

P301L-Tau模型小鼠内嗅皮层-海马神经纤维变化与记忆功能障碍的相关性及其分子机制研究

陈晓程¹, 梁胜祥², 林冰冰¹, 柳维林², 黄佳^{1*}

¹ 福建中医药大学康复医学院, 福建 福州 350122;

² 福建中医药大学康复产业研究院, 福建 福州 350122

* 通信作者: 黄佳, E-mail: jasmine1874@163.com

收稿日期: 2021-12-28; 接受日期: 2022-04-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(81774424); 福建省教育厅高校“新世纪优秀人才支持计划”(闽教科[2018]47号)

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2023.02007

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



摘要 **目的:**探讨阿尔茨海默病(AD)P301L-Tau模型小鼠内嗅皮层-海马神经纤维改变与学习记忆功能的相关性及相关分子机制,为AD患者Tau蛋白靶向治疗提供依据。**方法:**选择16只3月龄雄性C57BL/6小鼠,按随机数字表法分为空载病毒对照组(对照组)和P301L-Tau模型组(模型组),每组8只。麻醉后,对照组小鼠双侧内嗅皮层注射空载病毒;模型组小鼠双侧内嗅皮层注射AAV-P301L-Tau病毒。注射完成后常规饲养至12月龄。采用Morris水迷宫测试评估小鼠学习记忆功能;采用9.4 T磁共振行弥散张量成像(DTI)扫描检测小鼠双侧内嗅皮层和海马的神经纤维变化情况;采用Western blot法检测小鼠内嗅皮层、海马t-Tau、p-Tau(Ser262)和糖元合成激酶-3β(GSK3β)蛋白的表达水平;采用Pearson相关性分析法分析小鼠内嗅皮层、海马各向异性分数(FA)与学习记忆功能的相关性。**结果:**①学习记忆功能测试:与对照组比较,模型组小鼠学习记忆功能明显下降,逃避潜伏期明显增加,穿越平台次数和目标象限时间占比明显降低($P < 0.05$)。②小鼠内嗅皮层和海马脑区中神经纤维结构:与对照组比较,模型组小鼠内嗅皮层和海马FA值均明显下降,内嗅皮层平均弥散率(MD)明显增加($P < 0.05$),而海马MD值差异无统计学意义($P > 0.05$)。③小鼠内嗅皮层、海马脑区FA值与学习记忆功能的相关性分析:2组小鼠内嗅皮层、海马FA值与穿越平台次数均呈正相关关系($r = 0.76, P < 0.05; r = 0.62, P < 0.05$)。④小鼠内嗅皮层、海马脑区t-Tau、Ser262和GSK3β蛋白表达:与对照组比较,模型组内嗅皮层和海马t-Tau、p-Tau(Ser262)和GSK3β蛋白含量均明显增加($P < 0.05$)。**结论:**P301L-Tau模型小鼠内嗅皮层、海马脑区Tau蛋白过度磷酸化,导致小鼠内嗅皮层、海马脑区神经纤维结构遭受破坏和学习记忆功能障碍,其学习记忆功能障碍程度与内嗅皮层、海马神经纤维受损程度呈正相关。

关键词 阿尔茨海默病;磷酸化Tau蛋白;弥散张量成像;内嗅皮层-海马;学习记忆

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种与年龄相关的神经退行性疾病,可表现为学习和记忆功能进行性下降^[1]。Tau蛋白过度磷酸化形成的神经纤维缠结和淀粉样蛋白Aβ沉积是AD的神经病理学标志^[2]。Tau蛋白作为一种轴突微管结合蛋白,可促进轴突微管的形成和维持其稳定,是神经

纤维结构的重要组成部分^[2-3]。在AD病理状态下,Tau蛋白过度磷酸化,其病理性产物随着时间推移不断累积和扩散,引起突触功能障碍和神经退行性病变,严重影响AD患者认知功能^[4]。研究显示,Aβ靶向治疗AD患者的临床试验多以失败告终,且与Aβ淀粉样蛋白沉积比较,Tau蛋白病理改变与

引用格式:陈晓程,梁胜祥,林冰冰,等.P301L-Tau模型小鼠内嗅皮层-海马神经纤维变化与记忆功能障碍的相关性及其分子机制研究[J].康复学报,2023,33(2):136-141.

CHEN X C, LIANG S X, LIN B B, et al. Correlation analysis of the entorhinal cortex-hippocampus nerve fiber changes and memory dysfunction in P301L-Tau mouse model and molecular mechanism [J]. Rehabil Med, 2023, 33(2): 136-141.

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2023.02007

AD患者认知功能障碍的发生、发展具有更强的相关性^[5-7]。因此,近年来AD的Tau靶向疗法受到了越来越多的关注^[7]。

Tau蛋白磷酸化好发于脑部内侧颞叶结构,始于大脑内嗅皮层,可逐渐累及海马等脑区^[8]。内嗅皮层-海马环路是脑内执行空间学习记忆功能的关键结构^[9],内嗅皮层内具有表征特定空间坐标的“网格细胞”,可将空间信息输入至海马,共同完成空间学习记忆的过程。GOYAL等^[10]研究发现,通过脑电刺激内侧颞叶结构(内嗅皮层和海马)可破坏受试者记忆编码的时间和空间结构,表现为使有序内容回忆变得杂乱无序,并且使远距离物体的记忆能力下降。

弥散张量成像(diffusion tensor imaging, DTI)是一种利用水分子在组织中弥散的各向异性成像的磁共振扫描技术,可立体观察神经纤维的走行方向、空间位置、数量以及纤维间的连接关系。目前关于AD的Tau模型小鼠内嗅皮层和海马神经纤维变化及其与学习记忆功能之间的关系缺乏相关研究佐证。因此,本研究通过建立AD P301L-Tau模型小鼠,利用9.4 T磁共振DTI扫描技术探讨AD P301L-Tau模型小鼠内嗅皮层和海马神经纤维的变化与学习记忆功能的相关性及相关分子机制,为AD患者Tau蛋白靶向治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

从南京大学-南京生物医药研究院购买16只3月龄雄性C57BL/6小鼠[实验动物生产许可证号:SCXK(苏)2018-0008],饲养于福建中医药大学实验动物中心SPF级动物实验室[许可证号:SCXK(闽)2019-0007]。本实验经福建中医药大学动物实验伦理委员会批准(审批号:FJTCM IACUC2019031),实验动物的处理均严格按照动物伦理准则和指南的相关条例执行。

1.2 主要实验试剂与设备

BCA蛋白浓度测定试剂盒(美国赛默飞世尔科技公司);磷酸蛋白酶抑制剂(北京普利莱基因技术有限公司);t-Tau小鼠单克隆抗体(美国Proteintech公司,66499-1-Ig);p-Tau(Ser262)兔多克隆抗体(英国Abcam公司,ab131354);GSK3 β 兔多克隆抗体(美国Proteintech公司,22104-1-AP);AAV9-CAG-Tau(P301L)-EGFP-WPRE-pA病毒(武汉枢密脑科学技术有限公司);9.4 T小动物磁共振(德国布鲁克

公司,型号:94/20);脑立体定位仪(中国RWD生命科技有限公司);Morris水迷宫(中国上海市欣软信息科技有限公司);高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司);凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司,型号:GelDoc 2000)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型制备 采用随机数字表法将16只3月龄雄性C57BL/6小鼠分为空载病毒对照组(对照组)和P301L-Tau模型组(模型组),每组8只。采用3%异氟烷将小鼠麻醉后,将其固定于脑立体定位仪上。剪开头皮暴露前囟、后囟,以前囟为坐标原点,内嗅皮层定位坐标为前囟后5.28 mm,左右旁开2.82 mm,颅骨平面向下3.85 mm。在坐标上方颅骨钻孔,使用微量注射泵以0.05 μ L/min的速度分别将1 μ L空载病毒和AAV9-CAG-Tau(P301L)-EGFP-WPRE-pA病毒注射到对照组和模型组小鼠的目标脑区^[11],注射结束后停针10 min再缓慢拔出,缝合伤口。随后常规饲养至12月龄(喂养9个月),然后进行相关指标检测。

1.3.2 观察指标

1.3.2.1 小鼠学习记忆功能评估 采用Morris水迷宫测试评估2组小鼠学习记忆功能。Morris水迷宫水池直径为120 cm,水深30 cm,共分为4个象限,逃生平台放置于第3象限。水迷宫测试包括第1~4天定向航行测试、第5天空间探索测试。实验开始前1天将小鼠放置于水池中自由游泳2 min以适应环境和人的抓握等相关操作。实验第1天进行定向航线测试时将小鼠依次放入4个象限中,记录其寻找逃生平台的时间(逃避潜伏期),测试时间为90 s,并在平台上停留15 s。进行空间探索测试前,移除第3象限逃生平台,将小鼠从第1象限放入,测试90 s,记录其穿越原逃生平台所在位置的次数,检测其学习记忆能力。

1.3.2.2 小鼠内嗅皮层和海马神经纤维的变化情况检测 使用9.4 T小动物磁共振进行DTI扫描成像检测2组小鼠内嗅皮层和海马神经纤维的变化情况。扫描前,用3%异氟烷将小鼠麻醉后,采用牙杆和双侧耳杆将小鼠俯卧位固定于磁共振扫描床上,将专用表面线圈固定在小鼠头部,利用水循环加热系统维持小鼠体温相对恒定,实时监测小鼠体温、呼吸和心率。DTI扫描参数如下:弥散敏感因子 $b_0=1\ 000\ \text{s}/\text{mm}^2$,弥散敏感梯度为64个方向,层厚为0.6 mm,扫描层数为25,重复时间(time of repetition, TR)=3 750 ms,回波时间(time of echo, TE)=

32.6 ms, 体素 = 0.16 mm × 0.16 mm, 采集矩阵为 78 × 78。扫描完成后, 利用 FSL 6.0 (<http://fmrib.ox.ac.uk/fsl>) 和 ITK-SNAP 3.6.0 软件进行数据分析, 包括涡流校正、颅骨剥离, 得到全脑掩膜图像, 计算小鼠全脑各向异性分数 (fractional anisotropy, FA) 和平均弥散率 (mean diffusivity, MD) 参数图, 手动确定海马和内嗅皮层感兴趣区, 提取感兴趣区 FA 和 MD 平均值。与对照组比较, 模型组小鼠 FA 值降低或 MD 值升高可提示神经纤维结构损伤。

1.3.2.3 Western blot 法检测小鼠海马和内嗅皮层组织 t-Tau 蛋白、p-Tau (Ser 262)、糖元合成激酶-3β 蛋白的表达水平 用 3% 戊巴比妥钠对 2 组小鼠进行深度麻醉, 快速取出双侧海马和内嗅皮层, 先置于液氮中, 后放入 -80 °C 冰箱中冻存。检测时取出双侧小鼠海马和内嗅皮层组织, 按 1 mg: 10 μL 加入含有蛋白酶抑制剂的裂解液, 用超声仪裂解组织 2 次, 10 s/次, 间隔 10 s。4 °C 离心 15 min, 14 000 r/min, 取上清液到新的离心管, 使用 BCA 法定量后将浓度调至一致, 加入 5 × 蛋白上样缓冲液, 95 °C 变性 5 min。SDS-Page 电泳后, 转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后, 加入浓度均为 1: 1 000 的一抗 [t-Tau、p-Tau (Ser 262)、糖元合成激酶-3β (glycogen synthase

kinase-3β, GSK3β)], 在 4 °C 摇床孵育过夜, 回收一抗后, 室温孵育相应二抗 1 h。使用 ECL 显影液覆盖 PVDF 膜, 在 Bio-Rad 成像仪中进行显影, 采用 Image-lab 软件分析处理。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 24.0 统计软件进行数据分析。计量资料服从正态分布用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用两独立样本 *t* 检验。2 组水迷宫测试不同时间点的逃避潜伏期数据采用重复测量方差分析, 若方差齐性, 两两比较采用 LSD-*t* 法; 若方差不齐, 则采用 Dunnett's T3 法。小鼠内嗅皮层和海马脑区 FA 值与学习记忆功能的相关性采用 Pearson 相关分析法。P < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 2组学习记忆功能比较

Morris 水迷宫定位航行测试显示, 与对照组比较, 在第 4 天时模型组小鼠逃避潜伏期明显延长, 差异具有统计学意义 (P < 0.05)。空间探索实验结果显示, 与对照组比较, 模型组小鼠穿越平台次数和目标象限时间占比均明显减少, 差异均具有统计学意义 (P < 0.05)。见表 1 和表 2。

表 1 2组逃避潜伏期比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of escape latency between two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	第1天	第2天	第3天	第4天
对照组	8	68.67 ± 14.20	56.53 ± 11.06	41.74 ± 12.11	25.36 ± 6.80
模型组	8	77.80 ± 10.45	60.05 ± 12.43	47.61 ± 11.84	36.32 ± 6.36 ¹⁾

注: 与对照组比较, 1) P < 0.05。

Note: Compared with the control group, 1) P < 0.05.

表 2 2组穿越平台次数和目标象限时间占比比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of crossing platforms times and target quadrant time ratio between two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	穿越平台次数/次	目标象限时间占比/%
对照组	8	4.34 ± 1.60	35.13 ± 8.75
模型组	8	1.80 ± 0.70 ¹⁾	18.21 ± 4.64 ¹⁾

注: 与对照组比较, 1) P < 0.05。

Note: Compared with the control group, 1) P < 0.05.

2.2 2组内嗅皮层和海马脑区中神经纤维结构完整性比较

DTI 扫描结果表明, 与对照组比较, 模型组小鼠内嗅皮层和海马中 FA 值均明显下降, 内嗅皮层 MD 值明显增加, 差异具有统计学意义 (P < 0.05), 海马 MD 值差异无统计学意义 (P > 0.05)。见表 3。

2.3 小鼠内嗅皮层和海马脑区 FA 值与学习记忆功能的相关性分析

FA 值是 DTI 最常见的反映神经纤维完整性的参数, 而穿越平台次数是 Morris 水迷宫中检测学习记忆功能的重要指标。Pearson 相关分析结果显示, 2 组内嗅皮层 FA 值与其穿越平台次数呈正相关关系 (r = 0.76, P < 0.05), 海马脑区 FA 值与其穿越平台次数同样呈正相关关系 (r = 0.62, P < 0.05)。见图 1。

2.4 2组小鼠内嗅皮层和海马脑区 t-Tau、Ser262、GSK3β 蛋白表达水平比较

Western blot 结果显示, 与对照组比较, 模型组内嗅皮层和海马脑区 t-Tau、Ser262、GSK3β 蛋白表达含量均明显增加, 差异均具有统计学意义 (P < 0.05)。见表 4、图 2。

表3 2组内嗅皮层和海马脑区FA、MD值比较($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Comparison of FA, MD values of the entorhinal cortex and hippocampus between two groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	内嗅皮层		海马	
		FA	MD	FA	MD
对照组	8	0.15±0.01	0.77±0.05	0.14±0.01	0.78±0.05
模型组	8	0.13±0.01 ¹⁾	0.84±0.03 ¹⁾	0.13±0.00 ¹⁾	0.79±0.03

注:与对照组比较,1) $P<0.05$ 。

Note: Compared with the control group, 1) $P<0.05$.

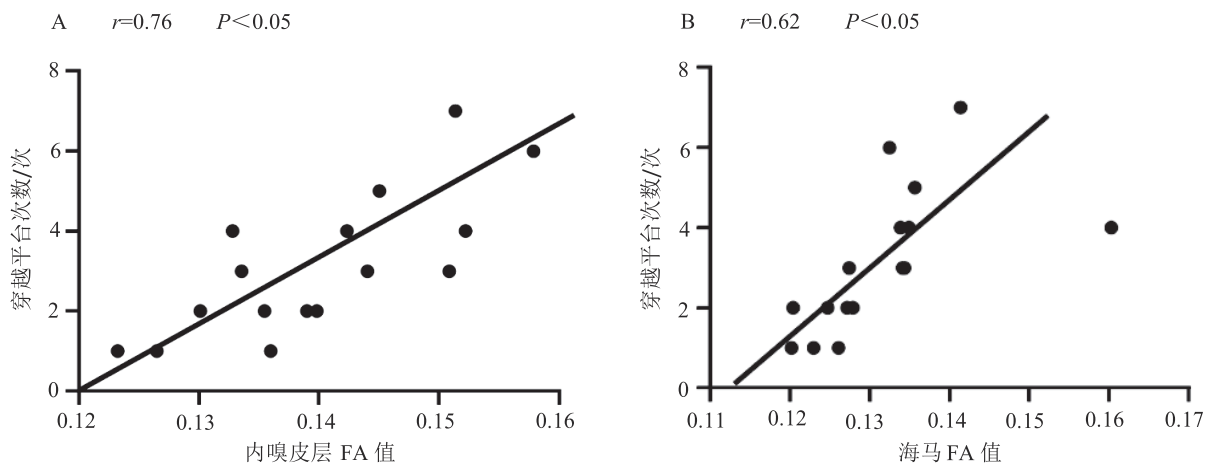


图1 2组内嗅皮层和海马FA值变化与穿越平台次数相关性分析

Figure 1 Correlation analysis between FA values variation of the entorhinal cortex and hippocampus and the number of crossing platforms between two groups

表4 2组内嗅皮层和海马t-Tau、Ser262、GSK3β蛋白表达比较

Table 4 Comparison of t-Tau, Ser262, GSK3β protein expression of the entorhinal cortex and hippocampus between two groups

组别	n	内嗅皮层			海马		
		t-Tau	Ser262	GSK3β	t-Tau	Ser262	GSK3β
对照组	8	0.38±0.07	0.54±0.14	0.64±0.13	0.48±0.08	0.56±0.11	0.81±0.04
模型组	8	0.64±0.11 ¹⁾	1.12±0.02 ¹⁾	1.04±0.16 ¹⁾	1.10±0.13 ¹⁾	1.39±0.15 ¹⁾	1.28±0.11 ¹⁾

注:与对照组比较,1) $P<0.05$ 。

Note: Compared with the control group, 1) $P<0.05$.

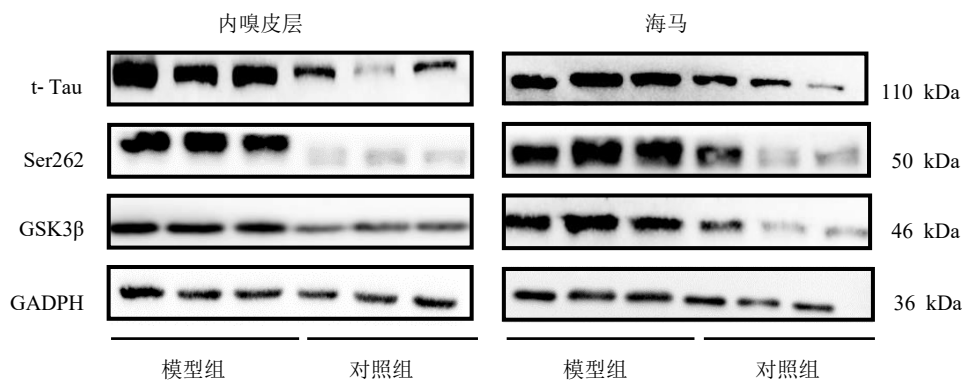


图2 2组内嗅皮层和海马中t-Tau、Ser262和GSK3β蛋白表达

Figure 2 Protein expression of t-Tau, Ser262 and GSK3β of the entorhinal cortex and hippocampus between two groups

3 讨论

内嗅皮层-海马环路是大脑执行学习记忆功能的关键结构^[10]。ASAI等^[12]通过向C57BL/6野生小鼠双侧内嗅皮层注射AAV-P301L-Tau病毒,只需4周时间便可建立快速诱导内嗅皮层磷酸化Tau蛋白通过小胶质细胞传播至海马的模型。目前大量体内外研究支持“Tau蛋白传播”这一概念,Tau蛋白病理性产物可随时间推移在脑内进一步传播^[8]。临床研究表明,AD患者Tau蛋白病理性产物的长期积累,对其认知功能造成了严重影响^[13]。为了探讨内嗅皮层和海马长期Tau蛋白磷酸化对其神经纤维结构和学习记忆功能的影响,本研究通过向C57BL/6野生小鼠双侧内嗅皮层注射了AAV9-P301L-Tau病毒构建AD Tau病理模型,进而通过应用DTI扫描观察12月龄P301L-Tau模型小鼠内嗅皮层和海马神经纤维结构的变化与学习记忆功能的关联性,以及相关分子机制。

3.1 P301L-Tau模型小鼠学习记忆障碍与内嗅皮层和海马脑区神经纤维结构破坏有关

Morris水迷宫结果显示,与对照组比较,模型组小鼠逃避潜伏期明显延长,穿越平台次数和目标象限时间占比均明显减少,提示模型组小鼠出现学习记忆功能障碍。表明在非转基因小鼠上通过注射AAV-P301L-Tau病毒构建AD Tau病理模型,能够模拟AD记忆功能障碍,与先前研究显示P301L-Tau突变转基因小鼠出现记忆功能缺陷的结果一致^[14]。

本研究DTI扫描结果显示,与对照组比较,12月龄模型组小鼠内嗅皮层FA值显著降低,MD值增加,表明模型组小鼠内嗅皮层的神经纤维的完整性遭到破坏,其结果与目前临床研究结果一致^[15]。此外,本研究中P301L-Tau模型小鼠海马脑区FA值下降,与MASSALIMOVA等^[14]研究发现,P301L转基因小鼠海马和丘脑脑区FA值较野生组显著下降的结果一致。为了进一步探讨内嗅皮层和海马神经纤维变化是否影响小鼠的学习记忆功能,本研究Pearson相关性分析结果显示,P301L-Tau模型小鼠内嗅皮层和海马脑区FA值与学习记忆功能呈正相关关系,即FA值越小,神经纤维结构受损越严重,学习记忆障碍越明显。这与先前临床研究显示AD患者神经纤维受损程度与记忆功能具有一定相关性的结果一致^[16]。

3.2 P301L-Tau模型小鼠内嗅皮层和海马脑区神经纤维结构的破坏可能与GSK3 β 介导的Tau蛋白过度磷酸化有关

研究发现,认知功能障碍患者双侧内嗅皮层MD值增加与该脑区较高水平的Tau蛋白沉积有关^[17]。Tau蛋白磷酸化受各种蛋白激酶和磷酸酶的共同调控,GSK3 β 是目前介导Tau蛋白磷酸化的关键激酶,其在AD患者脑内表达含量明显增加^[18],可促使Ser262在内的多个Tau蛋白氨基酸位点磷酸化。因此,本研究进一步采用Western blot法分别检测内嗅皮层和海马脑区t-Tau、Ser262、GSK3 β 蛋白的表达水平。结果显示,与对照组比较,模型组小鼠内嗅皮层和海马脑区的t-Tau、Ser262、GSK3 β 蛋白表达含量均增加,这表明P301L-Tau模型小鼠内嗅皮层和海马脑区神经纤维结构的破坏可能与GSK3 β 介导的Tau蛋白过度磷酸化有关。

4 小结

通过向C57BL/6野生小鼠双侧内嗅皮层注射AAV-P301L-Tau病毒可成功复制AD模型,模拟AD学习记忆障碍。P301L-Tau模型小鼠内嗅皮层和海马神经纤维结构遭受破坏,且破坏程度与学习记忆障碍呈正相关关系,其机制可能与GSK3 β 介导的Tau蛋白过度磷酸化有关,这可为临床AD患者Tau蛋白靶向治疗提供理论依据。

参考文献

- [1] 王晓雯,钱红,沈春娟,等.基于 α CaMK II-CREB-BDNF信号通路研究调心方对APP/PS1双转基因AD小鼠学习记忆和突触可塑性的影响[J].康复学报,2020,30(4):299-306.
WANG X W, QIAN H, SHEN C J, et al. Effect of Tiaoxin recipe on memory learning and synaptic plasticity in APP/PS1 double transgenic Alzheimer's disease mice based on α CaMK II-CREB-BDNF signal pathway [J]. Rehabil Med, 2020, 30(4): 299-306.
- [2] IQBAL K, LIU F, GONG C X, et al. Tau in Alzheimer disease and related tauopathies [J]. Curr Alzheimer Res, 2010, 7(8): 656-664.
- [3] WANG J Z, XIA Y Y, GRUNDKE IQBAL I, et al. Abnormal hyperphosphorylation of tau: sites, regulation, and molecular mechanism of neurofibrillary degeneration [J]. J Alzheimer's Dis, 2013, 33(Suppl 1): S123-S139.
- [4] LONG J M, HOLTZMAN D M. Alzheimer disease: an update on pathobiology and treatment strategies [J]. Cell, 2019, 179(2): 312-339.
- [5] BRIER M R, GORDON B, FRIEDRICHSEN K, et al. Tau and A β imaging, CSF measures, and cognition in Alzheimer's disease [J]. Sci Transl Med, 2016, 8(338): 338ra66.
- [6] JOHNSON K A, SCHULTZ A, BETENSKY R A, et al. Tau positron emission tomographic imaging in aging and early Alzheimer disease [J]. Ann Neurol, 2016, 79(1): 110-119.
- [7] CONGDON E E, SIGURDSSON E M. Tau-targeting therapies for Alzheimer disease [J]. Nat Rev Neurol, 2018, 14(7): 399-415.

- [8] LEWIS J, DICKSON D W. Propagation of Tau pathology: hypotheses, discoveries, and yet unresolved questions from experimental and human brain studies [J]. *Acta Neuropathol*, 2016, 131(1): 27-48.
- [9] 张宇豪, 金昊, 张秀峰, 等. APP/PS1 小鼠不同时期灰质体积变化与 A β 沉积和学习记忆功能的相关性分析 [J]. *康复学报*, 2020, 30(4): 285-292.
- ZHANG Y H, JIN H, ZHANG X F, et al. Correlation of the changes of gray matter volume with A β deposition and learning and memory abilities in APP/PS1 mice at different periods [J]. *Rehabil Med*, 2020, 30(4): 285-292.
- [10] GOYAL A, MILLER J, WATROUS A J, et al. Electrical stimulation in hippocampus and entorhinal cortex impairs spatial and temporal memory [J]. *J Neurosci*, 2018, 38(19): 4471-4481.
- [11] CLAYTON K, DELPECH J C, HERRON S, et al. Plaque associated microglia hyper-secrete extracellular vesicles and accelerate tau propagation in a humanized APP mouse model [J]. *Mol Neurodegener*, 2021, 16(1): 18.
- [12] ASAI H, IKEZU S, TSUNODA S, et al. Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation [J]. *Nat Neurosci*, 2015, 18(11): 1584-1593.
- [13] BEAUCHAMP L C, LIU X M, SEDJAHTERA A, et al. S-adenosylmethionine rescues cognitive deficits in the rTg4510 animal model by stabilizing protein phosphatase 2A and reducing phosphorylated Tau [J]. *J Alzheimer's Dis*, 2020, 77(4): 1705-1715.
- [14] MASSALIMOVA A, NI R Q, NITSCH R M, et al. Diffusion tensor imaging reveals whole-brain microstructural changes in the P301L mouse model of tauopathy [J]. *Neuro Degener Dis*, 2020, 20(5/6): 173-184.
- [15] WEN Q T, RISACHER S L, XIE L H, et al. Tau-related white-matter alterations along spatially selective pathways [J]. *NeuroImage*, 2021, 226: 117560.
- [16] SERRA L, CERCIGNANI M, LENZI D, et al. Grey and white matter changes at different stages of Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimer's Dis*, 2010, 19(1): 147-159.
- [17] LEROY K, YILMAZ Z, BRION J-P. Increased level of active GSK-3 β in Alzheimer's disease and accumulation in argyrophilic grains and in neurones at different stages of neurofibrillary degeneration [J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2007, 33(1): 43-55.
- [18] CRESPO-BIEL N, THEUNIS C, BORGHGRAEF P, et al. Phosphorylation of protein Tau by GSK3 β prolongs survival of bigenic Tau. P301L \times GSK3 β mice by delaying brainstem tauopathy [J]. *Neurobiol Dis*, 2014, 67: 119-132.

Correlation Analysis of the Entorhinal Cortex-Hippocampus Nerve Fiber Changes and Memory Dysfunction in P301L-Tau Mouse Model and Molecular Mechanism

CHEN Xiaocheng¹, LIANG Shengxiang², LIN Bingbing¹, LIU Weilin², HUANG Jia^{1*}

¹ College of Rehabilitation Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350122, China;

² Rehabilitation Industry Institute, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350122, China

*Correspondence: HUANG Jia, E-mail: jasmine1874@163.com

ABSTRACT Objective: To observe the correlation between the changes of entorhinal cortex-hippocampus nerve fibers and learning and memory function in the P301L-Tau mouse model of Alzheimer's disease (AD) and related molecular mechanism, so as to provide the evidence for Tau-targeted treatment in AD patients. **Methods:** A total of 16 3-month-old male C57BL/6 mice were randomly divided into non-vector virus control group (control group) and P301L-Tau model group (model group), with eight mice in each group. After anesthesia, non-vector virus was injected into the bilateral entorhinal cortex of mice in the control group, and AAV-P301L-Tau virus was injected into the bilateral entorhinal cortex of mice in the model group. After the injection, they were routinely fed to 12 months of age. Morris water maze test was used to detect the learning and memory function. Diffusion tensor imaging (DTI) scanning was used to detect the changes of nerve fibers in the bilateral entorhinal cortex and hippocampus. Western blot was used to detect the expression levels of t-Tau, p-Tau (Ser262), and glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β). Pearson correlation analysis was used to analyze the correlation between fractional anisotropy (FA) values in different brain regions of the entorhinal cortex-hippocampus and their corresponding learning and memory functions. **Results:** (1) Learning and memory function test: compared with the control group, the learning and memory function of the model group significantly decreased, the escape latency significantly increased, the number of platform crossings and time ratio of target quadrant significantly decreased ($P < 0.05$). (2) Structure of nerve fibers in the entorhinal cortex and hippocampus: compared with the control group, FA values of the entorhinal cortex and hippocampus in the model group decreased more significantly, MD values of the entorhinal cortex in the model group increased more significantly, while there was no significant difference in the MD values of the hippocampus in the model group ($P > 0.05$). (3) Correlation analysis between FA values in the entorhinal cortex-hippocampus and learning and memory function: FA values in the entorhinal cortex and hippocampus were positively correlated with the number of platform crossings ($r = 0.76$, $P < 0.05$; $r = 0.62$, $P < 0.05$). (4) Expression of t-Tau, Ser262 and GSK3 β protein in the entorhinal cortex-hippocampus: compared with the control group, the expression of t-Tau, p-Tau (Ser262) and GSK3 β protein of entorhinal cortex and hippocampus increased more significantly in the model group ($P < 0.05$). **Conclusion:** The Tau protein in the entorhinal cortex-hippocampus of the P301LTau mouse model was hyperphosphorylated, which leads to destruction of the nerve fiber structures in the entorhinal cortex-hippocampus and learning and memory dysfunctions. The degree of learning and memory dysfunction was positively correlated with the nerve fiber damage of entorhinal cortex and hippocampus.

KEY WORDS Alzheimer's disease; phosphorylated Tau protein; diffusion tensor imaging; entorhinal cortex-hippocampus; learning and memory

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2023.02007