spiracles homeobox 1 (Emx1) positive cells conditionally, which is expressed in the dorsal telencephalon. PCR was used for genotyping and Morris maze was used to test the learning and memory of mice. **Results:** We found that the PDK1 knockout mice had weaker capacity of learning and memory associated with hippocampus. **Conclusion:** PDK1 plays an important role in the hippocampus-dependent learning and memory in mice.

[Key words] hippocampus; PDK1; learning and memory

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(09): 1159-1162]

海马位于脑颞叶,是大脑边缘系统的重要组成部分之一。海马在哺乳动物中的主要功能是负责机体的学习和记忆^[1]。研究显示海马主要参与陈述性记忆的形成与空间定位,它也是众多以学习记忆障碍为主要临床表现的神经退行性疾病的易损脑区,如老年痴呆就是以海马依赖性空间学习记忆能力减退为主要临床表现^[2]。海马功能受到其内部神经环路和外部与其有直接或间接纤维支配的神经元的影响^[3]。海马主要由阿蒙森角(cornu ammon1, CA1)、CA3 和齿状回(dentate gyrus, DG)组成。在经典的三

突触通路中, DG 能够接收来自内嗅皮层的信号传入,将其转导至 CA 区并重新接受信号传回从而形成完整的神经环路^[4]。在成年小鼠中,有 2 个区域始终存在具备增殖分化能力的神经前体细胞,分别是颗粒细胞层下区(subgranule zone, SGZ)和室下区(subventricular zone, SVZ), SGZ 位于 DG 的门区和颗粒细胞层之间^[5-6]。这些神经前体细胞的分化受外界环境、应激、疾病或年龄的影响,新生成的神经元可以融合入现存的神经环路中并发挥正常功能^[7-8]。

记忆形成的基本分子机制涉及突触可塑性,而这个过程又受到多种蛋白激酶以及蛋白磷酸酶的调节。3-磷酸肌醇依赖的蛋白激酶-1(3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1, PDK1)是一种含有

[基金项目]国家自然科学基金(81222013)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: gaojun@njmu.edu.cn

556个氨基酸的蛋白激酶^[9],由于其PH结构域和磷脂酰肌醇-3,4,5-六磷酸 [phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate, PIP3]^[10-11]、磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, PIP2)^[11]有很高的亲和力,因此可以被招募到细胞膜上并被磷酸化而激活。PDK1可以通过自身磷酸化使其始终保持较高的活性。PDK1的磷酸化亚基位于其N端,可以磷酸化大部分AGC家族激酶T环上的高度保守序列^[12]。已有文献报道PDK1的全敲小鼠具有胚胎致死性,死于体节以及前脑缺失并伴有大量细胞凋亡^[13]。心肌中缺失PDK1的小鼠能正常发育,但在出生后4~6周会因心力衰竭而猝死,解剖发现这些小鼠的心脏都出现了类似于人类扩张性心肌病的病理表现,并伴有对缺氧耐受性的减弱^[14]。目前关于PDK1在神经系统的研究还非常少,只有少量文章发现全脑缺失PDK1会引起小头畸形^[15]。因此本研究拟观察PDK1在神经系统的功能,利用Cre/LoxP系统在Emx1(empty spiracles homeobox 1)阳性的神经细胞中敲除PDK1,观察其对海马功能的影响。Emx1蛋白是由Emx1基因编码的同源框蛋白,从约胚胎第9.5天开始可以特异性地表达在小鼠的背侧皮层,包括海马,因此使用Emx1-Cre工具鼠可以有效敲除小鼠海马中的PDK1。通过与学习记忆相关的行为学实验观察这些PDK1敲除小鼠的学习记忆能力的变化。

1 材料和方法

1.1 材料

利用PDK1^{fl/fl}和Emx1Cre两种基因工程小鼠,PDK1^{fl/fl}由南京大学模式动物所杨中州实验室赠送,Emx1Cre小鼠由Jackson实验室购得。所有小鼠都保持C57/B6背景,饲养在东南大学实验动物中心SPF级动物房。取6周以上性成熟小鼠于下午合笼,次日9点以前检查阴道栓,检出当天为胚胎0.5 d (E0.5),出生当天为生后第0天 (P0)。用PDK1^{fl/fl}小鼠和PDK1^{fl/fl}Emx1Cre小鼠交配得到同窝PDK1^{fl/fl}小鼠(对照组)和PDK1^{fl/fl}Emx1Cre小鼠(实验组)。所有的实验操作都严格按照中国国家卫生研究院的规定。

1.2 方法

1.2.1 Morris水迷宫实验

采用2个月大雄鼠,对照组8只,实验组10只。水迷宫由1个直径为1.2 m的圆形水池构成,平均分成4个象限,确定1个目标象限,在其中放入1个

直径为12 cm的平台供小鼠停留。由于水迷宫背景为黑色,因此用白色染料将池水染成白色,以便上方的摄像头能捕捉到黑色小鼠的行动轨迹。保持水温在23℃左右,训练阶段平台在水下1~2 cm不可见,使用Anymaze软件记录小鼠分别从4个象限入水后在60 s内找到平台所用的时间。若小鼠超过60 s仍找不到平台就人工引导其到达平台并停留15 s后拿出水迷宫。当大部分对照组小鼠能够在30 s内找到平台就可以进行测试,在测试时撤去平台,将小鼠从目标象限的对侧象限放入水迷宫,记录其在60 s内在目标象限活动的距离。

1.2.2 聚合酶链式反应(PCR)

取小鼠尾巴或脚趾组织放入快速裂解液中,加入1×蛋白酶K,放在55℃消化液中,振荡2 h,离心后95℃灭活蛋白酶K 30 min,离心后获得的DNA于4℃保存备用。以20 μL体系(2×Taq Master Mix Vazyme 10 μL、上下游引物各1 μL、DNA模板2 μL、ddH₂O 6 μL)扩增2个等位基因上的LoxP位点,扩增程序为94℃ 1 min,30个循环包括94℃ 1 min解链,63℃ 2 min退火以及72℃ 3 min延伸,最后维持在4℃。配制2%琼脂糖凝胶,PCR产物用120 V电泳20 min观察条带。含有LoxP位点的条带有246 bp,没有LoxP位点的条带有212 bp,在其上方。使用的扩增引物如下:PDK1-F 5'-CTATGCTGTGTACTTCTTGGAGCACAG-3',PDK1-R 5'-TGTGGA-CAAACAGCAATGAACATACACGC-3';CRE-F 5'-CA-TACCTGGAAAATGCTTCTGTCC-3',CRE-R 5'-TCC-CCAGAAATGCCAGATTACG-3'。

1.3 统计学方法

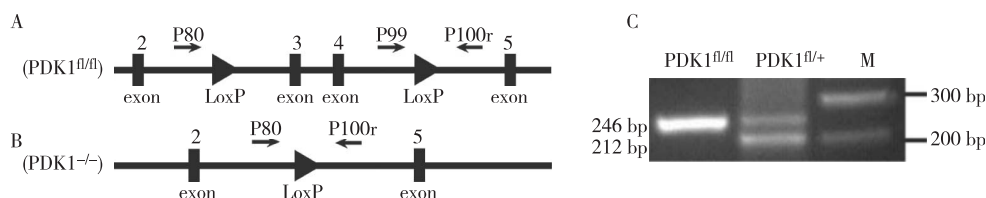
将行为学实验专业软件记录的数据导入Excel中进行整理,在GraphPad 5.0中采用独立样本t检验统计, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PDK1^{fl/fl}Emx1Cre小鼠的建立以及敲除效率的鉴定

为研究PDK1对小鼠海马依赖的学习记忆的作用,选用了Emx1Cre工具鼠,Emx1主要表达在端脑靠前部位,包括海马。PDK1^{fl/fl}小鼠是在PDK1基因的3和4号外显子两端插入2个LoxP位点(图1A),与Emx1Cre小鼠交配后,2个LoxP位点发生同源重组,3和4号外显子即被敲除(图1B)。通过P99/P100r这对引物扩增插入LoxP位点的区域,如果2条同源染色体上都带有LoxP位点即PDK1^{fl/fl},则仅扩增

出 246 bp 的片段;如果只有 1 条染色体带有 LoxP 位点即 PDK1^{fl/+}, 则扩增出 212 bp 及 246 bp 2 条带 (图 1C)。同时通过对 Cre 的检测明确小鼠的基因型。



A,B:构建 PDK1 敲除小鼠的分子策略。A:在 PDK1 基因的 3 和 4 号外显子两端各插入 1 个 LoxP 位点;B:3 和 4 号外显子已被敲除,2 个 LoxP 被水解并形成 1 个 LoxP;C:PCR 产物经过琼脂糖凝胶电泳后的图像。PDK1^{fl/fl}:两条同源染色体上都带有 LoxP 位点;PDK1^{fl/+}:只有 1 条染色体上带有 LoxP 位点;M:Marker。

图 1 构建 PDK1 敲除小鼠的分子策略及 PCR 进行基因型鉴定

Figure 1 Generation of PDK1 knockout mice and genotyping detected by PCR

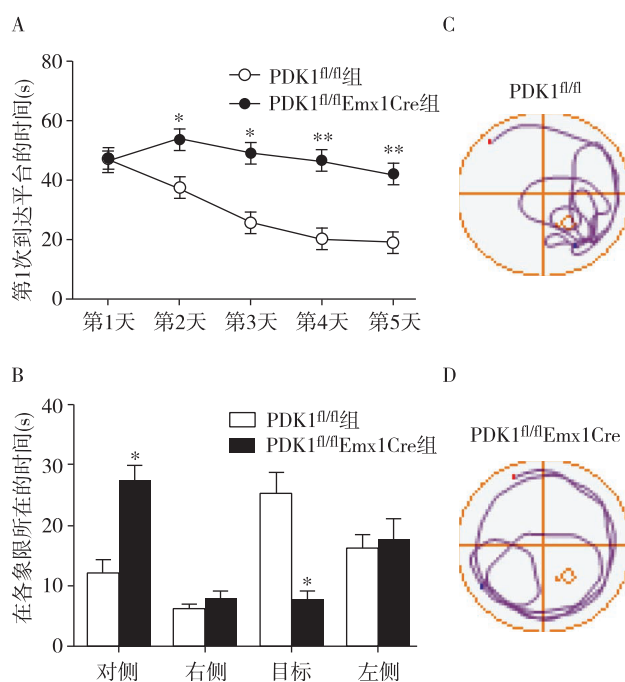
2.2 PDK1 敲除小鼠的学习记忆能力明显下降

Morris 水迷宫实验可以用来检测与海马相关的学习记忆能力, 根据实验结果可以看出 PDK1^{fl/fl} Emx1Cre 小鼠在训练阶段的学习过程已经受到影响, 它们不能在正常时间里找到平台(图 2A), 在随后的测试阶段中 PDK1^{fl/fl}Emx1Cre 小鼠在目标象限所花的时间也明显比 PDK1^{fl/fl} 小鼠短(图 2B), 说明它们没有很好地记住平台的位置。轨迹图显示 PDK1^{fl/fl} 小鼠在目标象限徘徊寻找平台(图 2C), 而 PDK1^{fl/fl}Emx1Cre 小鼠的运动轨迹却是不规则的(图 2D)。说明 PDK1 的敲除确实影响了小鼠与海马相关的学习记忆能力。

3 讨论

PDK1 是一种能够激活大部分 AGC 家族蛋白激酶 T 环的激酶, 和其他激酶如 PTEN 和 mTOR 等共同调节这些激酶的活性, 从而在不同的组织器官中发挥作用。已有一些研究报道了 PDK1 在机体发育过程中的必要性: 例如它的缺失可以导致小鼠胚胎于胚胎第 9.5 天死亡, 且有严重的体节和前脑缺失, 同时各器官体积及细胞体积变小; PDK1 在部分组织器官中的敲除会引起病理变化。目前对 PDK1 在神经系统中的研究还不是很深入, 只知道全脑敲除 PDK1 会引起小头畸形; 也有报道表明 PDK1 敲除会引起胶质细胞增生。

本研究结果显示, 在 Emx1 阳性细胞即端脑包括海马的兴奋性神经元中敲除 PDK1, 使与海马相关的学习记忆行为产生显著改变, 而这种改变可能与海马的发育有重大关系。已有研究表明敲除 PDK1 后, 受 PDK1 磷酸化的 Thr308 表达会下降。已有很多文献报道过丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (serine/threonine protein kinase, AKT) 信号与神经元的凋亡有关,



A: Morris 水迷宫实验检测两组第 1 次到达平台的时间。与 PDK1^{fl/fl} 组比较, * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ 。B: Morris 水迷宫实验检测两组在各象限所在的时间。与 PDK1^{fl/fl} 组比较, * $P < 0.001$ 。C: PDK1^{fl/fl} 小鼠在测试阶段的运动轨迹图。D: PDK1^{fl/fl}Emx1Cre 小鼠在测试阶段的运动轨迹图。

图 2 Morris 水迷宫实验

Figure 2 Morris water maze

它可以保护神经元免除凋亡, 因此 PDK1^{fl/fl}Emx1Cre 小鼠学习记忆能力的下降可能与海马区神经元凋亡相关。

因为 AKT 几种亚型的敲除小鼠表现出了不同程度的胚胎组织器官发育障碍^[16-17], 而且 AKT 也被证明和细胞生长有关, 所以我们推测是否 AKT308 位点的磷酸化在神经细胞产生过程中对前体细胞的增殖分化起作用。有报道发现 AKT 调控细胞生长是通过 TSC2^[18-19], AKT 的另 1 个磷酸化位点 Ser473 受

mTORC2 调控^[20], AKT 已经被证明和胰岛素及胰岛素样生长因子促进神经元分化有关, mTOR 信号也参与其中。胰岛素诱导的 PI3K-AKT 依赖的神经元分化增多过程能够上调 mTOR 磷酸化^[18], 而且 TSC2 会受到 AKT 的磷酸化抑制^[19], AKT 的 2 个磷酸化位点的作用可以通过 TSC2 联系起来。

另有研究表明在阿尔兹海默症和朊病毒疾病中受肿瘤坏死因子 α 转化酶 (tumor necrosis factor- α converting enzyme, TACE) 调控的 α 分泌酶下降, PDK1 的沉默可以通过保持 TACE 在膜上的浓度恢复 α 分泌酶的活性, 从而延缓 β 淀粉样蛋白的聚集以及毒性朊病毒蛋白的形成^[21-22], 这也使 PDK1 成为未来治疗阿尔兹海默症的 1 个新靶点。

[参考文献]

- [1] Eichenbaum HA. A cortical-hippocampal system for declarative memory[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2000, 1(1):41-50
- [2] Akers KG, Martinez-Canabal A, Restivo L, et al. Hippocampal neurogenesis regulates forgetting during adulthood and infancy[J]. *Science*, 2014, 344(6184):598-602
- [3] Heng YH, Mcleay RC, Harvey TJ, et al. NFIX regulates neural progenitor cell differentiation during hippocampal morphogenesis[J]. *Cereb Cortex*, 2014, 24(1):261-279
- [4] Mchugh TJ, Jones MW, Quinn JJ, et al. Dentate gyrus NMDA receptors mediate rapid pattern separation in the hippocampal network[J]. *Science*, 2007, 317(5834):94-99
- [5] Bekinschtein P, Kent BA, Oomen CA, et al. Brain-derived neurotrophic factor interacts with adult-born immature cells in the dentate gyrus during consolidation of overlapping memories[J]. *Hippocampus*, 2014, 24(8):905-911
- [6] Xu L, Tang X, Wang Y, et al. Radial glia, the keystone of the development of the hippocampal dentate gyrus[J]. *Mol Neurobiol*, 2015, 51(1):131-141
- [7] Nicola Z, Fabel K, Kempermann G. Development of the adult neurogenic niche in the hippocampus of mice[J]. *Front Neuroanat*, 2015, 9:53
- [8] Welberg L. Neurogenesis: a striatal supply of new neurons[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2014, 15(4):203
- [9] Baracho GV, Cato MH, Zhu Z, et al. PDK1 regulates B cell differentiation and homeostasis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(26):9573-9578
- [10] Rintelen F, Stocker H, Thomas G, et al. PDK1 regulates growth through Akt and S6K in *Drosophila*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(26):15020-15025
- [11] Itoh Y, Higuchi M, Oishi K, et al. PDK1-AKT pathway regulates radial neuronal migration and microtubules in the developing mouse neocortex[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(21):E2955-E2964
- [12] Bayascas JR. Dissecting the role of the 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1(PDK1) signalling pathways[J]. *Cell Cycle*, 2008, 7(19):2978-2982
- [13] Lawlor MA, Mora A, Ashby PR, et al. Essential role of PDK1 in regulating cell size and development in mice[J]. *EMBO J*, 2002, 21(14):3728-3738
- [14] Ito K, Akazawa H, Tamagawa M, et al. PDK1 coordinates survival pathways and beta-adrenergic response in the heart[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(21):8689-8694
- [15] Chalhoub N, Zhu G, Zhu X, et al. Cell type specificity of PI3K signaling in PDK1-and PTEN-deficient brains[J]. *Genes Dev*, 2009, 23(14):1619-1624
- [16] Luo W, Zhao X, Jin H, et al. Akt1 signaling coordinates BMP signaling and β -catenin activity to regulate second heart field progenitor development[J]. *Development*, 2015, 142(4):732-742
- [17] Matsui Y, Takehara A, Tokitake Y, et al. The majority of early primordial germ cells acquire pluripotency by AKT activation[J]. *Development*, 2014, 141(23):4457-4467
- [18] Weston MC, Chen H, Swann JW. Loss of mTOR repressors TSC1 or PTEN has divergent effects on excitatory and inhibitory synaptic transmission in single hippocampal neuron cultures[J]. *Front Mol Neurosci*, 2014, 7:1
- [19] Inoki K, Li Y, Zhu T, et al. TSC2 is phosphorylated and inhibited by AKT and suppresses mTOR signalling[J]. *Nat Cell Biol*, 2002, 4(9):648-657
- [20] Kwon CH, Zhu X, Zhang J, et al. MTOR is required for hypertrophy of PTEN-deficient neuronal soma *in vivo*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(22):12923-12928
- [21] Checler F. Alzheimer's and prion diseases: PDK1 at the crossroads[J]. *Nat Med*, 2013, 19(9):1088-1090
- [22] Pietri M, Alleaume-Butaux A, Launay JM, et al. From prion diseases to Alzheimer's disease: a common therapeutic target, PDK1[J]. *Med Sci*, 2014, 30(2): 139-141

[收稿日期] 2017-04-06