β-淀粉样蛋白寡聚体脑内注射动物模型在阿尔茨海默病研究中的应用

王丽莎, 刘新民, 陶　雪, 张梦荻, 周云丰, 常　琪*

(中国医学科学院、北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193)

摘要: 脑内 β-淀粉样蛋白 (amyloid-β peptide, Aβ) 的异常沉积在阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 的发病进程中起重要作用。Aβ 寡聚体脑内注射动物模型不仅为深入探索 Aβ 在 AD 中的作用机制提供了方法, 而且也可用来筛选靶向于 Aβ 寡聚体的候选药物。迄今为止, 已有大量文献报道利用该动物模型进行抗 AD 药物的活性评价和作用机制研究。本文拟对脑内注射可溶性 Aβ 寡聚体的研究进展进行总结, 主要包括实验动物、Aβ 的种类及其寡聚体的体外制备方法、注射部位和剂量、造模时长和行为学变化, 以及该动物模型相关的病理学机制等, 为该模型的合理应用提供参考。

关键词: 阿尔茨海默病; β-淀粉样蛋白; 寡聚体; 脑内注射; 动物模型

中图分类号: R965　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0513-4870 (2018) 07-1060-08

Application of the animal model of intracerebral injection of amyloid-β oligomers to the study of Alzheimer's disease

WANG Li-sha, LIU Xin-min, TAO Xue, ZHANG Meng-di, ZHOU Yun-feng, CHANG Qi*

(*Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China*)

Abstract: Progressive accumulation of the amyloid-β peptide (Aβ) in the brain plays a central role in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD). The animal model of intracerebral injection of Aβ oligomers not only provides a method for further exploring the mechanism of Aβ in AD, but also can be used to screen drug candidates targeting Aβ oligomers. This animal model has been widely used in the study of anti-AD drugs and mechanism of AD. In this paper, we summarize the research progress in the animal model of intracerebral injection of soluble Aβ oligomers, including experimental animals, the types of Aβ, the preparation of Aβ oligomers *in vitro*, injection sites and doses, the duration of modeling, animal behavioral changes, and the pathological mechanisms relating to this animal model, which will contribute to the application of the animal model to various conditions.

Key words: Alzheimer's disease; amyloid-β peptide; oligomer; intracerebral injection; animal model

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种多发生于老年人的中枢神经系统退行性疾病, 临床主要表现为记忆力减退、认知功能障碍、运动障碍及人格改变等。随着人类寿命的延长和人口老龄化的加剧, AD 的发病率呈快速增长趋势。到 2015 年, 全世界有 4.68 千万名 AD 患者, 医疗花费约为 8.18 千亿美元, 到 2018 年其费用将会突破万亿美元[1], 这给个人、家庭和社会带来了沉重的经济和精神负担。

收稿日期: 2018-01-24;　修回日期: 2018-03-14.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81773930); 国家重大创新药创制专项 (2017ZX09301029); 中国医学科学院创新工程项目 (2016-I2M-1-012).

*通讯作者 Tel: 86-10-57833468, E-mail: qchang@implad.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0088

AD 的发病机制复杂，至今尚不明确。AD 患者脑内含有大量纤维化淀粉样蛋白沉积[2]。在近几十年的研究中，淀粉样蛋白级联假说占主导地位。该假说认为遗传或其他因素引起 β-淀粉样蛋白 (amyloid-β peptide, Aβ) 聚集形成纤维化沉积，进而形成 β 淀粉样斑块，随后 tau 蛋白过度磷酸化形成神经纤维缠结，并产生突触和神经元功能损伤，最终导致认知功能障碍。支持这一假设的最有力证据来自于家族性 AD 的许多基因突变[3, 4]。这些突变使 Aβ 总量增加，提高 $A\beta_{1-42}$ 与 $A\beta_{1-40}$ 的比值[4]，也可产生更易形成淀粉样聚集的突变 Aβ[5]。早期研究认为，Aβ 纤维化聚集体，而非单体，与 AD 的淀粉样斑块类似，具有神经毒性[6]。但 AD 患者的痴呆程度与脑内纤维化斑块密度的相关性较差[7]。淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 转基因小鼠在淀粉样斑块形成之前就出现了学习记忆障碍和长时程增强 (long-term potentiation, LTP) 的抑制[8, 9]。Mucke 等[9]观察到突触损伤与淀粉样蛋白沉积无关，但与可溶性提取物中的 Aβ 免疫反应性水平相关。之后的研究进一步表明 Aβ 毒性与可溶性寡聚体有关，而不是纤维化聚集体[10−12]。Gong 等[13]已使用特异性抗体在 AD 患者脑中检测到这种寡聚体，它与体外聚集生成的 Aβ 寡聚体一致。在 APP cDNA 转染的中国仓鼠卵巢细胞培养液中[14]和 Tg2576 转基因小鼠的脑提取物中也观察到相似的 Aβ 寡聚体[15]。在细胞和动物模型中，Aβ 寡聚体能够产生与 AD 相关的病理改变，包括 tau 蛋白磷酸化、氧化应激和突触损伤等[16−18]。APP 转基因小鼠的突触损伤发生在淀粉样斑块核团周围[19]，这可能是因为淀粉样斑块作为 Aβ 寡聚体的惰性储存器，在脂质存在下易分解，局部产生 Aβ 寡聚体[20]。Aβ 纤维化聚集体的形成需要较高水平的 Aβ，而 Aβ 寡聚体在体内的形成只需要较低水平的 Aβ，这意味着体内首先产生 Aβ 寡聚体这一毒性形式，其在 AD 早期阶段起重要作用[21]。

基于 Aβ 假说，AD 动物模型的发展主要集中于脑内 Aβ 的异常过量。APP 或早老素基因的突变可引起 Aβ 失衡升高，最终导致家族性 AD[22]，在此基础上建立的转基因小鼠 (Tg2576、PDAPP、APP/PS1 和 APP23) 模型被广泛应用，它们能够较好地模拟人类 AD 病理变化进程。然而，转基因小鼠不但价格较高，还需要数月才能形成 Aβ 斑块，甚至更长时间才能显示出 Aβ 诱导的突触或行为异常[23]。而 Aβ 注射模型克服了转基因小鼠模型的上述缺点，不仅可以模拟 AD 行为异常，还可以表现家族性和散发性 AD 的病理特征。这一模型的最大优点在于其可控性，如 Aβ 的聚集形态 (单体、寡聚物、纤维化或混合物)、种类 ($A\beta_{1-40}$、$A\beta_{1-42}$ 和 $A\beta_{25-35}$ 等)、注射时间点、注射部位和造模时长等。因此，在研究由 Aβ 寡聚体诱导的神经毒性或炎症时、或研究尚未形成淀粉样斑块的 AD 病理学时、或评价作用于 AD 早期阶段的候选药药效时，建议采用可溶性 Aβ 寡聚体进行脑内注射。

本文集中总结了脑内注射可溶性 Aβ 寡聚体的研究，主要包括实验动物、Aβ 种类、Aβ 寡聚体的体外制备、注射部位和剂量、造模时长和行为学检测及与 Aβ 寡聚体相关的病理学机制，并对此模型的应用进行了展望。

1 实验动物

文献报道用于脑内注射 Aβ 的模型动物主要有非人灵长类动物和啮齿类动物，其中啮齿类动物最为常用[24, 25]。各个月龄的鼠都有使用，有选用 2 个月左右的成年鼠，也有选用 9 个月甚至 16 个月龄的老年鼠，以更好模拟老年人 AD 的病理情况[26]。研究大多数只采用雄性鼠，因为雌性鼠体内波动的雌激素具有神经保护作用[27]。Liu 等[28]研究表明，侧脑室注射 $A\beta_{25-35}$ 后，雄性昆明小鼠在水迷宫实验中学习记忆水平的降低程度明显大于雌性昆明小鼠。除了昆明小鼠外，较多研究还采用 C57BL/6J、ICR 和 Swiss 等小鼠以及 SD 和 Wistar 等大鼠 (表 1)[12, 29−48]。

2 Aβ 种类

较多研究报道，脑内注射 $A\beta_{1-40}$、$A\beta_{1-42}$ 和 $A\beta_{25-35}$ 等可产生神经毒性，引起认知功能障碍和 LTP 的抑制。Aβ 含有 36～43 个氨基酸残基，是由 APP 通过水解酶水解而得到。$A\beta_{1-40}$ 和 $A\beta_{1-42}$ 是 AD 患者脑内 Aβ 的两个主要成分，前者的含量高于后者。而 $A\beta_{1-42}$ 在 AD 患者脑组织中比在同龄正常人群中更丰富[49]，且被认为是引起 $A\beta_{1-40}$ 聚集的“种子”[50]。细胞转染实验中，能够引起 AD 的 APP 和早老素基因突变可以使 $A\beta_{1-42}$ 增多[51]。研究表明 $A\beta_{1-40}$ 和 $A\beta_{1-42}$ 的肽链组成基本相同，但 $A\beta_{1-42}$ 在 C-末端多了个二肽片段 (异亮氨酸−丙氨酸)，肽链更长、更疏水，自身的聚合反应更快[52]，毒性更大[53]。$A\beta_{25-35}$ 片段能够迅速聚集，产生神经毒性[54]。但这种合成的 Aβ 片段不存在于 AD 患者脑内，不能完全代表天然 Aβ，尤其是它不含有与共同沉积在神经炎斑块中的载脂蛋白 ApoE、α1-抗胰凝乳蛋白酶、肝素硫酸蛋白聚糖等分子发生相互作用的结构域。目前尚不清楚 $A\beta_{25-35}$ 是否可以模拟 AD 中病理生理过程以及蛋白质−蛋白质或蛋白质−脂质的相互作用[55]。

与人类的 Aβ 相比，啮齿类动物的 Aβ 在脑中不

Table 1 Summary of the animals, injection sites, doses, duration of modeling and behavioral tests of the animal model of intracerebral injection of Aβ oligomers

Year	Animal	Injection site	Dose (pmol/ mouse or rat)	Duration of modeling and behavioral test						
				Object recognition	Passive avoidance	Y maze	Fear conditioning	Water maze	Tail suspension and forced swim	Sucrose preference
2008[29]	C57BL/6 mice (12 w)	Lateral ventricle	500	−	−	4 day	−	7−14 day	−	−
2010[12]	C57BL/6 mice (7−8 w)	Lateral ventricle	7.5 (two injections)	1 day (recovered after 10 days)	−	−	−	−	−	−
2010[30]	C57BL/6 mice (20 w)	Lateral ventricle	222	−	−	−	1 day	−	−	−
2012[31]	Swiss mice (12 w)	Lateral ventricle	10	1 day	−	−		−	1, 8 day	1 day
2013[32]	C57BL/6J mice (12 w)	Lateral ventricle	50	−	−	4 day	−	−	−	−
2013[33]	Swiss mice (12 w)	Lateral ventricle	10, 50	1, 7, 14 day	−	−	−	−	−	−
2016[34]	ICR mice (7 w)	Lateral ventricle	500	−	−	3 day	−	−	−	−
2017[35]	Swiss mice (8−12 w)	Lateral ventricle	10	1 day (novel object) 8 day (object location)	−	−	−	−	−	−
2011[36]	ICR mice (8 w)	Granule cell layer of hippocampus	30	6 day	8 day	−	−	−	−	−
2011[37]	ICR mice (27−30 g)	Hilus of hippocampus	30	−	8 day	6 day	−	−	−	−
2015[38]	C57BL/6 mice (12 w)	Hippocampus	50	−	−	6 day (recovered after 30 days)	−	−	−	−
2012[39]	Wistar rats (12−48 w, 200−250 g)	Lateral ventricle	600/day (30−days infusion)	−	−	−	−	32−36 day	−	−
2012[40]	SD rats (200−300 g)	Lateral ventricle	144/day (30−days infusion)	−	−	−	−	31−35 day	−	−
2014[41]	SD rats (220−280 g)	Lateral ventricle	5000	−	−	−	−	2−10 day	−	−
2015[42]	SD rats (250 g)	Lateral ventricle	10.8	2 h	−	−	−	−	−	−
2015[43]	Wistar rats (280−300 g)	Lateral ventricle	5000	−	−	−	−	10−16 day	−	−
2016[44]	Wistar rats (280−300 g)	Lateral ventricle	5000	−	−	−	−	10−16 day	−	−
2016[45]	Wistar rats (24 w)	Lateral ventricle	5100	−	−	−	−	8−12, 19 day	−	−
2016[46]	SD rats (250−350 g)	Lateral ventricle	400/2 day (16−days infusion)	−	−	−	−	8−16 day	−	−
2017[47]	Charles River-Harlan rats (250−300 g)	Lateral ventricle	375, 1 125 and 3 000	−	−	−	−	8−12 day	−	−
2013[48]	Wistar rats (24 w, 220−250 g)	CA1 molecular layer of hippocampus	149.53	−	−	−	−	8−11 day	−	−

能形成纤维化沉积，且较少形成 β-折叠结构[56, 57]。这是由于人与啮齿类动物 Aβ_{1-42}之间的一级氨基酸序列不同。啮齿动物 Aβ_{1-42}含有人肽序列的 3 个氨基酸变异，即精氨酸 5、酪氨酸 10 和组氨酸 13 分别被甘氨酸、苯丙氨酸和精氨酸所取代[58]。由于氨基酸变异发生在与 Cu^{2+}结合的结构域内，啮齿类动物的 Aβ 缺乏还原 Cu^{2+}的能力，因此，推测其不具有与人 Aβ_{1-42}相同的毒性。而 Boyd-Kimball 等[59]研究表明：虽然啮齿类动物 Aβ_{1-42}的氨基酸变异发生在人 Aβ 的 Cu^{2+}结合和还原结构域内，但不足以阻止啮齿类动物

$A\beta_{1-42}$ 引起氧化损伤和形态学改变, 尽管其氧化损伤略低于人 $A\beta_{1-42}$。

3 Aβ 寡聚体的体外制备

Aβ 有多种聚集形态, 包括寡聚体 (二聚体、三聚体和四聚体等)、原纤维和纤维化聚集体等。Aβ 的种类和浓度、孵育时间和温度、介质的 pH 和离子强度等都影响 Aβ 的聚集[60]。Aβ 通过以下两种途径聚集: 一种是成核依赖性途径, 是由 Aβ 单体通过非共价键结合形成核或“种子”, 然后逐渐聚集形成可溶性原纤维中间体, 最终形成不溶性纤维状聚集体; 另一种是可溶性寡聚体形成途径, 随孵育时间的延长寡聚体逐渐变大[61]。

脑内注射的 Aβ 多采用双蒸水、PBS 或生理盐水直接溶解。引用次数较多的是 Maurice 等[62]所采用的方法: 将 $A\beta_{25-35}$ 和 $A\beta_{1-28}$ 溶解于双蒸水中 (1 $mg\cdot mL^{-1}$), 置于−20 ℃保存。使用前将其在 37 ℃孵育 4 天。用光镜观察“老化”的 $A\beta_{25-35}$, 发现其包含两种不溶性沉积: 双折射纤维状和球状聚集体。在 2003 年 Stine 等[60]的研究中, Aβ 冻干粉直接溶于双蒸水中, 原子力显微镜 (atomic force microscopy, AFM) 显示其包含寡聚体、纤维状和球状聚集体等各种形态。这些形态结构主要依赖于最初 Aβ 冻干粉中聚集体的形态, 它们能进一步聚集, 影响最终溶液内 Aβ 的形态和生物活性。Aβ 冻干粉直接溶解也可能形成无定型聚集体, 影响 Aβ 正常聚集。由于最初选用的 Aβ 冻干粉状态不可控, 虽然用水溶液溶解孵育条件一致, 但不能保证最终形成的溶液中 Aβ 聚集状态一致, 因此会导致研究结果存在差异。

采用冰冷的 1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇 (1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol, HFIP) 溶解 Aβ 冻干粉 (1 $mmol\cdot L^{-1}$), 可去除其中预先存在的不同聚集态结构, 使 Aβ 单体化, 经挥干 HFIP 后形成无色透明薄膜状肽, 它可在−80 ℃下保存 6 个月。使用前将薄膜状肽用无水二甲基亚砜超声复溶 (5 $mmol\cdot L^{-1}$), 这样可以形成均一可控的 Aβ 单体溶液。然后采用 PBS 或细胞培养基 (不含酚红的 Ham's F-12, BioSource) 稀释 (100 $\mu mol\cdot L^{-1}$), 于 4 ℃孵育 12～24 h 即可形成寡聚体。若采用 10 $mmol\cdot L^{-1}$ HCl 稀释并于 37 ℃孵育 24 h 则形成纤维状聚集体。溶液中 Aβ 的形态可以采用 AFM 和十二烷基硫酸钠−聚丙烯酰胺凝胶电泳免疫印迹法进行表征[60]。在 HFIP 挥干的过程中, 需要注意 Aβ 的稳定性, 温度偏高会引起 Aβ 降解, 使其变成棕色, 不能形成无色透明的薄膜状肽。因此, 需要密切关注这一过程中的温度, 使其维持在室温[63]。值得注意的是, 在整个制备过程中应选用聚丙烯塑料制品, 如离心管、吸头等, 因为聚丙烯塑料蛋白结合率低, 不影响溶液中不同 Aβ 形态的比例[64]。

4 注射部位和剂量

AD 病变发生在特定脑区, 尤其在海马和皮层部位[65]。Aβ 寡聚体诱导神经元死亡具有区域特异性, 它能够选择性杀伤海马 CA1 区和内嗅皮层的神经元, 而对小脑的神经元无毒性作用[66], 这与其在不同脑区的分布特性和受体表达差异有关[21]。较多的研究报道是将 Aβ 注射于侧脑室或海马 (CA1 区和齿状回等) 等部位 (表 1)。Jean 等[26]认为, 由于针头插入脑内会引起注射部位组织损伤, 导致额外的细胞死亡和胶质增生, 因此, 在进行脑片检测时必须远离注射处进行分析。如要研究 Aβ 对海马依赖性行为的影响, 则应在海马附近进行注射, 而不是直接注射进入海马, Aβ 可通过扩散进入海马内产生影响。

可以根据 AD 患者脑内的实际浓度选择造模所需的 Aβ 剂量。AD 患者脑内皮层中可溶性 Aβ 的平均浓度为 1.5 $\mu g\cdot g^{-1}$, 而正常人脑中的为 2 $ng\cdot g^{-1}$[67]。Epelbaum 等[38]的体内实验显示, Aβ 用量采用与 AD 患者脑内可溶性 Aβ 相同的数量级, < 1 $\mu g\cdot g^{-1}$ [68], 即每只小鼠注射 50 pmol, 相当于 0.225 μg Aβ 扩散于约 500 mg 的小鼠脑中达到 0.45 $\mu g\cdot g^{-1}$ 的浓度。其他研究也有采用高于此范围的剂量 (表 1)。

5 造模时长和行为学检测

表 1 总结了近 10 年来 Aβ 寡聚体脑内注射动物模型的造模时长和行为学检测方法。关于小鼠的研究报道中, 应用较多的是物体认知实验, 以检测动物短期学习记忆水平。总结这些文献发现, 14 天内模型组小鼠和对照组比较, 其学习记忆水平显著降低。但 2010 年 Balducci 等[12]研究表明, 在造模后第 10 天的检测中模型组和对照组的学习记忆水平没有统计学差异。推测原因可能包括: Aβ 寡聚体的制备方法与其他研究的不完全一致, 采用碱性溶液溶解 Aβ 后再用 PBS 稀释孵育, 而不是“Aβ 寡聚体的体外制备”中总结的常规方法, 可能包含不同或不同比例的寡聚体形态; 在熟悉期和测试期前 2 h 分别给予两次较低剂量的 Aβ 寡聚体 (7.5 pmol) 而不是熟悉期前单次注射稍多剂量的 Aβ 寡聚体 (10 和 50 pmol)。在海马部位注射 Aβ 后的第 8 天, 避暗实验表现出明显差异, 表明 Aβ 寡聚体也可影响动物的长期记忆水平[36, 37]。Y 迷宫实验中, 造模后 6 天内动物表现出空间工作能力的降低, 而 30 天后恢复正常[38]。这可能是由于小胶质细胞和星形胶质细胞对脑内 Aβ 的清除作用[69, 70]。

在 C57 小鼠侧脑室中一次性注射 500 pmol Aβ 寡聚体可以在第 7～14 天的水迷宫实验中表现出空间学习记忆能力的损伤[29]。Ledo 等[31]的研究发现，造模后小鼠不仅表现出学习记忆水平的下降，还表现出 AD 的另一症状——抑郁。在悬尾和强迫游泳实验中，造模后第 1 天和第 8 天都可以显著增加小鼠的不动时间；造模后第 1 天也显著降低模型小鼠对糖水的偏爱程度。关于大鼠的研究报道中，应用较多的是水迷宫实验。多数研究选在造模后 1 周开始检测水迷宫[43, 45, 47, 48]，也有研究采用每天注射一定量 Aβ 寡聚体，连续 30 天之后再开始进行检测[39, 40]。Rammes 等[42]研究表明，注射 Aβ 寡聚体 2 h 后可以显著降低大鼠在新物体识别中的短期学习记忆水平。

6 相关病理学机制

Aβ 寡聚体引发的细胞损伤几乎包含 AD 病理学的所有重要方面，如突触损伤、tau 蛋白异常磷酸化、胆碱能丢失、氧化应激、胰岛素抵抗、神经炎症和选择性神经元死亡等[71]。大量研究表明，可溶性 Aβ 寡聚体在 AD 中诱导突触丢失。Aβ 诱导的突触功能障碍依赖于对 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸受体 (*N*-methyl-*D*-aspartate receptors, NMDARs) 的过度刺激，导致氧化还原异常激活以及细胞质内 Ca^{2+}水平升高，这又进一步触发后续反应，涉及磷酸 tau 蛋白、caspases、Cdk5/dynamin 相关蛋白 1、钙调神经磷酸酶/PP2B、PP2A、Gsk-3β、Fyn、cofilin 和 CaMKII 等，并引起 AMPA 受体和 NMDARs 的内吞作用。这些信号通路的异常改变导致线粒体功能障碍和生物能量损失，随后引起突触功能障碍和损伤，抑制 LTP，降低认知水平。也有研究指出 Aβ 至少部分能够通过抑制谷氨酸摄取或促进胶质细胞释放谷氨酸来异常升高突触后谷氨酸水平。随后突触后 NMDARs 被过度刺激，通过上述途径导致突触功能障碍。与此一致的是，NMDARs 拮抗剂 (美金刚和 NitroMemantine) 可以部分改善 Aβ 的突触毒性[72]。

7 结语

尽管一些 Aβ 抗体 (礼来的 solanezumab、强生的 bapineuzumab 和罗氏的 gantenerumab) 在最近的 AD III 期临床试验中失败[73]，但作用于调节 Aβ 的候选药物和新型临床试验策略仍有希望[74]。Solanezumab 靶向于可溶性 Aβ 单体，bapineuzumab 和 gantenerumab 靶向于β淀粉样斑块。体内 Aβ 具有多种不同形态，对应的抗体需要包含不同结合表位，因此目前 Aβ 抗体临床试验的失败不能表明靶向于 Aβ 寡聚体等形态的抗体药物没有希望。另外，AD 药物的研发也越来越趋向于其早期治疗。如礼来正在进行的 solanezumab III 期 EXPEDITION-PRO 试验 (NCT02760602)，预计将在 2021 年完成[75]。总之，Aβ 寡聚体脑内注射动物模型为这些临床研究奠定基础，不仅能深入探索 Aβ 在体内的作用机制，而且可以筛选靶向 Aβ 寡聚体的候选药物，为阻止 AD 病理进程和逆转早期 AD 功能障碍提供方法[21]。

References

[1] Alzheimer's Disease International. World Alzheimer report 2016: improving healthcare for people living with dementia [R]. London: Alzheimer's Disease International, 2016.

[2] Cohen AS, Calkins E. Electron microscopic observations on a fibrous component in amyloid of diverse origins [J]. Nature, 1959, 183: 1202−1203.

[3] Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis [J]. Science, 1992, 256: 184−185.

[4] Selkoe DJ, Podlisny MB. Deciphering the genetic basis of Alzheimer's disease [J]. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2002, 3: 67−99.

[5] Nilsberth C, Westlind-Danielsson A, Eckman CB, et al. The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced Aβ protofibril formation [J]. Nat Neurosci, 2001, 4: 887−893.

[6] Pike CJ, Walencewicz AJ, Glabe CG, et al. *In vitro* aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity [J]. Brain Res, 1991, 563: 311−314.

[7] Terry RD, Masliah E, Salmon DP, et al. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimers-disease-synapse loss is the major correlate of cognitive impairment [J]. Ann Neurol, 1991, 30: 572−580.

[8] Hsia AY, Masliah E, McConlogue L, et al. Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96: 3228−3233.

[9] Mucke L, Masliah E, Yu GQ, et al. High-level neuronal expression of $A\beta_{1-42}$ in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation [J]. J Neurosci, 2000, 20: 4050−4058.

[10] Dahlgren KN, Manelli AM, Stine WB, et al. Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability [J]. J Biol Chem, 2002, 277: 32046−32053.

[11] DaRocha-Souto B, Scotton TC, Coma M, et al. Brain oligomeric beta-amyloid but not total amyloid plaque burden correlates with neuronal loss and astrocyte inflammatory response in amyloid precursor protein/tau transgenic mice [J].

J Neuropathol Exp Neurol, 2011, 70: 360−376.

[12] Balducci C, Beeg M, Stravalaci M, et al. Synthetic amyloid-beta oligomers impair long-term memory independently of cellular prion protein [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107: 2295−2300.

[13] Gong Y, Chang L, Viola KL, et al. Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric Aβ ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100: 10417−10422.

[14] Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, et al. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation *in vivo* [J]. Nature, 2002, 416: 535−539.

[15] Lesne S, Koh MT, Kotilinek L, et al. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory [J]. Nature, 2006, 440: 352−357.

[16] De Felice FG, Wu D, Lambert MP, et al. Alzheimer's disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by A β oligomers [J]. Neurobiol Aging, 2008, 29: 1334−1347.

[17] De Felice FG, Velasco PT, Lambert MP, et al. Aβ oligomers induce neuronal oxidative stress through an *N*-methyl-*D*-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine [J]. J Biol Chem, 2007, 282: 11590−11601.

[18] Jin M, Shepardson N, Yang T, et al. Soluble amyloid beta-protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108: 5819−5824.

[19] Spires TL, Meyer-Luehmann M, Stern EA, et al. Dendritic spine abnormalities in amyloid precursor protein transgenic mice demonstrated by gene transfer and intravital multiphoton microscopy [J]. J Neurosci, 2005, 25: 7278−7287.

[20] Martins IC, Kuperstein I, Wilkinson H, et al. Lipids revert inert Aβ amyloid fibrils to neurotoxic protofibrils that affect learning in mice [J]. EMBO J, 2008, 27: 224−233.

[21] Klein WL. Aβ toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets [J]. Neurochem Int, 2002, 41: 345−352.

[22] Kam TI, Gwon Y, Jung YK. Amyloid beta receptors responsible for neurotoxicity and cellular defects in Alzheimer's disease [J]. Cell Mol Life Sci, 2014, 71: 4803−4813.

[23] Elder GA, Gama Sosa MA, De Gasperi R. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease [J]. Mt Sinai J Med, 2010, 77: 69−81.

[24] Forny-Germano L, Lyra e Silva NM, Batista AF, et al. Alzheimer's disease-like pathology induced by amyloid-beta oligomers in nonhuman primates [J]. J Neurosci, 2014, 34: 13629−13643.

[25] Zhao B, Zhang XY, Fu XF. Advances in animal models of Alzheimer's disease [J]. Chin J Neuroanatomy (神经解剖学杂志), 2012, 28: 102−104.

[26] Jean YY, Baleriola J, Fa M, et al. Stereotaxic infusion of oligomeric amyloid-beta into the mouse hippocampus [J]. J Vis Exp, 2015, (100): e52805.

[27] Chakrabarti M, Haque A, Banik NL, et al. Estrogen receptor agonists for attenuation of neuroinflammation and neurodegeneration [J]. Brain Res Bull, 2014, 109: 22−31.

[28] Liu G, Hu ZY, Yang S, et al. Comparison of Alzheimer's disease animal model in BALB/c and Kunming mice by intracerebroventricular injection of β-amyloid [J]. Bull Acad Mil Med Sci (军事医学科学院院刊), 2009, 33: 554−557.

[29] Youssef I, Florent-Bechard S, Malaplate-Armand C, et al. N-Truncated amyloid-beta oligomers induce learning impairment and neuronal apoptosis [J]. Neurobiol Aging, 2008, 29: 1319−1333.

[30] Dineley KT, Kayed R, Neugebauer V, et al. Amyloid-beta oligomers impair fear conditioned memory in a calcineurin-dependent fashion in mice [J]. J Neurosci Res, 2010, 88: 2923−2932.

[31] Ledo JH, Azevedo EP, Clarke JR, et al. Amyloid-beta oligomers link depressive-like behavior and cognitive deficits in mice [J]. Mol Psychiatry, 2013, 18: 1053−1054.

[32] Bouter Y, Dietrich K, Wittnam JL, et al. N-Truncated amyloid beta (Aβ) 4−42 forms stable aggregates and induces acute and long-lasting behavioral deficits [J]. Acta Neuropathol, 2013, 126: 189−205.

[33] Figueiredo CP, Clarke JR, Ledo JH, et al. Memantine rescues transient cognitive impairment caused by high-molecular-weight Aβ oligomers but not the persistent impairment induced by low-molecular-weight oligomers [J]. J Neurosci, 2013, 33: 9626−9634.

[34] Kim HY, Lee DK, Chung BR, et al. Intracerebroventricular injection of amyloid-beta peptides in normal mice to acutely induce alzheimer-like cognitive deficits [J]. J Vis Exp, 2016, (109): 53308.

[35] Brito-Moreira J, Lourenco MV, Oliveira MM, et al. Interaction of amyloid-beta (Aβ) oligomers with neurexin 2α and neuroligin 1 mediates synapse damage and memory loss in mice [J]. J Biol Chem, 2017, 292: 7327−7337.

[36] Choi JG, Moon M, Kim HG, et al. Gami-Chunghyuldan ameliorates memory impairment and neurodegeneration induced by intrahippocampal $A\beta_{1-42}$ oligomer injection [J]. Neurobiol Learn Mem, 2011, 96: 306−314.

[37] Moon M, Choi JG, Nam DW, et al. Ghrelin ameliorates

cognitive dysfunction and neurodegeneration in intrahippocampal amyloid-β_{1-42} oligomer-injected mice [J]. J Alzheimers Dis, 2011, 23: 147−159.

[38] Epelbaum S, Youssef I, Lacor PN, et al. Acute amnestic encephalopathy in amyloid-beta oligomer-injected mice is due to their widespread diffusion *in vivo* [J]. Neurobiol Aging, 2015, 36: 2043−2052.

[39] Han X, Ma Y, Liu X, et al. Changes in insulin-signaling transduction pathway underlie learning/memory deficits in an Alzheimer's disease rat model [J]. J Neural Transm, 2012, 119: 1407−1416.

[40] He Y, Zheng MM, Ma Y, et al. Soluble oligomers and fibrillar species of amyloid beta-peptide differentially affect cognitive functions and hippocampal inflammatory response [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 429: 125−130.

[41] Zhang LL, Sui HJ, Liang B, et al. Atorvastatin prevents amyloid-beta peptide oligomer-induced synaptotoxicity and memory dysfunction in rats through a p38 MAPK-dependent pathway [J]. Acta Pharmacol Sin, 2014, 35: 716−726.

[42] Rammes G, Gravius A, Ruitenberg M, et al. MRZ-99030 - a novel modulator of Aβ aggregation: II - reversal of Abeta oligomer-induced deficits in long-term potentiation (LTP) and cognitive performance in rats and mice [J]. Neuropharmacology, 2015, 92: 170−182.

[43] Wang X, Hu X, Yang Y, et al. Systemic pyruvate administration markedly reduces neuronal death and cognitive impairment in a rat model of Alzheimer's disease [J]. Exp Neurol, 2015, 271: 145−154.

[44] Wang X, Hu X, Yang Y, et al. Nicotinamide mononucleotide protects against beta-amyloid oligomer-induced cognitive impairment and neuronal death [J]. Brain Res, 2016, 1643: 1 −9.

[45] Wong RS, Cechetto DF, Whitehead SN. Assessing the effects of acute amyloid beta oligomer exposure in the rat [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17: 1390.

[46] Zhang S, Wang P, Ren L, et al. Protective effect of melatonin on soluble Aβ_{1-42}-induced memory impairment, astrogliosis, and synaptic dysfunction *via* the Musashi1/Notch1/Hes1 signaling pathway in the rat hippocampus [J]. Alzheimers Res Ther, 2016, 8: 40.

[47] Kasza A, Penke B, Frank Z, et al. Studies for improving a rat model of Alzheimer's disease: icv administration of well-characterized beta-amyloid 1−42 oligomers induce dysfunction in spatial memory [J]. Molecules, 2017, 22: E2007.

[48] Cascella R, Conti S, Tatini F, et al. Extracellular chaperones prevent Aβ_{42}-induced toxicity in rat brains [J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1832: 1217−1226.

[49] Selkoe DJ. Cell biology of the amyloid beta-protein precursor and the mechanism of Alzheimer's disease [J]. Annu Rev Cell Biol, 1994, 10: 373−403.

[50] Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT Jr. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. Biochemistry, 1993, 32: 4693−4697.

[51] Scheuner D, Eckman C, Jensen M, et al. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased *in vivo* by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease [J]. Nat Med, 1996, 2: 864−870.

[52] Snyder SW, Ladror US, Wade WS, et al. Amyloid-beta aggregation: selective inhibition of aggregation in mixtures of amyloid with different chain lengths [J]. Biophys J, 1994, 67: 12161228.

[53] Sultana R, Perluigi M, Butterfield DA. Oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease (AD), mild cognitive impairment and animal models of AD: role of Aβ in pathogenesis [J]. Acta Neuropathol, 2009, 118: 131−150.

[54] Millucci L, Raggiaschi R, Franceschini D, et al. Rapid aggregation and assembly in aqueous solution of Aβ_{25-35} peptide [J]. J Biosci, 2009, 34: 293−303.

[55] Begum AN, Yang F, Teng E, et al. Use of copper and insulin-resistance to accelerate cognitive deficits and synaptic protein loss in a rat Abeta-infusion Alzheimer's disease model [J]. J Alzheimers Dis, 2008, 15: 625−640.

[56] Dyrks T, Dyrks E, Masters CL, et al. Amyloidogenicity of rodent and human beta A4 sequences [J]. FEBS Lett, 1993, 324: 231−236.

[57] Otvos L Jr, Szendrei GI, Lee VM, et al. Human and rodent Alzheimer beta-amyloid peptides acquire distinct conformations in membrane-mimicking solvents [J]. Eur J Biochem, 1993, 211: 249−257.

[58] Kowalik-Jankowska T, Ruta-Dolejsz M, Wisniewska K, et al. Possible involvement of copper II in Alzheimer disease [J]. Environ Health Perspect, 2002, 110 Suppl 5: 869−870.

[59] Boyd-Kimball D, Sultana R, Mohmmad-Abdul H, et al. Rodent Aβ_{1-42} exhibits oxidative stress properties similar to those of human Aβ_{1-42}: implications for proposed mechanisms of toxicity [J]. J Alzheimers Dis, 2004, 6: 515−525.

[60] Stine WB Jr, Dahlgren KN, Krafft GA, et al. *In vitro* characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis [J]. J Biol Chem, 2003, 278: 11612−11622.

[61] Rangachari V, Moore BD, Reed DK, et al. Amyloid-β_{1-42} rapidly forms protofibrils and oligomers by distinct pathways in low concentrations of sodium dodecylsulfate [J]. Bio-

chemistry, 2007, 46: 12451−12462.

[62] Maurice T, Lockhart BP, Privat A. Amnesia induced in mice by centrally administered beta-amyloid peptides involves cholinergic dysfunction [J]. Brain Res, 1996, 706: 181 −193.

[63] Fa M, Orozco IJ, Francis YI, et al. Preparation of oligomeric beta-amyloid 1−42 and induction of synaptic plasticity impairment on hippocampal slices [J]. J Vis Exp, 2010, (41): 1884.

[64] Lewczuk P, Beck G, Esselmann H, et al. Effect of sample collection tubes on cerebrospinal fluid concentrations of tau proteins and amyloid beta peptides [J]. Clin Chem, 2006, 52: 332−334.

[65] Hof PR, Giannakopoulos P, Vickers JC, et al. The morphologic and neurochemical basis of dementia: aging, hierarchical patterns of lesion distribution and vulnerable neuronal phenotype [J]. Rev Neurosci, 1995, 6: 97−124.

[66] Klein WL, Krafft GA, Finch CE. Targeting small Aβ oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? [J]. Trends Neurosci, 2001, 24: 219−224.

[67] Tabaton M, Piccini A. Role of water-soluble amyloid-beta in the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. Int J Exp Pathol, 2005, 86: 139−145.

[68] McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, et al. Soluble pool of Aβ amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease [J]. Ann Neurol, 1999, 46: 860 −866.

[69] Mandrekar S, Jiang Q, Lee CY, et al. Microglia mediate the clearance of soluble Aβ through fluid phase macropinocytosis [J]. J Neurosci, 2009, 29: 4252−4262.

[70] Guenette SY. Astrocytes: a cellular player in Aβ clearance and degradation [J]. Trends Mol Med, 2003, 9: 279 −280.

[71] Viola KL, Klein WL. Amyloid beta oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis [J]. Acta Neuropathol, 2015, 129: 183−206.

[72] Tu S, Okamoto S, Lipton SA, et al. Oligomeric Aβ-induced synaptic dysfunction in Alzheimer's disease [J]. Mol Neurodegener, 2014, 9: 48.

[73] Peng Y, Li PP, Li L, et al. Progress of clinical trials in Alzheimer's disease drugs [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2016, 51: 1185−1195.

[74] Mullard A. Alzheimer amyloid hypothesis lives on [J]. Nat Rev Drug Discov, 2016, 16: 3−5.

[75] The Lancet Neurology. Solanezumab: too late in mild Alzheimer's disease? [J]. Lancet Neurol, 2017, 16: 97.