

综 述

果蝇在阿尔茨海默病研究中的应用*

马慧颖¹ 张晓芸¹ 张力元¹ 李芳羽¹ 李欣然¹ 朱明雪² 杨利敏^{1,2**}

¹大连大学医学院人体解剖学与组织胚胎学教研室, 大连 116622; ²大连市慢性病研究中心, 大连 116622

[摘要] 阿尔茨海默病 (AD) 是较为常见的慢性神经退行性改变。果蝇遗传背景清晰、实验操作简便、与人类疾病有关的基因或是与其高度相似的同源基因都可以在果蝇体内找到。利用果蝇经典的半乳糖调节上游启动子元件 4 - 上游激活序列 (GAL4 - UAS) 系统已建立了多种 AD 果蝇模型, 开展了 AD 的分子机制及药物筛选研究。本文针对不同类型的 AD 果蝇模型的制备原理、方法及应用作一综述, 为利用果蝇进行 AD 研究提供思路。

[关键词] 阿尔茨海默病; 黑腹果蝇; GAL4 - UAS 系统

doi: 10.3969/j.issn.1674-7593.2024.02.018

Utilizing *Drosophila Melanogaster* in Alzheimer's Disease Research: Applications and Insights

Ma Huiying¹, Zhang Xiaoyun¹, Zhang Liyuan¹, Li Fangyu¹, Li Xinran¹, Zhu Mingxue², Yang Limin^{1,2**}

¹Department of Human Anatomy and Histology and Embryology, School of Medicine, Dalian University, Dalian 116622; ²Chronic Disease Research Center of Dalian, Dalian 116622

** Corresponding author: Yang Limin, email: yanglimin@dlu.edu.cn

[Abstract] Alzheimer's disease (AD) is a widely recognized chronic neurodegenerative condition. *Drosophila*, with its well-defined genetic structure, straightforward experimental methodologies, and the presence of human disease-related genes or highly similar homologous genes, serves as an advantageous model organism. The utilization of *Drosophila*'s renowned Galactose-regulated Upstream Promoter Element 4 - Upstream Activating Sequence (GAL4 - UAS) system has led to the development of various AD models. These models facilitate the exploration of AD's molecular mechanisms and the advancement of drug discovery efforts. This paper reviews the foundational principles, methodologies, and diverse applications of different AD *Drosophila* models, offering insights and innovative approaches for AD research utilizing *Drosophila*.

[Key words] Alzheimer's disease; *Drosophila melanogaster*; GAL4 - UAS system

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是老年人群表现神经元功能障碍中最常见的一种, 临床表现为神经紊乱、认知功能持续性进行性衰退、运动功能丧失等。在 AD 患者的大脑中, 可以观察到细胞内神经原的纤维缠结 (Neurofibrillary tangles, NFTs) 和细胞外淀粉样斑块 (Senile plaques, SPs) 沉积以及脑萎缩, 这些病理改变导致进行性神经元死亡、脑内突触丢失、记忆障碍和认知障碍^[1]。当前, 对于 AD 发病机理存在数种假

说, 主要包括炎症、氧化应激、 β 淀粉样蛋白 (Amyloid beta, A β) 在大脑神经元外异常沉积、神经元内 Tau 蛋白的 NFTs、胆碱能神经元损伤等, 但其确切的病理机制尚不明确^[2]。果蝇寿命仅 60 d 左右, 繁殖周期仅 10 ~ 12 d, 而 AD 具有缓慢进行性加重的特征, 因此, 该模型有助于短时间内观察到完整病程。除此之外, 果蝇繁殖力极强, 雌性果蝇一次可产卵约 400 枚, 这使得实验规模和数据获取速度得以大幅提升。最重要的是, 果蝇遗传物质

* 国家自然科学基金 (31571087, 31200839); 大连市高层次人才创新支持计划青年科技之星项目 (2021QR034)

** 通讯作者: 杨利敏, 电子邮箱 yanglimin@dlu.edu.cn

结构简单, 基因组现已被完全解析, 人类 AD 基因可以在果蝇体内找到相应同源基因。本文对现有的数种 AD 果蝇模型及其特点、应用等作一综述, 以期 AD 相关研究提供新的方向 and 选择。

1 黑腹果蝇的简介

黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*), 以下简称果蝇, 是昆虫纲、双翅目、果蝇科、果蝇属昆虫。由于其遗传背景清晰、繁殖力极强、生命周期较短以及实验室培养维持成本较低等优势, 广泛应用于遗传学、生物化学等领域。此外在发育生物学以及分子生物学领域, 果蝇的作用也不容小觑。在人类孟德尔遗传在线 (Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM) 数据库内, 929 个人类疾病相关基因条目中有 714 个 (77%) 在果蝇中具有高度相似的同源基因, 与神经系统和神经退行性疾病相关的果蝇基因与潜在人类疾病基因集的分析显示, 两者相关基因共 74 个, 重合度达 10.36%^[3]。此外, 果蝇还是人类基因组计划一部分测序工作的主要模式生物之一^[4]。

果蝇的半乳糖调节上游启动子元件 4 - 上游激活序列 (Galactose - regulated upstream promoter element4 - upstream activating sequence, GAL4 - UAS) 系统是一种二元表达系统, 常被用于果蝇遗传学相关研究。UAS 是基因启动子的上游激活序列, 是酵母中一种类似高等真核生物增强子的序列, 可通过增加转录活性来增强目的基因的表达。GAL4 是一个酵母转录激活因子, 其 DNA 结构结合域 (DNA - binding domain, BD) 可以识别 UAS 并与之结合, 从而激活 UAS 下游的目标基因, 诱导目标基因的转录。在 GAL4 未与 UAS 结合的情况下, UAS 下游的靶基因处于沉默状态^[5]。由于 GAL4 可强效激活拥有 GAL4 结合位点的基因转录, 因此, 将组织特异性的启动子或增强子与 GAL4 基因相连所建立的转基因系, 与 UAS - 目标基因系进行杂交, 可产生在特定组织中表达目标基因的子代^[6]。例如, 肌动蛋白 5C - 半乳糖调节上游启动子元件 4 (Actin 5C - galactose regulates upstream promoter elements 4, act5C - GAL4) 果蝇品系与 UAS - 目标基因系进行杂交可使目标基因表达在所有细胞内, 而胚胎致死性异常视觉系统 - 半乳糖调节上游启动子元件 4 (Embryonic lethal abnormal visual system - Galactose regulates upstream promoter elements 4, elav - GAL4) 则可使目标基因仅在果蝇神经细胞内特异性表达。目前, 果蝇的 GAL4 - UAS 系统已广泛应用于生命科学研究领域, 也是利用果蝇研究 AD 的重要工具之一。

2 AD 果蝇模型

目前存在多种关于 AD 的发病机制的假说, 其

中 A β 级联假说和 Tau 蛋白异常磷酸化假说得到了科学家的广泛认可。根据 A β 级联假说, 大脑中 A β 的积累是 AD 的主要原因。淀粉样前体蛋白 (Amyloid precursor protein, APP) 被 β 分泌酶, 也称为 β 位点 APP 裂解酶 (Beta - site amyloid precursor protein cleaving enzyme, BACE), 和 γ 分泌酶连续水解产生 A β , A β 逐渐聚合形成 SPs, 被认为是 AD 的关键致病因素。Tau 蛋白是一种微管相关蛋白, 在 AD 患者脑中, Tau 蛋白过度磷酸化, 由可溶性转变为不可溶性的, 同时高度聚集, 无法执行其原来所具有的生物学功能, 反而会产生毒性, 并导致 NFTs 的形成^[7]。基于这两种主流学说, 研究人员构建了多种不同的 AD 果蝇模型。

2.1 基于 APP/BACE 的果蝇模型

APP/BACE 模型是通过在发育过程中果蝇的中枢神经系统内过表达人类 APP 和 BACE 基因, 造成神经系统内 A β 生成增多, 形成 A β 沉积。利用 elav - GAL4 在神经系统内过表达这两种基因产物, 即亲本 elav - GAL4; 与 UAS - APP, UAS - BACE 杂交, 得到子一代, 即目标转基因果蝇 elav - GAL4; UAS - APP; UAS - BACE, 该品系果蝇在生物化学、神经病理、神经解剖和行为等方面会发生明显改变。包括大脑内出现 A β 样斑块、与学习记忆相关脑区的神经元树突和轴突的减少等。

该模型的优势在于模拟了人体内从 APP 剪切到 A β 的累积等一系列 AD 相关病理过程, 由于人类 APP 和人类 BACE 基因在果蝇中枢神经系统中的表达以及被 γ 分泌酶的切割等过程的发生, 会导致果蝇生物化学、神经解剖学、神经病理学和行为学等方面一系列的改变, 且这些神经病变和记忆缺陷在数日内就会发生, 而发育生物学可以帮助确定药物在体内的作用机制, 因此, 与其他果蝇模型相比, 该模型与临床 AD 关联更为紧密, 而且更适用于快速检测小分子药物对 AD 干预的有效性^[8]。如通过巴浦洛夫嗅觉记忆实验、寿命实验等检测药物的抗 AD 效果^[9]。但需要注意的是, 该模型的果蝇大脑内不会出现显著的 NFTs。其次, 利用果蝇经典的 GAL4 - UAS 系统, 通过连续杂交和分子表型的筛选建立的, 在果蝇全部神经元中表达两个拷贝 APP/BACE 的转基因果蝇, 神经退行性病变表型相较于其他模型更为明显^[10]。由此可见, 在神经系统中过表达 APP/BACE 是快速构建 AD 果蝇模型的有效工具。

近年来, 许多研究人员利用该模型, 以 γ 分泌酶抑制剂为突破口进行了深入研究。例如, 实验证明 γ 分泌酶抑制剂 N - [N - (3, 5 - 二氟乙酰基) - 1 - 丙氨酰] - (S) - 苯基甘氨酸叔丁基酯 (N -] N - (3, 5 - difluorophenacetyl) -

L-alanyl] - (S) - phenylglycine t-butyl ester, DAPT) 可以降低体内的 $A\beta$ 水平, 有望作为 AD 的潜在治疗药物^[11]。遗传学相关实验方法的发展将会提供蛋白质表达、分布和特性的精确结果, 基于 APP/BACE 的果蝇模型的遗传学价值, 涉及 AD 和 γ 分泌酶抑制剂等药物之间相互作用的研究将会更加深入、快速和精准。

2.2 基于 $A\beta$ 的果蝇模型

相较于其他模型, $A\beta$ 模型是最直接、最便利的研究 $A\beta$ 毒性及影响的模型。研究人员将 $A\beta$ 40 或 $A\beta$ 42 基因与果蝇内源性坏死基因序列的信号肽基因融合, 通过 GAL4 - UAS 系统, 培育了可以在不同时空上表达的 $A\beta$ 40 和 $A\beta$ 42 转基因果蝇。如将 elav - GAL4; 与 UAS - $A\beta$ 42; UAS - $A\beta$ 42 杂交, 得到所有神经元都表达 $A\beta$ 42 的子一代果蝇 elav - GAL4; UAS - $A\beta$ 42; UAS - $A\beta$ 42^[12]。成年后的 $A\beta$ 42 转基因果蝇较正常果蝇相比, 具有运动能力下降、寿命缩短等 AD 病理表型, 且表达两个拷贝 $A\beta$ 42 的果蝇神经退行性变表型相较只表达一个拷贝的果蝇要更为严重。

该模型可通过酶联免疫吸附实验、蛋白质印迹实验、免疫荧光等手段检测 $A\beta$ 的含量, 从而为药物作用效果、细胞信号转导通路探索、疾病进程判断提供支持, 也可以利用果蝇的负趋地性进行爬管实验, 通过逆重力攀爬指数对运动能力进行评定。由于表达的 $A\beta$ 40 或 $A\beta$ 42 与 APP 突变产生的肽相对应, 因此很好地避免了 APP 加工过程可能产生的其他大小不同的 $A\beta$ 对实验产生的影响^[13]。使得此果蝇模型具有直接评估 $A\beta$ 毒性的主要优势。

有研究人员证实氧化还原传感器在 $A\beta$ 果蝇模型中的适用性, 首次以定量方式区分神经毒性蛋白质聚集体对细胞氧化还原稳态的影响, 为后续以 $A\beta$ 果蝇为模型研究抗氧化剂对 $A\beta$ 毒性的影响提供了依据^[14]。研究人员通过将感光神经元中表达 $A\beta$ 42 的果蝇暴露于反应活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 中, 证明了 ROS 诱导的脂质过氧化可能会加剧 $A\beta$ 42 诱导的表型, 以及 ROS 和 $A\beta$ 42 的存在可以协同诱导果蝇的神经退行性变的假设。并且利用血脑屏障透过性抗氧化剂 N - 乙酰半胱氨酸酰胺 (N - acetylcysteine amide, NACA), 可以强烈抑制过氧化脂质的形成和果蝇神经胶质细胞中脂滴的积累, 从而控制 AD 的发展^[15]。

2.3 基于 Tau 蛋白异常磷酸化的 AD 果蝇模型

除基于 $A\beta$ 级联假说的 AD 果蝇模型外, 过表达人的 Tau 蛋白突变体的果蝇模型的应用也比较广泛, 相较于基于 $A\beta$ 的相关病理机制, Tau 蛋白的病理机理与认知功能减退联系更加紧密^[16]。Tau 蛋白是 NFTs 的主要组成成分, 而 NFTs 是 AD 主要病

理特征之一^[17]。研究人员应用 GAL4 - UAS 系统, 将人 Tau 蛋白或 Tau 蛋白突变体过表达于果蝇的不同部位, 开发出数种果蝇模型, 用于 AD 的相关研究。应用 elav - GAL4 将人 Tau 蛋白或 Tau 蛋白突变体过表达于所有神经元, 可导致果蝇寿命缩短和渐进性神经退行性病变^[18]。应用眼睛表达启动子 (Glass multiple reporter - galactose regulates upstream promoter elements 4, GMR - GAL4) 将人 Tau 蛋白或 Tau 蛋白突变体过表达于果蝇的光感受器神经元, 即 GMR - GAL4; 与 UAS - Tau; 杂交, 则可导致子一代基因型为 GMR - GAL4; UAS - Tau; 的果蝇产生粗糙眼表型^[19]。该表型可以帮助研究人员直观地判断 Tau 蛋白的毒性作用。

对比基于 $A\beta$ 级联假说的几种 AD 果蝇模型, Tau 蛋白转基因模型的最大优势在于可以模拟 AD 患者 Tau 蛋白的过度磷酸化, 因而被广泛应用。但该模型不能用于模拟 AD 其他病理过程。Tau 蛋白转基因模型可应用于针对 Tau 蛋白毒性或与 Tau 蛋白相关的细胞信号通路的研究, 也可应用此模型进行抗 Tau 蛋白毒性药物的快速筛选。近年来, 由于以 $A\beta$ 为靶点的多种药物在临床试验中表现不佳, 因此 Tau 蛋白转基因果蝇模型正受到来自世界范围内 AD 药物研发领域的重视。

通过 GMR - GAL4 将人类 Tau 基因表达在果蝇视网膜上, 将 Tau 蛋白毒性可视化, 研究人员发现了可以调控 AD 相关基因表达水平的 N6 - 甲基腺苷 (N6 - methyladenosine, m6A), 该模型帮助研究人员以一种快速、简单、定性的方式确认了 m6A 对 Tau 蛋白毒性的影响, 为 AD 机制的探索以及未来的药物研发提供了新的方向^[20]。

3 小结与展望

果蝇以其生命周期短, 繁殖力强, 遗传背景清晰以及基因组测序已全部完成等显著优势, 克服了 AD 这一神经退行性疾病研究过程中出现的实验周期长、成本高、致病机制复杂多样等困难。但是哺乳动物和昆虫的神经系统在发育过程中的组织结构以及发育方式并不完全相同, 这使得果蝇无法完美地模拟 AD 的一切病理过程, 例如哺乳动物神经系统内 NFTs 的形成在果蝇脑内并未观察到。但是果蝇最大优势在于其遗传可处理性, 这使得它非常容易克服各种限制, 在功能相对简单但进化保守的体内系统中使用强大的遗传工具, 对疾病过程加以模拟, 因此果蝇仍被证明是人类神经退行性疾病的绝佳模型。

近年来, 关于 AD 病理机制以及遗传相关领域的研究取得了丰富的成果, 使得我们对于 AD 有了更为深入的了解, 应用果蝇 AD 模型, 不仅可以对大量药物的抗 AD 药效进行初步筛选, 还可以进一

步从分子水平, 对药物作用的机制进行研究。本文对现有的 AD 果蝇模型的制备方案、特点、优势、局限性以及成功应用的案例进行了梳理总结。与对所有 AD 动物模型的研究一样, 许多用于研究果蝇神经退行性变的实验方法在疾病基因表达的空间和时间方面存在一些局限, 例如 Tau 蛋白在颗粒细胞层中的积累过程超出了果蝇的寿命以及 NFTs 的模拟难题等。然而, 该领域正在不断发展, 随着新的遗传工具不断投入使用, 研究人员将针对 AD 进行更深层次、更精确的实验, 使果蝇成为研究 AD 机制及药物的强大的非哺乳动物体内系统。

参考文献

- [1] Yu M, Sporns O, Saykin AJ. The human connectome in Alzheimer disease – relationship to biomarkers and genetics [J]. *Nat Rev Neurol*, 2021, 17 (9): 545 – 563.
- [2] Du X, Wang X, Geng M. Alzheimer's disease hypothesis and related therapies [J]. *Transl Neurodegener*, 2018, 7: 2.
- [3] Reiter LT, Potocki L, Chien S, et al. A systematic analysis of human disease – associated gene sequences in *Drosophila melanogaster* [J]. *Genome Res*, 2001, 11 (6): 1114 – 1125.
- [4] Adams MD, Celniker SE, Holt RA, et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster* [J]. *Science*, 2000, 287 (5461): 2185 – 2195.
- [5] Caygill EE, Brand AH. The GAL4 system: a versatile system for the manipulation and analysis of gene expression [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1478: 33 – 52.
- [6] Brand AH, Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes [J]. *Development*, 1993, 118 (2): 401 – 415.
- [7] 翟雅莉, 贾新, 王小明. 阿尔茨海默病的药物治疗进展 [J]. *国际老年医学杂志*, 2023, 44 (5): 605 – 608.
Zhai YL, Jia X, Wang XM. Emerging frontiers in drug therapies for Alzheimer's disease [J]. *Int J Geriatr*, 2023, 44 (5): 605 – 608.
- [8] Chakraborty R, Vepuri V, Mhatre SD, et al. Characterization of a *Drosophila* Alzheimer's disease model: pharmacological rescue of cognitive defects [J]. *PLoS One*, 2011, 6 (6): e20799.
- [9] Gao Y, Shuai Y, Zhang X, et al. Genetic dissection of active forgetting in labile and consolidated memories in *Drosophila* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116 (42): 21191 – 21197.
- [10] 刘宁, 张儒. 双拷贝 APP/BACE/DPsn 转基因果蝇模型的建立及基因功能的研究 [J]. *昆虫学报*, 2011, 54 (10): 1087 – 1093.
Liu N, Zhang R. Establishment of double copy APP/BACE/DPsn transgenic *Drosophila* model and study on gene function [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2011, 54 (10): 1087 – 1093.
- [11] Micchelli CA, Esler WP, Kimberly WT, et al. Gamma – secretase/presenilin inhibitors for Alzheimer's disease phenocopy Notch mutations in *Drosophila* [J]. *FASEB J*, 2003, 17 (1): 79 – 81.
- [12] Lim JY, Ott S, Crowther DC. *Drosophila melanogaster* as a model for studies on the early stages of Alzheimer's disease [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1303: 227 – 239.
- [13] Sun L, Zhou R, Yang G, et al. Analysis of 138 pathogenic mutations in presenilin – 1 on the in vitro production of A β 42 and A β 40 peptides by γ – secretase [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114 (4): E476 – E485.
- [14] Stapper ZA, Jahn TR. Changes in glutathione redox potential are linked to A β 42 – induced neurotoxicity [J]. *Cell Rep*, 2018, 24 (7): 1696 – 1703.
- [15] Moulton MJ, Barish S, Ralhan I, et al. Neuronal ROS – induced glial lipid droplet formation is altered by loss of Alzheimer's disease – associated genes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118 (52). doi: 10.1073/pnas.2112095118.
- [16] Wu JW, Hussaini SA, Bastille IM, et al. Neuronal activity enhances tau propagation and tau pathology in vivo [J]. *Nat Neurosci*, 2016, 19 (8): 1085 – 1092.
- [17] Avila J, Lucas JJ, Perez M, et al. Role of tau protein in both physiological and pathological conditions [J]. *Physiol Rev*, 2004, 84 (2): 361 – 384.
- [18] Wittmann CW, Wszolek MF, Shulman JM, et al. Tauopathy in *Drosophila*: neurodegeneration without neurofibrillary tangles [J]. *Science*, 2001, 293 (5530): 711 – 714.
- [19] Kumar JP. Building an ommatidium one cell at a time [J]. *Dev Dyn*, 2012, 241 (1): 136 – 149.
- [20] Shafik AM, Zhang F, Guo Z, et al. N6 – methyladenosine dynamics in neurodevelopment and aging, and its potential role in Alzheimer's disease [J]. *Genome Biol*, 2021, 22 (1): 17.

(2023 – 09 – 21 收稿)