

维生素 A 缺乏对 APP/PS1 小鼠认知功能和补体系统的影响

陈博文^{1,2,3}, 张凯文^{1,2,3}, 杨春^{1,2,3*}, 李鹏高^{1,2,3*}

(1. 首都医科大学公共卫生学院, 北京 100069; 2. 北京市环境毒理学重点实验室, 北京 100069;
3. 北京市临床流行病学重点实验室, 北京 100069)

摘要: **目的** 研究维生素 A 缺乏(vitamin A deficiency, VAD)对阿尔茨海默症(Alzheimer's disease, AD)模型 APP/PS1 小鼠认知功能和补体系统的影响, 探索补体因子影响 APP/PS1 小鼠认知功能的作用机制。**方法** 将 20 只雄性 APP/PS1 小鼠随机分为维生素 A 缺乏组(VAD)和维生素 A 正常组(vitamin A normal, VAN), 进行 45 周的特殊饲料干预。45 周后, 进行新物体识别实验和 Y 迷宫实验以检测小鼠的认知功能, 采用免疫组化和 Western Blot 检测小鼠皮质中的补体系统起始因子 C1q 的蛋白表达情况, 采用实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)检测小鼠海马中 C1q 以及其他补体因子的 mRNA 表达情况。**结果** 新物体识别实验和 Y 迷宫实验的结果显示, 维生素 A 缺乏使 APP/PS1 小鼠认知功能障碍加重。免疫组化和 Western Blot 的结果显示, 与 VAN 组相比, VAD 干预 45 周后皮质中的 C1q 的蛋白表达量显著升高($P<0.05$)。RT-qPCR 结果显示, VAD 干预 45 周后, 海马中 C1q 和 C1r 的 mRNA 表达显著上调($P<0.05$), C4、C4BP 和 C5 的 mRNA 表达显著下调($P<0.05$), 而 C1s、C2、C3 和 C5aR1 的 mRNA 表达无明显变化。**结论** 长期缺乏维生素 A 会加重 AD 模型 APP/PS1 小鼠的认知功能障碍并影响大脑中的补体系统, 且补体因子可能参与 VAD 影响认知功能的作用机制。

关键词: 维生素 A 缺乏; APP/PS1 小鼠; 认知功能; 补体系统

Effects of vitamin A deficiency on cognitive function and complement system in APP/PS1 mice

CHEN Bo-Wen^{1,2,3}, ZHANG Kai-Wen^{1,2,3}, YANG Chun^{1,2,3*}, LI Peng-Gao^{1,2,3*}

(1. School of Public Health, Capital Medical University, Beijing 100069, China; 2. Beijing Key Laboratory of Environmental Toxicology, Beijing 100069, China; 3. Beijing Key Laboratory of Clinical Epidemiology, Beijing 100069, China)

ABSTRACT: Objective To identify the effects of vitamin A deficiency (VAD) on cognitive function and complement system in APP/PS1 mice, and explore the mechanism of the complement factors on the cognitive

基金项目: 国家自然科学基金项目(81573128、81703216)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (81573128, 81703216)

***通信作者:** 杨春, 讲师, 主要研究方向为营养与食品卫生学。E-mail: linyingyangchun@163.com

李鹏高, 博士, 副教授, 主要研究方向为营养与食品卫生学。E-mail: penggao@ccmu.edu.cn

***Corresponding author:** YANG Chun, Lecturer, School of Public Health, Capital Medical University, Beijing 100069, China. E-mail: linyingyangchun@163.com

LI Peng-Gao, Ph.D, Associate Professor, School of Public Health, Capital Medical University, Beijing 100069, China. E-mail: penggao@ccmu.edu.cn

function of APP/PS1 mice. **Methods** Twenty male APP/PS1 mice were randomly divided into 2 groups (VAD and VAN) for 45 weeks with special feed intervention. After 45 weeks, new object recognition tasks and Y-maze tasks were performed to examine the cognitive function. The protein expression of C1q in the mouse cortex, the complement system initiation factor was detected by immunohistochemistry and Western Blot. The mRNA expression of *C1q* and other complement factors in the hippocampus were detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). **Results** The behavioral experiments showed that vitamin A deficiency exacerbated the cognitive dysfunction in the APP/PS1 mice. Immunohistochemistry and Western Blot results indicated that the protein expression level of C1q in the cortex was significantly increased after 45 weeks of the VAD diet ($P < 0.05$). RT-qPCR results illustrated that the mRNA expressions of *C1q* and *C1r* in the hippocampus were significantly upregulated ($P < 0.05$), and the mRNA expressions of *C4*, *C4BP*, and *C5* were significantly downregulated ($P < 0.05$), while the mRNA expressions of *C1s*, *C2*, *C3*, and *C5aR1* did not change significantly. **Conclusion** Long-term vitamin A deficiency aggravates the cognitive dysfunction and influences the complement system in APP/PS1 mice, and the complement factors may be involved in the mechanism of VAD influencing cognitive function.

KEY WORDS: vitamin A deficiency; APP/PS1 mice; cognitive function; complement system

0 引言

阿尔茨海默症(Alzheimer's disease, AD)是一种老年人最常见的神经退行性疾病,主要表现为精神障碍、记忆和认知障碍,日常生活的活动能力逐渐下降,伴有行为改变和各种神经精神症状^[1]。有研究预测,到 2050 年,全球将有 1.315 亿名 AD 患者^[2]。目前的主流观点是,AD 的典型病理特征是细胞外 β 淀粉样蛋白(amyloid- β peptides, A β)的沉积和 Tau 蛋白过度磷酸化,且可引起一系列反应,如炎症因子和补体因子的释放、能量代谢紊乱和氧化应激损伤,最终导致大脑皮质和海马神经元的变性和丧失^[3]。

维生素 A (vitamin A, VA)及其衍生物作为一种维持人体健康所必需的微量营养素,与中枢神经系统(central nervous system, CNS)的发育密切相关^[4],对维持正常的学习和记忆功能至关重要^[5]。维生素 A 缺乏(vitamin A deficiency, VAD)是全球三大营养素缺乏症之一,严重威胁着老年人的健康^[6],有研究发现 AD 患者的维生素 A 水平和 β -胡萝卜素水平显著低于正常人,这可能与饮食行为的改变有关^[7],因此探讨维生素 A 缺乏在 AD 发病中的作用具有重要意义。

补体系统是由血液和其他组织中的 40 多种相互作用的蛋白组成,是先天免疫系统的一部分,先天免疫反应对于快速识别并清除病原体、死亡细胞及错误折叠的蛋白至关重要,而蛋白的错误折叠是 AD 的发病机制中的关键一环^[8]。在体外实验方面,早在 1982 年就有研究发现补体因子与淀粉样斑块相关^[9],之后的研究还发现 β 淀粉样蛋白和过度磷酸化 Tau 蛋白可以直接激活补体级联反应^[10]。在体内实验方面,人体实验和动物实验已经证实补体因子 C1q 受纤维化 β 淀粉样蛋白影响,且与补体系统经典途径的激活相

关^[11],这说明补体系统在 AD 的炎症反应中起到重要作用。

维生素 A 与补体系统也存在一定联系。先前研究^[12]发现维生素 A 的衍生物(视黄酸)可以刺激补体信号途径中的补体因子基因的表达。一项对 50~60 岁的白人妇女膳食调查研究发现,血液循环中的补体 C3 水平与膳食中的维生素 A 以及维生素 A 前体均呈现负相关关系^[13]。然而,维生素 A 通过补体系统影响 AD 的相关机制目前尚不清楚。基于此,探究膳食中缺乏维生素 A 对 AD 的认知功能和补体系统的影响具有重要意义,本研究模拟日常缺乏维生素 A 的膳食情况,建立具有 AD 病理性特征的 VAD 小鼠模型,探究小鼠在长期维生素 A 缺乏的饮食之后对认知功能和补体系统的影响,以期为更全面地认识维生素 A 缺乏影响 AD 的作用机制提供证据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

AD 模型(APP/PS1 双转基因)小鼠[8 周龄,雄性,体重(20 \pm 2) g,北京华阜康公司];维生素 A 特殊饲料(北京科澳协力饲料有限公司); β -actin 抗体、山羊抗鼠二抗(美国 Abcam 公司);10% 福尔马林溶液、3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-Diaminobenzidine, DAB)、膜再生液、牛血清白蛋白(纯度 97%)(北京索莱宝科技有限公司);3% H₂O₂、Tris、乙二醇四乙酸(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA)、甘氨酸缓冲液(上海阿拉丁试剂有限公司);放射免疫沉淀法缓冲液(radio immuno precipitation assay, RIPA)、明胶、苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)、NaF、Na₃VO₃、石蜡、基因组 DNA 污染清除剂(北京普利莱基因技术有限公司);磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)、BCA 检测试剂盒(武汉赛维尔科技有限公司);聚偏二氯乙烯膜(polyvinylidene

fluoride, PVDF)、ECL 化学发光试剂盒(美国 Millipore 公司); C1q 抗体、TRIzol 试剂、RevertAid cDNA 合成试剂盒(美国 Thermo Fisher scientific 公司); SYBR 快速定量试剂盒(美国 KAPA 生物公司); PCR 引物(上海生工生物工程有限公司)。

XR-XX117 新物体识别实验仪器(上海欣软信息科技有限公司); BW-MYM103 Y 迷宫实验仪器(上海软隆科技发展有限公司); PANNORAMIC SCAN II 全自动切片扫描仪(匈牙利 3DHISTECH 公司); Fusion FX 成像系统(法国 Vilber Lourmat 公司); ND-1000 紫外分光光度计(美国 Thermo Fisher scientific 公司); CFX96 实时定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 动物分组及处理

本实验方案经首都医科大学动物实验伦理委员会批准(编号: AEEI-2018-176)。将 20 只 APP/PS1 小鼠饲养于首都医科大学动物中心 SPF 级动物房。小鼠在标准的单独通风笼中, 在温度为(22±2) °C、湿度为(50±5)% 的房间内和 12 h 的黑暗/光亮循环条件下进行饲养。适应 1 周后按体重随机分为 2 组: ①维生素 A 缺乏组(VAD 组): 正常饮食、饮水, 饲料采用维生素 A 缺乏饲料(维生素 A<120 IU/kg); ②维生素 A 正常组(VAN 组): 正常饮食、饮水, 维生素 A 正常饲料(维生素 A=15000 IU/kg)。考虑到小鼠物种具有较高的维生素 A 储存能力, 需要至少长达 40 周才能诱导维生素 A 缺乏状态^[14], 因此在本实验中进行了 45 周的饲料干预。经过 45 周的饲料干预后, 通过新物体识别实验和 Y 迷宫实验评估了小鼠的认知功能。

1.3 新物体识别实验

新物体识别实验按先前文献方法所述^[15], 并加以适当修改, 主要分为 3 个阶段: 适应阶段、训练阶段、测试阶段。在适应阶段中, 将小鼠放置于 30 cm×30 cm×35 cm 的灰色箱子中, 箱内无放置任何物体, 适应 20 min。适应阶段 24 h 之后即进行训练阶段, 在原先适应的箱子中放置 2 个相同的物体(A+A)探索 10 min, 分别记录小鼠探索 2 个物体 A 的时间; 训练阶段 24 h 之后即进行测试阶段, 将箱子中的一个物体 A 替换成另一个新的物体 B, 分别记录小鼠探索物体 A 和物体 B 的时间。采用新物体识别实验识别指数来评估小鼠的认知功能, 详见公式(1)。

识别指数=

$$\frac{\text{探索物体B时间(s)} - \text{探索物体A时间(s)}}{\text{探索物体B时间(s)} + \text{探索物体A时间(s)}} \quad (1)$$

1.4 Y 迷宫实验

Y 迷宫实验按先前文献方法所述^[16], 并加以适当修改。Y 迷宫装置由平行于水平面的 3 个臂组成, 分别记为 A 臂、B 臂、C 臂相邻两臂之间夹角为 120°。实验设计包含 2 个阶段, 即训练阶段和测试阶段。训练阶段封闭 B 臂入口, 让小鼠在 A 臂和 C 臂之间探索 10 min。间隔 2 h 后

即进行测试阶段, 该阶段 Y 迷宫装置的 3 个臂均开放, 将小鼠由 A 臂放入, 记录 5 min 内小鼠进臂的总次数和顺序, 其中正确交替反应定义为连续进入 3 个不同臂, 例如 ABC、ACB、BCA、BAC、CAB、CBA。采用 Y 迷宫实验自发交替反应率来评估小鼠的认知功能, 详见公式(2)。

$$\text{自发交替反应率(\%)} = \frac{\text{正确交替反应次数}}{\text{进臂的总次数} - 2} \times 100\% \quad (2)$$

1.5 免疫组化分析

免疫组化方法按先前文献方法所述^[17], 并加以适当修改。将小鼠的脑组织样本保存在 10% 福尔马林溶液中, 按照常规方法脱水并包埋在石蜡中。从石蜡切片上去除石蜡, 然后将切片与 3% H₂O₂ 孵育 10 min 以灭活内源性过氧化物酶活性。在微波炉中将切片在 Tris、EDTA 和甘氨酸缓冲液中煮沸 5 min。洗涤后, 切片在 3% 牛血清白蛋白中 37 °C 孵育 20 min。将载玻片与小鼠 C1q 抗体在 4 °C 下孵育过夜, 洗涤后, 切片用链霉亲和素与辣根过氧化物酶偶联的山羊抗鼠二抗在 37 °C 中孵育 1 h, 随后与 DAB 反应 10 min。再用 PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min, 之后用明胶包裹切片。最后, 在 3DHISTECH 切片扫描仪成像, 采用 ImageJ 软件通过计算 C1q 的积分光密度值(integral optical density, IOD), 从而进行定量分析。

1.6 Western Blot 检测

Western Blot 方法按先前文献方法所述^[18], 并加以适当修改。在 RIPA 缓冲液中添加 1 mmol/L PMSF、10 mmol/L NaF 和 1 mmol/L Na₃VO₃ 以制备裂解缓冲液。在 50 mg 小鼠皮质组织中加入 1 mL 的裂解缓冲液以提取总蛋白。根据制造商的说明书, 使用 BCA 检测试剂盒测定提取物中蛋白质的浓度。每泳道加入 30 μg 蛋白, 采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 然后电转至 PVDF 膜。在室温下用 5% 牛血清白蛋白封闭 2 h 后, 将膜与一抗在 4 °C 下孵育过夜。然后, 将 PVDF 膜与辣根过氧化物酶偶联的山羊抗鼠二抗在室温下孵育 1 h。之后, 用膜再生液洗去膜上的封闭蛋白, 并用 β-actin 抗体作为内参对照重新孵育。使用 ECL 化学发光试剂盒显色免疫反应条带。采用 Fusion FX 成像系统通过光密度测定法对蛋白质条带进行量化, 并以 β-actin 为内参。

1.7 实时荧光定量 PCR 检测

实时荧光定量 PCR 按先前文献方法所述^[19], 并加以适当修改。采用 TRIzol 试剂提取 APP/PS1 小鼠海马的总 RNA。为了确保 RNA 的纯度, 采用基因组 DNA 污染清除剂去除 RNA 中的基因组 DNA。RNA 的质量和数量通过紫外分光光度计测定 OD_{260 nm}/OD_{280 nm} 的比率来确定。采用 RevertAid cDNA 合成试剂盒将来自各样本的 1 μg 总 RNA 进行逆转录。随后采用 SYBR 快速定量试剂盒在实时定量 PCR 仪进行定量。以管家基因 β-actin 作为内参基因, 靶基

因的 mRNA 水平使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法进行定量。具体靶基因的引物序列, 如表 1 所示。

1.8 数据处理方法

数据以均数 \pm 标准偏差(mean \pm Sd)表示, 统计学分析用 SPSS 23.0 软件, 组间差异采用独立样本 t 检验, 检验水准取 $\alpha=0.05$ 。图表制作采用 Graphpad Prism 8 软件和 Adobe Illustrator 软件。

2 结果与分析

2.1 维生素 A 缺乏对小鼠认知功能的影响

2.1.1 新物体识别实验

新物体识别实验作为啮齿动物模型常用的行为学实验, 主要用于评估认知功能, 尤其是在识别记忆方面。本研究的新物体识别实验结果显示, VAD 组和 VAN 组识别指数分别为 0.22 ± 0.07 和 0.49 ± 0.09 。与 VAN 组相比, VAD 组的识别指数显著降低($P<0.05$), 表明 APP/PS1 小鼠经过 45 周的维生素 A 缺乏的饲料干预之后, 识别记忆能力显著下降。

2.1.2 Y 迷宫实验

Y 迷宫是一种采用空间记忆的方法测量啮齿动物模

型的认知功能, 主要用于短期记忆方面。本研究 Y 迷宫实验结果显示, VAD 组和 VAN 组自发交替反应率分别为 $53.98\%\pm 7.33\%$ 和 $68.52\%\pm 7.82\%$ 。与 VAN 组相比, VAD 组的自发交替反应率显著降低($P<0.05$), 表明 APP/PS1 小鼠经过 45 周维生素 A 缺乏的饲料干预之后, 认知功能障碍加重。Y 迷宫实验结果与新物体识别结果一致, 说明了小鼠在识别记忆和短期记忆等方面的认知功能在长期维生素 A 缺乏之后都受到损害。

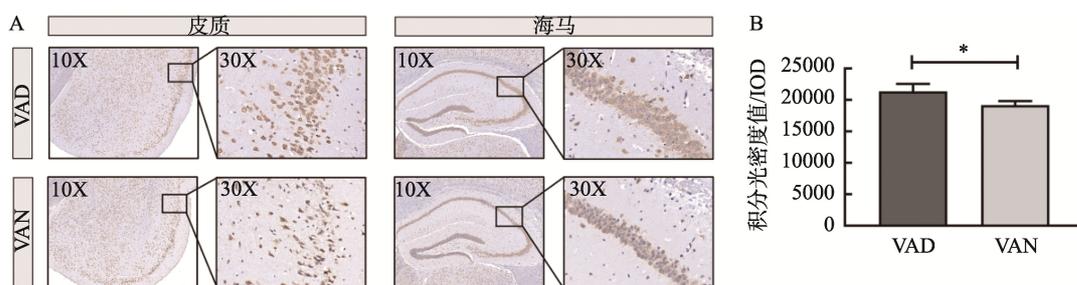
2.2 维生素 A 缺乏对小鼠补体系统的影响

2.2.1 免疫组化分析

为了探究补体途径的初始因子 C1q 在小鼠脑中皮质和海马的空间分布以及表达的数量, 采用免疫组化分析对两组小鼠的大脑切片进行染色。如图 1A 所示, C1q 在 APP/PS1 小鼠的大脑皮质和海马均有表达, 棕黄色染色即为 C1q, 且主要分布于神经元周围, 说明了 C1q 表达的位置与神经元相关。图 1B 显示了在免疫组化中 C1q 的定量, 结果显示 VAD 组大脑中 C1q 的 IOD 值显著高于 VAN 组($P<0.05$), 说明了 VAD 组的小鼠脑中的 C1q 蛋白含量较多。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
<i>β-actin</i>	TGCTGTCCCTGTATGCCTCTGG	ACCGCTCGTTGCCAATAGTGATG
<i>C1q</i>	GACTGAAGGGCGTGAAAGGCAAT	CCGTGTGGTTCCTGGTATGGACTCT
<i>C1r</i>	GACTACCGCCAAGATGAACCTAACAA	GCTACAGGCAGTCTGACGAACC
<i>C1s</i>	CCAGAATACTTCCTCCACGATGACAT	ATCTCCACTACAGTTGACTCCACAATT
<i>C2</i>	GAGTGTTCAGAGCAATGGAGTGTGGAGTG	AAGCAGGTTGGTGAGGGAGGTGTCT
<i>C3</i>	TCGGCATAGAGAAGAGGCAAGAGG	TTGTTGAAGGCAGCATAGGCAGAG
<i>C4</i>	AGTGCGGCTTCCTGATTCTATGAC	GAACACGAGTTGGCTTGCTACA
<i>C4BP</i>	CAAACCTTCGGGAGAATGGGAGATTT	TGCCTCGGACCTCACAAGAACT
<i>C5</i>	TGGTTCCTTCAGCAGACTCCT	TCCAGACTGCGTCAGCCACTAA
<i>C5aR1</i>	CCTTATCATCTACTCGGTGGTGTTCCT	GGACTATACAGGCGGTGGCATCA



注: A 为免疫组化染色图像; B 为免疫组化 C1q 的 IOD 值; * $P<0.05$ 。

图 1 C1q 的免疫组化分析

Fig.1 Immunohistochemistry analysis of C1q

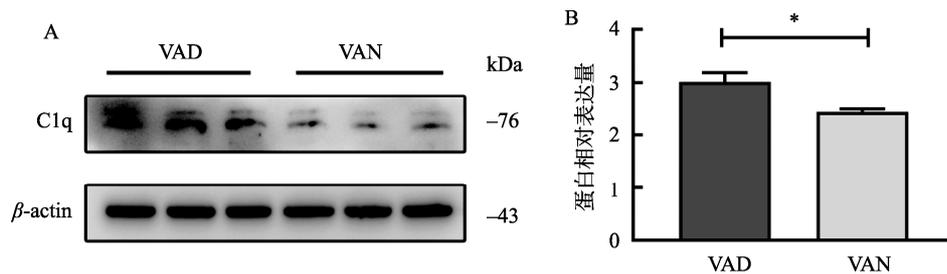
2.2.2 Western Blot 检测

为了验证免疫组化 C1q 表达的结果, 进一步采用 Western Blot 检测 APP/PS1 小鼠大脑皮质 C1q 的蛋白表达量。图 2A 为 VAD 组和 VAN 组 C1q 和 β -actin 的蛋白印迹条带。如图 2B 所示, 与免疫组化结果相一致, VAD 组大脑皮质的 C1q 的蛋白表达量显著高于 VAN 组 ($P < 0.05$), 说明了 APP/PS1 小鼠经过 45 周的维生素 A 缺乏的饮食干预后, C1q 的蛋白表达升高。

2.2.3 实时荧光定量 PCR 检测

为了进一步验证维生素 A 缺乏对 C1q 的影响, 采用实

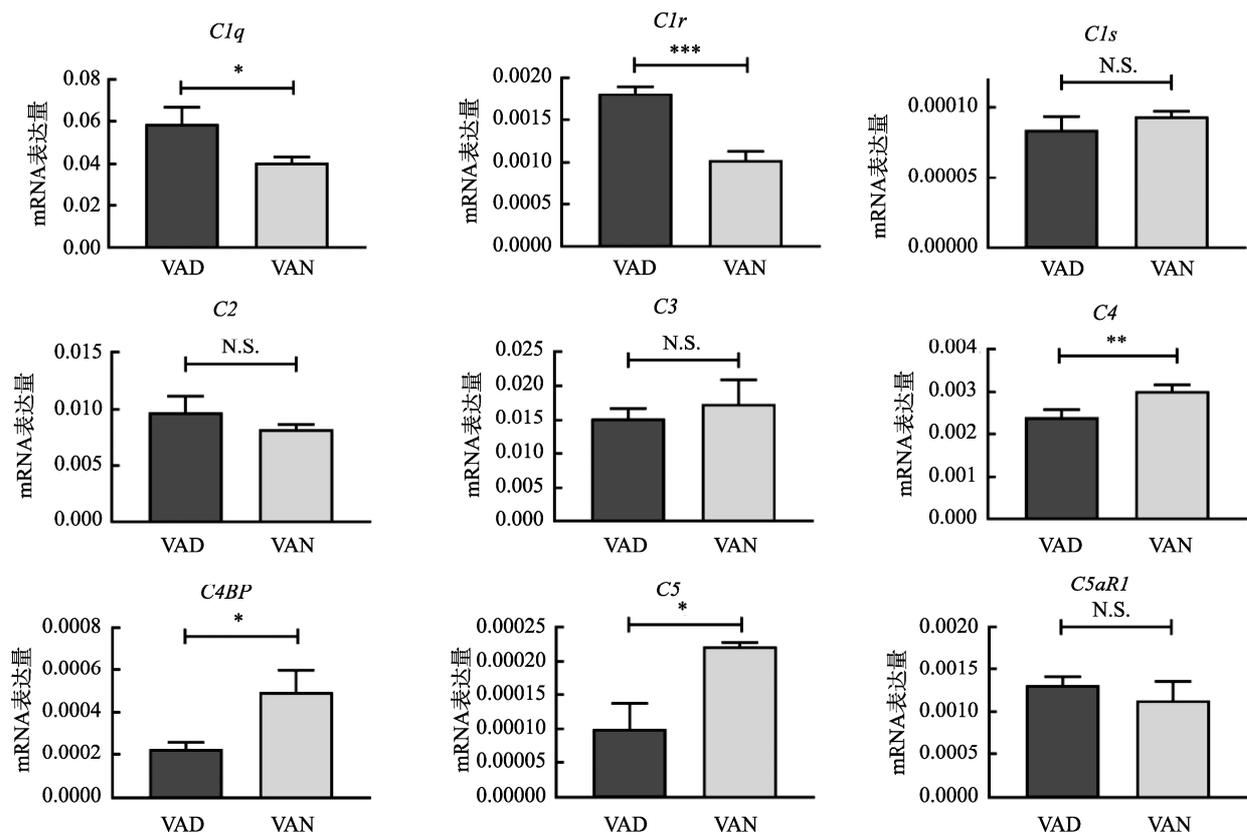
时荧光定量 PCR 检测海马中的 C1q 及其他补体因子的 mRNA 的表达量。如图 3 所示, VAD 组海马中的 C1q 和 C1r 的 mRNA 表达量显著高于 VAN 组 ($P < 0.05$; $P < 0.001$)。与 VAN 组相比, VAD 组海马中的 C4、C4BP 和 C5 显著降低 ($P < 0.01$; $P < 0.05$; $P < 0.05$)。两组 C1s、C2、C3、C5aR1 的 mRNA 表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。以上结果表明, 维生素 A 缺乏影响了 APP/PS1 小鼠海马中补体因子的 mRNA 表达。而 C1q、C1r、C4、C4BP 和 C5 作为补体途径中重要的补体因子, 说明了补体系统可能参与了维生素 A 缺乏影响 AD 的作用机制。



注: A 为 Western Blot 条带图; B 为 C1q 的蛋白相对表达量; * $P < 0.05$ 。

图 2 Western Blot 检测 C1q 的蛋白表达量

Fig.2 Protein expression of C1q detected by Western Blot



注: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; N.S.: 无统计学差异 ($P > 0.05$)。

图 3 实时荧光定量 PCR 检测补体系统的 mRNA 表达量

Fig.3 Real-time qPCR detects the mRNA expression of complement system

3 结论与讨论

老年维生素 A 缺乏被认为是 AD 以及其他认知障碍疾病的危险因素^[20]。然而, VAD 在发展中国家的广泛流行, 特别是在老年 AD 患者中, 表明了老年人摄入足量维生素 A 的重要性。从膳食中获得的维生素 A 以类维生素 A 物质的形式储存在肝脏中, 其释放受身体稳态控制, 为大脑及其他器官提供稳定的视黄醇来源^[21]。来自肝脏的视黄醇可以通过结合脉络膜丛和大脑血管壁上的视黄醇结合蛋白 1, 穿过血脑屏障进入大脑^[22]。视黄醇通过血脑屏障后, 分别经视黄醇脱氢酶和视黄醛脱氢酶作用转化为视黄醛和视黄酸。而视黄酸在大脑中可调节参与学习和记忆区域的突触可塑性, 从而影响认知功能^[23]。国内学者研究发现, 在对重庆 330 名老年人的膳食调查和认知功能研究中, 该老年人群中维生素 A 缺乏率为 10.9%, 认知功能障碍随着维生素 A 缺乏的严重程度而增加^[24]。本研究的行为学实验结果也表明, 长期缺乏维生素 A 将加重 AD 的认知功能障碍。

补体因子可以在全身的髓样细胞诱导合成, 也可以在中枢神经系统驻留的神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞和损伤或老化的小胶质细胞中调节其转录水平^[25]。而中枢神经系统特别容易因补体系统失调而受到损伤, 因为其神经元和胶质细胞对补体激活产物的抵御能力很差^[26]。中枢神经系统表达的大多数补体因子随着年龄的增长而增加, 在 AD 患者和 AD 动物模型中这种趋势更加明显, 这与补体因子在损伤反应与疾病进展中的作用一致^[27]。本研究结果显示, 作为补体经典途径的起始因子, *Clq* 的蛋白表达和 mRNA 表达在维生素 A 缺乏 45 周之后升高, 表明 *Clq* 所引起的经典补体途径可能在维生素 A 缺乏之后被激活, 从而参与 AD 患者的炎症反应, 加重认知障碍。先前研究表明, 在 AD 的大脑中, β 淀粉样斑块积累密集区域与其他区域相比, *Clq* mRNA 的表达水平升高了 8 倍^[28]。大脑中 *Clq* 的 mRNA 水平和蛋白质水平表达上调是对损伤或疾病的早期反应, 当缺乏丝氨酸蛋白酶 *Clr* 和 *Cls* 时 *Clq* 的上调将更显著, 这也说明了 *Clq* 可以独立于 *Cl* 介导的补体途径而发挥作用^[29]。而在 AD 模型中, 当大脑的 β 淀粉样斑块聚集得更多时, *Clr*、*Cls* 和 *C3* 又会随之发生上调^[25]。本研究中的 *Cls* 和 *C3* 的 mRNA 表达未发生上调, 可能由于还未达到大量的 β 淀粉样斑块情况或是独立于 *Cl* 的 *Clq* 补体途径过度激活。

本研究结果显示除 *Clq* 和 *Clr* 在维生素 A 缺乏之后表达上调之外, *C4*、*C4BP* 和 *C5* 的 mRNA 水平发生明显下调。*C4* 在经典补体途径中被 *Cls* 分解为 *C4a* 与 *C4b*, 而 *C4b* 被证实与纤维化淀粉样蛋白有关^[30]。补体调节因子 *C4BP* 是 *C4* 的结合蛋白, 是补体因子 I 裂解 *C4b* 的辅因子, 且与 AD 患者脑内的斑块和死亡细胞共定位^[31]。*C5* 在经典补体途径中被 *C5* 转化酶裂解为 *C5a* 和 *C5b*, *C5a* 可与大脑

中小胶质细胞的 *C5aR1* 受体结合, 诱导小胶质细胞向纤维化淀粉样斑块聚集, 通过 MAPK 途径产生促炎反应^[32]。以上均说明, *C4*、*C4BP*、*C5* 与 AD 的特征性病理、炎症反应相关。然而, 本研究的不足之处在于维生素 A 缺乏引起的补体系统的改变是原发于还是继发于 AD 的特征性病理(如 β 淀粉样蛋白沉积和 Tau 蛋白的过度磷酸化)尚不明确。维生素 A 缺乏影响补体系统的变化错综复杂, 需要进一步的研究来阐明维生素 A 缺乏基于补体系统的经典途径而加重 AD 的具体机制。

综上, 本研究结果表明长期维生素 A 缺乏将加重阿尔茨海默症模型 APP/PS1 小鼠的认知功能障碍以及影响大脑中的补体系统, 且补体因子可能参与 VAD 影响认知功能的作用机制。

参考文献

- [1] JOE E, RINGMAN JM. Cognitive symptoms of Alzheimer's disease: Clinical management and prevention [J]. *BMJ*, 2019, 367: 6217.
- [2] HSIAO YH, CHANG CH, GEAN PW. Impact of social relationships on Alzheimer's memory impairment: Mechanistic studies [J]. *J Biomed Sci*, 2018, 25(1): 3–11.
- [3] REITZ C, BRAYNE C, MAYEUX R. Epidemiology of Alzheimer disease [J]. *Nat Rev Neurol*, 2011, 7(3): 137–152.
- [4] MALASPINA A, MICHAEL-TITUS AT. Is the modulation of retinoid and retinoid-associated signaling a future therapeutic strategy in neurological trauma and neurodegeneration? [J]. *J Neurochem*, 2008, 104(3): 584–595.
- [5] SHERWIN JC, REACHER MH, DEAN WH, *et al.* Epidemiology of vitamin A deficiency and xerophthalmia in at-risk populations [J]. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*, 2012, 106(4): 205–214.
- [6] WIRTH JP, PETRY N, TANUMIHARDJO SA, *et al.* Vitamin A supplementation programs and country-level evidence of vitamin A deficiency [J]. *Nutrients*, 2017, 9(3): 190–208.
- [7] LOPES DSS, VELLAS B, ELEMANS S, *et al.* Plasma nutrient status of patients with Alzheimer's disease: Systematic review and meta-analysis [J]. *Alzheimers Dement*, 2014, 10(4): 485–502.
- [8] YANG J, WISE L, FUKUCHI K I. TLR4 cross-talk with NLRP3 inflammasome and complement signaling pathways in Alzheimer's disease [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 724.
- [9] EIKELBOOM P, STAM FC. Immunoglobulins and complement factors in senile plaques. An immunoperoxidase study [J]. *Acta Neuropathol*, 1982, 57(2-3): 239–242.
- [10] ROGERS J, COOPER NR, WEBSTER S, *et al.* Complement activation by beta-amyloid in Alzheimer disease [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(21): 10016–10020.
- [11] FONSECA MI, CHU SH, BERCI AM, *et al.* Contribution of complement activation pathways to neuropathology differs among mouse models of Alzheimer's disease [J]. *J Neuroinflammation*, 2011, 8(1): 4–16.
- [12] SCANTLEBURY T, SNIDERMAN AD, CIANFLONE K. Regulation by retinoic acid of acylation-stimulating protein and complement C3 in human adipocytes [J]. *Biochem J*, 2001, 356(2): 445–452.
- [13] VAN GREEVENBROEK MM, ARTS IC, KALLEN CJ, *et al.* Complement C3 is inversely associated with habitual intake of provitamin

- A but not with dietary fat, fatty acids, or vitamin E in middle-aged to older white adults and positively associated with intake of retinol in middle-aged to older white women [J]. *J Nutr*, 2014, 144(1): 61–67.
- [14] ETCHAMENDY N, ENDERLIN V, MARIGHETTO A, *et al.* Vitamin A deficiency and relational memory deficit in adult mice: Relationships with changes in brain retinoid signalling [J]. *Behav Brain Res*, 2003, 145(1-2): 37–49.
- [15] FLORES-BURGESS A, MILLON C, GAGO B, *et al.* Galanin (1-15)-fluoxetine interaction in the novel object recognition test. Involvement of 5-HT1A receptors in the prefrontal cortex of the rats [J]. *Neuropharmacology*, 2019, 155: 104–112.
- [16] KRAEUTER AK, GUEST PC, SARNYAI Z. The Y-Maze for assessment of spatial working and reference memory in mice [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1916: 105–111.
- [17] XU Z, ZHOU Z, ZHANG J, *et al.* Targeting BMI-1-mediated epithelial-mesenchymal transition to inhibit colorectal cancer liver metastasis [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(5): 1274–1285.
- [18] KIM M, SUR B, VILLA T, *et al.* Inhibitory activity of gintonin on inflammation in human IL-1 β -stimulated fibroblast-like synoviocytes and collagen-induced arthritis in mice [J]. *J Ginseng Res*, 2021, 45(4): 510–518.
- [19] GRABAREK B, WCISLO-DZIADECKA D, STRZALKA-MROZIK B, *et al.* Ustekinumab therapy changes the transcriptional activity pattern of TGF- β 1-3 genes [J]. *Postepy Dermatol Alergol*, 2021, 38(2): 244–248.
- [20] DAS BC, DASGUPTA S, RAY SK. Potential therapeutic roles of retinoids for prevention of neuroinflammation and neurodegeneration in Alzheimer's disease [J]. *Neural Regen Res*, 2019, 14(11): 1880–1892.
- [21] PARDRIDGE WM, SAKIYAMA R, COTY WA. Restricted transport of vitamin D and A derivatives through the rat blood-brain barrier [J]. *J Neurochem*, 1985, 44(4): 1138–1141.
- [22] WOLOSZYNOWSKA-FRASER MU, KOUCHMESHKY A, MCCAFFERY P. Vitamin A and retinoic acid in cognition and cognitive disease [J]. *Annu Rev Nutr*, 2020, 40: 247–272.
- [23] LENZ M, KRUSE P, EICHLER A, *et al.* All-trans retinoic acid induces synaptic plasticity in human cortical neurons [J]. *eLife Sci*, 2021, 10: 20–40.
- [24] 杜文雯, 张兵, 王惠君, 等. 1991—2009 年中国九省区中老年居民膳食维生素 A 摄入状况及变化趋势[J]. *中国食物与营养*, 2012, 18(11): 77–82.
- DU WW, ZHANG B, WANG HJ, *et al.* Dietary vitamin A intake and changing trends of middle-aged and elderly residents in nine provinces and regions in China from 1991 to 2009 [J]. *Chin Food Nutr*, 2012, 18(11): 77–82.
- [25] TENNER AJ, STEVENS B, WOODRUFF TM. New tricks for an ancient system: Physiological and pathological roles of complement in the CNS [J]. *Mol Immunol*, 2018, 102: 3–13.
- [26] SINGHRAO SK, NEAL JW, RUSHMERE NK, *et al.* Differential expression of individual complement regulators in the brain and choroid plexus [J]. *Lab Invest*, 1999, 79(10): 1247–1259.
- [27] WOODRUFF TM, AGER RR, TENNER AJ, *et al.* The role of the complement system and the activation fragment C5a in the central nervous system [J]. *Neuromol Med*, 2010, 12(2): 179–192.
- [28] YASOJIMA K, SCHWAB C, MCGEER EG, *et al.* Up-regulated production and activation of the complement system in Alzheimer's disease brain [J]. *Am J Pathol*, 1999, 154(3): 927–936.
- [29] BENOIT ME, HERNANDEZ MX, DINH ML, *et al.* C1q-induced LRP1B and GPR6 proteins expressed early in Alzheimer disease mouse models, are essential for the C1q-mediated protection against amyloid-beta neurotoxicity [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(1): 654–665.
- [30] VEERHUIS R. Histological and direct evidence for the role of complement in the neuroinflammation of AD [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2011, 8(1): 34–58.
- [31] MARTIN M, BLOM AM. Complement in removal of the dead-balancing inflammation [J]. *Immunol Rev*, 2016, 274(1): 218–232.
- [32] TENNER AJ. Complement-mediated events in Alzheimer's disease: Mechanisms and potential therapeutic targets [J]. *J Immunol*, 2020, 204(2): 306–315.

(责任编辑: 于梦娇 郑丽)

作者简介



陈博文, 硕士, 主要研究方向为营养与食品卫生。

E-mail: 13075840051@163.com



杨春, 博士, 讲师, 主要研究方向为营养与食品卫生。

E-mail: linyingyangchun@163.com



李鹏高, 博士, 副教授, 主要研究方向为营养与食品卫生。

E-mail: penggao@ccmu.edu.com