

学校编码: 10384  
学号: 24520141153445

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_  
UDC \_\_\_\_\_

廈門大學

硕士学位论文

***APOE* 基因亚型与小学生学习成绩的相关性  
研究、TREM2/DAP12 复合物在小胶质细胞  
中的信号通路研究**

**Association of *APOE* genotype with academic and physical  
education performance; The role of TREM2/DAP12  
complex in microglial signaling pathway**

李新秀

指导教师姓名: 卜国军 教授

陈小芬 副教授

专业名称: 微生物学

论文提交日期: 年 月 日

论文答辩时间: 年 月 日

学位授予日期: 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

年 月

APOE 基因型与小学生学习成绩的相关性研究 / TREM2/DAP12 复合物在小胶质细胞中的信号通路研究 李新秀

指导教师 卜国军 陈小芬 教授

厦门大学

# 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为( )课题(组)的研究成果，获得( )课题(组)经费或实验室的资助，在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

## 摘要

载脂蛋白 E (apolipoprotein E, apoE) 是脑中主要的载脂蛋白及胆固醇运载体。人类 *APOE* 基因具有多态性, 包含了 *APOE*  $\epsilon$ 2、 $\epsilon$ 3 和  $\epsilon$ 4 三种亚型。其中,  $\epsilon$ 4 等位基因是引起晚发型阿尔茨海默病 (Late-onset Alzheimer's Disease) 最重要的危险因素。尽管许多研究表明在老年人中 *APOE* 基因的多态性与认知功能密切相关, 但对其对青少年群体认知功能的影响研究非常少, 并且有限的研究结果存在争议性。为了进一步探讨 *APOE* 基因多态性对儿童认知功能的影响, 我们招募了 571 名 10-12 岁中国小学生, 并对他们的 *APOE* 基因型与学科学习成绩进行相关性分析。经过统计分析, 我们发现  $\epsilon$ 4 或  $\epsilon$ 2 等位基因和语文、数学、英语等学科学习成绩没有显著相关性。同样的,  $\epsilon$ 2 等位基因携带者与非携带者在各项体育测试成绩上没有显著差异。相比于非携带者,  $\epsilon$ 4 携带者在 50 米冲刺跑这项测试中少耗时 0.23 秒 ( $P=0.026$ ), 两者之间略有微小的统计学差异 ( $P\leq 0.05$ )。其他的各项体育测试成绩与  $\epsilon$ 4 等位基因并没有显著相关性。当按照按各个学期或学年对成绩再次评估时,  $\epsilon$ 4 和  $\epsilon$ 2 与各成绩仍然没有显著的相关性。我们的研究表明, *APOE* 基因多态性对中国小学生群体的学习与认知能力没有显著影响。

分子量为 12 kDa 的 DNAX 活化蛋白, DAP12, 是表达于免疫反应性细胞中的一个信号衔接蛋白, 它通过连接不同的受体, 参与免疫反应的正、负调控。DAP12 衔接的受体之一, 2 型髓系细胞触发受体 (TREM2), 在中枢神经系统中的小胶质细胞里面丰富表达。TREM2/DAP12 复合体参与调节小胶质细胞的生物学功能, 如抑制炎症反应的发生、刺激凋亡神经元的吞噬。*DAP12* 或 *TREM2* 基因的功能缺失性突变可以引发 NHD (Nasu-Hakola Disease) 和 AD, 预示着 TREM2 和 DAP12 在这些疾病病理进程中调控着某些信号通路。在我们的研究中, 我们阐述了 DAP12 在鼠源小胶质细胞中扮演着抑制炎症反应的角色, 并且依赖于和 TREM2 的相互作用。我们发现了一个功能性机制, 即在 LPS 刺激情况下, TREM2/DAP12 复合体抑制 JNK 信号通路的过度激活。有趣的是, LPS 下调鼠源小胶质细胞中 *Trem2* 的表达是通过 JNK 和 NF- $\kappa$ B 两条信号通路的激活, 形成了一种以协同方式促进炎症反应的恶性循环。我们的研究为神经炎症性疾病的机

制性治疗提供了新的视角。

**关键词：** *APOE* 基因型； 学业成绩； 体育成绩

DAP12； TREM2； JNK； LPS； 小胶质细胞； 炎症

厦门大学博硕士论文摘要库

## Abstract

Apolipoprotein E (apoE) is a major apolipoprotein and a cholesterol carrier in the brain. Human *APOE* gene is polymorphic and it exists in three major isoforms:  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$ ,  $\epsilon 4$ . The  $\epsilon 4$  allele is the strongest risk factor for late-onset Alzheimer's disease. Although it has been widely recognized that *APOE* polymorphic alleles are associated with cognitive impairment in the elderly people, there have been relatively few studies examining the association of *APOE* polymorphic alleles with cognitive function in young adults and children. Moreover, the reports on the association between *APOE* genotype and cognitive function in early adulthood have been controversial in different ethnic population. To further investigate the influence of *APOE* polymorphism on cognitive function in children, we analysed the association between *APOE* genotypes and academic and physical education performance scores in a cohort of 571 Chinese primary students aged 10 to 12. After statistical analysis, we found there were no statistically significant associations with academic performance scores of Chinese, Math, English subjects for either the  $\epsilon 4$  or  $\epsilon 2$  alleles. Similarly, *APOE*  $\epsilon 4$  and  $\epsilon 2$  were not significantly associated with physical education performance scores after adjusting for multiple testing. There was a nominally significant ( $P \leq 0.05$ ) association between *APOE*  $\epsilon 4$  and 50-meter dash time, which was slightly lower (Mean: 0.23 seconds,  $P = 0.026$ ) for students with a copy of  $\epsilon 4$ . The lack of a significant association of  $\epsilon 4$  and  $\epsilon 2$  with academic and physical education performance scores was consistent when examining scores at each separate time point. The results of this study indicate that *APOE* polymorphism does not play a major role in learning ability and normal cognitive function in Chinese primary school students.

DNAX-activating protein of 12 kDa (DAP12) is a signaling adapter protein expressed in cells that participate in innate immune responses. By pairing with different receptors, DAP12 has both positive and negative modulation of cellular responses. Triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2), as one of DAP12-coupled receptors, is highly expressed in microglia within the central nervous

system. The TREM2/DAP12 complex inhibits the pro-inflammatory responses, stimulates the phagocytosis of apoptotic neurons in microglia. Notably, loss-of-function mutations of either *DAP12* or *TREM2* result in disorders known as Nasu-Hakola disease and Alzheimer's disease, suggesting that TREM2 and DAP12 may regulate common signaling pathways in the disease pathogenesis. In this study, we demonstrated an anti-inflammatory role of DAP12 in murine microglia that relies on the presence of intact TREM2. We uncovered the functional mechanism by showing that the TREM2/DAP12 complex suppressed the hyperactivation of JNK signaling pathway upon LPS stimulation. Interestingly, LPS down-regulates the expression of *Trem2* via the activation of JNK and NF- $\kappa$ B signaling pathways, resulting in a vicious cycle that synergistically promotes the inflammatory responses. Our study provides insights into mechanism-based therapies for neuroinflammatory disorders.

**Keywords:** APOE genotype; academic performance; physical education performance  
DAP12; TREM2; JNK; LPS; microglia; inflammation



## 目录

<b>第一章 前言</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 AD 与 AD 的遗传风险因子</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 AD 概述 .....	1
1.1.2 与 AD 相关的遗传因素 .....	2
<b>1.2 ApoE 与学习认知能力</b> .....	<b>4</b>
1.2.1 载脂蛋白 E 的基因多态性与蛋白结构 .....	4
1.2.2 ApoE 亚型、认知功能、学习能力 .....	6
1.2.3 学业成绩与其影响因素 .....	7
<b>1.3 TREM2/DAP12 与神经炎症</b> .....	<b>10</b>
1.3.1 TREM2/DAP12 复合体 .....	10
1.3.2 TREM2 .....	10
1.3.3 DAP12 .....	11
1.3.4 TREM2/DAP12、小胶质细胞与神经炎症 .....	12
<b>本论文的研究内容与研究意义</b> .....	<b>14</b>
<b>第二章 材料与方法</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1 APOE 基因亚型与学业成绩课题的材料与方法</b> .....	<b>16</b>
2.1.1 研究对象及学业成绩的采集 .....	16
2.1.2 实验材料 .....	16
2.1.3 主要实验仪器 .....	17
2.1.4 实验方法 .....	17
2.1.5 统计学分析 .....	20
<b>2.2 TREM2/DAP12 介导炎症信号通路课题的材料与方法</b> .....	<b>21</b>
2.2.1 实验材料 .....	21
2.2.2 实验方法 .....	24
2.2.3 数据统计 .....	29
<b>第三章 结果与分析</b> .....	<b>30</b>
<b>3.1 APOE 基因亚型与学业成绩课题的实验结果与分析</b> .....	<b>30</b>

---

3.1.1 样本数据描述.....	30
3.1.2 <i>APOE</i> 基因型鉴定.....	32
3.1.3 <i>APOE</i> 基因亚型与学生学科成绩的关联性分析.....	32
3.1.4 <i>APOE</i> 基因亚型与学生体育测试成绩的关联性分析.....	33
<b>3.2 TREM2/DAP12 介导炎症信号通路课题课题的实验结果与分析.....</b>	<b>40</b>
3.2.1 LPS 诱导的 JNK 磷酸化水平在 <i>Trem2</i> -deficient 的原代小胶质细胞中上调.....	40
3.2.2 JNK 抑制剂不能消除 <i>Trem2</i> -deficient 小胶质细胞对 LPS 的高敏感性.....	42
3.2.2 LPS 诱导的 <i>Trem2</i> 表达水平的下调可以被 JNK 抑制剂和 NF- $\kappa$ B 抑制剂逆转.....	43
<b>第四章 结论与讨论 .....</b>	<b>45</b>
<b>参考文献 .....</b>	<b>48</b>
<b>致谢.....</b>	<b>64</b>
<b>主要科研成果 .....</b>	<b>65</b>

---

**CONTENTS**

<b>Chapter 1 Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 AD and AD genetics .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Introduction of AD .....	1
1.1.2 Genetic factor associated with AD .....	2
<b>1.2 ApoE and cognitive function.....</b>	<b>4</b>
1.2.1 <i>APOE</i> polymorphism and the structure of ApoE.....	4
1.2.2 ApoE isoforms, cognitive function, learning ability .....	6
1.2.3 Academic performance and its contributors .....	7
<b>1.3 TREM2/DAP12 and neuroinflammation.....</b>	<b>10</b>
1.3.1 TREM2/DAP12 complex .....	10
1.3.2 TREM2.....	10
1.3.3 DAP12.....	11
1.3.4 TREM2/DAP12, microglia and neuroinflammation .....	12
<b>Purposes and contents of this thesis .....</b>	<b>14</b>
<b>Chapter 2 Materials and Methods.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Materials and Methods in <i>APOE</i> genotypes project.....</b>	<b>16</b>
2.1.1 Study subjects and samples collection .....	16
2.1.2 Materials.....	16
2.1.3 Equipments.....	17
2.1.4 Methods .....	17
2.1.5 Statistical analysis .....	20
<b>2.2 Materials and Methods in TRM2/DAP12 project.....</b>	<b>21</b>
2.2.1 Materials.....	21
2.2.2 Methods.....	24
2.2.3 Data analysis .....	29
<b>Chapter 3 Results and Analysis .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1 Results and analysis of <i>APOE</i> genotypes project .....</b>	<b>30</b>

---

3.1.1 Description of population.....	30
3.1.2 <i>APOE</i> genotyping.....	32
3.1.3 Association of academic performance scores.....	32
3.1.4 Association of physical education performance scores.....	33
<b>3.2 Results and analysis of TREM2/DAP12 project .....</b>	<b>40</b>
3.2.1 LPS-induced JNK phosphorylation is increased in <i>Trem2</i> -deficient microglia .....	40
3.2.2 JNK inhibitor doesn't eliminate the hypersensitivity of <i>Trem2</i> -deficient microglia to LPS .....	42
3.2.2 JNK and NF- $\kappa$ B inhibitors restore the down-regulated expression of <i>Trem2</i> by LPS .....	43
<b>Chapter 4 Conclusion and Discussion .....</b>	<b>45</b>
<b>References.....</b>	<b>48</b>
<b>Acknowledgement.....</b>	<b>64</b>
<b>Publications .....</b>	<b>65</b>

## 英文缩略词

英文缩写	英文全名	中文名称
<b>AD</b>	Alzheimer's Disease	阿尔茨海默症
<b>ApoE</b>	Apolipoprotein E	载脂蛋白 E
<b>APP</b>	$\beta$ -Amyloid Precursor Protein	$\beta$ -淀粉样前体蛋白
<b>A<math>\beta</math></b>	$\beta$ -Amyloid	$\beta$ -淀粉样蛋白
<b>DAP12</b>	TYRO protein tyrosine kinase-binding protein	酪氨酸激酶结合蛋白
<b>ECL</b>	Enhanced chemiluminescence	强显剂
<b>ERK</b>	Extracellular regulated protein kinases	细胞外调节蛋白激酶
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleukin-1 $\beta$	白介素 1- $\beta$
<b>IL-6</b>	Interleukin-6	白介素 6
<b>ITAMs</b>	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif	酪氨酸依赖的免疫受体激活基序
<b>I<math>\kappa</math>B<math>\alpha</math></b>	Receptor Inhibitor of Nuclear Factor $\kappa$ B	NF- $\kappa$ B 抑制因子
<b>JNK</b>	c-Jun N-terminal kinase	c-Jun 蛋白激酶
<b>LOAD</b>	Late-onset AD	晚发型 AD
<b>LPS</b>	lipopolysaccharide	脂多糖
<b>MAPK</b>	Mitogen activated protein kinase	丝裂原活化蛋白激酶
<b>NHD</b>	Nasu-Hakola Disease	Nasu-Hakola 病
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Nuclear factor kappa B	核转录因子
<b>PBS</b>	Phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲液
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
<b>Syk</b>	Spleen tyrosine kinase	脾酪氨酸激酶

<b>TLR</b>	Toll-like receptor	Toll 样受体
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumor Necrosis Factor	肿瘤坏死因子
<b>TREM2</b>	Triggering receptor expressed on myeloid 2	表达于髓细胞上的触发受体
<b>ZAP70</b>	Zeta-chain-associated protein kinase 70	$\zeta$ 链相关蛋白激酶 70

厦门大学博硕士论文摘要库

## 第一章 前言

### 1.1 AD 与 AD 的遗传风险因子

#### 1.1.1 AD 概述

随着人类平均寿命的延长，人口的老齡化不断加剧，与年龄密切相关的疾病的发生(如痴呆)也随之增加。痴呆疾病无疑是人类健康和社会保障的潜在负担。2015 年，全世界罹患痴呆疾病的人数达到 4680 万，预计 2050 年人数将增至 1.3 亿多<sup>[1]</sup>。阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是神经退行性痴呆里最常见的一种，表现为渐进性的记忆丧失和思维、语言的丢失<sup>[2,3]</sup>。大部分病人发病是在 65 岁以后，属于晚发型 AD (Late-onset AD, LOAD); 2%-10% 的病人，病症初始时间在三、四十岁，被称为早发型 AD (Early-onset AD, EOAD)。从遗传学角度，AD 又可以分为家族遗传性 (Familial form) 和散发性 (Sporadic form) 两种。家族遗传型 AD 较为罕见，所占比率不到 1%，以伴有常染色体显性遗传为典型特征；散发型 AD 受多种因素影响，是环境和遗传易感性共同作用的结果<sup>[4]</sup>。解剖学上 AD 主要表现为由神经元丢失而导致的渐进性大脑皮层萎缩；组织病理学水平上，AD 主要有两个典型的特征： $\beta$  淀粉样蛋白 ( $A\beta$ ) 在神经元胞外沉积成淀粉样斑块；高度磷酸化的 Tau 蛋白在神经元胞内聚集形成纤维缠结。自从阿洛伊斯 阿尔茨海默医生首次描述了这两个典型的病理特征以后，多种假说纷纷被提出，包括  $A\beta$  假说、神经递质 (胆碱能) 假说、Tau 蛋白异常磷酸化假说、神经炎症假说<sup>[5]</sup>。

几十年来，在 AD 领域，淀粉样蛋白假说一直占据主导地位。 $\beta$  淀粉样蛋白前体蛋白 ( $\beta$ -amyloid Protein Precursor, APP) 可以通过两条途径被酶切，即不产生  $A\beta$  途径和产生  $A\beta$  途径。APP 经过  $\alpha$  分泌酶切割产生可溶性的 APP 片段 (Soluble APP N-terminus, sAPP)，剩下的  $\alpha$ -CTF (C-terminal fragment, CTF) 再经过  $\gamma$  分泌酶切割，产生约 3kD 的肽段 (3 kDa peptide, P3) 和 APP 胞内端 AICD (APP intracellular domain, AICD)。而  $A\beta$  则是由  $\beta$  分泌酶和  $\gamma$  分泌酶连续切割而产生。 $A\beta$  淀粉样斑假说认为  $A\beta$  的产生和清除的失衡导致  $A\beta$  的积累和聚集，并产生淀粉样斑块<sup>[6]</sup>。这种代谢的失衡最后导致神经元的凋亡丢失<sup>[7]</sup>。随着研究

者的不断探索,这个假说已经不能对许多复杂的病理进程做出很好的解释<sup>[8]</sup>。另一个研究较多的假说是 tau 蛋白假说,假说认为磷酸化激酶和去磷酸化酶活性的失调导致 Tau 蛋白高度磷酸化,从而形成神经元纤维缠结致使神经元死亡<sup>[9,10]</sup>。在其他的疾病例如额颞叶痴呆 (Frontotemporal dementia, FTD),也出现类似神经纤维缠结的情况<sup>[11]</sup>。Tau 蛋白高度磷酸化的原因有待于进一步探索。随着研究的进展,遗传和神经炎症对 AD 发病的作用也日益引起人们的关注。总之,AD 的发病机制十分复杂,虽有多种假设,但尚无一个假说能够比较完整的解释 AD 的发病机制。AD 可能是内在原因和外在因素共同作用的结果,这些因素之间相互联系、相互影响。

目前用于 AD 治疗的药物主要包括乙酰胆碱酯酶抑制剂 (AChEIs) 和 NMDA 受体 (N-methyl-D-aspartic acid receptor) 拮抗剂<sup>[12]</sup>。不久的将来,以 A $\beta$  和 Tau 蛋白为靶点的治疗新策略将成为改善该疾病的关键突破点。Anil Kumar 对近些年的药物靶向治疗 AD 的成果做了总结,探讨 AD 背后不同方面的病理生理机制及靶向药物对策。针对 A $\beta$  的转运、清除、生成等生物进程的药物调控和 Tau 蛋白磷酸化的抑制调节是目前治疗 AD 的策略前沿<sup>[13]</sup>。其他的替代疗法如免疫疗法、细胞基因治疗也在研究中。

### 1.1.2 与 AD 相关的遗传因素

早发型 AD 病人的发病年龄一般在 65 岁之前,分子病理水平上主要表现为 A $\beta$  的过度产生。有三个与 A $\beta$  产生密切相关的蛋白,即  $\beta$  淀粉样蛋白前体蛋白 (APP),早老素蛋白 1 (Presenilin 1, PSEN1) 和早老素蛋白 2 (Presenilin 2, PSEN2)、<sup>[4]</sup> 它们的基因突变会导致早发型 AD。所占比例为 5%-10%<sup>[14]</sup>。晚发型 AD 受遗传和环境因素的影响<sup>[15]</sup>。从遗传学角度看, APOE  $\epsilon$ 4 等位基因是目前晚发型 AD 最强的遗传风险因子<sup>[16,17]</sup>。人的 APOE 基因有三个多态性等位基因  $\epsilon$ 2、 $\epsilon$ 3、 $\epsilon$ 4,正常人群中其基因频率分别为 8.4%、77.9%、13.7%。而在 AD 病人中, $\epsilon$ 4 等位基因频率显著上升,达到 40%<sup>[18]</sup>。关于临床研究的 Meta 分析报告显示,白种人中,有单个拷贝  $\epsilon$ 4 等位基因 ( $\epsilon$ 2/ $\epsilon$ 4, OR=2.6;  $\epsilon$ 3/ $\epsilon$ 4, OR=3.2) 或双拷贝  $\epsilon$ 4 等位基因 ( $\epsilon$ 4/ $\epsilon$ 4, OR=14.9) 都增加 AD 的患病风险。而携带  $\epsilon$ 2 等位基因却起到保护作用 ( $\epsilon$ 2/ $\epsilon$ 2, OR=0.6;  $\epsilon$ 2/ $\epsilon$ 3, OR=0.6)<sup>[18]</sup>。APOE 基因多态性对不同种族人群罹患 AD 的影响程度有所不同。研究还显示, $\epsilon$ 4 等位基因的出现不仅增加散发



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库