



空军军医大学

Air Force Medical University

分类号 R964

UDC 615

密级 公开

博士学位论文

Progranulin 过表达导致脆性 X 综合征突触
可塑性异常的分子机制研究

张鷟

培养类别 全日制

学位类型 学术学位

一级学科(专业类) 药学

二级学科(专业) 药理学

研究方向 神经药理学

指导教师 招明高教授

培养单位 药学院药理学教研室

二〇一八年五月

独创性声明

秉承学校严谨的学风与优良的科学道德，本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，不包含本人或他人已申请学位或其他用途使用过的成果。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了致谢。

申请学位论文与资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

论文作者签名：_____ 日期：_____

保护知识产权声明

本人完全了解第四军医大学有关保护知识产权的规定，即：研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权单位为第四军医大学。本人保证毕业离校后，发表论文等使用本论文工作成果时第一署名单位仍然为空军军医大学。学校可以公布论文的全部或部分内容（含电子版，保密内容除外），可以采用影印，缩印或其他复制手段保存论文；学校有权允许论文被查阅和借阅，并在校园网上提供论文内容的浏览和下载服务。同意学校将论文加入《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》和编入《中国知识资源总库》等，并可浏览和下载，同时享受《中国优秀博硕士学位论文全文数据库出版章程》规定的相关权益。

论文作者签名：_____ 导师签名：_____ 日期：_____

目录

缩略语表	1
中文摘要	6
ABSTRACT	10
前言	15
文献回顾	16
一、脆性 X 综合征 (FXS)	16
1. 临床表现	18
2. FXS 与共情障碍	19
3. 动物模型	20
4. 细胞模型	22
5. 发病机制	23
6. <i>FMR1</i> 基因沉默的机制	24
7. FXS 的治疗	26
7.1. 对症治疗	26
7.2. 特异性药物治疗	26
7.3. 表观遗传治疗	28
7.4. 基因疗法	28
7.5. 治疗方法总结	29
二、颗粒体蛋白前体	29
1. PGRN 的结构	29
2. PGRN 在脑内的表达	30
3. PGRN 在神经元中的功能	31

3.1. PGRN 与神经树突的生长	31
3.2. 分选蛋白 (sortilin) 与 PGRN	31
3.3. TDP-43 与 PGRN	32
3.4. PGRN 在突触可塑性中的作用	32
3.5. PGRN 和应激反应	32
3.6. PGRN 与溶酶体	33
3.7. PGRN 调节的信号通路	33
4. PGRN 和小胶质细胞	34
5. PGRN 的受体	34
三、 TNF α 与学习记忆	36
正文	38
第一部分 颗粒体蛋白和 TNF α 平衡调节突触可塑性	38
1. 材料	38
1.1. 实验动物	38
1.2. 试剂和抗体	38
1.3. 溶液配制方法	39
1.4. 主要仪器	40
2. 方法	41
2.1 总 RNA 的提取	41
2.2 转录组测序	41
2.3 小鼠睡眠剥夺	42
2.4 新物体识别和新位置识别实验	42
2.5 Morris 水迷宫	43
2.6 旷场实验	43
2.7 高架十字迷宫实验	43
2.8 EdU 染色	43
2.9 高尔基染色	44

2.10	Western Blot	44
2.11	ELISA	45
2.12	脑室给药	46
3.	结果	46
3.1.	FMR1 KO 小鼠脑内 PGRN 水平明显增加	46
3.2.	PGRN 通过阻断 TNF α 通路缓解 S-DEP 引起的学习记忆障碍和焦虑样行为	52
4.	讨论	59
小结		61
第二部分 过量颗粒体蛋白通过 TNFR2 导致脆性 X 综合征突触可塑性异常		62
1.	材料	62
1.1.	实验动物	62
1.2.	试剂和抗体	62
1.3.	溶液配制方法	62
1.4.	主要仪器	63
2.	方法	64
2.1	脑片免疫荧光染色	64
2.2	细胞免疫荧光染色	64
2.3	原代皮层神经元培养	65
2.4	原代小胶质细胞培养	65
2.5	蛋白免疫共沉淀	66
2.6	染色质免疫共沉淀 (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP)	66
2.7	脑片电生理实验	67
2.8	脑立体定位病毒注射实验	68
2.9	恐惧制约实验	68
2.10	转棒实验	68
2.11	强迫游泳实验	68
2.12	siRNA 转染	69

3. 结果	69
3.1. 适量 PGRN 促进神经元树突棘的发生, 高浓度的 PGRN 抑制神经元树突棘的成熟	69
3.2. PGRN 对突触传递的影响	71
3.3. 减少 KO 小鼠脑内 PGRN 可以纠正 LTP 的缺失和异常蛋白表达	73
3.4. 减少 KO 小鼠脑内 PGRN 可以纠正突触形态的异常	76
3.5. 减少 KO 小鼠脑内 PGRN 可以纠正活动过度和学习记忆的障碍	77
3.6. PGRN 在脑内主要与 TNFR2 结合	78
3.7. TNFR2 参与 LTP 的诱导	79
3.8. TNFR2 参与甘氨酸诱导的突触可塑性增强	80
3.9. <i>FMRI</i> KO 小鼠脑内 NF κ B 亚基-RELB 过度激活	80
3.10. <i>FMRI</i> KO 小鼠脑内过量的 PGRN 引起 TNFR2/NF κ B 信号通路过度激活	81
3.11. 抑制 NF κ B 信号通路可以纠正 <i>FMRI</i> KO 小鼠学习记忆障碍	83
3.12. PGRN 通过 TNFR2 受体参与 <i>FMRI</i> KO 小鼠学习记忆障碍	84
4. 讨论	85
小结	88
参考文献	89
个人简历和研究成果	106
致谢	109

缩略语表

缩略词	英文全称	中文全称
AAV	Adeno-associated virus	腺相关病毒
AD	Alzheimer disease	阿尔茨海默症
ADHD	Attention deficit hyperactivity disorders	注意力缺陷多动障碍
AKT	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase	RAC-alpha 丝氨酸/ 苏氨酸-蛋白激酶
ASFMR	Antisense <i>FMRI</i> transcripts	<i>FMRI</i> 基因转录本反义序列
CB1	Cannabinoid receptor 1	大麻素受体 1
ChIP	Chromatin Immunoprecipitation	染色质免疫共沉淀
CREB	AMP-response element binding protein	环磷腺苷效应元件结合蛋白
CTCF	CCCTC binding factor	CCCTC 结合因子
DHPG	(R,S)-3,5-Dihydroxyphenylglycine	(R,S)-3,5-二羟基苯基甘氨酸
Dlk	Delta-likehomologue	Delta 样同源蛋白
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	改良 Eagle 培养基
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay	酶联免疫吸附测定
EphA2	Ephrin Type-A Receptor 2	Ephrin A 型受体 2
EPSP	Excitatory postsynaptic potential	兴奋性突触后电位
ERK	Extracellular regulated protein kinases	胞外信号调节蛋白激酶

		酶
ESC	Embryonic stem cell	胚胎干细胞
FAK	Focal adhesion kinase	粘附斑激酶
fMRI	Functional magnetic resonance imaging	功能性核磁共振成像
FTD	Frontotemporal dementia	额颞叶痴呆
FTLD	Frontotemporal lobar degeneration	额颞叶变性
<i>FMRI</i>	Fragile X mental retardation gene 1	脆性 X 智力低下基因 1
FMRP	Fragile X mental retardation protein	脆性 X 智力低下蛋白
FADD	Fas-associated death domain	Fas 相关死亡域
FXS	Fragile X syndrome	脆性 X 综合征
GluA1	Ionotropic Glutamate receptor AMPA-selective subunit 1	离子型谷氨酸受体 AMPA 选择性亚基 1
GPCR	G protein coupled receptors	G 蛋白偶联受体
GIRK	G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channels	G 蛋白偶联内向整流 型钾离子通道
GSK3 β	Glycogen synthase kinase-3 β	糖原合酶激酶-3 β
HDAC	Histone deacetylase	组蛋白去乙酰化酶
hESC	Human embryonic stem cells	人类胚胎干细胞
HFS	High frequency stimulation	高频刺激
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A	3-羟基-3-甲基戊二酰 辅酶 A
ICM	Inner cell mass	内细胞团
iPSC	Induced pluripotent stem cell	诱导的多能干细胞

IKB α	NF κ B inhibitor α	NF κ B 抑制因子 α
IQ	Intelligence Quotient	智力商数
ITI	Intertrial interval	试验间期
JNK	c-Jun N-terminal kinase	c-Jun 氨基末端激酶
KO	Knock-out	敲除
LFS	Low frequency stimulation	低频刺激
L-LTP	Late phase of LTP	晚时相 LTP
LncRNA	Long non-coding RNA	长链非编码 RNA
MCP	Middle cerebellar peduncle	小脑中脚
MMP-9	Matrix metalloprotein-9	金属蛋白激酶-9
mPFC	Midial Prefrontal cortex	前额叶皮层
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine	1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶
NIH	National Institutes of Health	美国国立卫生研究院
NF κ B	Nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells	激活 B 细胞核因子 κ 轻链增强子
PAK	p21-activated kinase	p21 激活激酶
PARP	Poly ADP-ribose polymerase	聚 ADP 核糖聚合酶 1
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
PD	Parkinson's disease	帕金森病
PGRN	Progranulin	颗粒体蛋白前体
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase	磷酸肌醇激酶-3
PPI	Pre-pulse inhibition	前脉冲抑制

PSC	Pluripotent stem cells	多能干细胞
PSD	Post synaptic density	突触后致密物
PTX	Picrotoxin	印防己毒素
PTK2B	Protein tyrosine kinase 2B	蛋白酪氨酸激酶 2B
RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	Ras 相关的 C3 肉毒素底物 1
RELA	V-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A	v-rel 鸟类网状内皮病毒肿瘤基因同系物 A
RELB	V-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B	v-rel 鸟类网状内皮病毒肿瘤基因同系物 B
RISC	RNA-induced silencing complex	RNA 诱导沉默复合物
RVG	Rabies virus glycoprotein	狂犬病毒糖蛋白
SAPs	Sphingolipid activator proteins	鞘磷脂激活蛋白
S-DEP	Sleep deprivation	睡眠剥夺
shRNA	Short hairpin RNA	短发卡 RNA
siRNA	Small interfering RNA	小干扰 RNA
SGZ	Subgranular zone of the dentate gyrus	海马齿状回颗粒下区
SLPI	Secretory leucocyte protease inhibitor	分泌型白细胞蛋白酶抑制剂
STEP	Striatal-enriched protein-tyrosine phosphatase	纹状体富集蛋白-酪氨酸磷酸酶
SVZ	Subventricular zone of the lateral ventricles	侧脑室的室管膜下区
TACE	TNF α converting enzyme	TNF α 转化酶

TBS	Theta-burst stimulation	Theta 波刺激
TDP-43	Transactive response DNA binding protein 43 kDa	反式激活反应 DNA 结合蛋白 43kDa
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	N,N,N',N'-四甲基乙二胺
TNF α	Tumor necrosis factor α	肿瘤坏死因子 α
TNFR1	TNF α receptor 1	肿瘤坏死因子受体 1
TNFR2	TNF α receptor 2	肿瘤坏死因子受体 2
TRADD	TNFR1-associated death domain	TNFR1 相关死亡域
TTX	Tetrodotoxin	河豚毒素
UTR	Untranslated region	非翻译区
WT	Wild-type	野生型

Progranulin 过表达导致脆性 X 综合征 (FXS) 突触可塑性异常的分子机制研究

博士研究生：张鹏

导 师：招明高教授

辅 导 教 师：刘水冰副教授

第四军医大学药学院药理教研室，西安 710032

资助基金项目：国家杰出青年基金（31325022）

中文摘要

【目的】

脆性 X 综合征 (Fragile X syndrome, FXS) 是 X 染色体连锁遗传性疾病，会导致一系列发育问题，包括学习和认知障碍，是临床上发病率仅次于唐氏综合征的遗传性智力障碍疾病。FXS 发生率男性约 1/4,000，女性 1/8,000，并且男性通常情况下比女性患者严重。经过 DNA 分析诊断大约有 2.8% 的智力障碍患者为 FXS^[1]。FXS 患者往往生活无法自理，给家庭和社会带来沉重负担。早期的优生优育诊断是降低患儿出生率的有效途径。同时，探索其发病机制对已经出生患者的治疗具有重要意义。大约三分之一的 FXS 患者具有孤独症的症状，是良好的孤独症模型，所以研究该疾病有利于了解自闭症的发病机制。FXS 是由于脆性 X 智力低下基因 1 (Fragile X mental retardation 1 gene, *FMR1*) 的突变或其他原因导致的启动子区过度甲基化引起其编码蛋白 FMRP 缺失所导致。FMRP 是一种 mRNA 结合蛋白，参与 mRNA 的转运、翻译，通过抑制突触调控蛋白的表达，在数分钟内就可以调节神经元突触可塑性^[2]。

神经营养因子可以调控神经元发育和突触传递，是治疗神经损伤等疾病的潜在药物靶点。颗粒体蛋白前体 (progranulin, PGRN)，是由 *GRN* 基因编码的一种分泌型糖蛋白，同时也是一种重要的神经营养因子。PGRN 最早在小鼠畸胎瘤细胞系 PC

的培养液中发现。PGRN 参与伤口修复、炎症反应及生长发育等多项重要的生理活动^[3]。近来研究发现, PGRN 基因突变与额颞叶变性 (frontotemporal lobar degeneration, FTL D) 的发生密切相关。已有研究发现孤独症患者血浆中颗粒体蛋白前体显著增加。但是关于 PGRN 是否参与脆性 X 综合征发病仍未见文献报道。

本研究拟分别从 PGRN 对神经元发育和突触传递的影响入手, 探讨 PGRN 水平与 FXS 突触结构可塑性异常的关系。

【方法】

1. 利用转录组高通量测序确定 WT 和 KO 小鼠脑内差异表达的基因;
2. Western blot 检测成年 WT 和 KO 小鼠内侧前额叶皮层 (medial prefrontal cortex, mPFC) 和海马 PGRN 的表达差异;
3. Western blot 检测出生 3, 7, 14, 28, 56 天时 WT 和 KO 小鼠 mPFC 区 PGRN 水平;
4. 利用酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 法检测 WT 和 KO 小鼠脑内 PGRN 水平;
5. 建立睡眠剥夺 (Sleep deprivation, S-DEP) 模型研究 PGRN 和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF α) 在中枢神经系统中的作用;
6. 利用水迷宫和新物体 (位置) 识别实验观察脑室注射 PGRN 后 S-DEP 小鼠空间记忆能力的变化;
7. 利用高尔基染色观察脑室注射 PGRN 后 S-DEP 小鼠海马 CA1 区神经元树突棘的数目变化;
8. 利用 EdU 染色观察脑室注射 PGRN 后 S-DEP 小鼠海马齿状回颗粒下区 (subgranular zone of the dentate gyrus, SGZ) 新生神经元的数目变化;
9. 采用免疫荧光技术, 检测不同浓度外源性 PGRN 对体外培养的 WT 和 KO 皮层神经元树突棘数目和形态的影响;
10. 应用膜片钳和 MED64 电生理技术, 观察外源性 PGRN 对 WT 和 KO 小鼠 mPFC 脑片 mEPSC 和 LTP 的影响;
11. 通过慢病毒表达 PGRN 小发卡 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 降低 WT 和 KO 小鼠脑内 PGRN 水平, 观察其对 LTP 的影响;
12. 降低 WT 和 KO 小鼠脑内 PGRN 水平后, 利用高尔基染色技术观察 mPFC 脑区

树突棘密度和形态变化；

13. 降低WT和KO小鼠脑内PGRN水平后，利用行为学技术观察小鼠自发活动和恐惧记忆变化；

14. 采用免疫共沉淀技术，检测WT和KO小鼠脑内PGRN和肿瘤坏死因子受体1和2（Tumor Necrosis Factor Receptor 1 and 2, TNFR1 and TNFR2）的结合情况；

15. 应用Med64电生理技术检测PGRN、TNFR1、TNFR2对突触可塑性的影响。

16. 应用甘氨酸诱导化学性LTP，观察PGRN、TNFR1、TNFR2对突触可塑性的影响；

17. 采用Western Blot和免疫荧光技术，检测PGRN对于TNFR1和TNFR2下游信号通路的影响；

18. 通过腹腔注射调节TNFR1和TNFR2下游信号通路的小分子化合物，观察对WT和KO小鼠自发活动和恐惧记忆行为的影响；

【结果】

1. 转录组高通量测序结果显示：KO小鼠mPFC区PGRN的mRNA显著高于WT小鼠，Western blot和ELISA在蛋白水平得到相同的结果。此外，脑内PGRN含量在出生后8周内发生明显的波动，两周时水平最高。

2. 在S-DEP小鼠模型中，海马区PGRN水平降低，TNF α 水平升高；

3. 脑室注射PGRN保护S-DEP小鼠的空间记忆能力；

4. 脑室注射PGRN增加S-DEP小鼠海马CA1区神经元的树突棘密度；

5. 脑室注射PGRN增加S-DEP小鼠海马SVZ区新生神经元的数目；

6. 低剂量外源性 PGRN (低于 50ng/ml) 可以增加 WT 神经元树突棘的密度和成熟度，促进树突棘发育；高剂量 PGRN (大于 100ng/ml) 可引起神经元树突棘密度增加但是成熟树突棘比例降低，出现类似于 KO 小鼠神经元树突棘发育缺陷的现象，这提示过量的 PGRN 可能阻碍神经元的成熟。

7. 小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 降低 KO 小鼠神经元 PGRN 含量后可以降低神经元树突棘密度并增加成熟度，提示降低 PGRN 水平可以纠正 KO 小鼠神经元树突棘发育的异常。

8. 高浓度 PGRN 可以促进谷氨酸受体 A1 (glutamate receptor A1, GluA1) 和环

磷腺苷效应元件结合蛋白（cAMP-response element binding protein, CREB）的磷酸化并增强突触传递，但是会阻碍进一步 LTP 的诱导，提示过量 PGRN 可能对 LTP 存在饱和性抑制。

9. 降低KO小鼠脑内PGRN后，可以挽救mPFC的LTP、树突棘发育障碍、过度活动和恐惧记忆的损害。

10. 在脑内PGRN主要与TNFR2结合，并特异性激活TNFR2下游活化B细胞的核因子 κ -轻链增强子（nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF κ B）亚基p52和RELB，从而促进下游基因的转录。

11. 为了抑制 KO 小鼠中 TNFR2 的功能，我们分别使用了 TNF α 合成抑制剂（Thalidomine）、释放抑制剂（TAPI-0）和 NF κ B 核转移抑制剂（JSH-23），发现 JSH-23 腹腔注射一周后可以显著改善 KO 小鼠的活动过度和恐惧记忆障碍。

【结论】

1. PGRN 通过增加神经元树突棘密度、促进神经元发生改善 S-DEP 小鼠的空间学习和记忆；

2. 证实 PGRN 在 FXS 中的重要作用，过量 PGRN 促进 GluA1 和 CREB 磷酸化，引起 LTP 的饱和性抑制；

3. 过量 PGRN 通过激活 TNFR2 促进 NF κ B 入核，激活下游基因转录，增加蛋白合成，引起神经元树突生长发育障碍；

4. 小分子化合物 JSH-23 通过抑制 NF κ B 的核转录可以显著改善 KO 小鼠的学习记忆障碍。

关键词：脆性 X 综合症；突触可塑性；颗粒体蛋白前体；突触发育；学习与记忆；肿瘤坏死因子受体 1；肿瘤坏死因子受体 2；长时程增强

The mechanisms of elevated progranulin impaired synaptic plasticity in fragile X syndrome

Candidate for master: Kun Zhang

Supervisor: Minggao Zhao

Tutor: Shuibing Liu

Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Fourth Military Medical University,
Xi'an 710032, China

Sponsored Programs: China National Funds for Distinguished Young
Scientists(31325022)

Abstract

AIM

Fragile X syndrome (FXS) is an X chromosome related inheritable disease, causing a series of developmental problems, including learning and cognitive impairment. It is the most common hereditary mental retardation disease which only comes after Down's syndrome. The incidence of FXS is about 1 in 4,000 male and 1 in 8,000 female, and male patients are more serious than women patients. About 2.8% of Chinese mental retardation patients screened by DNA analysis were FXS^[1]. The patients usually can't take care of themselves, which bring heavy burden to their family and society. Early eugenic diagnosis is an effective way to reduce the birth rate of FXS baby. Meanwhile, it is urgently necessary to explore the mechanism of FXS for treating FXS children. At the same time, FXS are good model for autism research, as one third of FXS patients have symptoms of autism. Therefore, the study on FXS is helpful for understanding the pathogenesis of

autism. FXS is caused by mutation or excessive methylation of *FMR1* gene, which caused loss of its encoded protein FMRP. FMRP is a kind of mRNA binding protein, which is involved in mRNA transportation and translation. FMRP mainly inhibits protein expression, regulating the development of neurons and synaptic plasticity within minutes^[2].

Neurotrophic factors play roles in neuron growth, synaptic transmission and neuron survival. These proteins are potential drug targets for treating central nervous system diseases. Progranulin (PGRN) is known for firstly discovered in a mouse teratoma cell line PC, encoded by gene *GRN*. PGRN is a kind of glycoprotein and an important neurotrophic factor. PGRN participates in many important physiological activities such as wound repair, inflammatory response, and neuron growth and development. Recent studies show that mutation of *GRN* is closely related to occurrence of frontotemporal lobar degeneration (FTLD)^[3]. Previous studies have found PGRN level in patients with autism are significantly higher than those in the control group. However, it has not been reported whether PGRN is involved in FXS.

In this study we started from the study of PGRN function on neuron development and synaptic transmission, trying to elucidate the connection between PGRN and impaired synaptic plasticity in FXS mice.

METHODS

1. Different genes expression level in WT and KO mice brain were determined by high throughput transcriptome sequencing, and then the differently expressed gene was verified by RT-PCR.
2. PGRN in medial prefrontal cortex (mPFC) and hippocampus from WT and KO mice were detected by western blot.
3. PGRN in mPFC from WT and KO mice were detected by western blot at 7, 14, 28 and 56 days after birth.
4. PGRN levels in WT and KO mice brain homogenate were detected by ELISA.
5. Sleep deprivation (S-DEP) mice were used to study PGRN and TNF α function in

central nervous system.

6. Morris water maze and novel object (location) were used to study changes of learning and memory in S-DEP mice after intraventricular injection of PGRN.
7. Golgi staining was used to study changes of dendritic spine density in S-DEP mice after intraventricular injection of PGRN.
8. EdU staining was used to study number of neurogenesis in SGZ of S-DEP mice after intraventricular injection of PGRN.
9. Immunofluorescence staining was used to detect effects of exogenous PGRN on spine density and morphology in vitro cultured WT and KO cortical neurons.
10. Patch clamp and Med64 electrophysiological technology were used to observe the effects of exogenous PGRN on synaptic transmission and plasticity in WT and KO mPFC slices.
11. Lentivirus expressing PGRN shRNA was injected in mPFC to study effect of PGRN on LTP in *FMR1* KO mice.
12. Golgi staining was used to evaluate dendritic spine density and morphology in WT and KO mice after down regulating mPFC PGRN level.
13. Behavioral techniques were used to observe spontaneous activity and fear memory in WT and KO mice after down regulating mPFC PGRN level.
14. Binding of PGRN to TNFR1 and TNFR2 was detected by immunoprecipitation in brain.
15. Effects of PGRN on synaptic plasticity through TNFR1 or TNFR2 were detected by Med64 electrophysiological technology.
16. Effects of PGRN, TNFR1 and TNFR2 on synaptic plasticity were evaluated by glycine induced chemical LTP.
17. Western Blot and immunofluorescence staining were used to detect effect of PGRN on downstream signaling pathway of TNFR1 and TNFR2.

18. Spontaneous activity and fear memory were observed after intraperitoneal injection of small molecular compounds regulating TNFR1 and TNFR2 downstream signaling pathways.

RESULTS

1. Digital gene expression profiling showed that PGRN mRNA in mPFC from KO mice was significantly higher than that in WT mice. PGRN protein levels were verified by Western Blot and ELISA. It was also found that PGRN levels in the brain fluctuated significantly in 8 weeks after birth, with the highest level at 2 weeks. This result suggests that PGRN may be related to synapse elimination in early neuronal development.
2. Decreased PGRN level while increased tumor necrosis factor α (TNF α) level in hippocampus S-DEP mice.
3. Intraventricular injection of PGRN protected spatial memory in S-DEP mice.
4. Intraventricular injection of PGRN increased dendritic spine density in S-DEP mice.
5. Intraventricular injection of PGRN promoted neurogenesis in S-DEP mice.
6. Low-dose exogenous PGRN (below 50 ng/ml) increased the density and maturation of dendritic spine in WT neurons. However, high doses of PGRN (exceed 100 ng/ml) increased dendritic spines density but decreased proportion of mature spine in WT cultured neurons, which was similar to the KO neurons, suggesting that excessive PGRN may impair neuron maturation.
7. Dendritic spines density was decreased and the maturity was increased through reducing PGRN in KO neuron by siRNA, suggesting that lowering PGRN can rescue the abnormal development of dendritic spine in KO neurons.
8. Higher concentration of PGRN promoted the phosphorylation of GluA1 and CREB, producing a saturated inhibition on LTP, enhancing synaptic transmission, which will hinder the further induction of LTP, suggesting a saturated inhibition of LTP.
9. Reducing the PGRN in brain of KO mice restored mPFC LTP, dysplasia of dendritic spine, hyperactivity and the damage of fear memory.

10. In brain, PGRN mainly binded with TNFR2 but not TNFR1, and specifically activated TNFR2 downstream pathway NF κ B subunit p52 and RELB, promoting the transcription of down-stream genes.
11. TNF α synthesis inhibitor (Thalidomine), TNF α release inhibitor (TAPI-0), and NF κ B translocation inhibitor (JSH-23) were used to downregulate TNFR2 function in KO mice. Intraperitoneal injection of JSH-23 for one week significantly ameliorated the hyperactivity of KO mice and fear memory disorders.

CONCLUSION

1. PGRN ameliorated spatial memory through increasing dendritic spine density and promoting neurogenesis in S-DEP mice.
2. We confirm the important role of PGRN in FXS. Higher concentration of PGRN promoted the phosphorylation of GluA1 and CREB, producing a saturated inhibition on LTP in FXS mice.
3. Excessive PGRN promotes the transcription of downstream genes by activating TNFR2, and increases protein synthesis, causing dendritic spine development retardation in FXS mice.
4. Small chemical compound JSH-23 can significantly ameliorate the learning and memory disorders of KO mice by inhibiting the nuclear transcription of NF κ B.

Key words: Fragile X syndrome; synaptic plasticity; progranulin; synapse development; learning and memory, TNF α , TNFR1, TNFR2, LTP

前言

孤独症谱系障碍 (Autism Spectrum Disorder, ASD), 又称自闭症。但它并不是一种心理疾病, 而是由于大脑发育障碍导致的疾病。自闭症最重要的两个致病因素是遗传和环境^[4, 5]。已发现的自闭症相关基因已达到 881 个 (<https://gene.sfari.org/database/human-gene/>)。FXS 是遗传性智力障碍和自闭症最常见的发病原因, 两者之间有许多重叠的表型^[6]。尽管 FXS 在所有 ASD 病例中只占 2% 到 6%, 但是大约 60% 的 FXS 患者也符合 ASD 的标准^[7, 8]。FXS 会导致各种认知、行为和生理问题, 这些问题往往只能通过支持疗法进行治疗, 包括行为疗法和药物的对症治疗^[9]。最近关于 FXS 的基础神经生物学研究取得了重大进展, 发现了在 FXS 模型小鼠中可以恢复部分表型的药物, 并开展了药物治疗的临床试验。但是目前临床试验结果显示多种 FXS 的治疗药物并不理想, 因此对 FXS 患者发生的突触可塑性障碍的机制需要进一步深入研究。本文发现了 FXS 中一个过表达的神经营养因子——PGRN 既影响未成熟神经元的发育又影响成熟神经元的突触传递。我们的研究结果提示 PGRN 是一个从多方面调节突触可塑性的分子, 可以作为 FXS 治疗的潜在药物靶点。

文献回顾

一、脆性 X 综合征 (FXS)

FXS 因为其患者细胞的 X 染色体上存在容易发生断裂的脆性位点而得名，这是区别于其他 X 染色体连锁智力障碍疾病的标志。FXS 是智力障碍和 ASD 相关的最常见的单基因遗传性疾病，尽管不同人群的患病率有所不同，但 FXS 影响了世界的所有种族。FXS 是一种脆性 X 相关疾病 (Fragile X-associated disorders, FXDs)，它是由 *FMR1* 启动子区域的三核苷酸重复序列 CGG 的过度重复引起的。这些 CGG 序列被转录到 *FMR1* mRNA 中，但是由于他们位于 *FMR1* mRNA 的 5' 非翻译区域，所以 CGG 重复单元的数量不会影响其编码的脆性 X 智力低下蛋白 (Fragile X mental retardation protein, FMRP) 的序列^[10]。正常人 *FMR1* 启动子区域 CGG 重复为 5-44 个，CGG 重复为 55-200 个被称为“前突变” (pre-mutation)，当 CGG 重复序列大于 200 个被称为“全突变” (full-mutation) (Figure 1)。

在美国人群中，女性前突变的患病率大约是 1:151 至 1:209，男性为 1:430 到 1:468^[11, 12]。这种突变与两种成年发病的疾病有关：脆性 X 相关震颤/共济失调 (fragile X-associated tremor/ataxia syndrome, FXTAS) 和脆性 X 相关的原发性卵巢功能不全 (fragile X-associated primary ovarian insufficiency, FXPOI)。在前突变范围内，FMRP 水平随 CGG 重复数增加而下降^[13, 14]，这表明轻度到中度 FMRP 不足是导致 FXTAS 携带者成年前认知障碍的原因之一^[15-17]。然而，目前尚无证据表明 FMRP 水平的降低是 FXTAS 发病原因，因为几乎所有 FXS 患者 (几乎没有 FMRP) 都没有发展成为 FXTAS。现在认为前突变引起的疾病与 *FMR1* mRNA 水平升高后高 CGG 重复的序列产生的毒性有关。在前突变患者体内也发现了含 CGG 重复序列的 *FMR1* 转录本反义序列 (Antisense *FMR1* transcripts, ASFMR)^[18]，同时 CGG 重复序列在经过核糖体翻译时产生的聚甘氨酸序列^[19]，这些说明前突变患者的发病原因是多样的。实际上，严重前突变患者 (> 150 重复) 由于 CGG 重复介导的翻译停滞导致 FMRP 表达水平降低，会出现和 FXS 患者相同的症状，但是程度轻微一些。

FMR1 全突变时 (> 200 重复) 导致 *FMR1* 启动子区的甲基化和转录沉默，从而使

FMRP减少。*FMR1*前突变携带者的CGG重复序列会随着后代的繁衍一代代增加。45-54个CGG重复被称为“灰色区域”，是轻度不稳定的状态，至少要经过两代才能变为全突变^[20]。

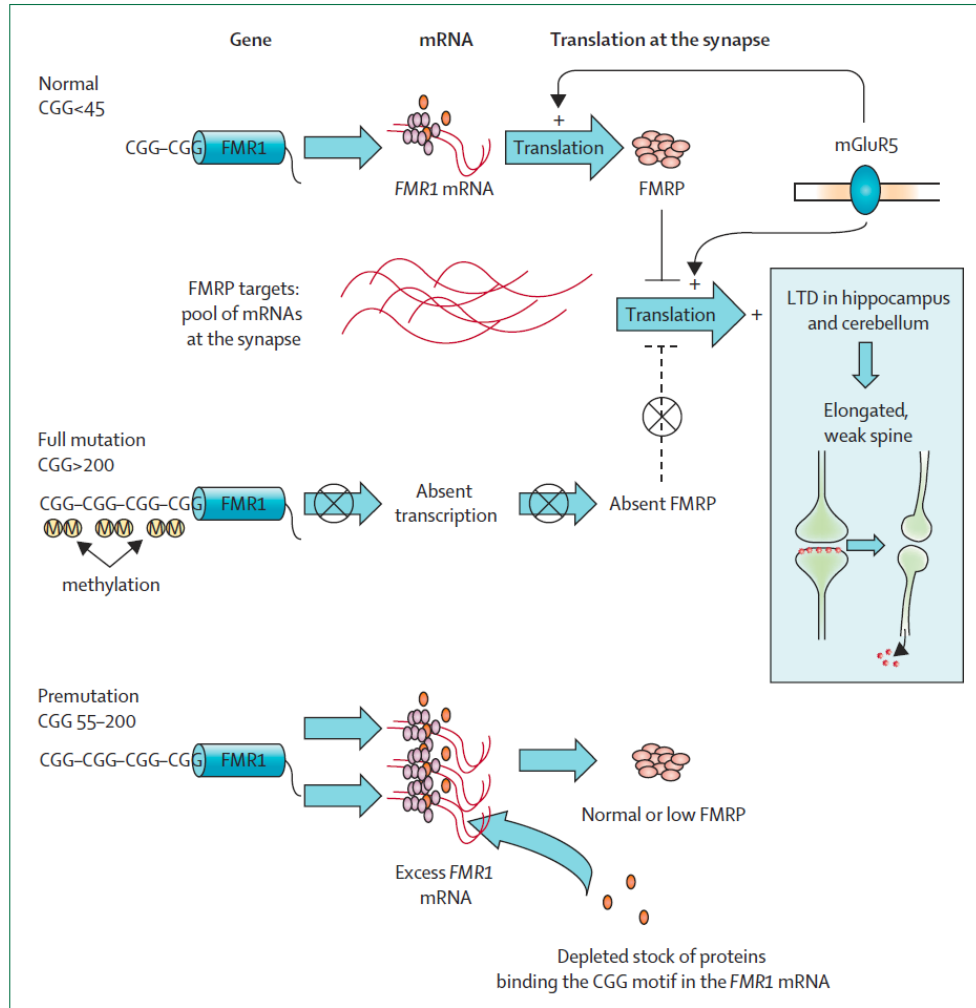


Figure 1. Model of pathogenesis of FXS (full mutation) and FXTAS (premutation).

Top: In individuals with a normal allele, mGluR5 stimulates translation of a pool of *FMR1* mRNA, FMRP synthesis is stimulated and serves as a negative feedback by repressing mRNA translation and therefore repressing the mGluR5-dependent long-term depression (LTD). In the presence of a full mutation, the absence of FMRP results in the loss of translational repression. Translational dependent activities are increased (such as mGluR5-dependent LTD). Bottom: premutation alleles result in RNA gain-of-function. Overexpression of abnormal *FMR1* mRNA (increased CGG repeats) in the premutation range may lead to excess binding of CGG mRNA-binding proteins. This excess binding is postulated to deplete those proteins from the cellular pool, resulting in the loss of their functions in other regulatory processes. (**Lancet Neurol. 2007 Jan; 6(1):45-55.**)

1. 临床表现

FXTA 患者通常在成年时发病，伴有震颤和/或共济失调，可能有执行功能障碍、神经病变、帕金森病、前庭功能障碍和精神症状如焦虑等，在某些情况下会有自主功能障碍和痴呆^[21]。在临床上，病人通常伴有许多神经症状，这使对他们很难进行分类诊断，并且疾病进展多变，通常迁延多年。患者会有脑萎缩、脑深层白质信号增强、核磁共振结果显示小脑中脚信号增强（middle cerebellar peduncle hyperintensity, MCP sign）等症状，而标志性的病理特征是在神经元内发现核内包涵体，确诊通常是通过 DNA PCR 检测 CGG 重复数来进行。前突变携带者中 20% 的女性患者被诊断为 FXPOI^[2]。60 岁之前前突变患者往往智力正常、生育能力正常、生活正常，然而 60 岁之后 40% 的男性和 16% 的女性发展为 FXTAS^[22, 23]。男性发病率为 1:813，女性发病率为 1:259^[12, 24]。

FXS 在幼儿时发病。患有 FXS 的儿童通常表现出语言发育迟缓，虽然经常也会出现轻微的运动迟缓，但是受影响的男性通常是因为语言迟缓而去医院就诊。肌张力减退通常在发育的早期就存在，会随着生长发育而改善，进入学龄期就会发展为协调障碍。女性和症状较轻的男性 FXS 患者早期语言习得可能正常，但表现出焦虑、注意力缺陷多动障碍 (Attention Deficit Hyperactivity Disorder, ADHD) 或在学校学习困难等其它问题^[7]。约 85% 的男性患者和约 30% 的女患者会显示出从轻微到严重的智力障碍 (IQ < 70)。童年时期他们的智商往往随着年龄的增长而下降，这并不是由于智力退化导致的，而是智力发展速度较其他正常儿童迟缓的结果。成年男性患者的平均智商为 40 到 50，心理年龄约为 5 至 6 岁^[25]。成年女性患者由于另一条 X 染色体上等位基因的代偿作用，临床表现更加多变，平均 IQ 在 80 左右。

患儿可能有焦虑、注意力缺失、多动、冲动、自残、攻击行为、感觉过敏、感觉迟钝、自言自语、不由自主拍手等。约 50% 的男性患者和约 20% 的女性患者满足孤独症的诊断标准^[26]。约 13%-18% 的男性和 4% 的女性患者会发生癫痫。约 70%-80% 的患者会出现脑电图谱的异常。随着年龄增长，多数男性和约一半的女性患者会出现明显的身体特征。这些特征包括：脸部狭长、大耳朵、下巴和前额突出、手指关节活动幅度过大、扁平足、耳朵外凸、高腭弓、嘴大唇厚、皮肤过软等^[27]。

2. FXS 与共情障碍

共情(empathy)一词最早属于认知科学和心理学的范畴,直到近年来才受到神经科学界的重视和应用。简单的定义是指“分享别人感受的能力”^[28],Decety把共情定义为“因能够理解别人的情绪状态、分享别人的感受和想象别人的期望而产生的情绪反应”^[29-31]。

目前研究最广泛的共情是疼痛共情。疼痛共情可以反映社会族群的偏好性,如中国被试者在分别看到中国人和高加索人接受针扎刺激图片时,被试者对本族人产生的疼痛共情评分显著高于外族人,且ACC、辅助运动区、前岛叶等情绪脑区激活的强度也更高,提示人类疼痛共情具有文化和民族特异性^[32, 33]。此外共情水平异常和损伤与精神性疾病发生密切相关,如自闭症、自恋症、焦虑症、抑郁症、人格障碍、精神分裂症等^[34]。人类fMRI结果已明确,疼痛共情的脑中枢主要在前额叶,如前扣带回(anterior cingulate cortex, ACC)、前腹侧岛叶(anterior ventral insula)。

正常小鼠与足底皮下注射蜜蜂毒液的小鼠相处30分钟后机械痛阈降低,热痛阈不变,这一现象需要mPFC的参与^[35],提示小鼠存在痛共情的现象。一只小鼠观测同笼饲养的另一只小鼠腹腔注射醋酸,结果观察组动物出现双足热痛敏;分别通过化学损毁小鼠双侧嗅球导致嗅觉障碍、破坏听骨链导致听觉障碍、用不透明屏障阻断视觉后,只有阻断视觉时小鼠疼痛共情反应消失,提示视觉在共情产生中至关重要^[36]。大鼠看到另一只同伴被困在束缚器中,会试图找到打开束缚器门的方法而解救同伴^[37]。雌性大鼠更易产生共情,对受困同伴施救速度更快;面对同种属雌雄两性,对受困雌性同伴的救援速度更快;同种属大鼠同笼或不同笼(熟悉程度不同)都会施加救援行为;不同种属大鼠必须在同笼饲养2周后才会施加救援行为^[38]。同时在一个非常有创新意义的双T迷宫实验中,一只大鼠可以自由进入T迷宫的两臂(actor),且两臂内均有食物;而对面迷宫的大鼠只能根据对方的选择进入一个臂(partner),但只有一个臂中有食物,即这只大鼠是否能获得食物会受到actor大鼠选择的影响。实验结果显示actor大鼠更倾向于做出让双方都获得食物的选择,提示大鼠存在利他行为^[39, 40]。这些实验结果说明大鼠和小鼠均存在共情行为,但研究共情行为的动物模型还很少,共情的神经生物学基础也有待于进一步研究。

推测他人的情绪和观点作为认知的重要组成部分,ASD患者此功能往往发生障

碍,这被认为与 ASD 患者的社会交往障碍密切相关^[41]。推断别人的情感和观点可以在即使没有诸如面部表情或韵律这样的直接情感线索来实现。由于在没有情感线索的情况下推断他人的情绪在良好社会关系中发挥着重要的作用^[42],一旦此功能受损,将严重影响个人的社交行为,这也是 ASD 患者社交障碍的潜在原因^[43]。催产素可以改善 ASD 患者或动物模型的社交障碍^[44-46],同时催产素也可以显著增加共情行为^[47-49],这提示催产素改善 ASD 的社交障碍可能与提高共情水平有关。

一般认为发生孤独症时共情行为受损,但也有观点指出孤独症患者对周围人的愤怒、焦虑等情绪更加敏感。所以孤独症时共情水平的高低还有待于进一步研究。同时 FXS 小鼠作为一个良好的孤独症模型,其共情的评估也未见报道。

3. 动物模型

要研究疾病的发生机制和治疗手段,良好的疾病模型必不可少。研究人员建立了不同的 FXS 动物模型用来研究缺乏 FMRP 对行为、mRNA 翻译和药理干预的影响。但是几乎所有动物模型都不相同于人类的基因型,因为目前研究 FXS 动物模型通常采用 *FMR1* 基因敲除的方法使 *FMR1* 转录丧失,从而导致 FMRP 缺失,而人类 FXS 患者 *FMR1* 沉默是由于 CGG 过度重复导致甲基化引起^[10]。*FMR1*CGG 敲入(knock in, KI)小鼠更贴近于人的发病机制,通过向 *FMR1* 启动子区敲入 CGG 重复序列,并且控制敲入 CGG 重复数目,可以分别得到“前突变”和“全突变”的小鼠。令人惊讶的是,CGG 重复超过 200-300 时仍然没有发生 *FMR1* 启动子区甲基化,这可能与全突变患者身上仍有部分细胞 *FMR1* 启动子区未甲基化的现象存在某种联系^[50]。KI 小鼠 *FMR1*mRNA 水平升高,但是 FMRP 降低,出现与 FXTAS 相似的特异性神经病理学特征——神经元和星形胶质细胞内核内涵体的出现和 Purkinje 细胞数量的减少。在行为学方面, Morris 水迷宫记忆损伤、转棒运动能力受损、活动过度、焦虑减少、被动回避受损^[10]。就目前的研究结果看, *FMR1*CGG KI 小鼠兼具 FXS 和 FXTAS 的部分表型,可以同时作为这两种疾病的研究模型。除此之外,这种小鼠 *FMR1* 基因 CGG 重复数超过 200 后仍未发生甲基化的现象也有待进一步研究。

另一种在研究中广泛应用的动物模型是 *FMR1* KO 小鼠。对 *FMR1* KO 小鼠的行为缺陷进行了大量的行为测试。*FMR1*KO 小鼠在空间学习上表现出明显缺陷,在声

音诱导惊吓反射的前脉冲抑制 (pre-pulse inhibition, PPI) 发生障碍, 活动明显增多, 并且更容易诱导癫痫发作。在神经元发育方面, FXS 患者大脑皮层神经元树突棘密度增加, 不成熟树突棘比例增加。同样的现象在 FXS 的小鼠模型上也可以观察到^[51]。在正常情况下, 从婴幼儿到成年大脑神经元树突棘会发生修剪 (pruning), 数目减少, 成熟树突棘比例增加^[52, 53]; 而成年 FXS 小鼠相较于 WT 小鼠的树突棘形态和密度更类似于一种未成熟状态, 这表明 FXS 小鼠神经元树突棘发育存在障碍。

突触可塑性方面, 在 FXS 模型小鼠海马区, Theta-burst stimulation (TBS) 诱导的突触传递长时程增强 (long term potentiation, LTP) 正常, 低频刺激 (low frequency stimulation, LFS) 诱导的长时程抑制 (long term depression, LTD) 显著降低, 而 DHPG ((RS)-3,5-Dihydroxyphenylglycine) 诱导的 LTD 则显著增强^[54], 高频刺激 (high frequency stimulation, HFS) 诱导的 LTP 正常。在皮层 LFS 诱导的 LTD 正常而 HFS 诱导的 LTP 受损^[55]。

在果蝇的 *FMR1* 同源基因 *dFMR* 鉴定出来后, 建立了果蝇的 FXS 模型^[56]。*dFMR* 敲除果蝇在解剖结构上是正常的, 但表现出行为异常。结果表明, *dFMRP* 缺乏导致生理节律异常、运动缺陷、求偶行为改变。转基因果蝇中枢神经系统出现神经元形态异常。*dFMRP* 缺失导致蘑菇体缺损, 并引起轴突分支的改变。

为了研究 *FMRP* 在发育过程中的作用, 在斑马鱼中采用吗啉代反义寡核苷酸敲低技术减少 *FMRP*; 在受精卵中注入反义的寡核苷酸, 将短时降低目的基因。采用这种方法, 观察到一些 FXS 的表型, 包括轴突分支、导向的异常^[57]。然而, 这些结果仍然有争议, 因为 *FMR1* KO 斑马鱼并没有明显的表型。这表明, 吗啉代反义寡核苷酸注射敲低 *FMR1* 斑马鱼的表型可能是由于人工引起的电位变化导致的。

小鼠与人类大脑在形成和结构方面的差异对利用小鼠模型研究 FXS 患者的异常大脑发育和功能带来了挑战。人类大脑的形成时间更长, 小鼠只要数周而人类则需要数月。更重要的是, 人类的大脑更依赖于神经元和星形胶质细胞的共同作用, 因此 FXS 小鼠模型可能无法充分揭示 FXS 患者的发病机制。但是所有动物模型对于阐明 FXS 临床症状的分子机制仍有重要价值。

4. 细胞模型

人类多能干细胞 (pluripotent stem cells, PSCs), 包括人类胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESCs) 和特别诱导的 PSCs (induced PSCs, iPSCs), 提供了 FXS 研究的细胞模型, 可以用来揭示 FXS 患者神经元发育和功能障碍的分子机制。人类 FXSPSCs 细胞模型的建立拓展了研究人员对 *FMR1* 表观遗传沉默机制和神经元发育方面的认识^[58]。为什么使用人体细胞来研究导致 FXS 的潜在机制, 特别是那些影响神经系统的机制? 有一个重要的原因: CGG 过度重复导致 FXS 的 *FMR1* 基因表观遗传沉默的现象只发生在人类身上: CGG 重复序列超过 200 的小鼠 *FMR1* 启动子区没有发生甲基化和沉默^[59], 表明人类和小鼠的表观遗传机制是不同的。

在 2005 年 Verlinsky 最先将携带 FXS 突变的 hESCs 从胚胎中分离出来^[60]。由于 FXS 的可遗传性, 体外受精后的胚胎经过遗传诊断筛选患有 FXS, 就可以从中分离出干细胞建立 FXS 细胞模型。出于研究目的, 可以从这些胚胎的内胚层细胞群 (inner cell mass, ICM) 中分离出它们^[61-64]。自最初报道以来, 已有多种 FXS hESCs 被开发出来^[65]。然而, 只有极少数的 FXS hESC 细胞系被美国国立卫生研究院 (National Institutes of Health, NIH) 批准在人类胚胎干细胞注册中心上市, 这制约了研究人员对这些细胞的使用。Eiges 等第一次详细描述了人类 FXS 胚胎干细胞 (human embryonic stem cells, hESC)。数据证实, 从 FXS 胚胎中提取的细胞符合 hESCs 的标准, 并且细胞保留了 *FMR1* 的全长突变。然而令人惊讶的是, *FMR1* 在这些细胞中没有甲基化并可以正常表达, 这些细胞分化后才出现表观遗传沉默, 这提供了研究 *FMR1* 沉默机制的新范式 (Figure 2)。最近来自多个 FXS hESCs 细胞系的研究结果表明: 最初胚胎的 ICM 细胞在干细胞时期可能出现不同程度的 *FMR1* 甲基化^[66]。因此, 未分化的细胞可以发生表观遗传沉默。随着更多的人类 FXS hESCs 被报道和研究, 我们将发现更多的现象。

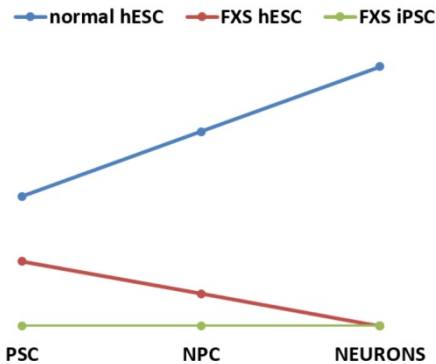
EXPRESSION OF *FMR1* IN HUMAN PSC

Figure 2. Neuronal differentiation-dependent *FMR1* gene inactivation

Graph depicts the *FMR1* gene expression in hPSCs during neuronal differentiation. The *FMR1* gene is expressed in normal hESCs and its expression levels increase during neuronal differentiation (blue line). *FMR1* is expressed in FXS hESCs but at lower levels than normal due to partial inactivation and is gradually silenced during differentiation (red line). The *FMR1* gene is silenced in FXS hiPSCs and throughout neural differentiation. (PSC=pluripotent stem cells, NPC=neural progenitor cells). (Mol Cell Neurosci. 2016 Jun;73:43-51. doi: 10.1016/j.mcn.2015.11.011. Epub 2015 Nov 27.)

5. 发病机制

FMRP 是一种 RNA 结合蛋白，与特定的 mRNA 结合以控制其定位和翻译。这一功能意味着 FMRP 在神经元发育、功能和突触可塑性方面发挥着重要的作用^[67-69]。FMRP 缺失导致蛋白质合成增加，激活许多细胞内信号通路转导，包括 mTOR、mGluR5、GSK3 β 、ERK1/2、MMP-9、endocannabinoid、BDNF、PI3K 和胰岛素通路。动物模型的研究表明，FMRP 在神经元发育过程中也起着至关重要的作用。FMRP 缺乏导致神经前体细胞更多地向神经胶质细胞分化，向神经元分化减少，并增加未成熟神经元的死亡，减少新生神经元的数目^[70-72]。FMRP 缺失的神经元也表现出神经元树突和棘突的形态异常。来自 FXS 小鼠模型的实验结果拓展了我们对 FXS 的理解，在 FXS 患者中已经进行了一些药物试验。FMRP 对于活动依赖的突触消除和稳定具有重要作用^[73, 74]。

FXS 的 mGluR 理论认为，FXS 中异常的突触功能和某些方面的异常行为是 mGluR 依赖的蛋白合成过度的结果。这个理论是基于三方面的研究结果：首先，mGluR 激活引发了新的蛋白质合成；第二，FMRP 作为一种 RNA 结合蛋白，是蛋白质生物合成的“刹车片”；第三，*FMR1* KO 小鼠表现出 mGluR 依赖的海马长期突触可塑性增强，这是一种 FXS 发病机制中的兴奋性传递增强^[75]。

另一种大脑中主要的抑制性神经递质-GABA，介导的是抑制性信号的传递。GABA 通过 GABA 受体发挥作用。GABA_A 受体是一种配体门控性氯离子通道，激活后引起神经元超极化。而 GABA_B 受体主要表达在突触前，是一种 G 蛋白偶联受体 (G Protein-Coupled Receptor, GPCR)。GABA_B 受体激活抑制突触前谷氨酸的释放，通过开放 G 蛋白激活的内向整流钾离子通道 (G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channels, GIRK)，引起突触后神经元的超极化，从而降低兴奋性突触的谷氨酸传递。在 *FMRIKO* 小鼠中，GABA_B 受体拮抗剂如巴氯芬或阿巴氯芬能使蛋白合成和多种行为表型恶化；阿坎酸可以激活 GABA_B 和 GABA_A 受体，却可以改善 *FMRIKO* 小鼠的多种表型。与 WT 小鼠相比，*FMRI KO* 小鼠脑中促进 GABA 合成的受体和酶的表达水平显著降低。临床前的研究已经揭示了抗癫痫药甘索酮是一种神经类固醇和 GABA 受体正向调节剂，它具有镇静、抗焦虑和抗惊厥作用，它改善 *FMRI KO* 小鼠的几种表型^[76]。

6. *FMRI* 基因沉默的机制

FMRI 基因甲基化嵌合体的存在证明 *FMRI* 甲基化对基因沉默十分重要。有些 FXS 患者是甲基化嵌合体，尽管他们的 CGG 重复序列超过 200，但是他们身体的一些细胞亚群没有发生甲基化，一些细胞中甲基化水平较低，或在女性患者的一个等位基因中没有发生甲基化^[50]。极少数全突变的男性患者由于他们的 CGG 未甲基化，在临床上他们仅表现出轻微的症状^[77-80]。

研究人员广泛使用了遗传和表观遗传的方法研究激活或抑制 *FMRI* 表达的分子机制^[58] (Figure 3)。DNA 足迹的方法确定了结合在 *FMRI* 基因启动子区的 4 个转录因子，它们分别为 α -PAL/nuclear respiratory factor (NRF1)、specificity protein 1 (Sp1)、(histone H4 transcription factor 1) H4TF1/Sp1-like、myelocytomatosis viral oncogene-c (c-myc)。在多种正常细胞 *FMRI* 中均检测到这四种转录因子的结合，但在 FXS 患者的细胞中它们与 *FMRI* 的结合减少^[81]。ChIP 的研究结果表明，正常细胞的 *FMRI* 5' 非翻译区与乙酰化 H3 和 H4 结合，从而激活转录。组蛋白 H3K9、H3K27、H4K20 甲基化会抑制基因转录；H3K4、H3K36、H3K79 甲基化会激活基因转录。在 FXS 细胞中，*FMRI* 基因的乙酰化 H3 和 H4 水平显著降低，并且乙酰化 H3 的水平

与 CGG 重复数成反比。此外, FXS 细胞中 H3K4 的甲基化减少, 而 H3K9 甲基化增加, 与 FXS 细胞中 *FMR1* 的沉默状态一致。组蛋白修饰的这些变化仅限于 *FMR1* 启动子区。此外, 人类胚胎干细胞中 *FMR1* 沉默与包括 H3K4me2 在内的染色质激活状态的标志物减少和包括 H3K9me3 在内的染色质抑制状态的标志物增加有关^[66]。然而, 对 *FMR1* 启动子未甲基化的全突变男性患者的研究发现, 其启动子区去乙酰化 H3、H4 和甲基化 H3K9 仍然增加, 这说明 *FMR1* 基因沉默时组蛋白修饰可能与 DNA 甲基化无关^[82]。这些看似矛盾的研究结果表明, 调控 *FMR1* 表达的机制十分复杂。另一方面, FMRP 已被证明可以与 miRNAs 结合^[83], 人类 *FMR1* 基因座可以编码多个长链非编码 RNA (long non-coding RNA, LncRNA)^[82, 84]。FXS 患者基因组中除 *FMR1* 外还有多个基因也发生甲基化沉默, 如 *FAM11A*^[85] 和一些长链非编码 RNA, 如 *ASFMR1*^[18] 和 *FMR6*^[84]。

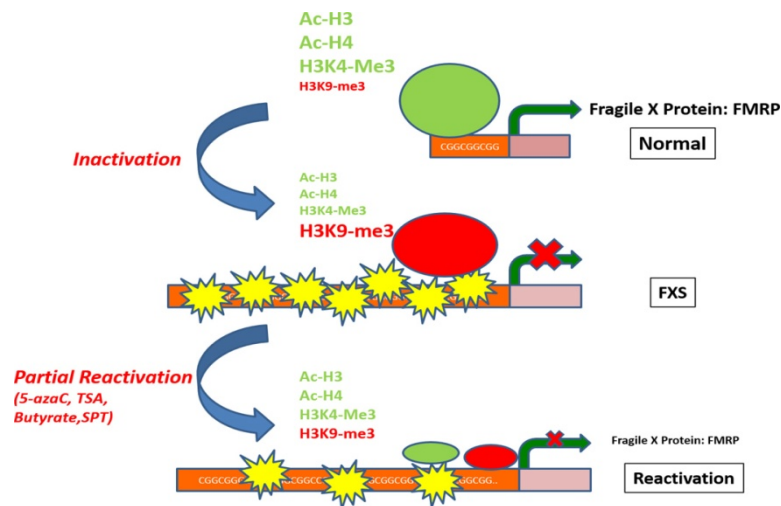


Figure 3. The *FMR1* gene promoter in normal cells is unmethylated and is enriched with active chromatin markers such as acetylated Histone H3 (Ac-H3), acetylated Histone H4 (Ac-H4), trimethylated H3 at lysine4 (H3K4-me3) but low in inhibitory chromatin markers such as trimethylated histone H3 at lysine 9 (H3K9-me3). The *FMR1* gene promoter in cells from FXS patients is methylated and is enriched with inactive chromatin marker such as H3K9-me3 but low in active chromatin markers. Treatment with DNA methyltransferase inhibitors such as 5azaC or HDAC inhibitors such as trichostatin A, butyrate or splitomicin can partially change the histone signature and reactivate the *FMR1* gene. (Mol Cell Neurosci. 2016 Jun;73:43-51. doi: 10.1016/j.mcn.2015.11.011. Epub 2015 Nov 27.)

FMR1 基因上游约 685 到 800 个核苷酸的位置发现了甲基化边界, 以及与该区域相结合的几种核蛋白质, 包括绝缘蛋白 CCCTC binding factor (CTCF)。FXS 细胞中 CTCF 与 *FMR1* 该区域的结合缺失^[18]。CTCF 结合可以阻止 *FMR1* 基因沉默, 但不能

阻止 DNA 甲基化^[86]。研究人员推测 CTCF 可以通过调节染色体构象发挥作用。另一项使用人类胚胎干细胞的研究表明，组蛋白标志物的变化先于 DNA 甲基化发生^[87]。用 5-氮杂胞苷将 *FMRI* 启动子区去甲基化后，CGG 重复的突变型 mRNA 会介导 H3K27 甲基化，抑制基因的转录^[88]。最近研究证实过多 CGG 重复的 *FMRI* mRNA 会和 DNA 结合形成 R-loop 介导 *FMRI* 沉默^[89, 90]。因此，可能有多种机制发挥沉默 *FMRI* 基因的作用。

7. FXS 的治疗

7.1. 对症治疗

在对症治疗方面，叶酸有一定的预防作用。非典型抗精神病药利培酮^[91]、阿片受体拮抗剂纳洛酮、促肾上腺皮质激素释放激素(adrenocorticotropichormone, ATCH)都可用于缓解 FXS 的症状^[92]。舍曲林也已被为数不多的开放性研究证明可改善自闭症患者的焦虑、激越、易激惹、愤怒、刻板等，患者对药物耐受较好^[93, 94]。双丙戊酸钠可有效改善自闭症患儿的情绪不稳、易激惹、冲动行为、攻击行为，减轻脑电图异常，患者药物耐受良好^[95, 96]。

7.2. 特异性药物治疗

随着对 FMRP 在突触水平上的功能了解越来越多，研究人员期望通过调节特定受损神经元受体的功能而治疗 FXS^[97]，所以在这类药物的研究方面开展了大量工作，发现了一些药物，但是临床实验的结果显示他们或者改善症状的效果不明显或者毒性太大，所以目前为止并没有上市的针对 FXS 的特效药，然而所有的这些研究对下一步的药物研发提供了良好的借鉴。

洛伐他汀：通常用于治疗高胆固醇血症。他汀类药物可以抑制 RAS 蛋白的活性，这是 FXS 中引起蛋白过度合成的上游分子。洛伐他汀作为一种弱效的 RAS 抑制剂，通过干扰 RAS 法尼基化，将其募集在细胞膜上，从而抑制了 ERK 信号通路的激活，减少 FMRP 调控的蛋白质合成。洛伐他汀已经进行了临床前试验，下一步临床试验即将开始^[98]。

二甲双胍：是一种广泛用于治疗 2 型糖尿病的药物，它也可以减少 ERK 通路的激活。洛伐他汀和二甲双胍治疗 *FMR1* KO 小鼠纠正了包括蛋白质过度合成在内的多种表型^[99]。

基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloprotein-9,MMP9)：是一种细胞外 MMP，可以降解促进突触成熟和稳定所需的蛋白质，在 *FMR1* KO 小鼠的脑组织中表达过多，*MMP9* 基因敲除或使用抑制剂米诺环素可纠正 *FMR1* KO 小鼠的多种表型^[100]。

锂：可以抑制 GSK3 参与的蛋白合成。慢性锂治疗可以纠正 *FMR1* KO 小鼠的多个表型^[101]。

纹状体富集蛋白-酪氨酸磷酸酶 (Striatal-enriched protein-tyrosine phosphatase, STEP)：表达在一些脑区的神经元中，可以作用于包括 AMPA 受体、NMDA 受体、ERK、酪氨酸激酶 Fyn、酪氨酸蛋白激酶 2 β (Protein tyrosine kinase 2B,PTK2B)、丝裂原活化蛋白激酶 p38 在内的多个靶点。FMRP 可以调控 *STEP*mRNA 的翻译，*FMR1* KO 小鼠中敲除 *STEP* 可改善突触功能障碍和多种异常行为表型^[102]。

核糖体蛋白 S6 激酶 (ribosomal protein S6 kinase beta-1,p70-S6K)：对调节细胞蛋白的合成和代谢至关重要，并可以调节 FMRP 的磷酸化，与 FMRP 缺失时蛋白质合成增加有关。在 *FMR1* KO 小鼠中基因敲除或药物抑制 p70-S6K，可纠正多种表型。但是目前没有发现适合人类应用的 S6K 抑制剂^[103]。

CB1 抑制剂：mGluR5 激活可以产生内源性大麻素，激活大麻素受体 1 (cannabinoid receptor 1, CB1) 能够引起 LTD。给予 *FMR1* KO 小鼠 CB1 抑制剂利莫那班和 NESS0327 可以抑制过度激活的 CB1 信号通路，并纠正多种行为表型^[104]。

p21 激活激酶家族 (p21-activated kinase,PAKs) 是 Ras 相关的 C3 肉毒素底物 1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, RAC1) 和细胞分裂控制蛋白 42 (CDC42) 的效应蛋白。它们都是 RHO 小 GTPases，参与调节细胞骨架功能、细胞分裂、运动和存活。据报道，在 *FMR1* KO 小鼠中，PAK 信号通路增强，而敲除 PAK 基因或使用 PAK 抑制剂 FRAX486 可以纠正 *FMR1* KO 小鼠的表型。但目前没有发现适合人类应用的抑制剂^[105]。

AMPA 激酶：AMPA 受体家族是突触后离子型谷氨酸受体，介导快速谷氨酸能神经传递。AMPA 激酶，如 CX516，是 AMPA 受体的正向变构调节剂。在 FXS 中，

mGluR 依赖的 LTD 过度增强, 导致 AMPA 受体中 GluA1 的减少, 这表明增强 AMPA 受体功能可能具有治疗效用。在 *FMR1*KO 小鼠中没有进行临床前研究。CX516 在 1 例临床试验中未见疗效^[106]。

7.3. 表观遗传治疗

考虑到 FMRP 调节大量 mRNA 和各种已知的通路, 所以 FXS 患者细胞中异常的信号通路有许多, 很难找到可以同时调节这些信号通路的药物。所以研究人员期望使用表观遗传的方法重新恢复 FXS 患者 FMRP 的表达, 这就促进了表观遗传治疗的出现。罕见的未甲基化全突变个体的存在, 说明使用药理学的方法恢复 *FMR1* 转录是可行的。DNA 去甲基化可以用 5-氮杂胞苷。5-氮杂胞苷在细胞复制过程中与脱氧胞苷类似, 并不可逆转地抑制 DNA 甲基转移酶^[107]。1998 年, 研究人员用 5-氮杂胞苷处理脆性 X 淋巴细胞样细胞, 通过 RT-PCR 检测 mRNA 和 Western blot 检测蛋白后发现, 小部分 (5-10%) 处理细胞中发现了 *FMR1* 的表达^[108]。由于 CGG 重复数的增加, mRNA 翻译效率较低, 这可能是 *FMR1*mRNA 和蛋白质水平之间明显差异的原因。将 5-氮杂胞苷与各种组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylase, HDAC) 抑制剂丁酸、苯丁酸或曲古抑菌素 A 联合应用, 通过 RT-PCR 检测发现它们对 *FMR1* 的激活具有协同作用^[107]。然而, 单纯使用 HDAC 抑制剂本身并不能诱导 *FMR1* 的再活化, 这表明 DNA 甲基化对 *FMR1* 的沉默起主导作用。进一步研究证实 5-氮杂胞苷治疗后, *FMR1* 启动子区发生去甲基化^[109]。但反对使用 5-氮杂胞苷或 HDAC 抑制剂的主要是因为它们的靶点是针对全部基因组的。然而, 通过基因芯片筛选给药后 10814 个基因的表达, 结果表明治疗后只有很少基因的转录受到影响: 5-氮杂胞苷 51 个, 曲古抑菌素 A 23 个。

7.4. 基因疗法

新生的 *FMR1*KO 小鼠双侧脑室内注射单链腺相关病毒 (AAV9) 表达 FMRP。Western blot 和免疫荧光结果显示纹状体、海马、扣带皮层出现 FMRP 的表达。在海马和皮层, 注射后 56 天达到 WT 小鼠大约 50% 的水平, 并且重复行为和社交损害也得到明显改善。这些结果首次证明了基因治疗可以纠正 FXS 小鼠模型的行为异常^[110]。通过 CRISPR/Cas9 介导的基因编辑技术将 FXS 胚胎干细胞过度重复的 CGG 序列剪

切掉以后也可以恢复 FMRP 表达，从而纠正甲基化^[111-113]。

7.5. 治疗方法总结

目前尚没有针对自闭症的特效药物。最近的 FXS 临床试验研究了多个药物靶点。虽然许多药物可以抑制谷氨酸能神经元和增强 GABA 能神经传递，但研究的化合物并不局限于此。作为一种单基因疾病，研究人员认为可以通过药物治疗显著改善患者的症状。不幸的是，尽管这些药物在 FXS 动物模型的研究结果很有前景，但是在临床治疗过程中几乎都是失败的^[114]。关于 FXS 的临床研究有力推动了迄今为止对一种遗传性神经发育障碍疾病最全面的药物开发，在这一过程中所获得的经验也将促进对这一大类疾病的研究。FXS 处在神经发育障碍药物研发最前沿的位置，未来在这一领域的成功将取决于从过去的挑战中吸取经验，改进临床试验设计，选择适当的结果评价标准。

二、颗粒体蛋白前体

1. PGRN 的结构

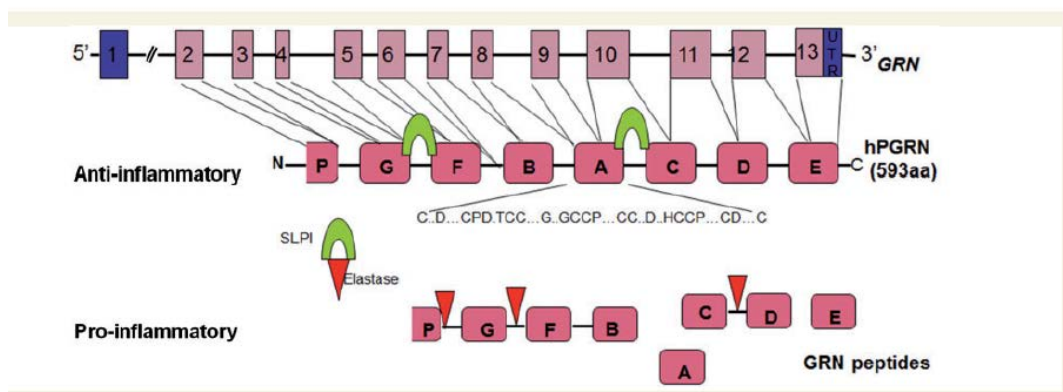


Figure 4. Diagrammatic representation of the human *GRN* gene, progranulin protein and its proteolytic digestion pathway to granulin peptides.

(Top) The exonic structure of the *GRN* gene (dark blue for UTRs). (Middle) The protein structure with lettered boxes that represent individual granulin modules. The thin lines descending from the gene structure indicate which exons contribute to which protein modules. Secretory leucocyte protease inhibitor (SLPI) binds at sequences between granulin modules to protect full length progranulin from proteolysis by elastase and other proteases. Intact progranulin blunts the inflammatory reaction and has growth factor-like activity. SLPI therefore promotes the anti-inflammatory and growth factor properties of progranulin. The bottom panel illustrates the cleavage of progranulin into granulin peptides some of which have proinflammatory and anti-proliferative activities. (**Brain. 2017 Dec 1;140(12):3081-3104. doi: 10.1093/brain/awx198.**)

由 *GRN* 基因编码的 PGRN 是一种分泌型糖蛋白，包括 7.5 个串联重复且不同的颗粒体蛋白结构域，每个结构域里有 12 个半胱氨酸。PGRN 这种独特的多效性与许多生理和病理调节有关，包括但不限于胚胎发生、肿瘤发生、炎症、伤口修复、神经退化和溶酶体功能等。*GRN* 的显性突变导致 PGRN 不足引起额颞叶变性（frontotemporal lobar degeneration, FLTD），这是一种进行性神经元萎缩，表现为额颞叶痴呆（frontotemporal dementia, FTD）^[115]。与老年痴呆症不同，FTD 是一种早期发作的痴呆症，发病年龄在 28 到 55 岁之间，平均发病年龄为 38 岁^[116]。FTD 是 *GRN* 相关的一种病，其特征是神经元内含物包括泛素化和碎片式 TDP-43 (TAR DNA binding protein, encoding TDP-43, 由 *TARDBP* 编码) 的出现。近年来，PGRN 的营养和神经免疫调节功能已被报道，但仍未充分了解。在阿尔茨海默病（Alzheimer disease, AD）和帕金森病（Parkinson's disease, PD）的实验模型中，增加 *GRN* 的表达可以抑制疾病的发展^[117]。

PGRN 由 593 个氨基酸残基组成，非糖基化的 PGRN 分子量约为 68 kD，而糖基化的 PGRN 分子量为 88 kD 左右。在外周主要由血管内皮细胞、外周血中性粒细胞分泌，在中枢系统主要由成熟神经元和小胶质细胞分泌。可被蛋白酶降解，以 6kD 的多肽形式释放单个颗粒体蛋白（granulin），也被称为 epithelins。虽然 PGRN 和颗粒体蛋白都具有生物活性，但通常作用相反^[118]。例如，PGRN 发挥抗炎作用，而颗粒体蛋白具有促炎功能。在细胞生长方面，完整 PGRN 促进有丝分裂，而不同的颗粒体蛋白可能有的促进生长，有的抑制生长。PGRN 与颗粒体蛋白之间的平衡由分泌型白细胞蛋白酶抑制剂 (secretory leucocyte protease inhibitor, SLPI) 调节，它通过与 PGRN 结合抑制弹性蛋白酶和其他中性蛋白酶对 PGRN 的水解 (Figure4)。

2. PGRN 在脑内的表达

在早期发育过程中，脑内 PGRN 表达较低，随着年龄的增长而增加^[119]。它主要表达在成熟的神经元和小胶质细胞上，也可能在星形胶质细胞和室管膜细胞有低水平的表达^[29]。

许多研究表明：伤害性反应刺激如脊髓损伤，坐骨神经手术和外伤性脑损伤后，活化的小胶质细胞或巨噬细胞中 PGRN 表达增加。在发生肌萎缩性侧索硬化症、路

易体痴呆、AD 及多发性硬化等疾病时，小胶质细胞中 PGRN 表达也增加^[117]。

鉴于 *GRN* 突变会导致 FTLD，研究人员推测突变携带者 PGRN 表达水平降低。对健康人群及 *GRN* 突变携带人群的 *GRNmRNA* 水平进行分析，结果显示 *GRN* 突变携带者没有病变或仅有轻微病变的脑区如小脑和枕叶皮质，PGRN 会减少，和预测的一样。然而，有趣的是在严重病变区域，随着小胶质细胞数量的增加和激活，患者 *GRN mRNA* 水平显著升高^[120]。在所有形式的急性和慢性损伤后，特别是 *GRN* 功能缺失的突变患者，活化的小胶质细胞中 PGRN 明显增加，表明 PGRN 参与了神经免疫过程调节^[121]。

神经元是否会参与损伤后 PGRN 水平调节尚不清楚。在 AD 小鼠中随着致密斑块的产生，PGRN 阳性的神经元数量也会随之增加。但另一些人则认为，神经元在损伤后 PGRN 表达不会改变^[122, 123]甚至减少^[124]。这种结果的差异可能是由于包括生物种类、神经元亚群或神经元损伤的形式等多种因素造成的。

星形胶质细胞可以调控 PGRN 的表达也有两方面报道：第一，在星形胶质肿瘤细胞内和相关脉管中出现了强的 PGRN 表达^[125]；第二，体外培养的人类胚胎来源的星形胶质细胞检测到低水平 PGRN 的分泌，炎性刺激后显著增加^[126]。

3. PGRN 在神经元中的功能

3.1. PGRN 与神经树突的生长

在斑马鱼中，PGRN 对正常运动神经元的发育和神经元树突的生长、分支有重要作用^[127]。在原代培养的小鼠神经元中，PGRN 通过调控 GSK3 β 促进神经元树突的生长。*GRNKO* 小鼠海马区 CA1 锥体神经元树突长度减少^[128]。

3.2. 分选蛋白 (sortilin) 与 PGRN

分选蛋白 (sortilin) 是一种神经元上的跨膜蛋白，有几个确定的配体，包括神经肽、神经紧张素和神经营养因子前体 (pro-nerve growth factor, pro-NGF)^[129]。在神经元中，sortilin 被证明可以与 PGRN 结合，并促进其内吞作用和快速向溶酶体转运，因此被认为是神经元特异的 PGRN 受体。Sortilin 介导的内吞作用可以调节胞外 PGRN 水平^[130]。但是一个真正的 PGRN 受体应该激活一个下游的信号通路，事实上有证据表明，至少有一部分的 PGRN 功能与 sortilin 无关^[131, 132]。也许 sortilin 对 PGRN 的作

用仅限于胞外水平的调控。

3.3. TDP-43 与 PGRN

在 FTLD 患者中, TDP-43 被过度磷酸化、泛素化, 并裂解生成 C 端片段。在 *GRN* 敲除小鼠模型中, 免疫组织化学结果显示老龄鼠脑内 TDP-43 过度磷酸化并定位错误。从机制上讲, TDP-43 是一种 RNA 结合蛋白, 能够结合细胞质 *GRN* mRNA 并使其降解, 使 PGRN 水平降低^[133]。这可能是一个正反馈循环, PGRN 的减少引起胞内应激, 最终导致 TDP-43 在细胞质的错误定位, 从而引起 TDP-43/*GRN* mRNA 的结合, 进一步降低 PGRN 水平。在神经元中, 可能存在着一个对 PGRN 不足的耐受性阈值, 一旦超过这个阈值, 就会导致 PGRN 缺失和 TDP-43 的错误定位, 联合损伤导致神经退行性病变的发生^[134]。

3.4. PGRN 在突触可塑性中的作用

越来越多的证据证实 PGRN 在突触可塑性中有重要作用。用 siRNA 敲低海马神经元 PGRN 后, 观察到突触小泡数量和囊泡释放频率的改变^[135]。在携带 *GRN* 突变的 FTLD 患者发现脑内囊泡数目发生变化也证实了这一点^[136]。随后的研究表明, PGRN 以活动依赖的方式分泌, 调控突触结构和功能^[137]。此外, 最近还采用筛查 *GRN* 突变的 FTLD 患者脑内功能障碍基因的方法, 研究 PGRN 在突触可塑性中的作用^[138]。

3.5. PGRN 和应激反应

有几项研究已经证明了在外源性应激下 PGRN 的作用。PGRN 不足会使小鼠原代培养神经元对 H₂O₂ 和 NMDA 介导的兴奋毒性更加敏感。同时 PGRN 也可以减轻淀粉样蛋白₁₋₄₂ (A β ₁₋₄₂) 对大鼠原代培养皮层和海马神经元的毒性^[139]。*GRN* 突变后 iPSCs 诱导分化的神经元对激酶抑制剂的敏感性也增加, 特别是那些抑制 PI3K、Akt、MEK、MAPK 信号通路的抑制剂^[140]。在体内实验中, 采用慢病毒在脑内过表达 PGRN 能够保护大脑中动脉闭塞引起的损伤^[141]。应用 MPTP (一种神经毒素, 能够破坏黑质中多巴胺能神经元用来制备帕金森动物模型), *GRN* 突变小鼠神经元死亡增多。相反的, PGRN 对其他多种引起纹状体或海马损伤的药物并没有保护作用^[142]。综上所述, 从 *GRN* 突变患者的 iPSCs 分化的神经元的结果支持 PGRN 对应激诱导的神经元细胞死亡具有保护作用; 来自 *GRN* 突变小鼠的结果模棱两可: 在体实验显示了

PGRN 对部分神经毒素引起的损伤有保护作用。

3.6. PGRN 与溶酶体

蛋白质降解在患 FTLN 时受损^[143]。PGRN 参与溶酶体的正常功能，GRN 突变相关的 FTD 可能与此有关。人类和小鼠的 GRN 纯合子突变会导致溶酶体功能的严重破坏^[144, 145]。在与 GRN 相关的 FTD 中，泛素化的 TDP-43 增加，这意味着蛋白质清除途径受阻。此外，与 GRN 相关的蛋白 Sortilin、TMEM106B 和鞘脂激活蛋白原蛋白 (prosaposin) 都与溶酶体功能有关^[30-34, 37, 145, 146]。除了与 PGRN 结合，Sortilin 还与溶酶体转运酸性鞘脂酶和鞘脂激活蛋白 (sphingolipid activator proteins, SAPs) 结合，这是溶酶体降解鞘糖脂所必需的途径^[147]。鞘脂激活蛋白原作为 SAPs 的前体，可以与 PGRN 结合，说明 PGRN 可能参与了这一信号通路。在老年小鼠的大脑中，PGRN 不足会使 TMEM106B 增加，而基因敲除神经元 TMEM106B 会增加脂褐素的沉积^[148]。有趣的是，人类中 TMEM106B 和 GRN 的基因突变都与人类大脑加速衰老有关^[149]。这表明不仅在 FTD 中，在健康大脑的老化中，PGRN/TMEM106B 信号通路也发挥一定作用。此外，PGRN 敲除的神经元自噬受损，研究表明 PGRN 可能与溶酶体、自噬和内吞相关蛋白有关^[150]。

3.7. PGRN 调节的信号通路

在许多细胞类型中，PGRN 可以激活 ERK1/2 和 Akt 信号通路。PGRN 使神经元内 Akt 和 GSK-3 β 磷酸化，Akt 通路激活，GSK-3 β 失活^[151]。敲除 GSK-3 β 则会完全阻断 PGRN 的神经营养作用^[151]。这些结果表明，在 PGRN 介导的神经树突生长和神经元存活中，Akt/GSK-3 β 通路有重要作用。在非神经元细胞中，PGRN 与粘附斑激酶 (focal adhesion kinase, FAK) 的激活有关^[152]。但是在神经元中是否有类似的 PGRN 调控 FAK 通路还不清楚。

有越来越多的证据表明，PGRN 与 Wnt 信号相互作用。因此，一项功能基因组学研究结果表明，在一个人类神经前体细胞 PGRN 缺失和 FTD 的大脑中，发现由于 PGRN 的缺乏，Wnt 信号通路明显激活^[153]。Wnt1 和 PGRN 的表达是一种负性调控关系^[153]。在携带有 GRN 突变的淋巴细胞中，检测到非经典的 Wnt5a 信号的激活^[154]。利用携带 GRN 突变的 FTLN 患者的 iPSCs 诱导为神经元后，也观察到 Wnt 信号通路

的异常激活^[155]。在 SH-SY5Y 神经肿瘤细胞敲除 *GRN* 后, 经典和非经典的 Wnt 级联信号都被激活^[156]。由于 Wnt 信号可以提高神经元的存活, 它的增强可能是 FTD 中 PGRN 不足产生的一种保护作用^[153, 156]。

4. PGRN 和小胶质细胞

关于小胶质细胞中 PGRN 作用的研究相对较少, 但是有足够证据支持 PGRN 的抗炎作用。刺激不同的 Toll-like receptor (TLR) 受体, *GRN* KO 的巨噬细胞和小胶质细胞分泌产生更多的细胞因子, 对原代神经元产生毒性^[126, 157]。在体实验中也可以观察到类似的结果, CD11b-Cre 条件性敲除小胶质细胞中 *GRN* 后, MPTP 导致的小鼠黑质神经元死亡数量增加^[157]。在人类胚胎来源的小胶质细胞中, 采用 siRNA 敲低 PGRN 后, LPS 诱导产生的细胞因子明显减少^[126]。这一相反的证据说明, 人类与小鼠的小胶质细胞中 PGRN 可能有不同的作用, 也可能是急性敲低 PGRN 和基因敲除 PGRN 作用的差异。

在特定条件下, PGRN 对小胶质细胞有趋化作用。小鼠皮层内注射表达 PGRN 的慢病毒载体增加了注射部位周围活化状态的小胶质细胞的数量^[158]。由于慢病毒表达 PGRN 蛋白或培养细胞给予 PGRN 都可以促进小胶质细胞的激活, 这些数据与 PGRN 促进小胶质细胞趋化的作用完全一致。此外 *GRN* KO 小鼠活化的小胶质细胞没有显示出迁移的缺陷, 从而进一步说明 PGRN 可以促进小胶质细胞的趋化过程, 但并不是不可或缺。

PGRN 可以调控巨噬细胞和小胶质细胞的内吞作用。*GRN* KO 小鼠腹膜巨噬细胞吞噬非生理和生理底物的速度比 WT 巨噬细胞明显增快。重组 PGRN 可以增强小胶质细胞对 $A\beta_{1-42}$ 的内吞作用^[158]。尽管小胶质细胞和巨噬细胞的吞噬活性受到了 PGRN 水平的影响, 但在 *GRN* KO 细胞实验和添加外源性 PGRN 的实验中却再一次观察到了 PGRN 的不同作用。

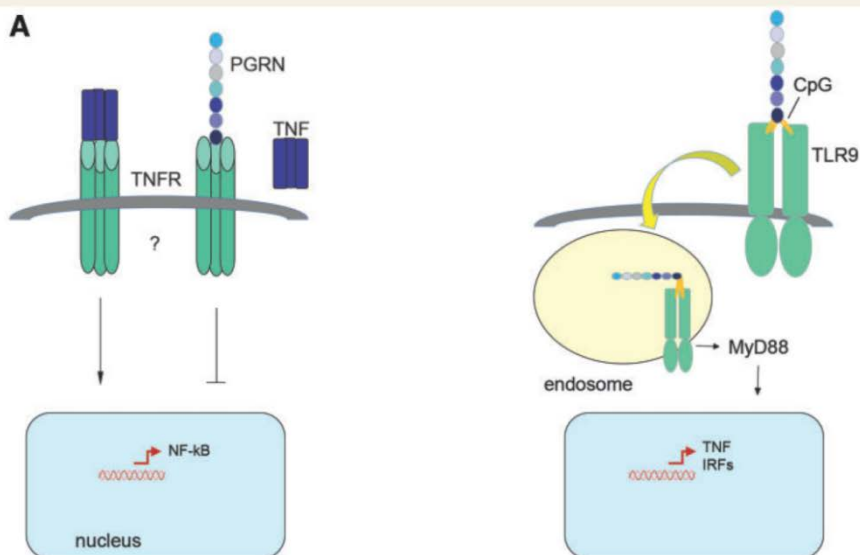
5. PGRN 的受体

在机体中没有孤立的有生物活性的配体, 它们都要通过与受体结合而发挥作用。在中枢神经系统中, 除了 sortilin 外, PGRN 可以结合 SLPI、几种基质金属蛋白酶 MMP2、MMP9、MMP13、MMP14、MMP17^[126, 159]、ADAMTS-7 (一个有血小板反

应蛋白结构域 7 的解聚蛋白和金属蛋白酶)^[160]、细胞外基质蛋白-基质膜聚糖^[161]和软骨寡聚基质蛋白^[162]。这些细胞外基质蛋白与 PGRN 结合可以调节其功能。

可以与 PGRN 结合的膜蛋白包括 sortilin^[146]、TNFR^[163]、TLR9、Dlk^[164]、EphA2 (Ephrin Type-A Receptor 2)^[165]和 Notch 受体^[166]。如上所述, PGRN 通过羧基末端尾部与 sortilin 的螺旋桨区域结合, sortilin 可以调节细胞外 PGRN 水平^[167]。据报道, PGRN 可以竞争性拮抗 TNF α 与 TNFR1 和 TNFR2 的结合^[163]。虽然这与 PGRN 在神经炎症方面的作用相一致, 但也有研究发现 PGRN 不与 TNFR 结合^[168, 169]。此外, PGRN 作为 TLR9 信号的可溶性辅助因子, 可以与 CpG ODNs 和 TLR9 结合^[170], 揭示了 PGRN 调节炎症和神经免疫的新途径^[171, 172]。

蛋白质组学分析神经元过表达 PGRN 的小鼠 PFC, 结果提示 PGRN 可以调控 Notch 信号通路^[166]。PGRN 通过 Notch 受体胞外结构域可以与所有四个 Notch 受体结合^[166]。在上皮细胞和内皮细胞的研究发现, 酪氨酸受体激酶 EphA2 可以识别 PGRN, 可能是 PGRN 信号的转导分子^[173]。值得注意的是, Ephrin 和 Notch 都参与细胞之间信号交流, 一个细胞膜表达的配体可以与另一个细胞膜上的受体结合。但是 PGRN 是作为辅助因子与 Notch 配体或 Ephrin 一起分别与 Notch 受体和 EphA2 受体结合, 还是单独与 Notch 受体和 EphA2 受体结合还不清楚^[165]。



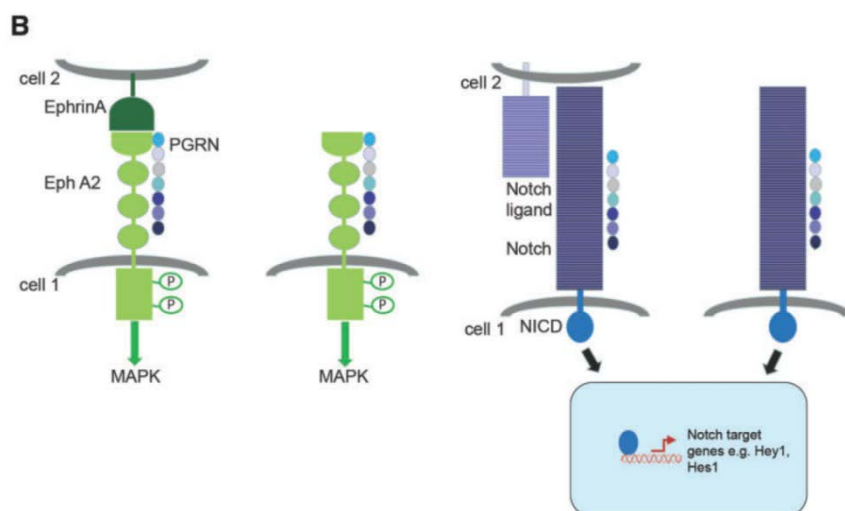


Figure 5. Progranulin binds to multiple cell surface receptors.

(A) Progranulin (PGRN) may influence inflammatory signalling by interfering with TNF binding to TNF-receptors^[163]. The arrow indicates activation and the blunt-ended line indicates inhibition. The question mark indicates that not all research groups detect progranulin binding to the TNFR^[168, 169]. Progranulin is, in addition, a cofactor for CpG binding to TLR9 either on cell membranes or in endocytotic vesicles^[170]. (B) Progranulin may influence non-inflammatory cell signalling through EphA receptors^[173] or by notch signalling^[166]. It is not yet clear whether progranulin forms a complex with the receptor and its typical ligand (ephrin or notch-ligand) or acts alone with these receptors. The bent red arrow indicates gene expression. CpG: unmethylated CpG; EphA2: Ephrin type A receptor 2; Hes1: hairy enhancer of SPLIT-1; Hey1: hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein 1; IRFs: interferon-regulatory factors; MAPK: mitogen-activated protein kinase; MyD88: myeloid differentiation primary response gene 88; NF- κ B: nuclear factor κ -light chain enhancer of activated B cells; NICD: notch intracellular domain; TLR9: Toll-like receptor 9; TNF: tumour necrosis factor; TNFR: TNF receptors. (Brain. 2017 Dec 1;140(12):3081-3104. doi: 10.1093/brain/awx198.)

三、TNF α 与学习记忆

在本文中，我们发现 PGRN 降低 S-DEP 小鼠脑内 TNF α 水平，并通过 TNFR2 受体发挥调节突触发育和可塑性的功能，所以 TNF α 水平同样也会影响 PGRN 的功能。TNF α 作为免疫激活的产物发现于大约 40 年前。TNF α 合成后作为一个 26 kD 的 II 型跨膜蛋白锚定在细胞膜上，称为 membrane TNF α (mTNF α)。免疫激活后 mTNF α 被金属蛋白酶——TNF α 转化酶 (TNF- α converting enzyme, TACE) 水解成 17 kD 的 TNF α ，进一步成为 51 kD 的可溶性同质-三聚体分子，称为 soluble TNF α (sTNF α)，发挥炎性介质的作用^[174, 175]。TNF α 除了调控免疫系统外，近年来发现对中枢神经系统具有调控作用。研究表明，神经元或胶质细胞中过度表达 TNF α 会损害被动回避记忆^[176]、突触可塑性^[177]和小脑学习能力。TNF α 参与了慢性 LPS 处理后小鼠记忆受

损^[178],这提示 TNF α 是损害学习记忆的。但同时也有研究发现,学习后大鼠脑内 TNF α 水平升高^[179],敲除 TNF α 和它的受体后小鼠出现广泛的学习能力受损^[180],TNF α 可以调节体外培养神经元的突触缩放 (synaptic scaling)^[181],但不影响海马区的 LTP 和 LTD^[181]。这些结果说明 TNF α 过度激活或功能不足都会引起学习记忆的损害。

TNF α 通过它的两个受体 TNFR1 和 TNFR2 发挥作用。TNFR1 可以被 mTNF α 和 sTNF α 激活,而 TNFR2 则更倾向于与 mTNF α 结合^[182]。TNFR1 和 TNFR2 激活后的胞内信号通路也不同,但有一些重叠和串扰^[181]。例如两者激活后都可以促进 NF κ B 入核,但 TNFR2 对于 NF κ B 的影响相较于 TNFR1 更持久,激活的 NF κ B 亚基也不同^[183]。TNF α 结合 TNFR1 后激活两种连接蛋白 TNFR1 相关死亡域 (TNFR1-associated death domain, TRADD) 和 Fas 相关死亡域 (Fas-associated death domain, FADD),发挥促凋亡作用^[184]。与之相反, TNF α 结合 TNFR2 后激活 TNF α 受体相关因子 2 (TNF receptor-associated factor 2, TRAF2),促进 NF κ B 入核,启动下游的基因转录,发挥促存活作用^[185] (如 Figure 6 所示)。

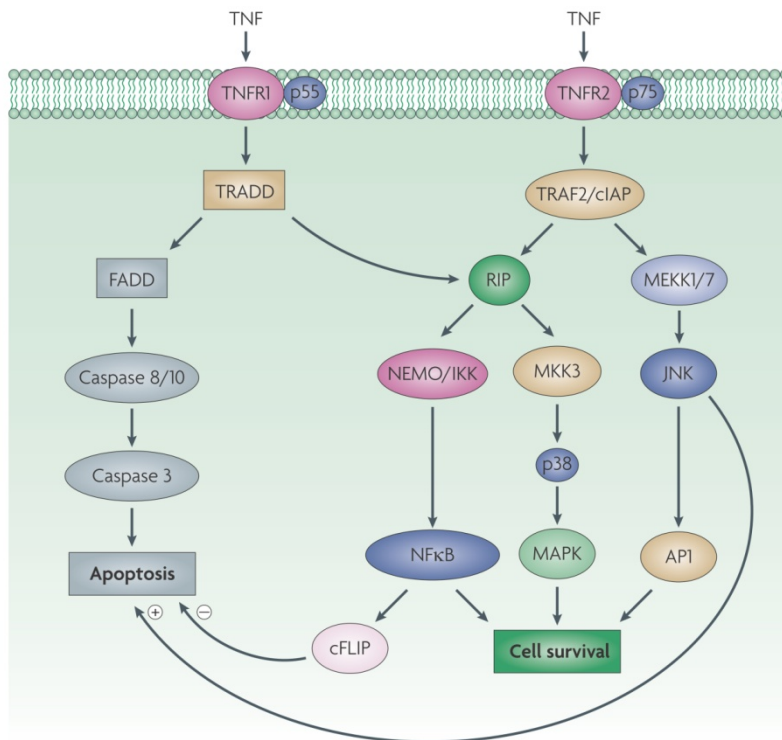


Figure 6. TNF α and TNFRs. Complex interplay between soluble and membrane bound TNF α and their cognate receptors. Membrane TNF α is cleaved by TACE to produce soluble trimeric TNF that binds TNFR1 and TNFR2. Membrane TNF α also binds both TNFR1 and TNFR2 molecules. (Nat Rev Drug Discov. 2010 Jun;9(6):482-93. doi: 10.1038/nrd3030.)

正文

第一部分 颗粒体蛋白和 TNF α 平衡调节突触可塑性

1. 材料

1.1. 实验动物

FMRI 基因敲除 (KO) 和野生型正常对照小鼠 (WT), 雄性, 8-12 周龄, 购自 Jackson Laboratory。C57BL/6J 小鼠, 雄性, 8-12 周龄, 购自第四军医大学实验动物中心。饲养于恒温、恒湿, 12 h 照明的环境中, 自由进食、饮水。

1.2. 试剂和抗体

1.2.1. 试剂

增强型化学发光液 (ECL) 购自 ZETA life; BCA 蛋白定量试剂盒购自美国 Pierce 公司; 蛋白酶抑制剂、PVDF 膜购自美国 Roche 公司; 免疫共沉淀磁珠购自 Cell Signaling Technology 公司; Hoechst33342、RIPA 裂解液和 5 \times 上样缓冲液购自碧云天生物技术有限公司; 小鼠 PGRN ELISA 试剂盒 (货号 ab213473)、TNF α ELISA 试剂盒 (货号 ab100747) 购自 Abcam 公司; 小鼠 PGRN ELISA 试剂盒购自 Enzo Life Sciences 公司 (货号 ADI-900-047); 重组小鼠 PGRN (货号 50396-M08H) 和 TNF α 蛋白 (货号 50349-MNAE) 购自义翘神州; EdU 染色试剂盒 (货号 C10371-1) 购自广州市锐博生物科技有限公司。

1.2.2. 抗体

PGRN 抗体购自 R&D systems; β -actin 抗体购自 Sigma 公司; p-CREB、TNF α 、IKB α 、p-IKB α 抗体购自 Cell Signaling Technology 公司; 辣根过氧化物酶标记的兔抗绵羊 IgG 购自 Millipore 公司; 辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠、山羊抗兔 IgG 抗体

购自 Abbkine 公司。

1.3. 溶液配制方法

1.3.1. 4%多聚甲醛固定液

称取 20g 多聚甲醛粉末加入盛有 400 ml PBS 溶液的烧杯中，于 60℃ 水浴中不断搅拌至完全溶解，滴加数滴氢氧化钠加速多聚甲醛的分解，继续搅拌数分钟后调 pH 至 7.4，继续添加 PBS 定容至 500ml 过滤后 4℃ 储存备用。

1.3.2. 50%甘油封片剂

取 5ml 甘油溶于 10ml PBS 即得。

1.3.3. 高尔基染色工作液

HgCl₂ 2 g、K₂Cr₂O₇ 2 g 和 KCrO₄ 1.5 g，溶于 200 ml 去离子水中，室温避光保存，备用。

1.3.4. 分离胶缓冲液

36.34g Tris 置于 200ml 烧杯中，加入约 160ml 去离子水，充分搅拌溶解，用盐酸调节 pH 值至 8.8，定容至 200ml，于 4℃ 保存。

1.3.5. 浓缩胶缓冲液

12.12g Tris 置于 200ml 烧杯中，加入约 160 ml 去离子水，充分搅拌溶解，用盐酸调节 pH 值至 6.8，定容至 200ml，于 4℃ 保存。

1.3.6. 30%丙烯酰胺

称取丙烯酰胺 29g 和甲叉基双丙烯酰胺 1g 置于 100ml 烧杯中，加入约 60 ml 去离子水，充分搅拌溶解，定容至 100 ml。

1.3.7. 10%十二烷基硫酸钠

10g SDS 溶于 80ml 去离子水中，定容至 100ml，室温保存。

1.3.8. 10%过硫酸铵

称取 2g 过硫酸铵，加入约 20ml 去离子水后搅拌溶解，分装保存于 -20℃。

1.3.9. 10mM 苯甲基磺酰氟 (PMSF)

称取 0.174g PMSF, 用 10ml 异丙醇溶解后, 分装于 1.5ml 离心管中, -20℃ 保存。

1.3.10. 组织裂解液

称取 0.078g NaH_2PO_4 , 0.071g Na_2HPO_4 , 0.439g NaCl , 0.5g 脱氧胆酸钠, 0.05g SDS, 0.105g NaF , 0.5ml NP-40 置于 100ml 烧杯中, 加入 40ml 去离子水, 定容至 50ml。

1.3.11. 5×电泳液缓冲液

称取 7.55 g Tris, 37g Glycine, 2.5g SDS (电泳级), 加入约 450 ml 去离子水搅拌溶解。定容至 500 ml, 4℃ 保存。使用前 5 倍稀释。

1.3.12. 10×丽春红储存液

称取 2 g 丽春红, 30 g 三氯乙酸, 30 g 磺基水杨酸, 溶于 100 ml。

1.3.13. 转膜缓冲液

称取 3.03 g Tris, 14.4g 甘氨酸溶于 800ml 的去离子水中, 加入甲醇至 1000ml。现用现配。

1.3.14. Apollo 染色反应液

混合顺序依次为去离子水 469 μl 、Apollo 反应缓冲液 (试剂 B) 25 μl 、Apollo 催化溶液 (试剂 C) 5 μl 、Apollo 荧光染料溶液 (试剂 D) 15 μl 、Apollo 缓冲添加剂 (试剂 E) 5 mg。

1.4. 主要仪器

激光共聚焦显微镜	日本 Olympus 公司 FV-1000
恒温摇床	上海予腾生物科技有限公司
Eppendorf research plus 移液器	德国 Eppendorf 公司
电泳仪	上海天能科技有限公司 EPS300 型
全自动化学发光成像分析系统	上海天能科技有限公司 Tanon5200
冰冻切片机	德国 Leica 公司
高倍明场显微镜	日本 Olympus 公司 BX51
微量电动组织匀浆器	美国 Kimble 公司

2. 方法

2.1 总 RNA 的提取

- 1) 小鼠断头后迅速于冰上切取 mPFC 脑区；
- 2) 每 50-100 mg 组织加入 1 ml TRIzol，用电动匀浆器进行匀浆处理；
- 3) 4℃ 12,000rpm 离心 10 min，取上清。
- 4) 加入 0.2 ml 氯仿，剧烈振荡 15 s，室温放置 3 min。
- 5) 4℃ 12,000rpm 离心 15 min，取上层水相。
- 6) 加入 0.5 ml 异丙醇，室温静置 12 min。
- 7) 4℃ 12,000rpm 离心 10 min，吸弃上清。
- 8) 用 75% 乙醇洗涤 RNA 沉淀两次。每次 1 ml 75% 乙醇。
- 9) 室温放置干燥 RNA 沉淀，加入 100 μ l DEPC 水，用枪头吸打几次，55℃ 放置 10 min 使 RNA 溶解，-80℃ 保存。

2.2 转录组测序

1.2.1. 样本质检

样本质量达到二代测序文库构建要求，包括无降解，无凋亡，无污染，无杂带，无残留等；RNA 样本的 RIN (RNA Integrity Number) 值 ≥ 7.0 。

1.2.2. 样品检测

样品的检测由生工生物工程(上海)股份有限公司使用 IlluminaHiSeq 2500 平台完成；主要实验参数如下：

- 1) 使用 TruSeq RNA 样本准备试剂盒(Illumina)给 mPFC 样品的 1 μ g 总 RNA 加 poly-A 尾；
- 2) 将包含 7 个核苷酸接头连接到双链 cDNA；
- 3) 使用酶促反应纯化 DNA 并使用 AMPureXP(Beckman Coulter Genomics)免疫磁珠分离大小合适的 DNA 片段用以构建文库；
- 4) 文库浓度和片段大小的评价分别使用 DNA 高灵敏度试剂盒在 LabChipGX (Perkin Elmer) 平台和 qPCR KAPA 文库定量试剂盒 (KAPA Biosystems) 平台上进行；

- 5) 文库使用 Illumina HiSeq2500 平台进行测序;
- 6) 测序结果使用 Ensemble TopHat 1.4.1 版本进行比对。每 25bp 片段可以最多允许 2bp 的错配, 并将其与 20 个不同的基因组进行比对;
- 7) 转录丰度和可变剪切的分析使用 Cufflinks 1.3 版本, 并使用从 TopHat 中获得的 BAM 校准文件校准;
- 8) 使用生物信息学数据库 (DAVID, <https://david.ncifcrf.gov/>) 对检测到的基因进行功能注释。

1.2.3. 结果分析

采用 cufflinks 中的 cuffdiff 进行差异基因检验。筛选条件设为 $p \leq 0.05$ 。

2.3 小鼠睡眠剥夺

小鼠被放置在一个有 12 个平台 (直径 2.5 cm, 距离水面 1 cm) 的充满水的水箱中。这些平台的间距为 5 cm, 这样小鼠就可以自由地从一个平台移动到另一个平台。小鼠可以自由地获得水和食物。当动物进入快速眼动睡眠阶段时, 由于肌肉张力降低但平台的大小又不足够让小鼠卧下, 它就会掉入水中, 然后醒来。快速动眼睡眠剥夺的持续时间为 72 h, 这是在先前的研究基础上确定的。这种方法剥夺了 95% 的快速动眼睡眠, 有效地减少 31% 慢波睡眠时间。对照组小鼠不经历 S-DEP, 而是被饲养在同样但是没有水的装置中。

2.4 新物体识别和新位置识别实验

本测试中使用的是蓝色的圆柱体和立方体, 体积相同。实验在一个 25 cm 长, 25 cm 宽, 20cm 高的聚氯乙烯制成的盒子内进行, 测试时这个盒子被放入一个装有数码相机的隔音箱里。第 1 天, 每只小鼠在没有物体的情况下适应 10 min。第二天, 两个相同的圆柱体被对称地放置在盒子内 (训练试验)。第 3 天, 一个圆柱体被立方体所取代 (测试试验)。在训练和测试试验中, 允许小鼠自由探索 10 min, 并记录对每一个物体的探索时间。在新位置位置识别测试中, 两个圆柱体中一个位置不变, 另一个改变位置。每组实验结束后, 盒子的地板都用湿布擦拭, 然后用 70% 的乙醇擦拭。每组视频由一台与电脑相连的摄像机记录。每个物体的探索时间由软件 (上海吉量) 分析。TN/(TF + TN) 定义为“偏好指数” (TF: 用于探索熟悉的对象的时间;

TN: 用于探索新对象的时间)。

2.5 Morris 水迷宫

Morris 水迷宫在白色圆形罐中进行 (直径 120 cm, 高 50 cm), 里面盛有 20 cm 深的白色不透明的液态奶, 水温保持在 24℃。平台通常在水面以下 0.5 cm。在空间学习期间, 小鼠每天接受 4 次训练, 连续三天。每次试验采用不同的象限作为起始点。每次间隔时间为 3 h。在每一次试验中, 小鼠被允许最多搜索 60 s。如果它们在这段时间内没有找到隐藏的平台位置, 他们会被小心地引导至平台, 并允许在上面停留 30 s。第四天撤掉平台。老鼠的位置通过视频跟踪系统进行识别 (Any-Maze, Stoelting, IL)。

2.6 旷场实验

所用实验设备购自上海吉量软件有限公司, 型号 JBehv-LAM-4。摄像记录动物 15min 的行为。最后根据软件统计小鼠总的运动距离。

2.7 高架十字迷宫实验

实验设备采用的是上海吉量公司的装置 (DigBehv-EPMG), 由两个开放臂 (25×8×0.5 cm) 和两个闭臂 (25×8×12 cm), 一个共同的中央平台 (8×8 cm) 组成。该仪器离地面 50 cm 高。在测试前, 小鼠被允许在试验室进行 2 天的适应训练, 并通过每天两次的抚触来消除他们的紧张情绪。每一次测试中, 小鼠都被放置在中心平台处, 面对一个开放臂, 自由活动 5 min, 用固定在迷宫上方的摄像机拍摄小鼠的行为, 并通过视频跟踪系统进行分析。记录了小鼠进入开放臂和闭臂的次数和时间。

2.8 EdU 染色

- 1) 0.1mg EdU 溶于 100 μ l 生理盐水后, 小鼠腹腔注射, 开始睡眠剥夺实验;
- 2) 试验结束后, 小鼠用乙醚麻醉后, 经左心室分别灌入 0.9%生理盐水和 4%多聚甲醛;
- 3) 小心取出完整全脑后至 4%多聚甲醛后固定过夜;
- 4) 20%蔗糖、30%蔗糖依次脱水, 包埋剂包埋后行冰冻切片, 厚度为 10 μ m; 将脑片贴于阳离子包被的载玻片上, -80℃保存;
- 5) 室温放置 30 min 后, 4℃丙酮固定 10 min, PBS 清洗 3 次, 每次 5 min;

- 6) 2 mg/mL 甘氨酸清洗 10 min;
- 7) 加入 100 μ l 渗透剂(0.5% Triton X-100 的 PBS)脱色摇床孵育 10 min, PBS 清洗;
- 8) 加入 100 μ l 的 Apollo 染色反应液, 避光、室温孵育 30 min 后, 弃染色反应液;
- 9) 加入渗透剂(含 0.5% TritonX-100 的 PBS)清洗 2~3 次, 每次 10 min, 弃渗透剂;
- 10) 加入甲醇清洗 1~2 次, 每次 5 min, 弃甲醇。PBS 清洗一次;
- 11) 加入 100 μ l 1 \times Hoechst33342 染色反应液, 避光, 室温孵育 30 min 后, 弃染色反应液;
- 12) PBS 清洗 1~3 次, 洗脱 Hoechst33342 反应液;
- 13) 50% 甘油封片, 激光共聚焦显微镜下观察结果。

2.9 高尔基染色

- 1) 小鼠处死后快速取出全脑, 浸于高尔基染色工作液中, 室温浸染12天;
- 2) 全脑漂洗5min, 70%、96%和100%乙醇梯度脱水;
- 3) 乙醇和乙醚1:1混合液中脱水;
- 4) 振动切片机切取含有mPFC区脑片, 厚度120 μ m;
- 5) 去离子水漂洗5min, 16%氨水浸泡30 min;
- 6) 去离子水漂洗2min, 1%硫代硫酸钠浸泡7min;
- 7) 去离子水漂洗10min, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明30s;
- 8) 中性树胶封片, 显微镜明场下观察树突棘形态和数量。
- 9) 随机选择基树突进行成像。拍照和统计依照盲法进行。树突棘密度的计算方法是从细胞体开始每10 μ m树突一段, 计数树突棘。树突棘的形态学根据之前描述的标准分类:“瘦长”形有长颈和小脑袋;“矮胖形”的有一个大脑袋, 但没有脖子;“蘑菇”型有一个大脑袋, 粗脖子。来自同一基因型小鼠的神经元的值被合并在一起, 计算平均值。

2.10 Western Blot

- 1) 每 1mg 组织样本中加入 30 μ l 组织裂解液, 每 10⁵ 个细胞加入 50 μ l 组织裂解液, 超声波细胞粉碎仪匀浆 4 次(15%功率, 3s/次), 超声过程中组织保持在冰上, 避免超声产生的热量破坏样品;

2) 4℃, 12,000rpm 离心 20min, 收集上清液置于冰上。样本中加入 5×loading buffer, 混匀后于沸水中煮沸 10min;

3) 按下表中所需的液体体积配制 9% 分离胶;

试剂名称	9% 分离胶	3% 浓缩胶
H ₂ O	4.3ml	2.6ml
分离(浓缩)胶缓冲液	2.5ml	1ml
30% 丙烯酰胺	3.0ml	0.4ml
10% 十二烷基磺酸钠	90μl	40μl
10% 过硫酸铵	90μl	40μl
TEMED	10μl	6μl

4) 分离胶凝固后, 按上表中所需的液体体积配 3% 的浓缩胶;

5) 将胶板安放于电泳槽中, 注满电泳缓冲液后, 垂直地拔出梳子, 向泳道内加入蛋白样品。

6) 开始电泳, 分离不同分子量的蛋白;

7) 将裁剪好的 PVDF 膜加入甲醇中活化, 以“黑胶白膜”的朝向放置凝胶和 PVDF 膜;

8) 冰浴中转膜, 100V 恒压 100min;

9) 转膜结束后, 丽春红染色并剪下目的条带, 用 PBST 洗去丽春红, 5% 的脱脂奶粉中室温封闭 1h;

10) 向膜加入用 PBST 稀释好的一抗, 4℃ 孵育过夜;

11) 漂洗未结合的一抗;

12) 加入用 TBST 稀释好的二抗, 室温孵育 1h;

13) 漂洗未结合的二抗;

14) 将发光液试剂盒中试剂 A 和试剂 B 避光等量混匀, 均匀浇于膜上, 在 Tanon5200 全自动化学发光成像分析系统上检测, 并保存图像。

2.11 ELISA

1) 用 50000pg/ml 的标准品配制浓度依次为 6000,3000,1500,750,375,187.5,93.75, 0pg/ml 的标准品;

2) 将 10× 的捕获抗体和 10× 的检测抗体用抗体稀释液稀释 10 倍成为抗体工作液;

- 3) 每孔加入样品或标准品 50 μ l, 加入抗体工作液 50 μ l, 室温 400 rpm 孵育 1h;
- 4) 倒置、轻磕 96 孔板, 用洗涤液清洗 3 次, 每次使用 200 μ l;
- 5) 每孔加入 100 μ l TMB 底物, 室温避光 400 rpm 孵育 10 min;
- 6) 每孔加入 100 μ l 终止液, 450nm 波长检测吸光度, 绘制标准曲线;
- 7) 根据标准曲线计算 PGRN 浓度。

检测 TNF α 水平参照此方法。

2.12 脑室给药

- 1) 0.2%戊巴比妥钠麻醉小鼠;
- 2) 脑立体定位仪定位到脑室 (bregma 后 0.5mm, 左右 2mm, 深 2.2mm);
- 3) 用牙科水泥固定套管和覆盖去除皮肤后暴露的头骨表面;
- 4) 手术后小鼠单笼饲养, 恢复 3 天;
- 5) 在 S-DEP 实验开始前, 小鼠通过套管以 1 μ l/min 的速度向脑室注射重组 PGRN (5 ng 溶于 5 μ l 0.9%生理盐水) 或 TNF α (10 ng 溶于 5 μ l 0.9%生理盐水), 对照组注射 5 μ l 0.9%生理盐水。

3. 结果

3.1. *FMRI* KO 小鼠脑内 PGRN 水平明显增加

3.1.1. 高通量结果显示 *FMRI* KO 小鼠脑内 PGRN 水平明显升高

FMRP 可以结合的 mRNA 多达数千种, 这其中包括很多转录因子, 同时 FMRP 也可以和 miRNA 结合参与转录后调控。为了研究 *FMRI* KO 小鼠脑内究竟哪些基因表达发生了变化, 采用了高通量测序的方法检测了 *FMRI* KO 与 WT 小鼠 mPFC 脑区的转录组。结果显示 *GRN* 的 mRNA 在 *FMRI* KO 小鼠 mPFC 脑区显著升高, 并通过 ELISA 测定 PGRN 含量验证, 发现 PGRN 在 mPFC 升高而在海马区没有差异 (Figure 1-1A-E)。

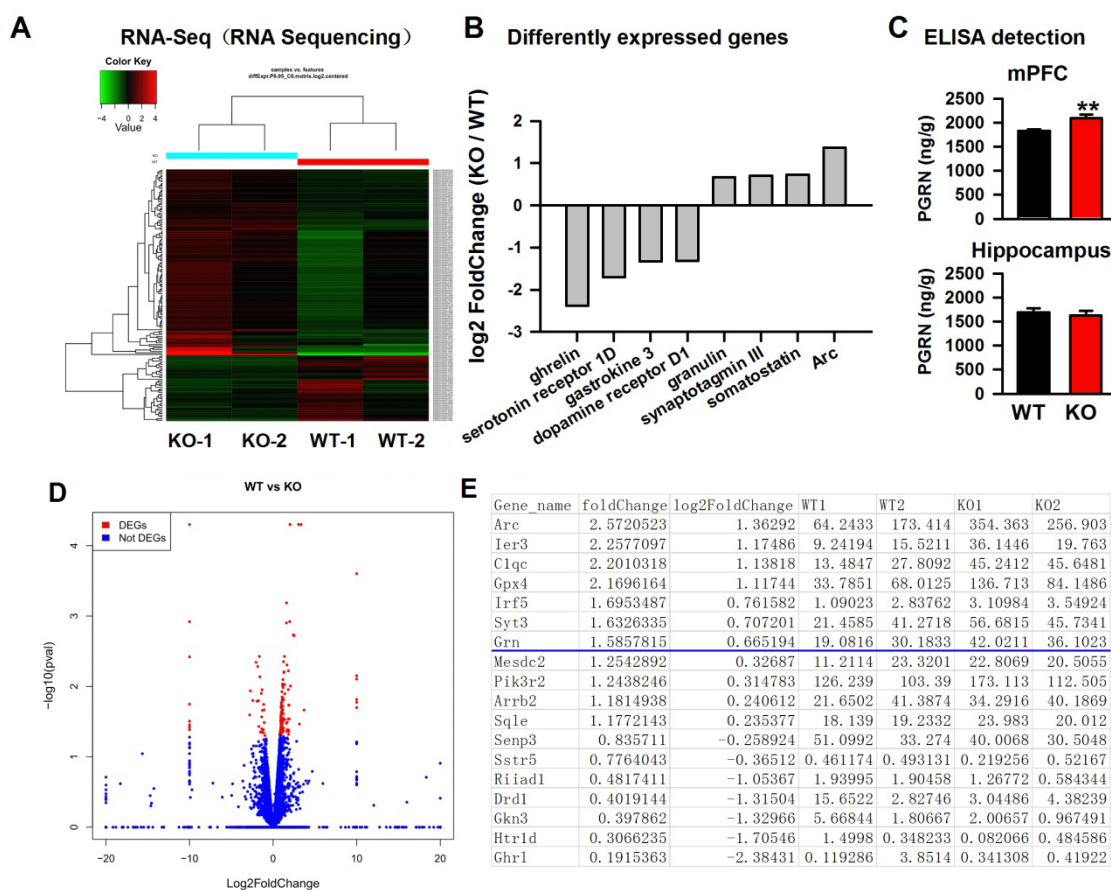


Figure 1-1. Increased PGRN level according to high throughput sequencing.

(A) Heatmap comparing mRNA of mPFC from KO and WT mice according to the RNA sequencing results. (B) Levels of mRNAs in KO mice compared with WT mice according to the RNA sequencing results. (C) Levels of PGRN were higher in mPFC, but not in hippocampus, detected by ELISA. $n = 6$ mice per genotype. (D) Volcano plot displaying differential expression of mRNAs in WT and KO mice. X-axis displays fold change while the Y-axis displays the significance (p -value). (E) Changes of mRNA levels in the mPFC between WT and KO mice.

3.1.2. *FMRI* KO 小鼠 mPFC 脑区 PGRN 蛋白水平增加

PGRN 是一种分泌糖蛋白生长因子，可以在 N 端发生糖基化。根据糖基化状态可以将 PGRN 分为未成熟亚型 (58-68 kD) 和完全糖基化成熟分泌亚型 (90 kD)^[186]。为了验证 *FMRI* KO 小鼠 mPFC 脑区是否也有不同程度糖基化的 PGRN，我们检测了 15 kD 至 250 kD 范围内的 PGRN。和文献报道的一样^[187]，WT 与 KO 小鼠脑内均有未成熟亚型 (58-68 kD) 和完全糖基化成熟分泌亚型 (90 kD) 的 PGRN (Figure 1-2)。由于分泌到细胞外的 PGRN 是完全糖基化的，通常认为这是成熟状态的 PGRN (90 kD)，所以在后续的研究中我们检测的是此分子量 (90 kD) 的 PGRN。同时 KO 小鼠

mPFC 中未成熟型和成熟型的 PGRN 水平均高于 WT 小鼠,这与高通量测序和 ELISA 的结果一致。

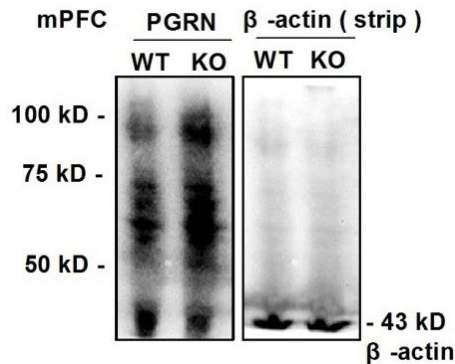
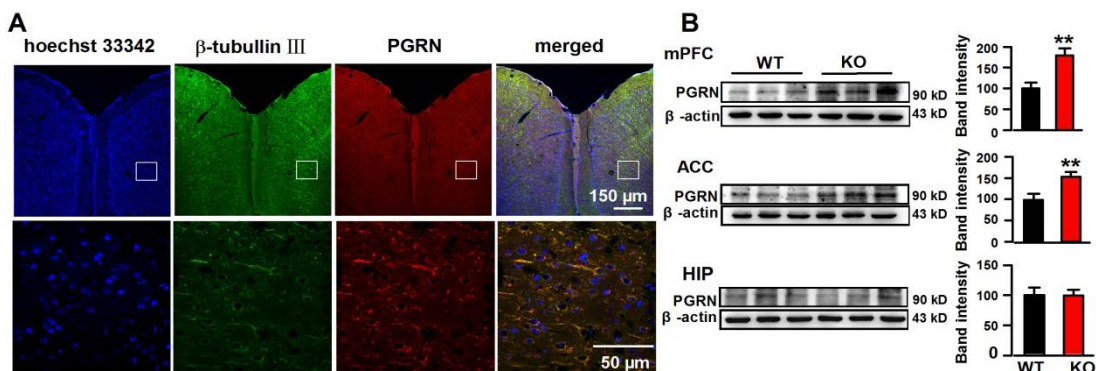


Figure 1-2. Sample showing different molecular weights of PGRN in mPFC.

免疫荧光染色显示小鼠 mPFC 脑区神经元 PGRN 广泛表达在胞浆中 (Figure 1-3A)。为了进一步确定 WT 和 KO 小鼠 PGRN 水平是否存在差异,用 Western blot 检测了 mPFC、ACC 和海马区 PGRN 的表达,发现与 WT 小鼠相比, KO 小鼠 mPFC 和 ACC 脑区中 PGRN 表达显著增加,而在海马区却没有明显差别 (Figure 1-3B)。为了研究 PGRN 水平在不同发育阶段的变化,分别取了出生后 3、7、14、28、56 天小鼠的 mPFC,采用 Western blot 检测 PGRN 水平。结果显示 PGRN 水平在第 14 天达到峰值,随后开始下降。KO 小鼠 mPFC 的 PGRN 水平明显高于出生相同天数的 WT 小鼠 (Figure 1-3C)。体外培养神经元,发现培养 7 天和 14 天的 KO 小鼠神经元 PGRN 水平与 WT 神经元相比显著升高,与整体动物实验结果类似 (Figure 1-3D)。但是体外培养神经元的 PGRN 水平没有像小鼠脑内那样有一个明显的先增加后减少的波动,而是从 3 到 14 天持续增加,这可能因为体外培养的神经元相较于脑内神经元是一种 naive 的状态,需要大量的 PGRN 促进自身发育。



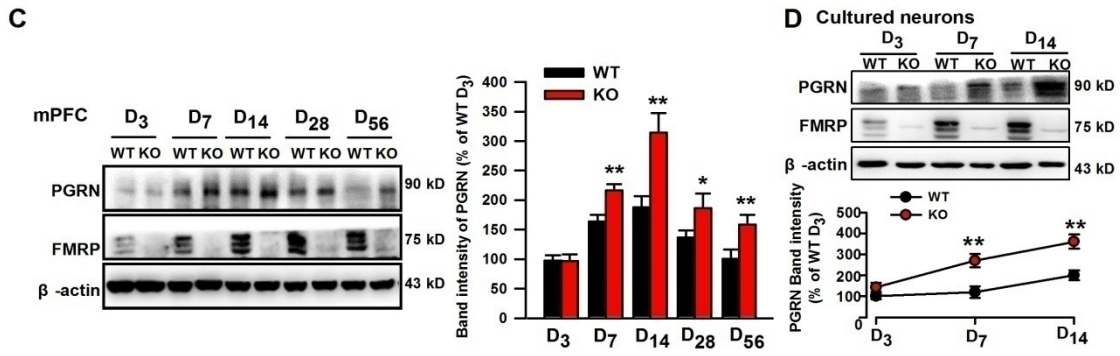


Figure 1-3. Increased PGRN level according to Western blot. (A) Representative images of mPFC sections stained for β -tubulinIII (green) and PGRN (red) in WT mice. Nuclei were showed by Hoechst 33342 (blue). Upper: scale bar = 150 μ M; Lower: scale bar = 50 μ M. (B) Westernblot showed that levels of PGRN were higher inmPFCand anterior cingulate cortex (ACC) of KO mice compared to WT mice. No significant difference of PGRN expression was found in hippocampus between WT and KO mice. n = 6 mice per genotype. (C) Developmental changes of PGRN levels in WT and KO mice. n = 5 mice per genotype. (D) Changes of PGRN levels with culture time in WT and KO neurons. n = 5 dishes per genotype. Unpaired Student's *t*test; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus WT mice or neurons.

GSK3 β 是 KO 小鼠脑内一个标志性的过表达蛋白^[188]。实验结果显示，与 WT 小鼠相比，KO 小鼠 mPFC 中 GSK3 β 表达明显升高 (Figure 1-4A, B)，与文献报道的结果一致^[71, 189]，这提示小鼠模型是成立的。同时 PGRN 与 TNF α 可能共用受体^[163, 190]，所以 TNF α 水平也有可能影响 PGRN 的功能，所以又检测了 WT 和 KO 小鼠 mPFC 的 TNF α 水平。结果显示 TNF α 水平在 KO 和 WT 小鼠之间没有区别 (Figure 1-4A, C)。

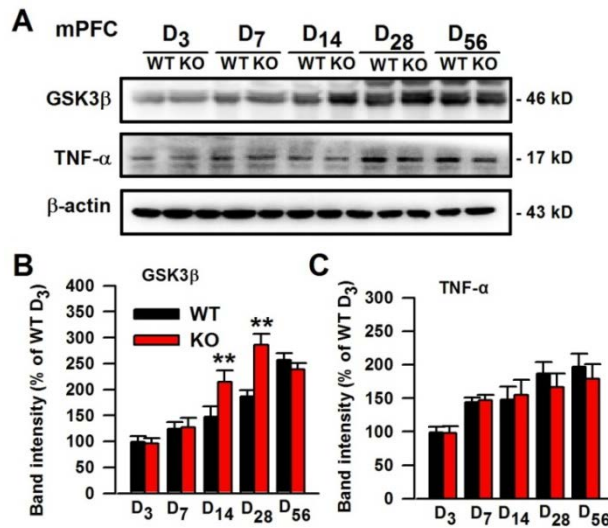


Figure 1-4. (A) Responsive images showing the levels GSK3 β and PGRN. (B) The levels of GSK3 β were higher in the KO mPFC than that in the WT mice between postnatal Day 14 and Day 28. (C) The levels of TNF α increased during the postnatal 8 weeks, but had no difference between the WT and KO mice. Unpaired Student's *t*test; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus WT mice or neurons.

除了 Western blot, 又使用 ELISA 分别对组织和血浆中的 PGRN 和 TNF α 水平进行了测定。结果显示 WT 和 KO 小鼠海马区 PGRN 水平没有差异 (Figure 1-5A), 这与 Western blot 结果一致; KO 小鼠血浆中 PGRN 水平低于 WT 小鼠 (Figure 1-5B), 这与 mPFC 的结果相反, 提示脑组织和血浆中 PGRN 水平的调控可能存在不同的机制; WT 和 KO 小鼠 mPFC 和血浆中 TNF α 水平均没有差异 (Figure 1-5C, D), 这说明 PGRN 和 TNF α 水平的调控可能是两个独立的过程, 一个水平升高并不一定会引起另一个水平变化。

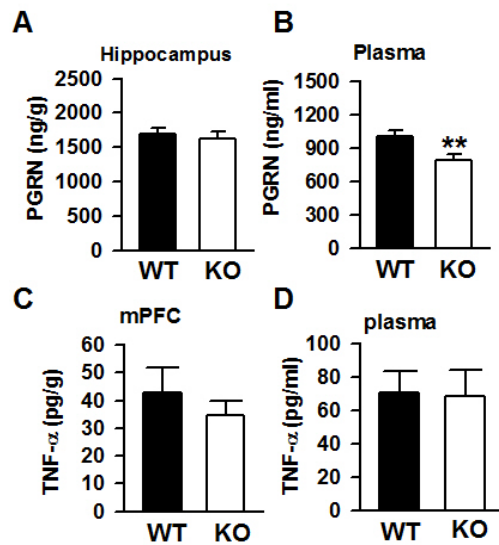


Figure 1-5. PGRN levels in hippocampus(A)and plasma(B) were detected by ELISA. TNF α levels in mPFC (C)and plasma(D) were detected by ELISA. n = 6 mice per genotype.Unpaired Student's *t*test;* p < 0.05, ** p < 0.01 versus WT mice or neurons.

由于神经元和小胶质细胞是 PGRN 的主要来源^[191], 为了探究 KO 小鼠脑内过高的 PGRN 是来自神经元还是小胶质细胞, 分别在体外培养了神经元和小胶质细胞。实验结果提示 KO 神经元和小胶质细胞产生的 PGRN 均分别高于 WT 神经元和小胶质细胞 (Figure 1-6A)。体外实验得到了类似的结果。检测它们向培养基中分泌的 PGRN 水平后发现了相同的情况 (Figure 1-6B)。有意思的是在小胶质细胞的培养液中我们检测到了两种分子量的 PGRN (50kD 和 90kD), 但是在神经元的培养液中我们仅检测到了分子量为 90kD 的 PGRN, 这提示在小胶质细胞和神经元分泌的 PGRN 中可能存在不同的信号途径。

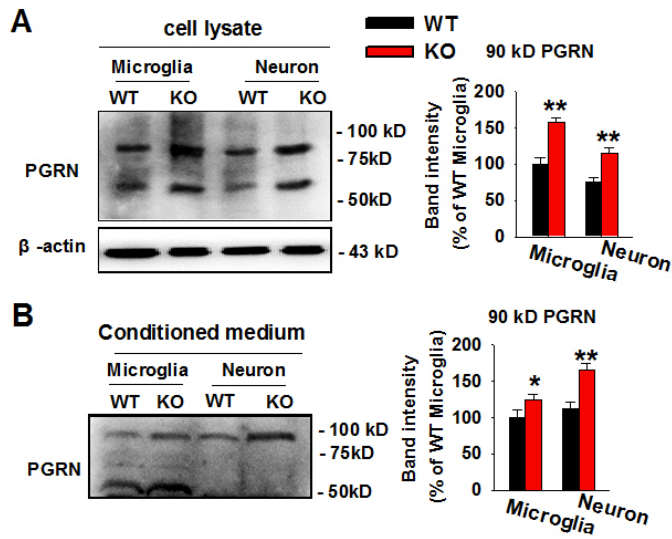


Figure 1-6. (A) Sample showing PGRN was increased in both microglia and neuron lysate from KO mice. (B) Sample showing PGRN in conditioned culture medium was increased both microglia and neuron from KO mice. $n = 5$ dishes in each group. Unpaired Student's *t* test; ** $p < 0.01$ versus WT.

为了研究 PGRN 的功能，需要调节神经元内 PGRN 的水平。外源性的重组小鼠 PGRN（义翘神州，货号 50396-M08H，表达自 HEK293 细胞）和 PGRN siRNA 分别被用来观察升高和降低 PGRN 水平后神经元发育的变化。为了验证重组 PGRN 的活性检测了它的分子量，实验结果显示其分子量在 90 kD 附近，并可以激活 ERK1/2 和 AKT 信号通路（Figure 1-7）。这说明购买的 PGRN 是成熟的且具有活性。

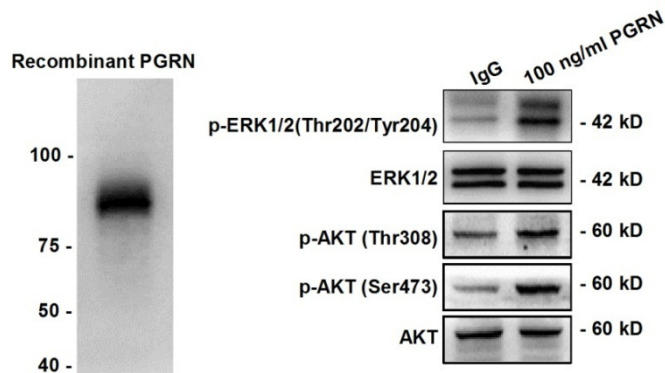
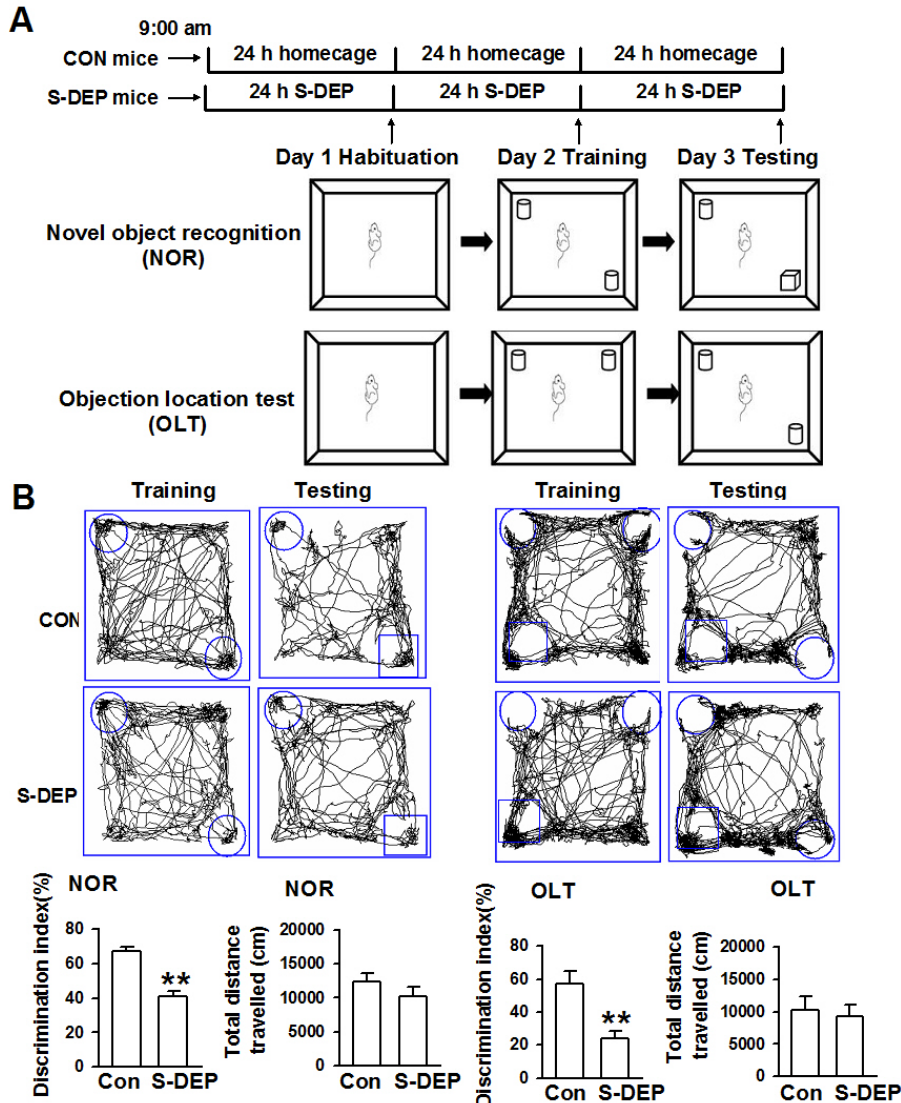


Figure 1-7. Left: sample showing molecular weight of purchased recombinant PGRN. Right: sample showing recombinant PGRN activated ERK and AKT pathways when treated cultured neurons. $n = 5$ dishes in each group. Unpaired Student's *t* test; ** $p < 0.01$ versus IgG treated group.

3.2. PGRN 通过阻断 TNF α 通路缓解 S-DEP 引起的学习记忆障碍和焦虑样行为

3.2.1. 睡眠剥夺 (sleep deprivation, S-DEP) 引起学习记忆障碍

已经证明了在 *FMRI* KO 小鼠中 PGRN 水平升高并不影响 TNF α 水平, 同时也有研究结果表明两者的信号通路有密切联系^[163], 推测两者可能存在一个平衡, 这个平衡的失调可能就是导致学习记忆障碍的原因。为了验证这个平衡系统的存在, 使用了小鼠的 S-DEP 模型, 因为 FXS 患者同样也有睡眠障碍^[192]。如果 PGRN 和 TNF α 参与调节 S-DEP 引起的学习记忆损害, PGRN 和 TNF α 可能也参与调控 *FMRI* KO 小鼠学习记忆的损害。有文献报道, S-DEP 时 TNF α 水平升高, 学习记忆受损^[193]。水平台 S-DEP 72 h, 用新物体识别、新位置识别和 Morris 水迷宫检测小鼠行为学表现, 发现动物学习记忆受损, 提示我们模型建立成功 (Figure 2-1A-D)。



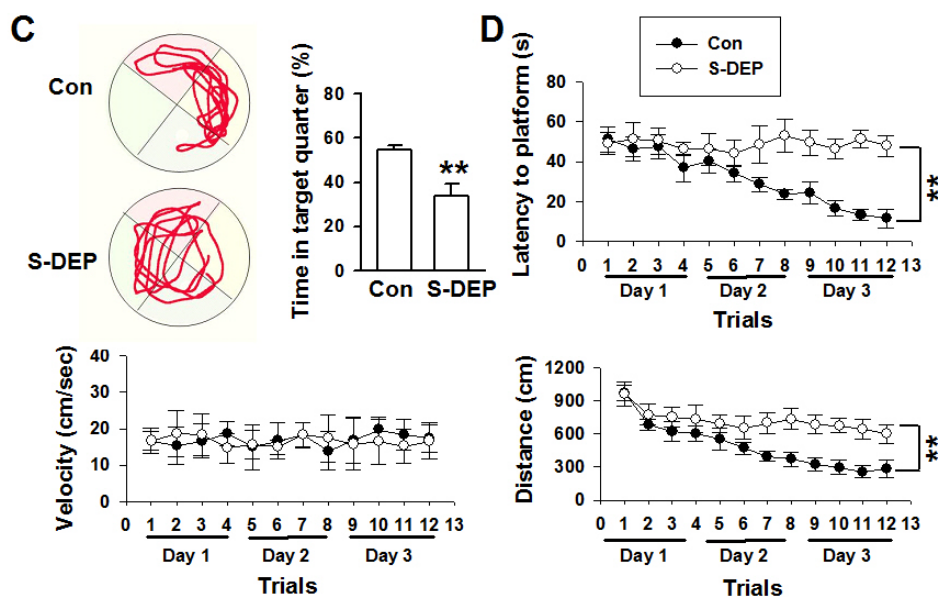


Figure 2-1. Sleep deprivation induced memory impairment.

(A) Schematic of the novel object recognition test. (B) Left: sample traces of locomotor activity in the novel object recognition test for Control (Con) and S-DEP mice respectively, preference index toward a novel object, and total distance travelled were summarized. Right: sample traces of locomotor activity in the object location test for Control (Con) and S-DEP mice respectively, preference index toward a novel location and total distance travelled were summarized. (C) Left: Representative swimming paths in the water maze during the probe trial on day 3. Right: Percentage of time spent in the target quadrant of the water maze. (D) Latency to located platform position, velocity, and travelled distance during the learning phase of the water maze task. $n = 10$ per group; unpaired Student's *t* test or repeated measures ANOVA, $*p < 0.05$ versus control mice.

3.2.2. S-DEP 引起小鼠焦虑样行为

开放场和高架十字迷宫实验是两种检测小鼠焦虑样行为的方法^[194]。结果显示 S-DEP 小鼠相较于对照组小鼠表现出中央活动时间减少 (Figure 2-2A, B), 开放臂进入次数减少 (Figure 5C, D), 出现明显的焦虑样行为。

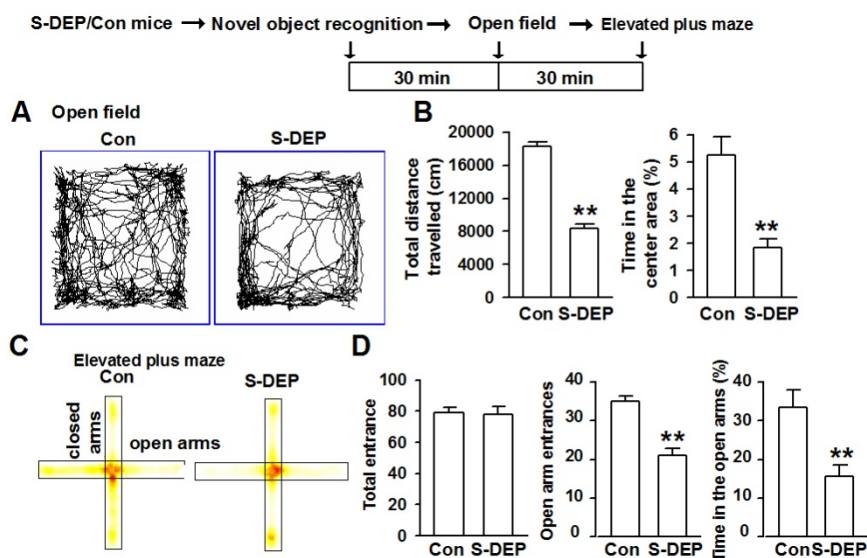


Figure 2-2. Sleep deprivation induced anxiety-like behaviors.

(A) Sample traces of locomotor activity in the open field test. (B) S-DEP significantly reduced the total distance traveled and time spent in the center area. $n = 10$ mice per group. (C) Sample traces of locomotor activity in the elevated plus maze test. (D) S-DEP significantly reduced the entrance to open arms and time spent in the open arms. $n = 10$ mice per group; unpaired student t test, $**p < 0.01$ versus control group.

3.2.3. PGRN 和 $TNF\alpha$ 参与了 S-DEP 引起的学习记忆障碍和焦虑样行为

接下来使用了 Western blot 对 S-DEP 小鼠海马区 PGRN 和 $TNF\alpha$ 水平进行了检测，结果显示睡眠剥夺后 PGRN 水平降低， $TNF\alpha$ 水平升高，二者之比显著降低 (Figure 2-3A, B)。IKB α 是 $TNF\alpha$ 的下游信号通路， $TNF\alpha$ 促进 IKB α 磷酸化，对 NF κ B 去抑制，激活炎症反应。睡眠剥夺后此信号通路激活 (Figure 2-3C, D)。当睡眠剥夺小鼠再进行恢复性睡眠后 PGRN 水平升高和 $TNF\alpha$ 水平降低 (Figure 2-3E, F)，和睡眠剥夺时相反。这提示 PGRN 和 $TNF\alpha$ 水平与 S-DEP 引起的学习记忆障碍密切相关。

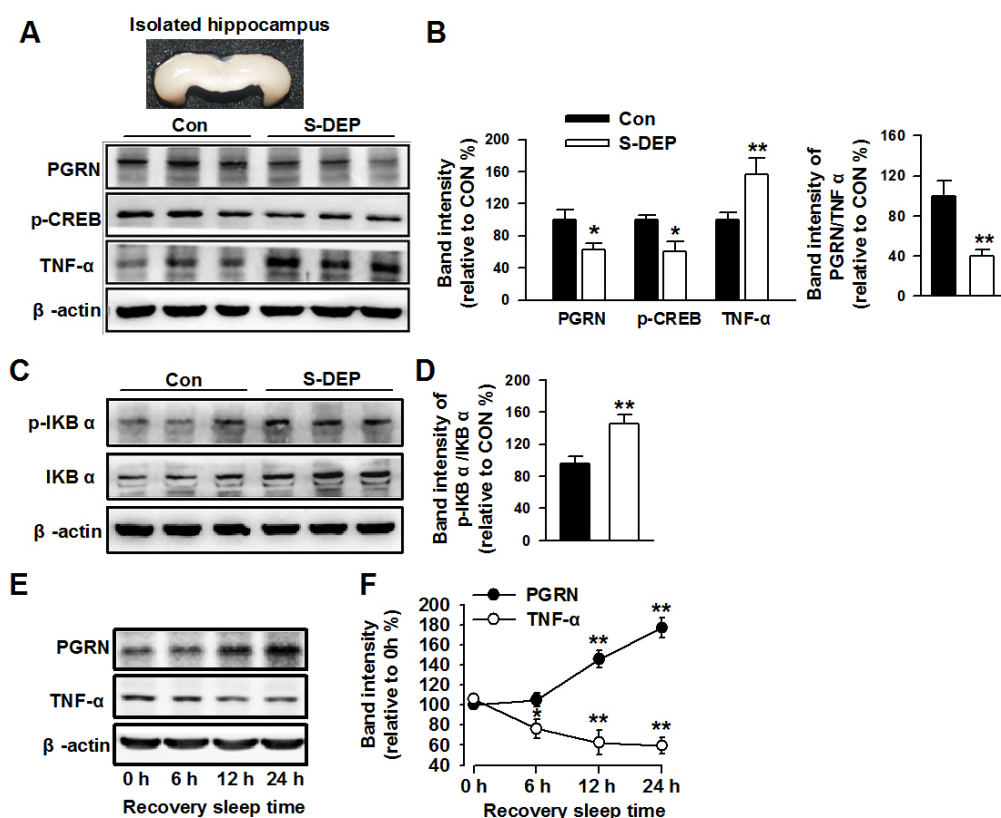


Figure 2-3. Effects of sleep deprivation on the levels of TNF α and PGRN.

(A) Western-blot samples of PGRN, p-CREB, and TNF α . (B) Band intensities were quantified as percentage of values from Con mice hippocampus. (C) Western blot samples of p-I κ B α and I κ B α . (D) Band intensities were quantified as percentage of values from control mice hippocampus. $n = 6$ mice per group; unpaired student t test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus control mice. (E) Western blot samples of PGRN and TNF α after recovery sleep. (F) Band intensities were quantified as percentage of values from 0 hour recovery sleep mice. $n = 4$ mice per group; unpaired Student's t test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus 0 hour recovery sleep mice.

3.2.4. 调节 PGRN 和 TNF α 水平可以纠正 S-DEP 引起的学习记忆障碍和焦虑样行为

为了纠正 S-DEP 小鼠 PGRN 和 TNF α 水平的失衡, 采用了脑室注射 PGRN 重组蛋白和/或腹腔注射 TNF α 合成抑制剂 Thalidomide 的方法 (Figure 2-4A, B)。结果显示 Thalidomide 可以显著降低 S-DEP 小鼠的 TNF α 水平而不影响 PGRN 水平 (Figure 2-4C), 改善 S-DEP 小鼠的学习记忆并缓解小鼠的焦虑样行为, 这种作用可以被外源性 TNF α 取消 (Figure 2-4D, E), 这说明 S-DEP 小鼠学习记忆的损害和焦虑样行为是由于 TNF α 升高引起的。PGRN 可以纠正 S-DEP 小鼠的学习记忆障碍 (Figure 2-4D) 和焦虑样行为 (Figure 2-4E), 外源性 TNF α 同样也可以取消 PGRN 对 S-DEP 小鼠的

保护作用。PGRN 通过拮抗 $TNF\alpha$ 功能发挥作用，可能是通过抑制 $TNF\alpha$ 的产生也可能是直接拮抗 $TNF\alpha$ 下游的信号通路。PGRN 和 Thalidomide 两者联合使用时效果没有叠加效应 (Figure 2-4D, E)。

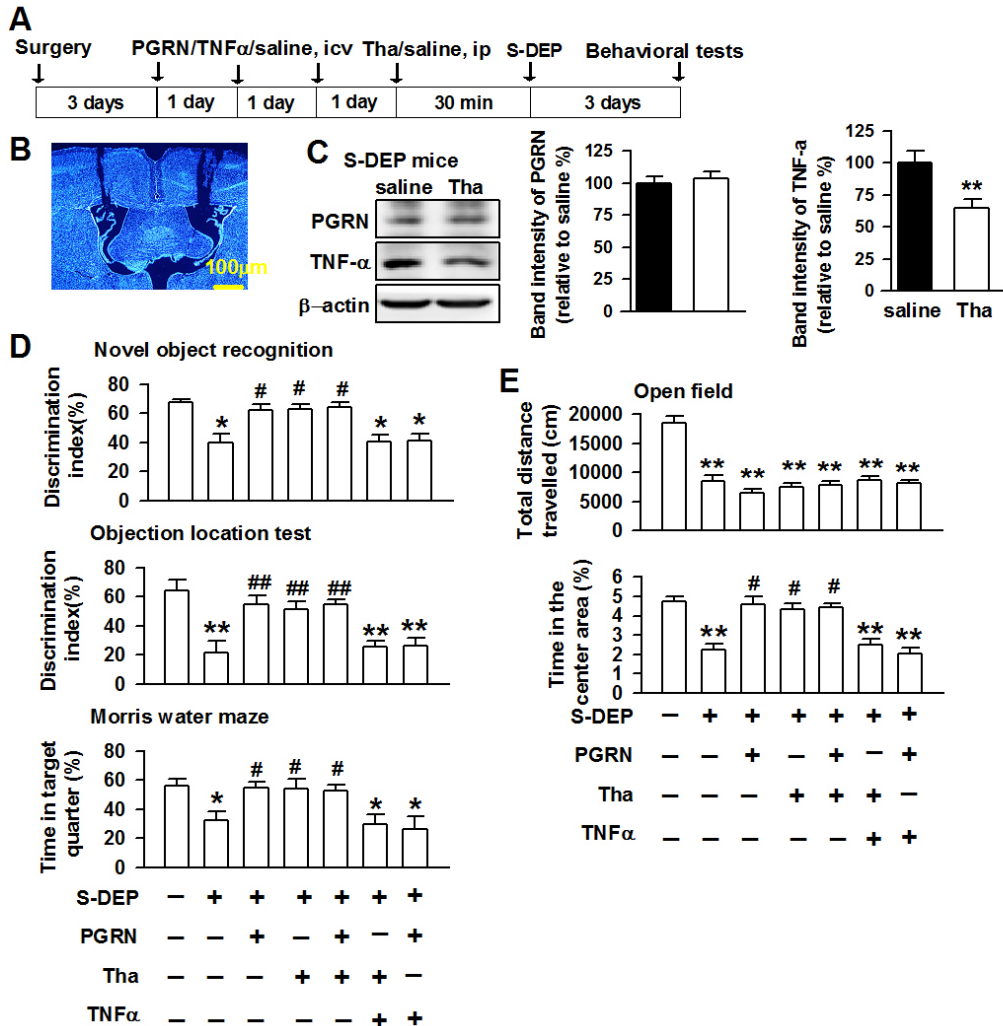


Figure 2-4. Blocking $TNF\alpha$ pathway attenuated memory impairment and anxiety-like behaviors. (A) Schematic of experimental procedures. (B) Sample of PGRN intraventricular injection (ICV) site. (C) Westernblot samples of PGRN and $TNF\alpha$ and band intensities after thalidomide (Tha) treatment in S-DEP mice. (D) Preference index of control, S-DEP, PGRN (ICV, 5 ng), and Tha (ip, 25 mg/kg) treated mice in novel object recognition test. (E) Locomotors activities and time spent in the center area of control, S-DEP, PGRN (ICV, 5 ng), and Tha (ip, 25 mg/kg) treated mice in open field test. $n = 6$ mice per group; one-way ANOVA with LSD test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus control mice, # $p < 0.05$ versus saline treated S-DEP mice.

3.2.5. PGRN 抑制 S-DEP 小鼠 $TNF\alpha$ 的产生

PGRN 究竟是通过抑制 $TNF\alpha$ 产生还是直接拮抗 $TNF\alpha$ 功能对 S-DEP 小鼠产生保

护作用呢？为了研究 PGRN 和 $\text{TNF}\alpha$ 两者之间的关系，对照小鼠和 S-DEP 小鼠分别给与 PGRN 后发现：在 S-DEP 小鼠，PGRN 可以抑制 $\text{TNF}\alpha$ 下游的信号通路 $\text{IKB}\alpha$ 磷酸化，却并不影响对照小鼠 p- $\text{IKB}\alpha$ 水平 (Figure 2-5A, B)。同时，PGRN 抑制 S-DEP 小鼠 $\text{TNF}\alpha$ 水平，在对照小鼠却没有此现象。而 $\text{TNF}\alpha$ 无论在 S-DEP 小鼠还是对照小鼠均不影响 PGRN 水平 (Figure 2-5C, D)。说明 PGRN 通过抑制 $\text{TNF}\alpha$ 产生对 S-DEP 小鼠产生保护作用，但是不能排除 PGRN 也参与 $\text{TNF}\alpha$ 下游信号通路的调节。

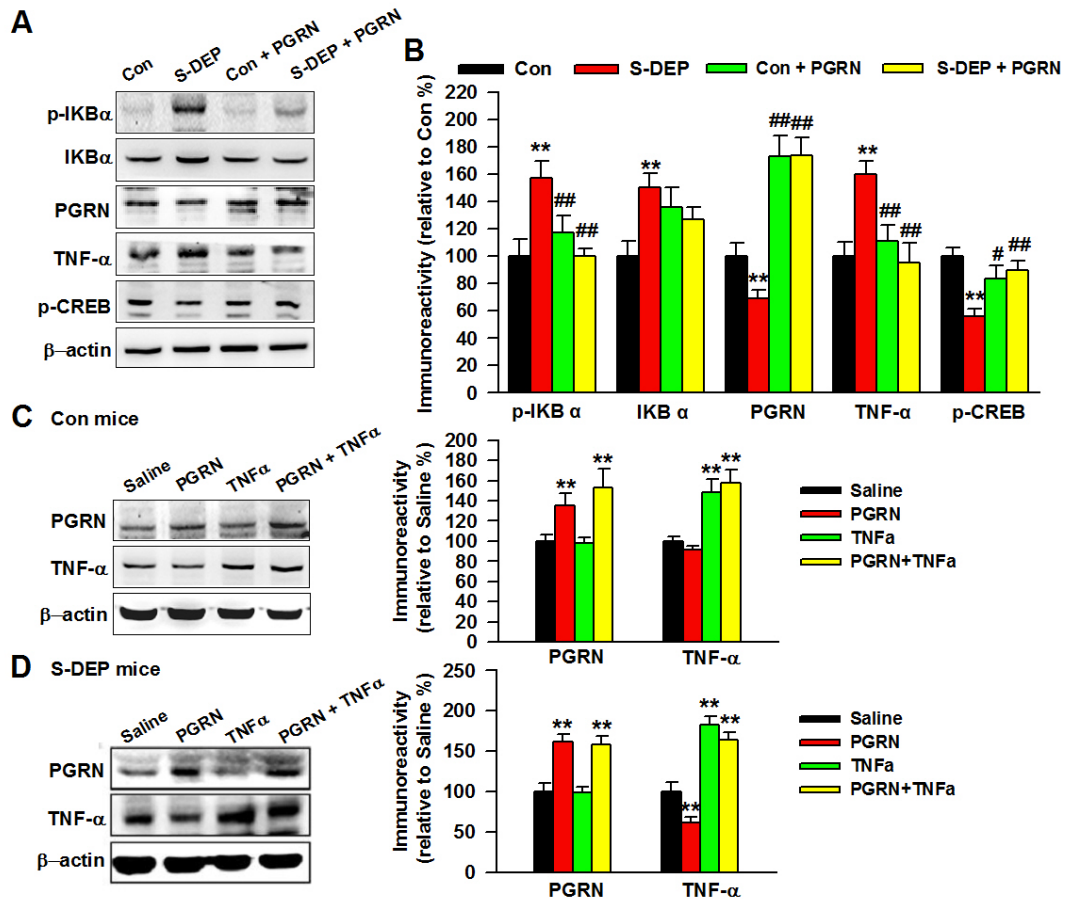


Figure 2-5. PGRN decreased $\text{TNF}\alpha$ production in S-DEP mice.

(A) Mice were sacrificed after behavior tests. The levels of p-I κ B α , I κ B α , PGRN, $\text{TNF}\alpha$, and p-CREB in hippocampus were detected by Western blot. (B) Band intensities were quantified as percentage of values from control mice. $n = 6$ mice per group, Two-way ANOVA with Bonferroni's Multiple Comparison Test; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus control mice, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ versus saline treated S-DEP mice. Levels of PGRN and $\text{TNF}\alpha$ in hippocampus were detected after exogenous PGRN and $\text{TNF}\alpha$ treatment in control mice (C) and S-DEP (D) mice. $n = 6$ mice per group; one-way ANOVA with LSD test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus control mice, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ versus saline treated S-DEP mice.

3.2.6. PGRN 调节树突棘密度

S-DEP 时会发生树突棘的丢失^[195]。高尔基染色是最常用的观察脑内神经元树突棘形态的方法。因为它的染色效率很低（仅有 5%作用），可以在复杂的神经网络中显示出单个完整神经元的结构，在高倍明场显微镜下可以清晰显示树突棘的数目和形态^[196]。为了进一步证明 PGRN 和 TNF α 水平对树突棘密度的影响，S-DEP 小鼠脑室注射重组 PGRN 或 TNF α ，取大脑进行了高尔基染色，结果显示 PGRN 可以显著纠正 S-DEP 小鼠树突棘的丢失，提高神经元树突棘的密度（Figure 2-6A, B）。

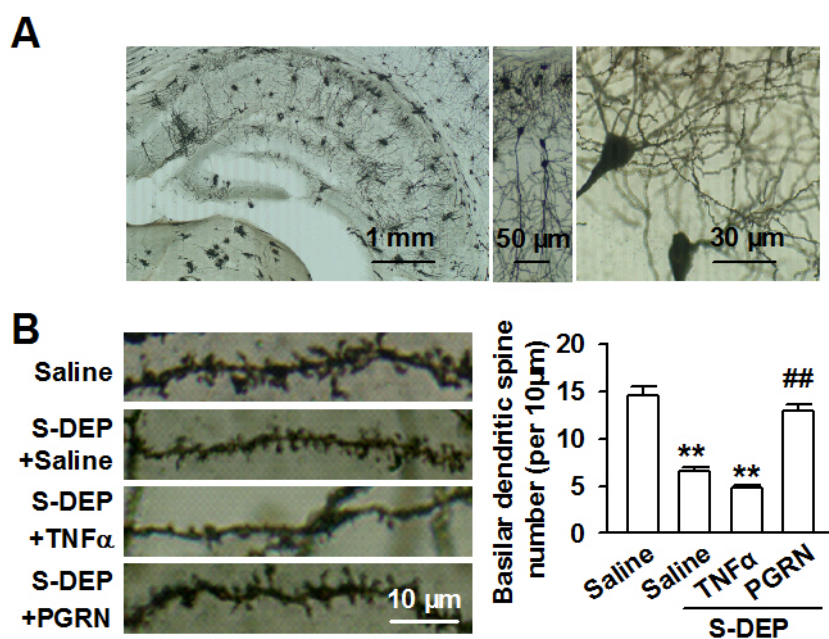


Figure 2-6. PGRN treatment reversed the spine density in CA1 area.

(A) Golgi-Cox-staining of CA1 pyramidal neurons for spine counting. (B) Left: Representative images of basilar dendrites from control, saline (ICV, 5 μ l) treated S-DEP, TNF α treated (ICV, 10 ng/5 μ l) S-DEP, and PGRN treated (ICV, 5 ng/5 μ l) S-DEP mice. Right: Summary of spine counts from basilar dendrites. $n = 40$ neurons/4 mice per group; two-way ANOVA with LSD test, ** $p < 0.01$ versus control mice, ## $p < 0.01$ versus saline treated S-DEP mice.

3.2.7. PGRN 促进神经元发生

小鼠产生新生神经元的两个区域是侧脑室的室管膜下区 (subventricular zone of the lateral ventricles, SVZ) 和海马齿状回颗粒下区 (subgranular zone of the dentate gyrus, SGZ)。SGZ 新生神经元对记忆的形成和抑郁状态有至关重要的作用^[197]。FXS 和 S-DEP 小鼠都存在新生神经元减少的现象^[198, 199]。PGRN 和 TNF α 水平对新生神经元有什么影响呢？EdU 作为一种核苷酸类似物，在 DNA 合成时被利用进入分裂期

的神经元，可以完成对神经干细胞的标记。再利用 EdU 的抗体进行免疫荧光染色，并可以指示出新生神经元的数目。结果显示脑室注射 PGRN 可以显著增加 S-DEP 小鼠 SGZ 新生神经元的数目 (Figure 2-7A, B)。

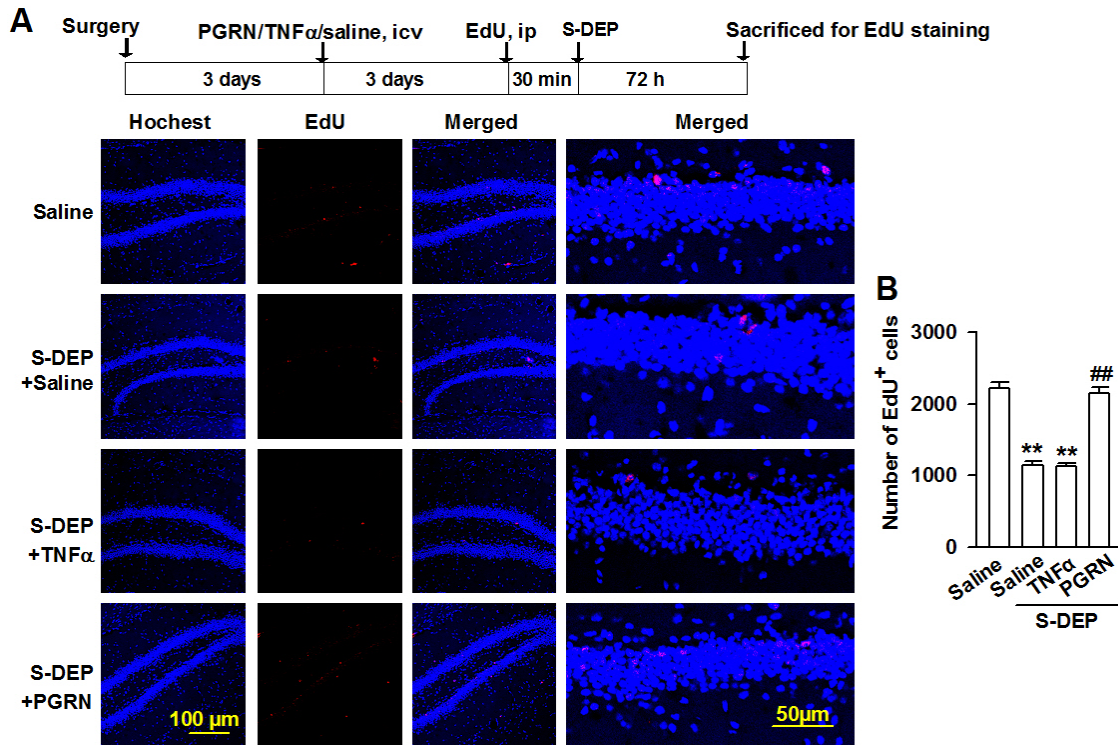


Figure 2-7. PGRN increased neurogenesis in S-DEP mice.

(A) Representative micrograph of double staining to identify newborn neurons (EdU/red) in the dentate gyrus of the hippocampus. Left: scale bar = 100 μ m; Right: scale bar = 50 μ m. (B) Number of EdU positive neurons in the dentate gyrus subgranular zone from control, saline (ICV, 5 μ l) treated, TNF α treated (ICV, 10 ng/5 μ l), and PGRN treated (ICV, 5 ng/5 μ l) S-DEP mice. n = 3 mice per group; one-way ANOVA with LSD test, ** p < 0.01 versus saline treated control mice, ## p < 0.01 versus saline treated S-DEP mice.

4. 讨论

PGRN 作为一种有抗炎作用的细胞因子，除了可以结合 TNFR1 和 TNFR2 受体外^[163]，它还可以抑制 TNF α 的产生^[190]。在本研究中，通过高通量测序我们发现 PGRN 可能参与了 *FMRI* KO 小鼠的突触可塑性异常，进一步实验证实了 *FMRI* KO 小鼠 mPFC 中 PGRN 的水平升高。但 PGRN 在中枢神经系统中的作用机制并不明确，同时它与 TNF α 相互作用，可能存在一个复杂的平衡调节。为了研究 PGRN 的功能以及它和 TNF α 的关系，我们使用了 S-DEP 模型。在这个模型中 PGRN 表达水平降低，

TNF α 水平升高。ICV 注入 PGRN 缓解 S-DEP 引起的学习记忆障碍和焦虑样行为，并抑制 TNF α 信号通路的激活。此外，PGRN 治疗逆转了 S-DEP 诱导的 SGZ 区神经发生障碍和 CA1 区树突棘缺失。在 S-DEP 小鼠中 PGRN 降低 TNF α 表达水平，但在正常小鼠中 PGRN 本身并不影响 TNF α 表达水平。TNF α 无论在正常小鼠还是 S-DEP 小鼠中均不影响 PGRN 表达水平。这提示两者在表达调控上存在一定独立性，但也有相关性。与 TNF α 相比，PGRN 对 TNFR2 显示了更高的亲和力^[163]。然而，PGRN 的下游信号通路仍然需要进一步研究。

PGRN 除了调控 TNF α 表达水平外，是否参与 TNF α 下游信号通路的调控？此外，PGRN 的升高与 FXS 的突触可塑性障碍又有什么联系？这些内容我们在第二部分进行了进一步研究。

小结

通过以上实验我们证明了 *FMRI* KO 小鼠的 PGRN 水平高于 WT 小鼠。PGRN 可以通过调节 $\text{TNF}\alpha$ 信号通路增加 S-DEP 小鼠神经元树突棘的密度, 促进神经元再生。PGRN 和 $\text{TNF}\alpha$ 之间关系密切, 不仅因为他们存在相同的受体——TNFR1 和 TNFR2, 而且 PGRN 还能调控 $\text{TNF}\alpha$ 表达水平。

第二部分 过量颗粒体蛋白通过 TNFR2 导致脆性 X 综合征突触可塑性异常

1. 材料

1.1. 实验动物

同第一部分。

1.2. 试剂和抗体

1.2.1. 试剂

NeurobasalTM 培养基、B-27TM 添加物、胎牛血清 (FBS) 和胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司; DMEM 高糖培养基购自 Hyclone; DMEM-F-12 培养基购自 Invitrogen 公司; 青链霉素购自 Millipore; 四甲基罗丹明 (TRITC) 标记的鬼笔环肽、多聚 L-赖氨酸 (PLL) 购自美国 Sigma 公司; RNA 反转录试剂盒购自 Thermo Fisher; ChIP Assay Kit 购自碧云天 (货号: P2078)。其他试剂参见第一部分。

1.2.2. 抗体

β -tubullin III 抗体购自 sigma 公司; GluA1、FMRP、p-GluA1_{ser845}、p-GluA1_{ser831} 抗体购自 Abcam 公司; ERK1/2、p-ERK1/2、JNK、p-JNK、RELB、RELA、mTor、p-mTor、p50、p52、p100、p105、pro-Caspase8、PARP、p-CREB、 β -catenin、p- β -catenin、AKT、p-AKT、MAP2 购自 Cell Signaling Technology 公司; 免疫印迹用 TNFR1、TNFR2 抗体购自美国 Santa Cruz 公司; 中和抗体试验用 TNFR1、TNFR2 抗体购自 BioLegend; 荧光二抗购自康为世纪公司; 其他抗体参见第一部分

1.3. 溶液配制方法

1.3.1. 神经元接种培养基

含有 20% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基。

1.3.2. 100×谷氨酰胺储备液

称取 0.3 g 谷氨酰胺溶解于 20mlPBS 缓冲液中，过滤除菌后分装在 1.5 ml 的 EP 管中，-20℃ 储存。

1.3.3. Neurobasal 培养基

含有 2% B-27™ 添加物和 5 mM 谷氨酰胺的 Neurobasal™ Medium。

1.3.4. 小胶质细胞培养基

DMEM- F-12 培养基，添加 2mM L-谷氨酸，1mM 丙酮酸钠，10%胎牛血清和 0.5%双抗溶液。

1.3.5. 多聚赖氨酸包被液

含有 25μg/ml 多聚赖氨酸的去离子水，过滤除菌。

1.3.6. 2.5%胰蛋白酶

取 0.25 g 胰蛋白酶溶于 10mlPBS 中，过滤除菌后分装于-20℃ 保存备用。

1.3.7. 切片液

0.37g KCl、0.11g CaCl₂、4.2g NaHCO₃、1.44g MgSO₄、3.6g Glucose、0.29g NaH₂PO₄ 和 172.52g Sucrose，溶于去离子水中，调 PH 至 7.4，最后定容至 2L。

1.3.8. 电极内液

4.6g Cs-gluconate、0.0432g NaCl、0.952g BAPTA、0.0314g Na₃-GTP、0.0152g Na₄-EGTA、0.9532g HEPES、0.0304g Mg-ATP、0.1716g OX-314-Br 和 0.1656g TEA-Cl，溶解 160 ml 去离子水中，调节 pH 至 7.2，Glucose 调渗透压为 290 mOsmol，定容至 200ml，-20℃ 保存。

1.4. 主要仪器

Med 恐惧制约系统	美国 Med Associates 公司
高倍明场显微镜	日本 Olympus 公司 BX51
微量电动组织匀浆器	美国 Kimble 公司
MED64 平面微电极矩阵记录系统	日本 Alpha MED Scientific 公司
玻璃微电极	美国 Axon 公司

振动切片机	美国 Vibratome 公司 1000 Plus
微电极控制仪	美国 Sutter 公司
Real-Time PCR 仪	美国 Applied Biosystems 公司 PRISM 7500
64 通道微阵列	日本 Alpha Med Scientific 公司 P515A
Qubit [®] 2.0 荧光计	美国 Invitrogen 公司

2. 方法

2.1 脑片免疫荧光染色

- 1) WT 或 KO 小鼠用乙醚麻醉后,经左心室分别灌入 0.9%生理盐水和 4%多聚甲醛;
- 2) 小心取出完整全脑后至 4%多聚甲醛后固定过夜;
- 3) 20%蔗糖、30%蔗糖依次脱水,包埋剂包埋后行冰冻切片,厚度为 15 μm ; 将脑片贴于阳离子包被的载玻片上, -80°C 保存;
- 4) 含有 0.3% Triton X-100 的 5%山羊血清室温封闭 0.5h;
- 5) 一抗 (anti-PGRN, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$; anti- β -tubullin III, 1:500) 稀释于 0.1% Triton X-100 的 10%山羊血清,滴加到脑片上, 4°C 孵育过夜;
- 6) PBS 漂洗 3 次后;
- 7) 荧光二抗和 Hoechst33342 稀释于 0.1% Triton X-100 的 10%山羊血清,滴加到脑片上,室温避光孵育 3 h;
- 8) PBS 漂洗 3 次;
- 9) 50%甘油封片,共聚焦显微镜观察。Hoechst 激发波长为 350nm,发射波长为 461nm。

2.2 细胞免疫荧光染色

- 1) 种植于玻片上的细胞培养至第14天时,吸弃培养液,适量冰冷PBS漂洗3次;
- 2) 4%的多聚甲醛固定20min;
- 3) PBS漂洗3次;
- 4) 0.1% TritonX-100的10%山羊血清室温封闭0.5 h;
- 5) 一抗 (β -tubullin III, 1:1000) 稀释于0.1% Triton X-100的10%山羊血清,滴加到细胞爬片上,置于湿盒内 4°C 孵育过夜;

- 6) 用PBS漂洗3次;
- 7) TRITC-phalloidin 1 μ g/ml, FITC标记的山羊抗小鼠荧光二抗和终浓度为10 μ g/ml的Hoechst33342 (衬染胞核) 稀释于0.1% Triton X-100的10%山羊血清, 滴加到细胞爬片上, 室温避光孵育2 h;
- 8) PBS漂洗3次稍晾干;
- 9) 50%甘油封片, 激光共聚焦显微镜下观察结果。

在三次独立的实验中, 对免疫荧光染色的图像进行分析。每个实验使用三个以上的玻片来获得神经元的样本进行分析。分析树突棘的方法参见高尔基染色。

2.3 原代皮层神经元培养

- 1) 加入适量多聚赖氨酸包被液于培养皿, 至少盖住底面, 置孵箱中静置 4h 后, 回收包被液, 培养板用无菌水清洗两遍, 备用; 取孕 15 天孕鼠, 脱颈处死, 取出胎鼠置于盛有 D-Hank's 缓冲液的培养皿中, 显微镜下分离出皮层;
- 3) 组织块于 0.25% 胰蛋白酶中消化 20 min;
- 4) 终止消化后用滴管在神经元种植培养基中轻轻吹打组织块 5 min, 过 200 目筛网, 滤掉未消化的组织块;
- 5) 细胞计数后接种于多聚赖氨酸包被过的培养板中, 接种密度为 6 孔板每孔 2×10^6 个细胞, 24 孔板每孔 3×10^5 个细胞;
- 6) 第二天全量换液为 Neurobasal 培养基, 之后每 3 天换液一次。

2.4 原代小胶质细胞培养

- 1) 将 3-5 只新生小鼠用上述同样方法分离大脑皮层, 0.2% 木瓜蛋白酶 37 $^{\circ}$ C 消化 15 min;
- 2) 用含 10% FBS 的 DMEM-F12 培养基终止消化, 洗掉木瓜蛋白酶, 胶头滴管吹打成单细胞悬液, 200 目滤网过滤;
- 3) 细胞用 10% FBS 的 DMEM-F12 培养基接种于 PLL 包被过的培养板中;
- 4) 12-14 天后, 细胞长满培养瓶, 在 37 $^{\circ}$ C 摇床中以 200rpm 振荡 4 h。收集培养液, 离心后将沉淀的细胞团块重新用小胶质细胞培养基接种于培养板中;
- 5) 细胞使用前经过小胶质细胞标志物 Iba-1 免疫荧光染色鉴定其纯度在 99% 以上。

2.5 蛋白免疫共沉淀

- 1) 依照 Western Blot 中的方法使用 NP-40 裂解液裂液 mPFC 组织;
- 2) BCA 蛋白定量后取出 20 μ l 作为 Input 组, 剩余样品加入 NP-40 裂解液稀释, 使蛋白浓度为 1 mg/ml, 体积为 1 ml;
- 3) 每份样品中加入 1% BSA、10 μ l 抗体 (阴性对照组加入等量的 IgG), 4 $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜, 使抗原抗体充分结合;
- 4) 每份样本使用 50 μ l 磁珠, 加 500 μ l NP40 裂解液洗涤, 简单振荡后吸弃上清;
- 5) 将磁珠加入到上述过夜的样本中室温缓慢摇动孵育 2 h;
- 6) 沉淀磁珠, 弃上清, 用 1 ml NP40 裂解液漂洗 3 次;
- 7) 加入 100 μ l NP-40 裂解液重悬磁珠, 加入 5 \times loading buffer, 混匀后于沸水中煮沸 10 min;
- 8) Western Blot 检测蛋白含量。

2.6 染色质免疫共沉淀 (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP)

- 1) 取小鼠 mPFC 组织加入冰冷 PBS 研磨获得单细胞悬液;
- 2) 加入 37% 甲醛, 使得甲醛的终浓度为 1%, 37 $^{\circ}$ C 孵育 10min 交联蛋白质与 DNA;
- 3) 加甘氨酸至终浓度为 2 mM 混匀后, 在室温下静置 5min, 终止交联;
- 4) 4 \times 2000rpm 去上清, 收集细胞;
- 5) 加入 1 ml RIPA Lysis Buffer (含蛋白酶抑制剂), 超声破碎细胞, 调整超声仪的参数和时间, 使产生的 DNA 片段为 100-400 bp;
- 6) 4 \times 2000g 离心 10min, 去除不溶物质;
- 7) 取 10 μ l 裂解液用 TE Buffer 稀释至 500 μ l, 加入 8 μ l 5M NaCl, 65 $^{\circ}$ C 加热 4 h 解交联;
- 8) Qubit 2.0 定量样本中的 DNA 浓度, 加入适量裂解液稀释样本至 DNA 浓度相同;
- 9) 取 100 μ l 超声裂解液, 加入 900 μ l ChIP Dilution Buffer、1% BSA、100 μ g/ml 鱼精 DNA、50 μ l 免疫磁珠, 5 μ l 抗体 4 \times 转混匀过夜;
- 10) 磁珠 Low Salt Immune Complex Wash Buffer、High Salt Immune Complex Wash Buffer、LiCl Immune Complex Wash Buffer 和 TE Buffer 依次各洗涤一次;
- 11) 在 500 μ l TE Buffer 重悬沉淀, 加入 20 μ l 5M NaCl, 混匀, 65 $^{\circ}$ C 加热 4 h, 解交

联;

12) Qubit 2.0 定量 DNA, 2%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 含量。

2.7 脑片电生理实验

2.7.1. mPFC脑片的制备

- 1) 8-12 周雄性小鼠乙醚麻醉后断头取脑, 置于氧饱和的冰冷切片液 (cutting solution) 中;
- 2) 用刀片修平端脑与小脑连接处, 粘于振动切片机的切片底座上;
- 3) 在氧饱和的冰冷切片液中行冠状切取 300 μ m厚的mPFC脑片;
- 4) 滴管吸取脑片置于室温O₂饱和的ACSF孵育 1 h。

2.7.2. 全细胞膜片钳记录

- 1) 将孵育后的脑片放置于记录液槽中, 氧饱和的ACSF循环灌流;
- 2) 玻璃电极贴附细胞, 形成千兆欧姆封接;
- 3) 向ACSF中加入 100 μ M印防己毒素 (picrotoxin, PTX), 在具有红外线DIC系统的显微镜下钳制mPFC锥体神经元, 钳制电压为-70 mV, 刺激强度分别为 15 V、20 V、25 V、30 V、35 V, 开始记录兴奋性突触后电流 (EPSC);
- 4) 记录mEPSC时向ACSF中加入 1 μ M河豚毒素 (tetrodotoxin, TTX) 和 100 μ M印防己毒素 (picrotoxin, PTX)。

2.7.3. MED64 平面微电极矩阵记录系统

- 1) 将孵育后的mPFC脑片转移到MED64 探针MED-P515A内, 95% O₂ 和 5% CO₂ 混合气饱和的ACSF持续灌流;
- 2) 给予电刺激后记录各个通道的场兴奋性突触后电位 (field excitatory postsynaptic potentials, fEPSPs), 持续记录至电流斜率和幅度至少平稳 30 min;
- 3) 诱导LTP 时使用TBS (theta burst stimulation); 诱导mGluR依赖的LTD时, 提前半小时向ACSF中加入NMDA受体拮抗剂 50 μ M AP-5^[200], 采用 900 个 1Hz的双脉冲低频刺激, 单个脉冲刺激持续 0.2 ms, 两个脉冲间隔 50 ms^[201];
- 4) 给予电刺激后LTP持续记录 3 h, LTD持续记录 2 h, 最后 30min的fEPSP斜率的平均值相对于基线的变化用来衡量LTP或LTD的幅度。每张脑片要平均多个通道的

结果，每次试验至少统计来自四只小鼠的 7 张脑片。

2.8 脑立体定位病毒注射实验

1) 慢病毒介导的基因敲低靶序列如下：

PGRN (5'-GACAGAGTGCATTGCTGTC-3'),

TNFR2 (5'-GCTATTCCCGGAAATGCAAGC-3')

对照序列(5'-TTCTCCGAACGTGTACAGT-3')，由上海吉玛(GenePharm)公司包装进带绿色荧光蛋白 GFP 的 pSUPER 慢病毒质粒中，扩增，纯化后-80℃保存备用；

2) 0.2%戊巴比妥钠麻醉小鼠；

3) 脑立体定位仪定位到 mPFC 区(bregma 前 2.43 mm, 左右 0.28 mm, 深 1.81 mm)；

4) 双侧以 0.1μl/min 的速度注射滴度为 3×10^8 TU/ml 的慢病毒 1μl；

5) 手术结束 14 天后，进行行为学或电生理实验。

2.9 恐惧制约实验

1) 第一天，小鼠置于 Med 红外视频恐惧制约箱中 60s，给予小鼠 15s80 分贝的白噪音作为条件性刺激，风扇提供背景噪音，照明灯打开，最后 0.5s 给予 0.7mA 电刺激，间隔 210s 后重复上述过程，共十次，完成训练将小鼠放回笼内，统计小鼠的不动时间；每组实验结束后，75%乙醇清洁箱体；

2) 第二天，将小鼠置于一个新的环境（在试验箱内加装屋顶形挡板，风扇关闭，照明灯关闭），只给予声音的条件刺激，而不给予电击，统计小鼠在各试验间期内的不动时间；每组实验结束后，3%乙酸清洁试验箱。

2.10 转棒实验

转棒实验使用的是上海吉量公司的转棒。

1) 第一天训练小鼠在转棒上以 4 rpm 的速度至少坚持 3 min；

2) 第二天小鼠放在 5min 内从 4 rpm 加速到 42 rpm 的转棒上，记录跌落时间。每隔 30 min 测一次，共测 4 次，统计每只小鼠的最长跌落时间。

2.11 强迫游泳实验

强迫游泳测试是由一个预实验和 24 h 后的正式试验组成，实验在 15 W 灯泡提供

的低照度条件下进行。动物被放置在一个塑料圆柱形透明罐中(直径 15 cm, 高 35 cm), 装满 24°C±1°C 水, 25 cm 的深度, 保证后肢骨骼不能接触到水箱底部。在所有实验中, 同一只小鼠在同一罐中进行 15 min 的预试验和 5min 的正式试验, 但正式试验中仅对最后 4 min 进行分析。在进行预实验或正式试验后, 小鼠用毛巾擦干, 并放回到笼子里保温 30 min。在强迫游泳试验期间, 一个摄像头与电脑上记录动物行为的软件相结合。每只小鼠的静止时间由软件进行分析。

2.12 siRNA 转染

PGRN 和 TNFR2 siRNA 有吉玛公司合成, 并连接上 Alexa Fluor488 荧光素。其序列根据以往的文献报道确定^[135, 202, 203]:

PGRN siRNA 5'-GACAGAGTGCATTGCTGTC-3';

PGRN siRNA-2 5'-CACUGUAGUGCAGAUGGGAAAUCCU-3';

对照序列 5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3'。

TNFR2 干扰序列根据互补原则设计三条, 验证后使用效率较高的一条:

TNFR2-siRNA-1: 5'-GCTGCAGTTCTTCCTGTACCA-3';

TNFR2-siRNA-2: 5'-GCCAAACTCCAAGCATCCTTA-3';

TNFR2-siRNA-3: 5'-GCTATTCCCGGAAATGCAAGC-3'。

使用转染试剂 DOTAP (罗氏, 货号 11201375001) 依照操作说明在细胞培养的第一天进行转染。

3. 结果

3.1. 适量 PGRN 促进神经元树突棘的发生, 高浓度的 PGRN 抑制神经元树突棘的成熟

突触结构是功能的基础, 所以为了研究 PGRN 对 FXS 突触可塑性的影响, 首先从神经元树突棘发育状态入手。先前的研究已经证实 *FMRI* KO 小鼠 mPFC PGRN 水平升高, TNF α 水平不变, 提示 *FMRI* KO 小鼠中 PGRN 并不是通过调节 TNF α 水平发挥作用。采用 siRNA 干扰技术选择性敲低 PGRN 水平, 为了保证 PGRN 敲低效率, 我们合成了两条 PGRN siRNAs: PGRN siRNA 和 PGRN siRNA-2, 通过阳离子脂质体(DOTAP)转染进入体外培养一天的神经元。一周后 Western blot 检测神经元 PGRN

表达水平，从中挑选了效率比较高的 PGRN siRNA (Figure 1-1)。

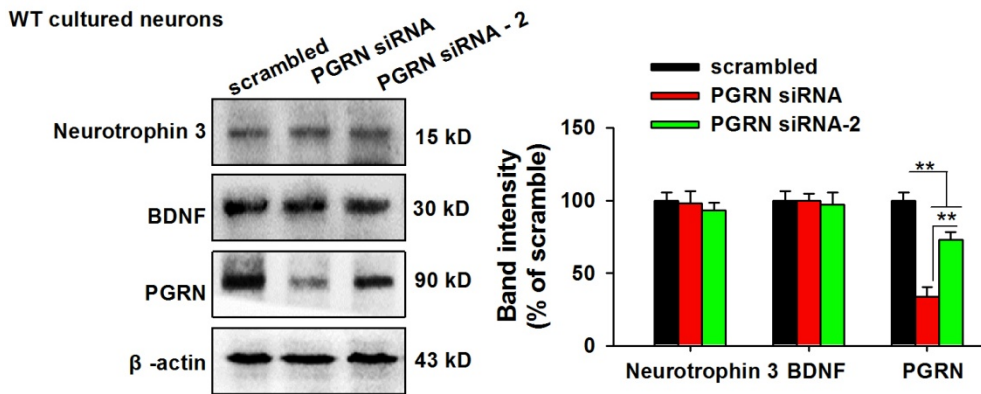


Figure 1-1. The selected PGRN target siRNA sequence showed better efficiency than PGRN siRNA-2. And it did not affect the expression of NT-3 and BDNF in WT cultured neuron. $n = 5$ dishes in each group. One-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test; $**p < 0.01$.

神经元树突棘是突触形成部位膨大形成的特殊结构，接受突触前释放的神经递质形成电活动，完成突触传递^[204]。正常的树突棘是突触可塑性的结构基础。有文献报道，KO 小鼠神经元树突棘密度过大，且多为不成熟的细丝状树突棘^[205]。PGRN 是调节神经发育的营养因子，可以增加神经元树突棘的密度^[206]。研究 PGRN 对 FXS 树突棘发育的影响，发现体外培养 WT 小鼠神经元中加入 100ng/ml 的 PGRN 使树突棘密度增大但是成熟的树突棘减少，出现类似于 KO 神经元的形态(Figure 1-2A, B)。进一步研究发现，在体外培养的 WT 小鼠神经元中加入 0-50ng/ml 的 PGRN 可以增加总树突棘的密度和成熟树突棘的比例，但是高浓度的 PGRN (75-200ng/ml) 使增加总树突棘密度的效果达到饱和，同时会降低成熟树突棘所占的比例，但 PGRN 对 KO 小鼠神经元没有影响 (Figure 1-2C)。使用 PGRN siRNA 敲低培养神经元 PGRN 水平，siRNA 在一定范围内可以增加 KO 和 WT 小鼠神经元成熟树突棘的比例，同时降低总树突棘的比例，提示适量 siRNA 可以纠正 KO 小鼠神经元树突棘的发育异常。KO 小鼠神经元对于 PGRN siRNA 的调节作用相较于 WT 小鼠神经元更加敏感 (Figure 1-2D)。

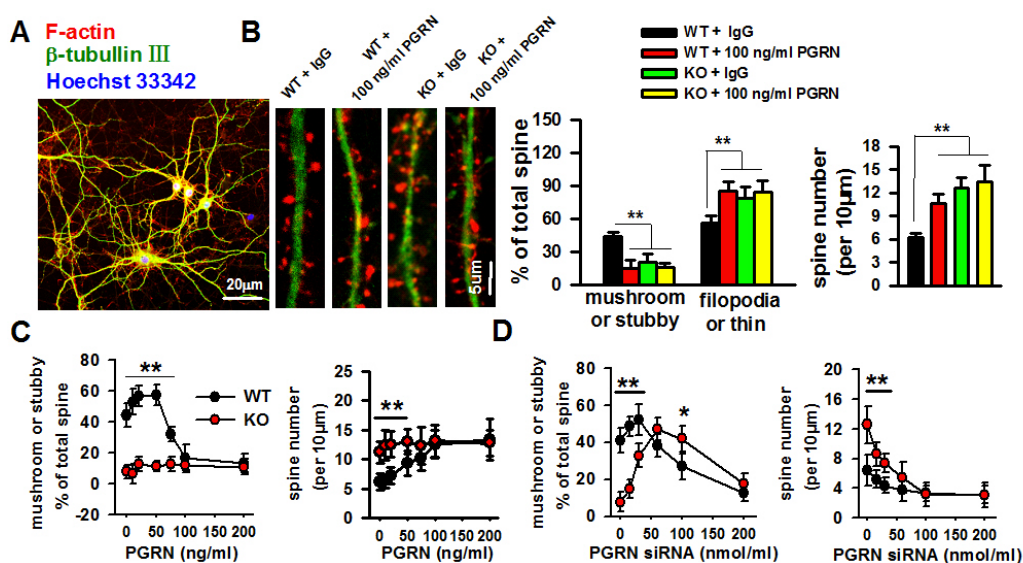


Figure 1-2. Exogenous PGRN impairs spine morphology.

(A) Phalloidin staining of cultured neurons in DIV (day in vitro) 21. Scale bar = 20 μm . (B) Spine morphology studies showing fraction of mushroom, stubby and filopodia spines from IgG and PGRN (100 ng/ml) treated WT and KO neurons. Scale bar = 50 μm . $n = 10$ neurons from 3 dishes per treatment group. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test; $**p < 0.01$ versus IgG treated WT neurons. (C) Curves showing effects of different PGRN concentrations (0, 10, 20, 50, 75, 100, 200 ng/ml) on dendritic spine developments of WT and KO neurons. (D) Curves showing effects of different PGRN siRNA concentrations (0, 15, 30, 60, 100, 200 nM) on dendritic spine developments of WT and KO neurons. $n = 10$ neurons from 3 dishes per treatment group. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test; $**p < 0.01$ versus KO neurons treated by the same concentration of PGRN.

3.2. PGRN 对突触传递的影响

细胞的离体实验证明:降低 KO 小鼠神经元的 PGRN 水平可以纠正树突棘发育障碍。急性分离脑片的电生理实验是一种半离体的实验,可以用来研究 PGRN 对突触功能的影响。MED64 是一种新的神经元电生理记录方法,采用贴附式记录方法,可以稳定记录神经元的电活动长达 10h 以上。MED64 实验结果提示:在 ACSF 中添加 100ng/ml 的重组 PGRN,可以增加 WT 小鼠脑片的 fEPSPs 斜率 (Figure 2-1A),提示此微环路的突触传递增强。全细胞膜片钳结果显示:在相同刺激下,100ng/ml 的 PGRN 可以增加 WT 小鼠脑片的 EPSC 幅度,但对于 KO 小鼠脑片没有作用 (Figure 2-1B)。这两个实验结果说明外源性 PGRN 可以增加 WT 小鼠神经元的突触传递。但 PGRN 对 KO 小鼠神经元没有影响,推测这可能与 KO 小鼠脑内 PGRN 水平本身已经很高, PGRN 的作用已经达到饱和有关。

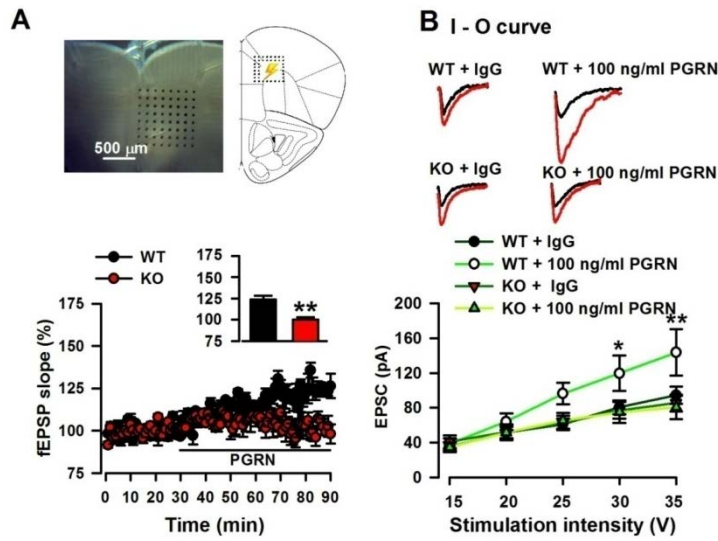


Figure 2-1. Exogenous PGRN impairs spine morphology and synaptic transmission.

(A) Curves showing effects of different PGRN concentrations (0, 10, 20, 50, 75, 100, 200 ng/ml) on dendritic spine developments of WT and KO neurons. (B) Curves showing effects of different PGRN siRNA concentrations (0, 15, 30, 60, 100, 200 nM) on dendritic spine developments of WT and KO neurons. $n = 10$ neurons from 3 dishes per treatment group. Two-way ANOVA followed by Tukey's Bonferroni's *post hoc* test; $**p < 0.01$ versus KO IgG treated WT neurons treated by the same concentration of PGRN.

LTD 是一种突触可塑性现象，被认为是学习记忆的电生理机制^[207]。在 KO 小鼠海马中 mGluR 依赖的 LTD 相较于 WT 小鼠增大^[208]，mPFC 中 mGluR 依赖的 LTD 是否发生变化尚不清楚，对此我们也进行了研究。结果显示 KO 小鼠 mPFC 中 mGluR 依赖的 LTD 相较于 WT 小鼠没有变化（Figure 2-2），提示在海马和 mPFC 可能存在不同的突触可塑性机制。

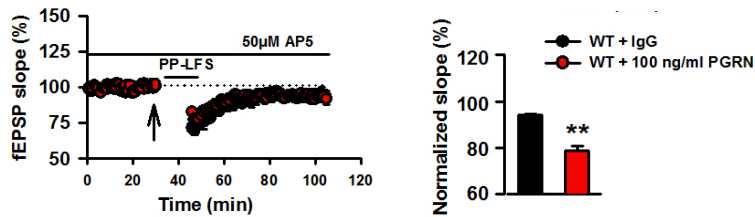


Figure 2-2. Normal mGluR dependent LTD in mPFC of *FMRI* KO mice.

Accumulative fEPSPs recorded at mPFC from WT slices bath application of IgG (100 ng/ml, black circles), KO slices bath application of IgG (100 ng/ml, red circles), and KO slices bath application of PGRN (100 ng/ml, green circles). $25\mu\text{M}$ DL-AP5, a NMDA receptors blocker, was added throughout this recording to exclude the NMDA receptors dependent LTD. Mean values of the depression of fEPSPs averaged from 50 to 60 min following PP-LFS. $n = 4-5$ slices/4-5 animals. Error bars, SEM. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ versus IgG treated WT group with a one-way ANOVA test.

3.3. 减少 KO 小鼠脑内 PGRN 可以纠正 LTP 的缺失和异常蛋白表达

为了排除外源性重组 PGRN 中杂质对脑片电生理功能的影响,同时为了可以在更长时间内降低 PGRN 的水平,我们使用了慢病毒表达 *GRN shRNA* 敲低 KO 小鼠脑内 PGRN 的水平,表达杂乱序列 *shRNA* 的病毒作为对照。*ShRNA* 与化学合成的 siRNA 不同,是一种双链 RNA,通常被克隆进表达载体中,可以稳定在细胞内表达。*GRNshRNA* 序列来自于以往文献的报道^[202],并经过我们的实验验证。脑立体定位注射技术可以将病毒注射进入特定脑区,从而调节注射区域的基因表达水平,对其他脑区没有影响。Figure 3-1A 结果显示表达 *GRNshRNA* 的病毒被准确注射到 mPFC 区域。慢病毒注射两周后,取小鼠 mPFC 脑区检测 PGRN 水平,发现 *GRN shRNA* 注射 WT 和 KO 小鼠脑内 PGRN 的水平相对于对照组显著下调 (Figure 3-1B)。同时我们用 *GRN shRNA* 慢病毒注射小鼠 mPFC 脑片进行电生理实验,发现 *GRNshRNA* 并不影响 WT 小鼠 LTP 的诱导和表达 (Figure 3-1C),但可以纠正 KO 小鼠 LTP 的缺失 (Figure 3-1D)。这在整体动物水平证明了降低 KO 小鼠脑内的 PGRN 水平可以纠正突触可塑性异常。降低 WT 小鼠 PGRN 水平不影响 LTP 的表达,这可能是由于其他营养因子的代偿作用,或者成年后仅需较低水平 PGRN 就可以维持正常生理功能。

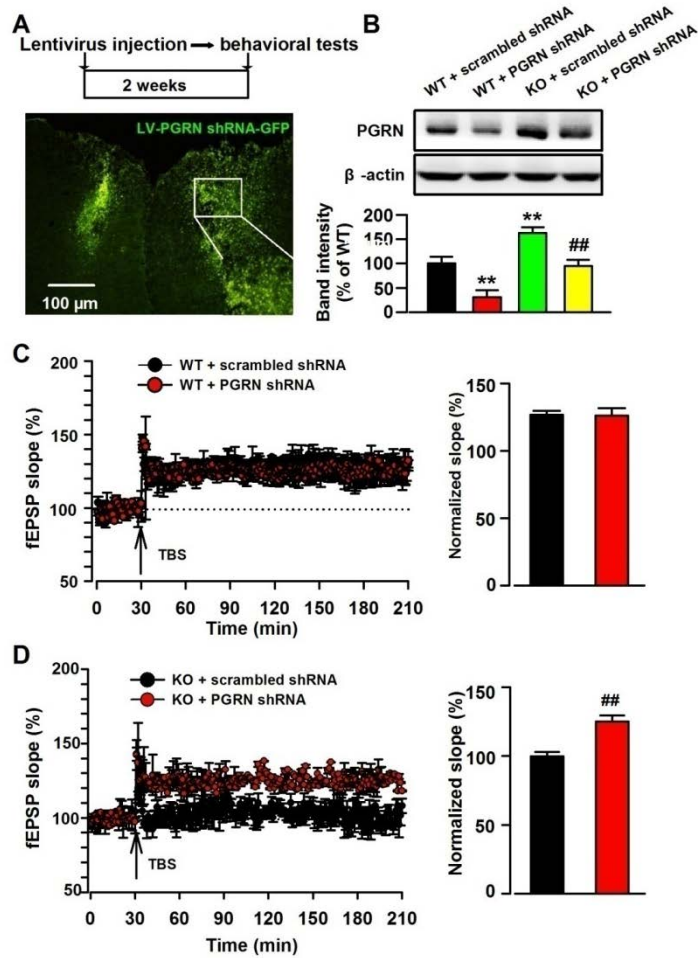


Figure 3-1. Knock-down of PGRN rescues L-LTP in the mPFC of *FMRI* KO mice.

(A) Sample image to show the lentivirus (LV-PGRN shRNA-GFP) injection sites and the location of MED64 probe. The green fluorescence dots were GFP, showing successful lentivirus infection. (B) Decreased PGRN in mPFC from WT and KO mice 10 days after *shRNA* injection. $n = 5$ mice per genotype. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test; $**p < 0.01$ versus negative *shRNA* injected WT mice; $##p < 0.01$ versus negative *shRNA* injected KO mice. (C) Left: accumulative fEPSPs recordings at mPFC from WT animals. Right: averaged fEPSPs slope during the last 1 h. Arrow indicates the point of TBS application. $n = 8$ slices/4 mice with negative *shRNA* injection; $n = 7$ slices/4 mice with PGEN *shRNA* injection. (D) Left: accumulative fEPSPs recordings at mPFC from KO animals. Right: averaged fEPSPs slope during the last 1 h. Arrow indicates the point of TBS application. $n = 7$ slices/4 mice with negative *shRNA* injection; $n = 7$ slices/4 mice with PGRN *shRNA*. Unpaired Student's *t* test; $##p < 0.01$ versus KO negative *shRNA* injection.

注射 *GRNshRNA* 后, 检测 mPFC 细胞内各种信号通路的激活状态, 因为神经元内多种信号通路的协调对神经元正常生理功能具有重要作用。以往文献报道 KO 小鼠脑内 Akt^[98]、ERK^[209]、mTor^[210] 信号通路过度激活; GSK3 β 会引起 β -catenin 磷酸化, 使其更容易被降解^[189, 211], 因此 β -catenin 信号通路受到抑制; Akt 信号通路的激

活会引起下游 mTor 信号通路的激活^[212]。小鼠脑定位注射病毒2周后，取慢病毒注射部位的组织进行 Western blot 检测，结果显示 KO 小鼠上述异常的信号通路得到纠正 (Figure 3-2 A-E)。

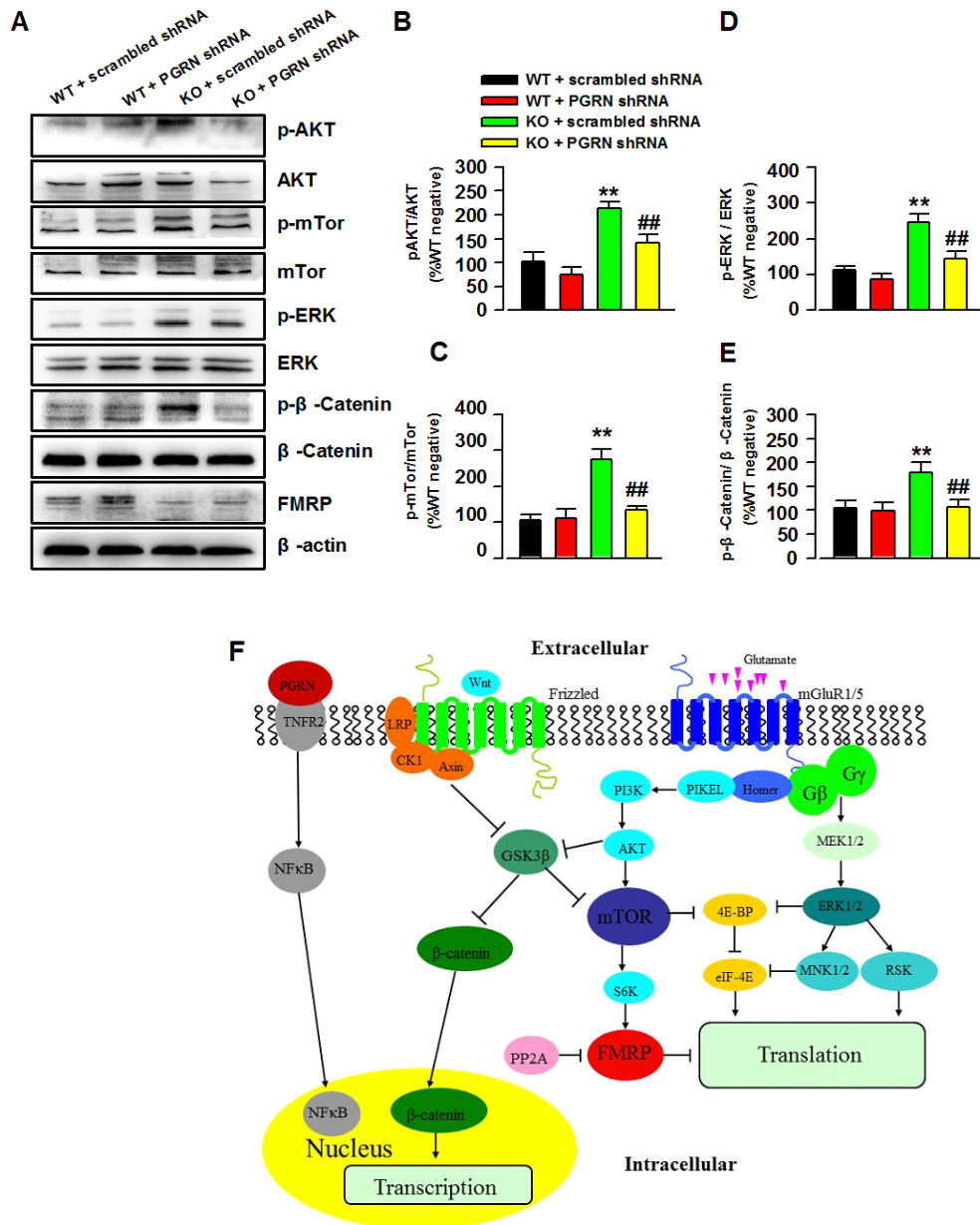


Figure 3-2. Excessive PGRN alters mTor signaling in *FMR1* KO mice.

(A) Samples of Westernblot to show the protein levels in the mPFC of WT and KO mice. The ratio of p-Akt/Akt (B), p-mTor/mTor (C), p-ERK/ERK (D), and p-β-catenin/β-catenin (E) in the mice treated with PGRN shRNA. n = 6 mice per genotype. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test; ** $p < 0.01$ versus negative shRNA injected WT mice; ## $p < 0.01$ versus negative shRNA injected KO mice. (F) schematic diagram showing the connection of different proteins in FXS pathology.

3.4. 减少 KO 小鼠脑内 PGRN 可以纠正突触形态的异常

采用高尔基染色法研究 KO 小鼠 mPFC 脑区树突棘形态和数目的变化, 结果显示 *GRN shRNA* 降低 PGRN 的水平可以减少 KO 小鼠的树突棘密度 (Figure 4A, B), 同时增加成熟树突棘所占的比例 (Figure 4C)。

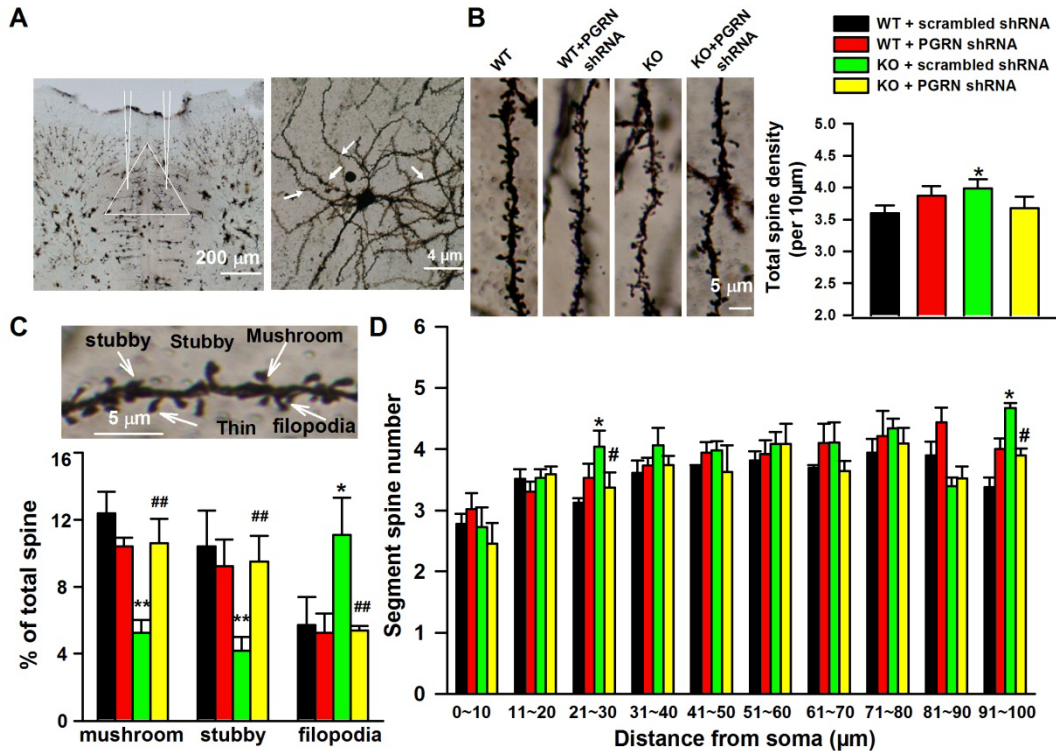


Figure 4. Knock-down of PGRN rescues spines morphology of *FMR1*KO mouse.

(A) Left: sample of lentivirus infection site in mPFC. Scale bar = 200µm. Right: sample of Golgi-Cox staining of layer II/III pyramidal neuron. Scale bar = 4µm. (B) Representative images of Golgi-Cox-staining basilar dendrites. The total spine density was increased in KO mice. Number of spines was counted from basilar dendrites per 10µm. n = 20 neurons from 4 mice in each group. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test; * $p < 0.05$ versus WT mice. (C) Upper: sample spines from 41-50µm segment in WT mice. Scale bar = 5µm. Lower: fraction of mushroom, stubby and filopodia spines from negative *shRNA* injected WT mice (1682 spines), PGRN *shRNA* injected WT mice (1621 spines), negative *shRNA* injected KO mice (1431 spines), and PGRN *shRNA* injected KO mice (1821 spines). n = 20 neurons from 4 mice in each group. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus negative *shRNA* injected WT mice; ## $p < 0.01$ versus negative *shRNA* injected KO mice. (D) Histograms representing the spines density distribution of each 10 µm segment. n = 20 neurons from 4 mice in each group; Two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test; * $p < 0.05$ versus negative *shRNA* injected WT mice; # $p < 0.05$ versus negative *shRNA* injected KO mice.

3.5. 减少 KO 小鼠脑内 PGRN 可以纠正活动过度和学习记忆的障碍

体外培养神经元、半离体脑片、整体动物研究检测了降低 KO 小鼠 PGRN 后对突触发育和可塑性的影响，但对 KO 小鼠行为的影响尚不清楚。*GRNshRNA* 病毒注射后，检测小鼠行为学变化。开放场实验结果显示，减少 KO 小鼠 PGRN 可以纠正活动过度的行为表型 (Figure 7-1A)。恐惧制约试验结果显示减少 KO 小鼠 PGRN 水平可以改善学习 (Figure 5-1C) 和记忆能力 (Figure 5-1D)。

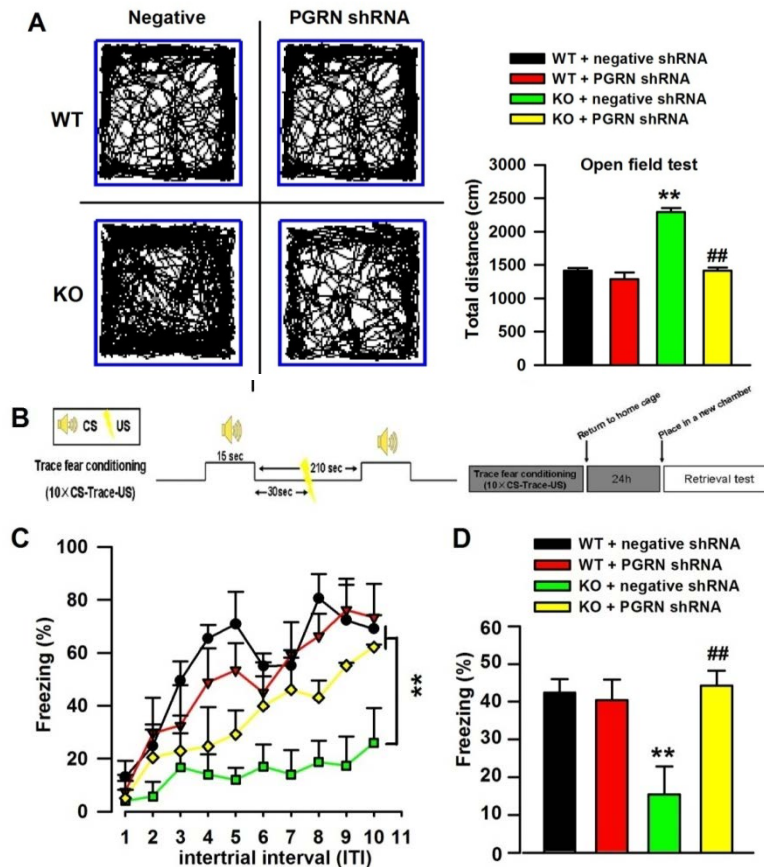


Figure 5-1. Knock-down of PGRN rescues abnormal behaviors of *FMRI* KO mice

(A) Left: sample traces of open field test. Right: locomotor activity in WT or KO mice treated with PGRN *shRNA* or negative *shRNA*. $n = 6$ mice per genotype. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test; $**p < 0.01$ versus negative *shRNA* injected WT mice; $##p < 0.01$ versus negative *shRNA* injected KO mice. (B) Schematic of Trace fear conditioning. (C) The percentage of freezing time in training phase. Univariate ANOVA followed by Lower-bound correction; $**p < 0.01$ versus negative *shRNA* injected WT mice. (D) The freezing time in testing course. $n = 6$ mice per genotype. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test; $**p < 0.01$ versus negative *shRNA* injected WT mice; $##p < 0.01$ versus negative *shRNA* injected KO mice.

高架十字实验检测小鼠的焦虑样行为，结果显示 KO 和 WT 小鼠进入开放臂的次数没有差异，降低 PGRN 水平后也没有影响 (Figure 5-2A)。转棒实验检测小鼠的运

动学习能力^[213]，结果显示 KO 小鼠跌落时间短于 WT 小鼠，表明 KO 小鼠运动学习能力受损，降低 PGRN 水平后没有得到改善（Figure 5-2B）。强迫游泳实验检测小鼠的抑郁状态^[214]，结果显示 KO 小鼠的不动时间少于 WT 小鼠，说明 KO 小鼠没有出现抑郁，降低 PGRN 后没有变化。以上研究结果可以说明 PGRN 并不影响 WT 和 KO 小鼠的焦虑和抑郁样行为（Figure 5-2C）。

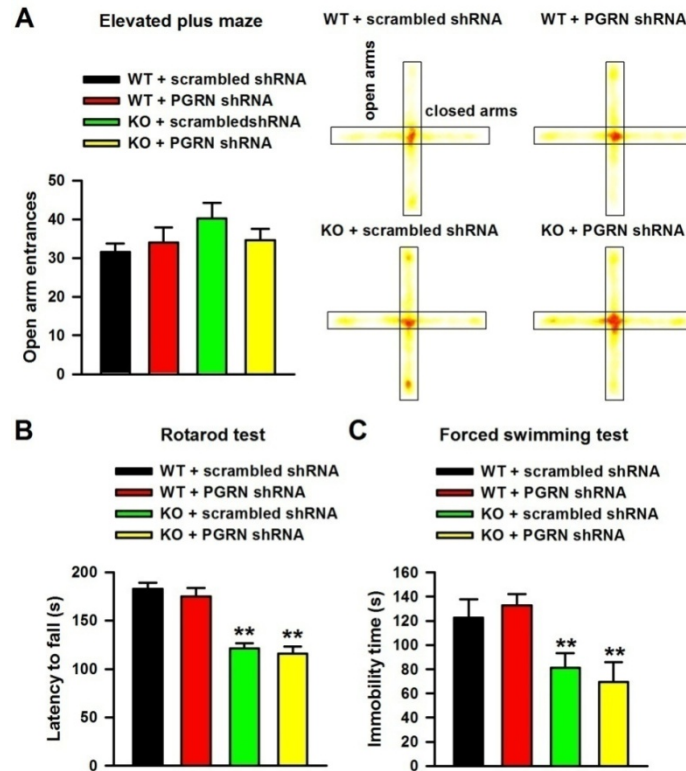


Figure 5-2. Knock-down of PGRN on the anxiety- and depression-like behaviors

(A) In the elevated plus maze test, knocking down PGRN in mPFC did not alter the innate anxiety-like behavior in the WT and KO mice. (B) In rotarod test, motor function was decreased in KO mice; however, knockingdown PGRN in mPFC did not improve the performance of KO mice. (C) In forced swimming test, KO mice showed more depression-like behaviors compared with the WT mice. However, knockingdown PGRN in mPFC did not improve the performance of KO mice. A-C: $n = 6$ mice in each group. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test; ** $p < 0.01$ versus negative *shRNA* injected WT mice.

3.6. PGRN 在脑内主要与 TNFR2 结合

前面的结果证明了 KO 小鼠脑内 PGRN 水平显著高于 WT 小鼠，降低 PGRN 水平可以纠正 KO 小鼠的突触可塑性异常、行为和信号通路异常。但是 PGRN 如何调节突触可塑性的机制尚未阐明。TNFR1 和 TNFR2 是 PGRN 的受体，我们通过蛋白

免疫共沉淀检测了 PGRN 与 TNFR1 和 TNFR2 的结合。实验结果显示 PGRN 主要与 TNFR2 结合而与 TNFR1 结合很少 (Figure 6A, B)。TNFRs 的另一个配体 TNF α 与 TNFR1 和 TNFR2 的结合水平相当 (Figure 6A, B)。

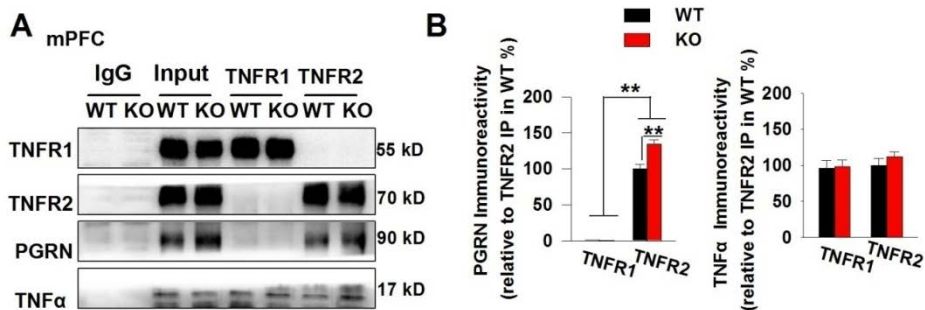


Figure 6. Co-immunoprecipitation sample showing binding of PGRN and TNFR2. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test; $n = 5$ mice in each group. $**p < 0.01$.

3.7. TNFR2 参与 LTP 的诱导

为了研究 PGRN 调控 LTP 的具体机制, 需要探明其受体 TNFR2 在 LTP 诱导和表达方面的功能。我们分别使用了高浓度氯化钾 (60mM), 诱导化学性 LTP 和 TBS 诱导的电学 LTP^[215], 并评价 TNFR2 在这两种 LTP 中的作用。在这一过程中我们分别使用了 TNFR1 和 TNFR2 的封闭抗体^[216]。CREB 磷酸化后启动下游基因的转录对 LTP 的维持有重要作用^[217], 因此将 CREB 磷酸化作为评价 LTP 的指标。研究结果发现阻断 TNFR2 的功能后氯化钾诱导的 CREB 磷酸化被阻断 (Figure 7A), MED64 结果显示阻断 TNFR2 后 LTP 受损, 阻断 TNFR1 对 LTP 却没有影响 (Figure 7B)。这提示氯化钾诱导的化学性 LTP 需要 TNFR2 的激活。

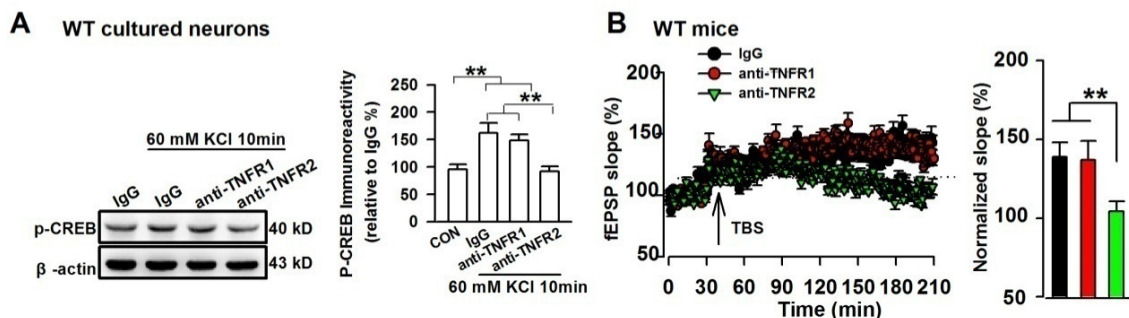


Figure 7. (A) In cultured neurons, TNFR2 but not TNFR1 antibody suppressed KCl-induced elevation of p-CREB. $n = 5$ dishes in each group. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test; $**p < 0.01$. (B) Left: accumulative fEPSPs recordings at mPFC from WT animals. Right: averaged fEPSPs slope during the last 1 h. Arrow indicates the point of TBS application. TNFR2 antibody (100 ng/ml) inhibited the L-LTP in mPFC slices. $n = 8$ slices/4 mice in each group. One-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test; $**p < 0.01$.

3.8. TNFR2 参与甘氨酸诱导的突触可塑性增强

200 μ M 甘氨酸也可以有效地诱导化学性 LTP，并促进 GluA1 磷酸化^[218]。此外 PGRN 也可以促进 GluA1 磷酸化。阻断 TNFR2 受体的功能可以抑制甘氨酸或 PGRN 诱导的 GluA1 磷酸化，提示 TNFR2 激活对 LTP 诱导过程中 GluA1 磷酸化和 PGRN 引起的 GluA1 磷酸化是不可或缺的 (Figure 8A, B)。MED64 结果进一步证实：阻断 TNFR2 可以有效阻断 PGRN 增强突触传递的作用 (Figure 8C)。

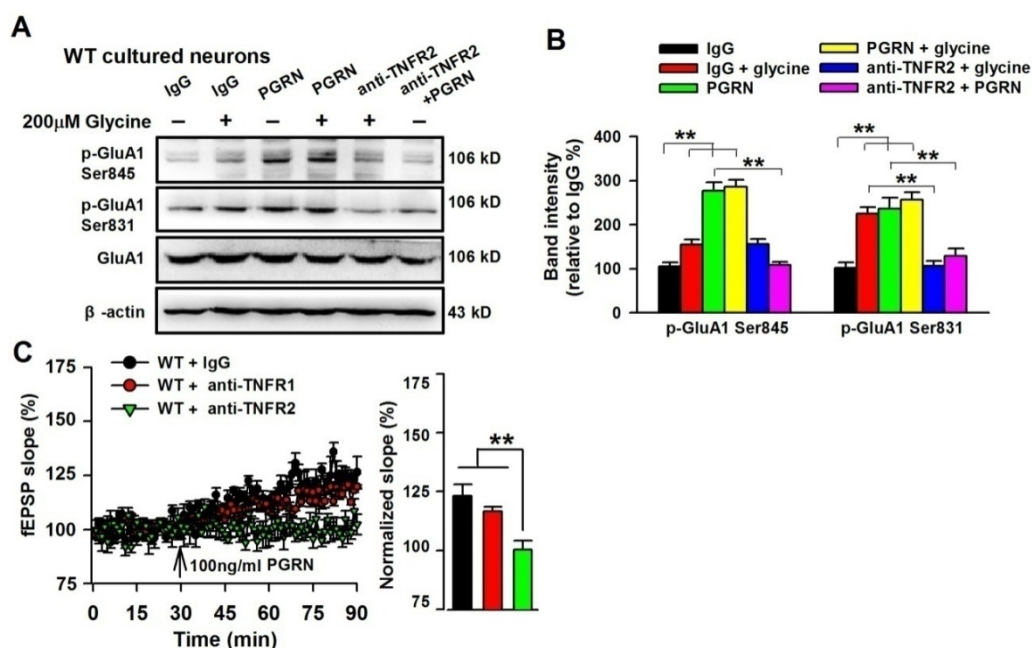


Figure 8 (A) Western blot samples showing the protein levels in culture WT neurons. (B) TNFR2 antibody blocked the phosphorylation of GluA1 (p-GluA1-ser845/831) induced by PGRN (100 ng/ml) or glycine (200 μ M) in WT cultured neurons. $n = 5$ dishes in each group. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test; $**p < 0.01$. (C) Left: accumulative fEPSPs recordings at mPFC from WT animals. Right: averaged fEPSPs slope during the last 5 min. Arrow indicates the point of PGRN (100 ng/ml) application. $n = 8$ slices/4 mice in each group. One-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test; $**p < 0.01$.

3.9. FMRI KO 小鼠脑内 NF κ B 亚基-RELB 过度激活

TNFR2 参与了 PGRN 对突触可塑性的调节，KO 小鼠脑内 PGRN 水平过高是否影响了 TNFR2 和它下游的 NF κ B 信号通路未见文献报道。RELB 是 TNFR2 下游信号通路，作为 NF κ B 的亚基之一同时也是一个转录因子。TNFR2 激活后 RELB 入核并启动下游的基因转录。免疫荧光染色结果显示 KO 小鼠 mPFC 细胞核内的 RELB 水平相较于 WT 小鼠更高 (Figure 9A)。

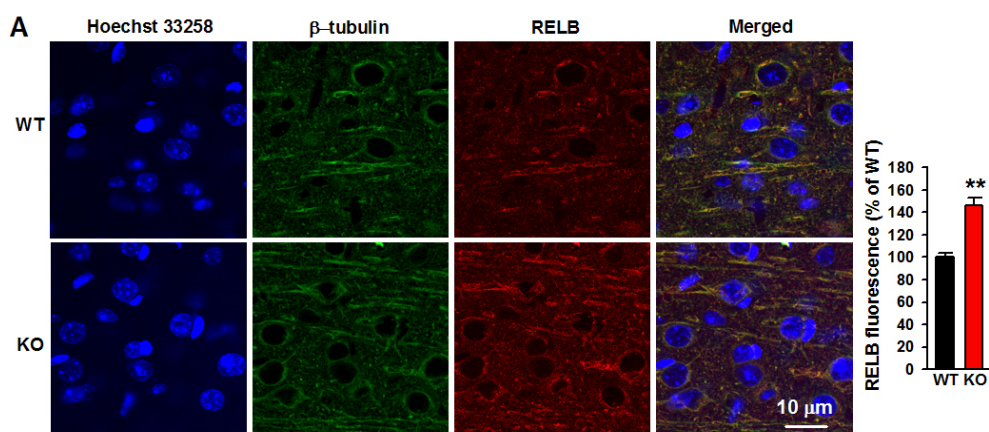


Figure 9. Left: Representative images of mPFC sections staining for β -tubulin (green) and RELB (red) in WT mice. Nuclei were shown by Hoechst 33258 (blue). Scale bar = 10 μ m. Right: Fluorescence intensity of RELB signal measured across 100 neurons (10 neurons per slice, two slices per mouse, n = 5 mice in each group) for each genotype. Unpaired Student's *t* test; ***p* < 0.01 versus WT mice.

3.10. *FMRI* KO 小鼠脑内过量的 PGRN 引起 TNFR2/NF κ B 信号通路过度激活

为了进一步证明上面的假设，我们阻断 TNFR2 并观察 PGRN 对 NF κ B 活性的影响。TNFR2 siRNA-3 可以有效降低体外培养神经元的 TNFR2 水平 (Figure 10-1)。

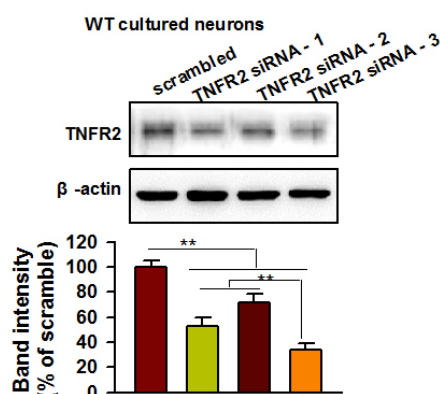


Figure 10-1. The selected TNFR2 target siRNA-3 sequence showed better efficiency than the other two designed siRNA sequences. n = 5 dishes in each group. One-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test; ***p* < 0.01.

PGRN 可以激活神经元 NF κ B 亚基 p50、p52 和 RELB，用 siRNA 敲低 TNFR2 后，这一现象消失 (Figure 10-2A)，提示 PGRN 可以激活 TNFR2/NF κ B 信号通路。KO 小鼠 mPFC 区细胞质和细胞核中 NF κ B 亚基 p52、RELA 和 RELB 表达量升高 (Figure 10-2B, C)，这提示 RELB 是 KO 神经元和组织过度激活的一个 NF κ B 亚基。RELB 激活后进入细胞核，作为一个转录因子结合到靶基因的启动子区，调节下游基因的转录。ChIP 可以检测蛋白和 DNA 的结合，结果显示 RELB 结合的 DNA 量升高

(Figure 10-2D)。结果提示 KO 小鼠脑内过量 PGRN 引起 TNFR2/NFκB 信号通路过度激活，促进 NFκB 进入细胞核，启动下游基因转录。

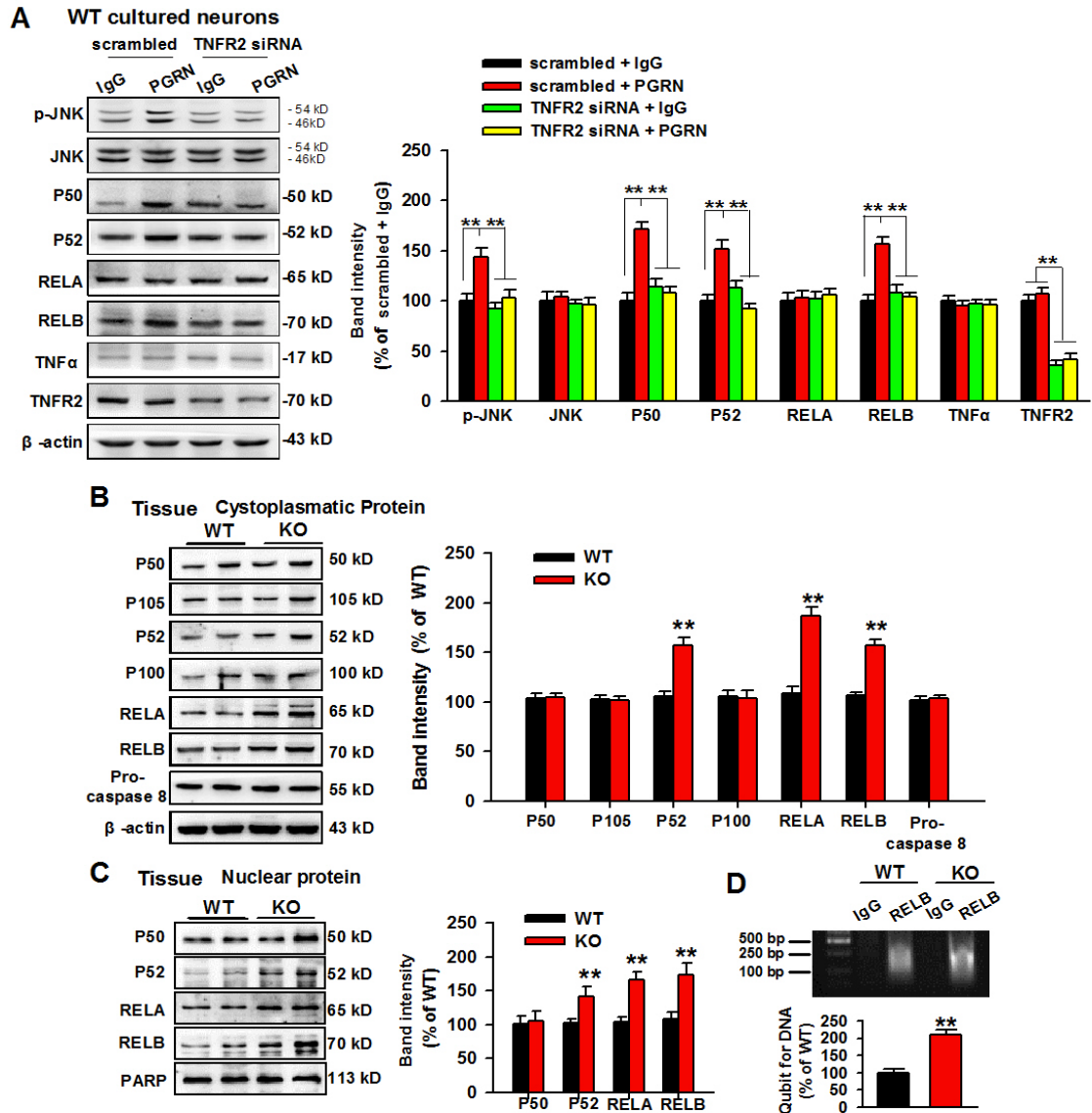
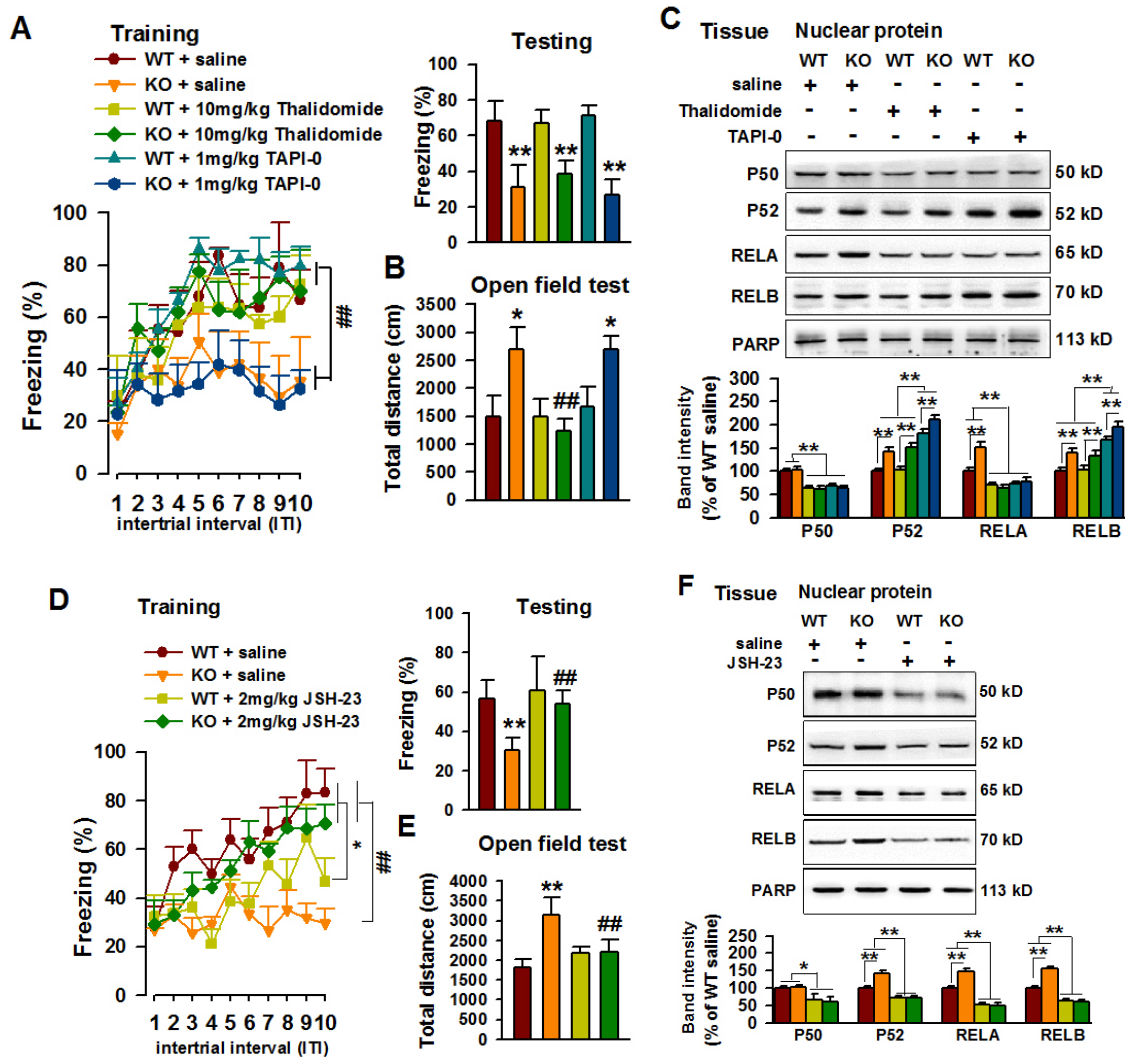


Figure 10-2.(A) Left: westernblot samples of proteins from cultures. Right: The PGRN induced activation of NFκB subunits (p50, p52, and RELB) and phosphorylation of JNK could be blocked by siRNA mediated TNFR2 knocking down in WT neurons. n = 5 dishes in each group. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test; ***p* < 0.01. (B-C) Western-blot samples from mPFC tissues. Higher levels of cytoplasmic (B) and nuclear (C) p52, RELA, and RELB in mPFC of KO mice compared to WT mice. n = 5 mice in each group. Unpaired Student's *t* test; ***p* < 0.01 versus WT mice. (D) Upper: Electrophoretogram of binding between RELB and DNA after ChIP analysis from mPFC tissues. Lower: Higher level of RELB binding DNA was found in mPFC of KO mice compared to WT mice according to Qubit 2.0 quantification. n = 8 mice in each group. Unpaired Student's *t* test; ***p* < 0.01 versus WT mice.

3.11. 抑制 NF κ B 信号通路可以纠正 *FMRI* KO 小鼠学习记忆障碍

Thalidomide 可以有效抑制 TNF α 的合成^[219]; TAPI-0 是 TACE 的抑制剂,可以有效阻断 TNF α 的释放^[220]; JSH-23 是 NF κ B 核转移抑制剂^[221]。分别给与小鼠腹腔注射这三种药物,每日一次,一周后进行行为学检测。实验结果显示 Thalidomide 和 TAPI-0 均不能改善 KO 小鼠的行为异常 (Figure 11A, B)。Thalidomide 和 TAPI-0 可以抑制 p50 和 RELA 的核内转移,但是 Thalidomide 不能纠正 p52 和 RELB 的核内转移,而 TAPI-0 会引起细胞核内 p52 和 RELB 的升高 (Figure 11C)。这可能是由于阻断 TACE 后导致 mTNF α 升高,而 mTNF α 对 TNFR2 的作用更强,引起下游 p52 和 RELB 的核内转移^[222]。JSH-23 不论给药一周或是给药一次均可以纠正 KO 小鼠的行为异常 (Figure 11D, E)。与此结果一致, JSH-23 可以有效抑制 p50、p52、RELA 和 RELB 的核转移 (Figure 14F)。



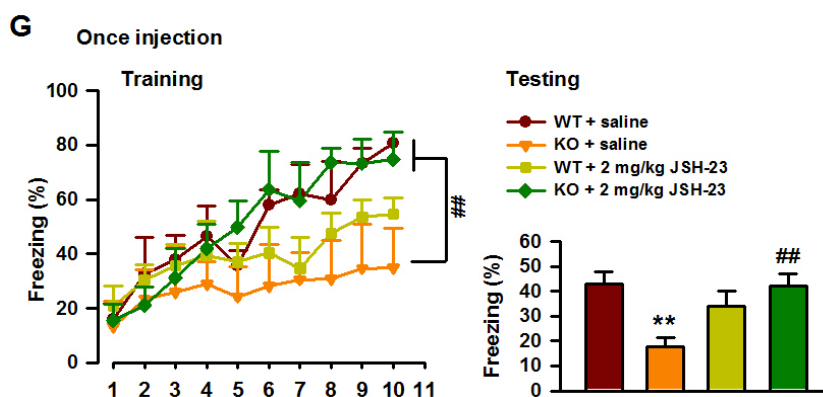


Figure 11. Partially blocking the TNFR2/NF κ B pathway rescues the abnormal behaviors of *FMR1*KO mouse. Drugs were administered intraperitoneally for 1 week before testing trace fear memory. Effects of Thalidomide (10 mg/kg) and TAPI-0 (1 mg/kg) on fear conditioning (A) and locomotor activity (B). $n = 8$ mice in each group. Univariate ANOVA followed by Lower-bound correction or Two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test; $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ versus saline injected WT mice; $^{##}p < 0.01$ versus saline injected KO mice. Western blot samples showed nuclear NF κ B subunits translocation in mPFC after Thalidomide or TAPI-0 treatments (C). $n = 6$ mice in each group. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test; $*p < 0.05$, $**p < 0.01$. Effects of JSH-23 (2 mg/kg) on fear conditioning (D) and locomotor activity (E). $n = 8$ mice in each group. Univariate ANOVA followed by Lower-bound correction or Two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test; $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ versus saline injected WT mice; $^{##}p < 0.01$ versus saline injected KO mice. Western blot samples showed nuclear NF κ B subunits translocation in mPFC after JSH-23 treatment (F). $n = 6$ mice in each group. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test; $*p < 0.05$, $**p < 0.01$. Trace fear memory test was performed 1 h after intraperitoneal injection of JSH-23 (2 mg/kg). (G) JSH-23 improved the learning and memory of KO mice as shown by the increased freezing time in training and testing phase. $n = 6$ mice in each group. Univariate ANOVA followed by Lower-bound correction or Two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test; $**p < 0.01$ versus WT saline control; $^{##}p < 0.01$ versus KO saline control.

3.12. PGRN 通过 TNFR2 受体参与 *FMR1* KO 小鼠学习记忆障碍

为了研究 KO 小鼠敲除 PGRN 后得到的行为学改善是否是因为 TNFR2 的激活受到抑制引起的，我们使用两种慢病毒分别和同时下调脑内的 PGRN 和 TNFR2。结果显示分别下调脑内的 PGRN 和 TNFR2 均可以纠正 KO 小鼠的行为异常，但是同时下调脑内的 PGRN 和 TNFR2 却没有叠加效应，这说明这两者可能是通过同一条信号通路发挥作用 (Figure 12A, B)。

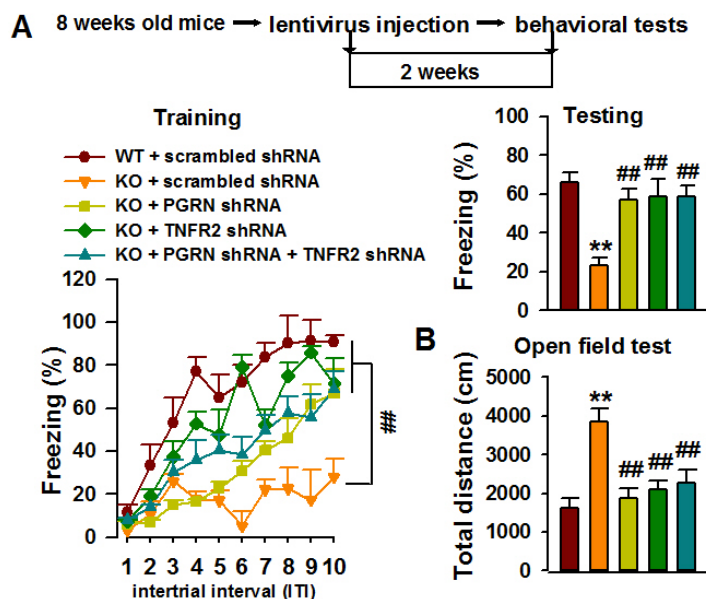


Figure 12. Effects of knocking down PGRN and TNFR2 in mPFC by *shRNA* on trace fear memory (A) and locomotor activity (B). $n = 8$ mice in each group. Univariate ANOVA followed by Lower-bound correction or Two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test; ** $p < 0.01$ versus negative *shRNA* injected WT mice; ## $p < 0.01$ versus negative *shRNA* injected KO mice.

4. 讨论

在本研究中，我们发现过量的 PGRN 引起 TNFR2/NF κ B 信号通路过度激活，导致了异常的树突棘发育和 LTP 受损。在 KO 小鼠中，降低 PGRN 水平可以恢复树突棘发育、突触可塑性，改善小鼠行为活动过度及学习和记忆。PGRN 诱导了 NF κ B 的核转位和 GluA1 的磷酸化，这对 LTP 的表达是不可或缺的。然而，在 KO 小鼠皮层中，过多的 PGRN 使 NF κ B 的活性维持在较高水平，阻断了活动依赖的突触可塑性。JSH-23 是 NF κ B 核转位阻断剂，可以改善 KO 小鼠的学习和记忆，降低活动过度等异常行为。这些研究结果为 PGRN/TNFR2/NF κ B 信号通路在学习和记忆中的作用提供了新的理论基础，并揭示了治疗 FXS 认知缺陷的潜在靶点。有趣的是，PGRN 表达的增加是在 mPFC 脑区中观察到的，而不是在海马区，这是一个对学习和记忆至关重要的大脑区域。PGRN 在不同脑区表达不一致可能是由于 KO 小鼠中 mPFC 和海马突触可塑性调节的机制不同。例如，在海马中 LTD 增大，LTP 正常^[223]，而在 PFC 中 LTP 受损^[224]。

FMRP 是 mRNA 翻译的抑制因子。在 KO 小鼠中，FMRP 的缺失导致了数百个基因的失调。mGluR 理论是解释 FXS 认知障碍的一种有前景的理论^[225]。特异性的

mGluR 拮抗剂被认为是 FXS 的有效治疗靶点。然而，副作用限制了它们在临床中的应用。mTOR 和 ERK 信号级联由 mGluRs 控制，并在 KO 小鼠中过度激活。在 KO 小鼠 mPFC 中，PGRN shRNA 抑制 Akt、mTOR、ERK 和 β -catenin 磷酸化。因此，在 FXS 中抑制过度激活的 PGRN 也可以拮抗 mGluR 级联信号通路。

PGRN 调控神经元树突生长并增强其存活。在发育的大脑中有突触强度活动依赖性降低的发生，因此这一过程是神经回路的突触修剪和后天发育的必要步骤^[52]。正如之前有文献报道：PGRN 在突触传递和可塑性方面扮演着重要的角色。然而，在本研究中，我们发现过度表达的 PGRN 损害了突触功能，并增加了树突棘密度和未成熟树突棘的比例。正常的 PGRN 水平对树突棘发育和基础突触传递至关重要。过度 PGRN 可能延迟树突棘的成熟，并保持它们的幼稚 (naive) 状态。改善学习和记忆可以通过提高成熟树突棘的比率来实现。由于神经元的突触传递效率较低，且树突棘不成熟，因此有更多的神经营养因子释放；这些因素可以进一步阻碍树突棘的发育。大鼠出生后的第一个星期，树突丝状体出现并与轴突相互作用形成新生的突触，在出生第二周中出现了细长的和蘑菇状的树突棘^[226]。我们注意到 PGRN 水平是随着发育过程而变化的，mPFC 的 PGRN 水平从出生后的第一个星期逐渐增加，在第二周达到高峰。KO 小鼠 PGRN 的水平随着发育也有相似变化，但与野生型小鼠相比，在出生后所有的时间点上 PGRN 的水平都明显升高。小鼠 PGRN 水平的改变提示了 PGRN 在早期出生后树突棘的成熟过程中发挥关键作用。

树突棘的形态可以分为三种类型，即细长形、蘑菇状和粗短形。细长形树突棘缺乏一个球头，通常出现在发育中的神经元树突上。树突棘形态学变化与信息输入密切相关，信息输入参与许多基本过程，如学习和记忆^[227]。树突棘的形态可塑性与功能可塑性密切相关，即突触可塑性。LTP 是突触传递的一种现象，被认为是学习和记忆的电生理基础。LTP 与突触后密度的增加和重构有关，原有的树突棘增大了，并与转录和翻译相关。局部敲低 PGRN 的水平恢复 KO 小鼠大脑中蘑菇状树突棘的比例。因此，可以观察到 PGRN shRNA 慢病毒注射小鼠脑中神经元功能的恢复。局部敲低 PGRN 还纠正了 LTP 的缺失，并逆转了恐惧记忆的伤害。外源性 PGRN 促进了野生型小鼠的突触传递和 GluA1 磷酸化，但在 KO 小鼠中却没有。可能在 KO 小鼠中，PGRN 的高基础水平阻止了外源性 PGRN 进一步促进突触可塑性。事实证明，

在 KO 小鼠中, PGRN 的局部敲除或 TNFR2/NF κ B 信号下调改善了突触可塑性和记忆缺失。这一发现证实了 KO 小鼠脑中过量 PGRN 破坏树突棘形态和功能可塑性的假设。

TNFR 在 PGRN 作用中扮演的角色存在着很大的争议。例如, 有报道称 PGRN 直接与 TNFRs 结合, 防止多发性关节炎小鼠模型的炎症和抑制 TNF α 激活^[163]。与 TNF α 相比, PGRN 对 TNFR2 具有显著的亲和力。在另一项研究中报道: PGRN 促进而不是抑制 TNF-TNFR2 相互作用从而调控 T 细胞的功能^[228]。此外, 还有人说 PGRN 不与 TNFR 结合, 并不是免疫或神经元细胞中 TNF α 依赖性信号或生物活性的直接调节者^[168]。然而, 在本研究中, 我们指出 PGRN 直接与 TNFRs 结合, 在 mPFC 中更倾向于与 TNFR2 结合。TNF α 的功能依赖于激活 TNFR 的类型。激活 TNFR1 会引起细胞损伤, 而激活 TNFR2 可以保护神经元存活^[229]。TNFR1 可与 sTNF α 或 mTNF α 结合, 但优先与 sTNF α 结合。相反, mTNF α 优先激活 TNFR2^[230]。因此, 我们推测 PGRN 是具有竞争性的 TNFR 配体, 而不是 TNF α 的拮抗剂。在本研究中, PGRN 被认为是 TNFR2 的激活剂, 通过 TNFR2/NF κ B 通路促进突触传递, 如阻断 TNFR2 可以抑制 PGRN 介导的突触传递促进作用。这些结果揭示了我们对 PGRN 和 TNF α 在突触结构和 L-LTP 诱导中的作用。

药理学家可以在不同水平上区分 TNFR2/NF κ B 信号通路。在 *FMRI*KO 小鼠中, 通过抑制 TNF α 合成或将跨膜 TNF α 转化为可溶 TNF α , 对小鼠的追踪恐惧记忆没有改善。然而, 抑制 NF κ B 核易位改善了 *FMRI* KO 小鼠的追踪恐惧记忆, 提示 NF κ B 的激活, 而不是 TNF α 的合成, 对提高学习和记忆能力至关重要。抑制 TNF α 合成不能改善学习记忆可能是由于其他细胞因子或生长因子产生代偿作用。

为了进一步证实 TNFR2/NF κ B 信号通路在 PGRN 介导的学习记忆中的作用, 我们在 mPFC 中进行了 PGRN 和 TNFR2 的双重敲低。单个敲低 PGRN 或 TNFR2 提高了 KO 小鼠的学习记忆能力。然而, PGRN 和 TNFR2 的双重敲除并没有明显的协同效应, 这表明 PGRN 和 TNFR2 有相同的信号通路。

小结

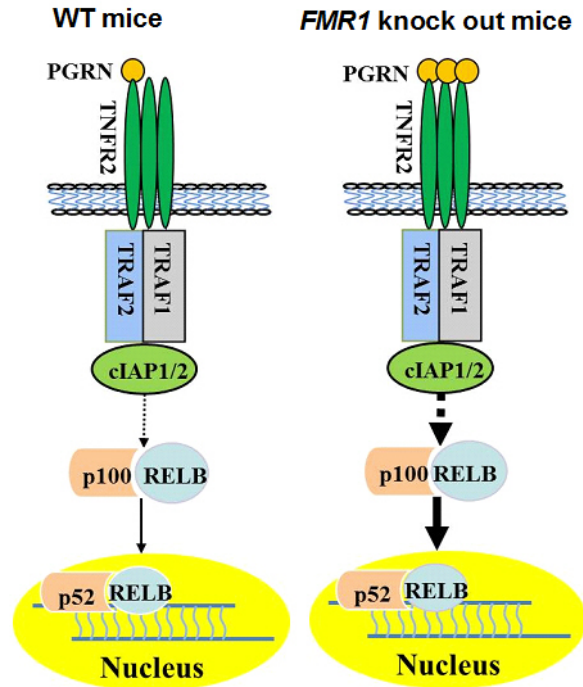


Figure 13. Schematic of PGRN/TNFR mediated signalling. Left: Normally, PGRN binds to TNFR2 and activates downstream effector molecules. It leads to activation and nuclear translation of NF κ B, which are critical for the spine development and synaptic plasticity. Right: Excessive PGRN induces overactivating TNFR2/NF κ B signalling pathway, leading to abnormal spine development and impaired synaptic plasticity in mPFC of *FMR1*KO mice.

综上所述，与野生型小鼠相比，过量 PGRN 通过过度激活 TNFR2/ NF κ B 信号通路 (Figure 13) 导致了异常的树突棘发育并损害 LTP 的诱导。这项工作提供了在突触发生的关键时期，过量的 PGRN 诱导树突棘发育异常并导致与 FXS 相关的突触可塑性障碍的直接证据。

参考文献

- [1] N. Zhong, W. Ju, W. Xu, L. Ye, Y. Shen, G. Wu, S. H. Chen, R. Jin, X. F. Hu, A. Yang, X. Liu, P. Poon, C. Pang, Y. Zheng, L. Song, P. Zhao, B. Fu, H. Gu and W. T. Brown. Frequency of the fragile X syndrome in Chinese mentally retarded populations is similar to that in Caucasians. *American journal of medical genetics*. 1999, 84: 191-194.
- [2] A. Rajaratnam, J. Shergill, M. Salcedo-Arellano, W. Saldarriaga, X. Duan and R. Hagerman. Fragile X syndrome and fragile X-associated disorders. *F1000Research*. 2017, 6: 2112.
- [3] F. Arechavaleta-Velasco, C. E. Perez-Juarez, G. L. Gerton and L. Diaz-Cueto. Progranulin and its biological effects in cancer. *Med Oncol*. 2017, 34: 194.
- [4] M. Woodbury-Smith and S. W. Scherer. Progress in the genetics of autism spectrum disorder. *Developmental medicine and child neurology*. 2018.
- [5] I. Hertz-Picciotto, R. J. Schmidt and P. Krakowiak. Understanding environmental contributions to autism: Causal concepts and the state of science. *Autism research : official journal of the International Society for Autism Research*. 2018.
- [6] R. J. Hagerman, E. Berry-Kravis, H. C. Hazlett, D. B. Bailey, Jr., H. Moine, R. F. Kooy, F. Tassone, I. Gantois, N. Sonenberg, J. L. Mandel and P. J. Hagerman. Fragile X syndrome. *Nature reviews. Disease primers*. 2017, 3: 17065.
- [7] M. Raspa, A. C. Wheeler and C. Riley. Public Health Literature Review of Fragile X Syndrome. *Pediatrics*. 2017, 139: S153-S171.
- [8] W. E. Kaufmann, S. A. Kidd, H. F. Andrews, D. B. Budimirovic, A. Esler, B. Haas-Givler, T. Stackhouse, C. Riley, G. Peacock, S. L. Sherman, W. T. Brown and E. Berry-Kravis. Autism Spectrum Disorder in Fragile X Syndrome: Cooccurring Conditions and Current Treatment. *Pediatrics*. 2017, 139: S194-S206.
- [9] S. Lee, J. Won, S. Park, S. R. Lee, K. T. Chang, J. H. Kim and Y. Hong. Beneficial effect of interventional exercise on autistic Fragile X syndrome. *Journal of physical therapy science*. 2017, 29: 760-762.
- [10] R. Willemsen, J. Levenga and B. A. Oostra. CGG repeat in the FMR1 gene: size matters. *Clinical genetics*. 2011, 80: 214-225.
- [11] F. Tassone, K. P. Iong, T. H. Tong, J. Lo, L. W. Gane, E. Berry-Kravis, D. Nguyen, L. Y. Mu, J. Laffin, D. B. Bailey and R. J. Hagerman. FMR1 CGG allele size and prevalence ascertained through newborn screening in the United States. *Genome medicine*. 2012, 4: 100.
- [12] M. M. Seltzer, M. W. Baker, J. Hong, M. Maenner, J. Greenberg and D. Mandel. Prevalence of CGG expansions of the FMR1 gene in a US population-based sample. *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*. 2012, 159B: 589-597.
- [13] A. L. Ludwig, G. M. Espinal, D. I. Pretto, A. L. Jamal, G. Arque, F. Tassone, R. F. Berman and P. J. Hagerman. CNS expression of murine fragile X protein (FMRP) as a function of CGG-repeat size. *Human molecular genetics*. 2014, 23: 3228-3238.
- [14] D. I. Pretto, G. Mendoza-Morales, J. Lo, R. Cao, A. Hadd, G. J. Latham, B. Durbin-Johnson, R.

Hagerman and F. Tassone. CGG allele size somatic mosaicism and methylation in FMR1 premutation alleles. *Journal of medical genetics*. 2014, 51: 309-318.

[15] F. Tassone, R. J. Hagerman, A. K. Taylor and P. J. Hagerman. A majority of fragile X males with methylated, full mutation alleles have significant levels of FMR1 messenger RNA. *Journal of medical genetics*. 2001, 38: 453-456.

[16] B. L. Goodlin-Jones, F. Tassone, L. W. Gane and R. J. Hagerman. Autistic spectrum disorder and the fragile X premutation. *Journal of developmental and behavioral pediatrics : JDBP*. 2004, 25: 392-398.

[17] D. Hessler, F. Tassone, D. Z. Loesch, E. Berry-Kravis, M. A. Leehey, L. W. Gane, I. Barbato, C. Rice, E. Gould, D. A. Hall, J. Grigsby, J. A. Wegelin, S. Harris, F. Lewin, D. Weinberg, P. J. Hagerman and R. J. Hagerman. Abnormal elevation of FMR1 mRNA is associated with psychological symptoms in individuals with the fragile X premutation. *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*. 2005, 139B: 115-121.

[18] P. D. Ladd, L. E. Smith, N. A. Rabaia, J. M. Moore, S. A. Georges, R. S. Hansen, R. J. Hagerman, F. Tassone, S. J. Tapscott and G. N. Filippova. An antisense transcript spanning the CGG repeat region of FMR1 is upregulated in premutation carriers but silenced in full mutation individuals. *Human molecular genetics*. 2007, 16: 3174-3187.

[19] A. J. Iliff, A. J. Renoux, A. Krans, K. Usdin, M. A. Sutton and P. K. Todd. Impaired activity-dependent FMRP translation and enhanced mGluR-dependent LTD in Fragile X premutation mice. *Human molecular genetics*. 2013, 22: 1180-1192.

[20] W. L. Stone and E. Los, *Fragile X Syndrome*, in: StatPearls, Treasure Island (FL), 2018.

[21] E. Berry-Kravis, L. Abrams, S. M. Coffey, D. A. Hall, C. Greco, L. W. Gane, J. Grigsby, J. A. Bourgeois, B. Finucane, S. Jacquemont, J. A. Brunberg, L. Zhang, J. Lin, F. Tassone, P. J. Hagerman, R. J. Hagerman and M. A. Leehey. Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome: clinical features, genetics, and testing guidelines. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2007, 22: 2018-2030, quiz 2140.

[22] S. M. Coffey, K. Cook, N. Tartaglia, F. Tassone, D. V. Nguyen, R. Pan, H. E. Bronsky, J. Yuhas, M. Borodyanskaya, J. Grigsby, M. Doerflinger, P. J. Hagerman and R. J. Hagerman. Expanded clinical phenotype of women with the FMR1 premutation. *American journal of medical genetics. Part A*. 2008, 146A: 1009-1016.

[23] S. Jacquemont, R. J. Hagerman, M. A. Leehey, D. A. Hall, R. A. Levine, J. A. Brunberg, L. Zhang, T. Jardini, L. W. Gane, S. W. Harris, K. Herman, J. Grigsby, C. M. Greco, E. Berry-Kravis, F. Tassone and P. J. Hagerman. Penetrance of the fragile X-associated tremor/ataxia syndrome in a premutation carrier population. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2004, 291: 460-469.

[24] S. Jacquemont, R. J. Hagerman, P. J. Hagerman and M. A. Leehey. Fragile-X syndrome and fragile X-associated tremor/ataxia syndrome: two faces of FMR1. *Lancet neurology*. 2007, 6: 45-55.

[25] T. W. Yu and E. Berry-Kravis. Autism and fragile x syndrome. *Seminars in neurology*. 2014, 34: 258-265.

[26] L. W. Wang, E. Berry-Kravis and R. J. Hagerman. Fragile X: leading the way for targeted treatments in autism. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2010, 7: 264-274.

[27] R. J. Hagerman, E. Berry-Kravis, W. E. Kaufmann, M. Y. Ono, N. Tartaglia, A. Lachiewicz, R. Kronk, C. Delahunty, D. Hessler, J. Visotsak, J. Picker, L. Gane and M. Tranfaglia. Advances in the treatment of

fragile X syndrome. *Pediatrics*. 2009, 123: 378-390.

[28] M. R. Almeida, M. C. Macario, L. Ramos, I. Baldeiras, M. H. Ribeiro and I. Santana. Portuguese family with the co-occurrence of frontotemporal lobar degeneration and neuronal ceroid lipofuscinosis phenotypes due to progranulin gene mutation. *Neurobiology of aging*. 2016, 41: 200 e201-200 e205.

[29] Z. Ahmed, H. Sheng, Y. F. Xu, W. L. Lin, A. E. Innes, J. Gass, X. Yu, C. A. Wuertzer, H. Hou, S. Chiba, K. Yamanouchi, M. Leissring, L. Petrucelli, M. Nishihara, M. L. Hutton, E. McGowan, D. W. Dickson and J. Lewis. Accelerated lipofuscinosis and ubiquitination in granulin knockout mice suggest a role for progranulin in successful aging. *The American journal of pathology*. 2010, 177: 311-324.

[30] V. M. Van Deerlin, P. M. Sleiman, M. Martinez-Lage, A. Chen-Plotkin, L. S. Wang, N. R. Graff-Radford, D. W. Dickson, R. Rademakers, B. F. Boeve, M. Grossman, S. E. Arnold, D. M. Mann, S. M. Pickering-Brown, H. Seelaar, P. Heutink, J. C. van Swieten, J. R. Murrell, B. Ghetti, S. Spina, J. Grafman, J. Hodges, M. G. Spillantini, S. Gilman, A. P. Lieberman, J. A. Kaye, R. L. Woltjer, E. H. Bigio, M. Mesulam, S. Al-Sarraj, C. Troakes, R. N. Rosenberg, C. L. White, 3rd, I. Ferrer, A. Llado, M. Neumann, H. A. Kretschmar, C. M. Hulette, K. A. Welsh-Bohmer, B. L. Miller, A. Alzualde, A. Lopez de Munain, A. C. McKee, M. Gearing, A. I. Levey, J. J. Lah, J. Hardy, J. D. Rohrer, T. Lashley, I. R. Mackenzie, H. H. Feldman, R. L. Hamilton, S. T. Dekosky, J. van der Zee, S. Kumar-Singh, C. Van Broeckhoven, R. Mayeux, J. P. Vonsattel, J. C. Troncoso, J. J. Kril, J. B. Kwok, G. M. Halliday, T. D. Bird, P. G. Ince, P. J. Shaw, N. J. Cairns, J. C. Morris, C. A. McLean, C. DeCarli, W. G. Ellis, S. H. Freeman, M. P. Frosch, J. H. Growdon, D. P. Perl, M. Sano, D. A. Bennett, J. A. Schneider, T. G. Beach, E. M. Reiman, B. K. Woodruff, J. Cummings, H. V. Vinters, C. A. Miller, H. C. Chui, I. Alafuzoff, P. Hartikainen, D. Seilhean, D. Galasko, E. Masliah, C. W. Cotman, M. T. Tunon, M. C. Martinez, D. G. Munoz, S. L. Carroll, D. Marson, P. F. Riederer, N. Bogdanovic, G. D. Schellenberg, H. Hakonarson, J. Q. Trojanowski and V. M. Lee. Common variants at 7p21 are associated with frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 inclusions. *Nature genetics*. 2010, 42: 234-239.

[31] N. Finch, M. M. Carrasquillo, M. Baker, N. J. Rutherford, G. Coppola, M. DeJesus-Hernandez, R. Crook, T. Hunter, R. Ghidoni, L. Benussi, J. Crook, E. Finger, K. J. Hantanpaa, A. M. Karydas, P. Sengdy, J. Gonzalez, W. W. Seeley, N. Johnson, T. G. Beach, M. Mesulam, G. Forloni, A. Kertesz, D. S. Knopman, R. Uitti, C. L. White, 3rd, R. Caselli, C. Lippa, E. H. Bigio, Z. K. Wszolek, G. Binetti, I. R. Mackenzie, B. L. Miller, B. F. Boeve, S. G. Younkin, D. W. Dickson, R. C. Petersen, N. R. Graff-Radford, D. H. Geschwind and R. Rademakers. TMEM106B regulates progranulin levels and the penetrance of FTL in GRN mutation carriers. *Neurology*. 2011, 76: 467-474.

[32] O. A. Brady, Y. Zheng, K. Murphy, M. Huang and F. Hu. The frontotemporal lobar degeneration risk factor, TMEM106B, regulates lysosomal morphology and function. *Human molecular genetics*. 2013, 22: 685-695.

[33] M. Stagi, Z. A. Klein, T. J. Gould, J. Bewersdorf and S. M. Strittmatter. Lysosome size, motility and stress response regulated by fronto-temporal dementia modifier TMEM106B. *Molecular and cellular neurosciences*. 2014, 61: 226-240.

[34] X. Zhou, L. Sun, F. Bastos de Oliveira, X. Qi, W. J. Brown, M. B. Smolka, Y. Sun and F. Hu. Prosaposin facilitates sortilin-independent lysosomal trafficking of progranulin. *The Journal of cell biology*. 2015, 210: 991-1002.

[35] Z. Li, Y. F. Lu, C. L. Li, Y. Wang, W. Sun, T. He, X. F. Chen, X. L. Wang and J. Chen. Social interaction with a cagemate in pain facilitates subsequent spinal nociception via activation of the medial prefrontal

cortex in rats. *Pain*. 2014, 155: 1253-1261.

[36] D. J. Langford, S. E. Crager, Z. Shehzad, S. B. Smith, S. G. Sotocinal, J. S. Levenstadt, M. L. Chanda, D. J. Levitin and J. S. Mogil. Social modulation of pain as evidence for empathy in mice. *Science*. 2006, 312: 1967-1970.

[37] C. M. Lang, K. Fellerer, B. M. Schwenk, P. H. Kuhn, E. Kremmer, D. Edbauer, A. Capell and C. Haass. Membrane orientation and subcellular localization of transmembrane protein 106B (TMEM106B), a major risk factor for frontotemporal lobar degeneration. *The Journal of biological chemistry*. 2012, 287: 19355-19365.

[38] I. Ben-Ami Bartal, D. A. Rodgers, M. S. Bernardez Sarria, J. Decety and P. Mason. Pro-social behavior in rats is modulated by social experience. *eLife*. 2014, 3: e01385.

[39] C. Marquez, S. M. Rennie, D. F. Costa and M. A. Moita. Prosocial Choice in Rats Depends on Food-Seeking Behavior Displayed by Recipients. *Current biology : CB*. 2015, 25: 1736-1745.

[40] J. Hernandez-Lallement, M. van Wingerden, C. Marx, M. Srejjic and T. Kalenscher. Rats prefer mutual rewards in a prosocial choice task. *Frontiers in neuroscience*. 2014, 8: 443.

[41] U. Frith. Mind blindness and the brain in autism. *Neuron*. 2001, 32: 969-979.

[42] D. C. Kidd and E. Castano. Reading literary fiction improves theory of mind. *Science*. 2013, 342: 377-380.

[43] E. van Roekel, R. H. Scholte and R. Didden. Bullying among adolescents with autism spectrum disorders: prevalence and perception. *Journal of autism and developmental disorders*. 2010, 40: 63-73.

[44] K. Preckel, P. Kanske, T. Singer, F. M. Paulus and S. Krach. Clinical trial of modulatory effects of oxytocin treatment on higher-order social cognition in autism spectrum disorder: a randomized, placebo-controlled, double-blind and crossover trial. *BMC psychiatry*. 2016, 16: 329.

[45] M. Althaus, Y. Groen, A. A. Wijers, H. Noltes, O. Tucha and P. J. Hoekstra. Oxytocin enhances orienting to social information in a selective group of high-functioning male adults with autism spectrum disorder. *Neuropsychologia*. 2015, 79: 53-69.

[46] C. K. De Dreu and M. E. Kret. Oxytocin Conditions Intergroup Relations Through Upregulated In-Group Empathy, Cooperation, Conformity, and Defense. *Biological psychiatry*. 2016, 79: 165-173.

[47] S. Strang, H. Gerhardt, N. Marsh, S. Oroz Artigas, Y. Hu, R. Hurlmann and S. Q. Park. A matter of distance-The effect of oxytocin on social discounting is empathy-dependent. *Psychoneuroendocrinology*. 2017, 78: 229-232.

[48] S. Palgi, E. Klein and S. Shamay-Tsoory. The role of oxytocin in empathy in PTSD. *Psychological trauma : theory, research, practice and policy*. 2017, 9: 70-75.

[49] A. Abu-Akel, S. Palgi, E. Klein, J. Decety and S. Shamay-Tsoory. Oxytocin increases empathy to pain when adopting the other- but not the self-perspective. *Social neuroscience*. 2015, 10: 7-15.

[50] R. Stoger, D. P. Genreux, R. J. Hagerman, P. J. Hagerman, F. Tassone and C. D. Laird. Testing the FMR1 promoter for mosaicism in DNA methylation among CpG sites, strands, and cells in FMR1-expressing males with fragile X syndrome. *PloS one*. 2011, 6: e23648.

[51] S. Jawaid, G. J. Kidd, J. Wang, C. Swetlik, R. Dutta and B. D. Trapp. Alterations in CA1 hippocampal synapses in a mouse model of fragile X syndrome. *Glia*. 2018, 66: 789-800.

[52] W. J. Bian, W. Y. Miao, S. J. He, Z. Qiu and X. Yu. Coordinated Spine Pruning and Maturation Mediated by Inter-Spine Competition for Cadherin/Catenin Complexes. *Cell*. 2015, 162: 808-822.

[53] G. N. Elston, T. Oga and I. Fujita. Spinogenesis and pruning scales across functional hierarchies. *The*

- Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 2009, 29: 3271-3275.
- [54] Y. Tian, C. Yang, S. Shang, Y. Cai, X. Deng, J. Zhang, F. Shao, D. Zhu, Y. Liu, G. Chen, J. Liang, Q. Sun, Z. Qiu and C. Zhang. Loss of FMRP Impaired Hippocampal Long-Term Plasticity and Spatial Learning in Rats. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2017, 10: 269.
- [55] N. S. Desai, T. M. Casimiro, S. M. Gruber and P. W. Vanderklish. Early postnatal plasticity in neocortex of Fmr1 knockout mice. *Journal of neurophysiology*. 2006, 96: 1734-1745.
- [56] Y. Q. Zhang, A. M. Bailey, H. J. Matthies, R. B. Renden, M. A. Smith, S. D. Speese, G. M. Rubin and K. Broadie. Drosophila fragile X-related gene regulates the MAP1B homolog Futsch to control synaptic structure and function. *Cell*. 2001, 107: 591-603.
- [57] B. Tucker, R. I. Richards and M. Lardelli. Contribution of mGluR and Fmr1 functional pathways to neurite morphogenesis, craniofacial development and fragile X syndrome. *Human molecular genetics*. 2006, 15: 3446-3458.
- [58] A. Bhattacharyya and X. Zhao. Human pluripotent stem cell models of Fragile X syndrome. *Molecular and cellular neurosciences*. 2016, 73: 43-51.
- [59] J. R. Brouwer, E. J. Mientjes, C. E. Bakker, I. M. Nieuwenhuizen, L. A. Severijnen, H. C. Van der Linde, D. L. Nelson, B. A. Oostra and R. Willemsen. Elevated Fmr1 mRNA levels and reduced protein expression in a mouse model with an unmethylated Fragile X full mutation. *Experimental cell research*. 2007, 313: 244-253.
- [60] Y. Verlinsky, N. Strelchenko, V. Kukhareno, S. Rechitsky, O. Verlinsky, V. Galat and A. Kuliev. Human embryonic stem cell lines with genetic disorders. *Reproductive biomedicine online*. 2005, 10: 105-110.
- [61] D. Ben-Yosef, M. Malcov and R. Eiges. PGD-derived human embryonic stem cell lines as a powerful tool for the study of human genetic disorders. *Molecular and cellular endocrinology*. 2008, 282: 153-158.
- [62] A. Kuliev, S. Rechitsky, I. Tur-Kaspa and Y. Verlinsky. Preimplantation genetics: Improving access to stem cell therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2005, 1054: 223-227.
- [63] S. J. Pickering, P. R. Braude, M. Patel, C. J. Burns, J. Trussler, V. Bolton and S. Minger. Preimplantation genetic diagnosis as a novel source of embryos for stem cell research. *Reproductive biomedicine online*. 2003, 7: 353-364.
- [64] E. L. Stephenson, C. Mason and P. R. Braude. Preimplantation genetic diagnosis as a source of human embryonic stem cells for disease research and drug discovery. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*. 2009, 116: 158-165.
- [65] J. Gerhardt, M. J. Tomishima, N. Zaninovic, D. Colak, Z. Yan, Q. Zhan, Z. Rosenwaks, S. R. Jaffrey and C. L. Schildkraut. The DNA replication program is altered at the FMR1 locus in fragile X embryonic stem cells. *Molecular cell*. 2014, 53: 19-31.
- [66] M. Avitzour, H. Mor-Shaked, S. Yanovsky-Dagan, S. Aharoni, G. Altarescu, P. Renbaum, T. Eldar-Geva, O. Schonberger, E. Levy-Lahad, S. Epsztejn-Litman and R. Eiges. FMR1 epigenetic silencing commonly occurs in undifferentiated fragile X-affected embryonic stem cells. *Stem cell reports*. 2014, 3: 699-706.
- [67] L. Liu-Yesucevitz, G. J. Bassell, A. D. Gitler, A. C. Hart, E. Klann, J. D. Richter, S. T. Warren and B. Wolozin. Local RNA translation at the synapse and in disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2011, 31: 16086-16093.
- [68] M. S. Sidorov, B. D. Auerbach and M. F. Bear. Fragile X mental retardation protein and synaptic plasticity. *Molecular brain*. 2013, 6: 15.
- [69] J. C. Sears and K. Broadie. Fragile X Mental Retardation Protein Regulates Activity-Dependent

- Membrane Trafficking and Trans-Synaptic Signaling Mediating Synaptic Remodeling. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2017, 10: 440.
- [70] W. Guo, A. M. Allan, R. Zong, L. Zhang, E. B. Johnson, E. G. Schaller, A. C. Murthy, S. L. Goggin, A. J. Eisch, B. A. Oostra, D. L. Nelson, P. Jin and X. Zhao. Ablation of Fmrp in adult neural stem cells disrupts hippocampus-dependent learning. *Nature medicine*. 2011, 17: 559-565.
- [71] W. Guo, A. C. Murthy, L. Zhang, E. B. Johnson, E. G. Schaller, A. M. Allan and X. Zhao. Inhibition of GSK3beta improves hippocampus-dependent learning and rescues neurogenesis in a mouse model of fragile X syndrome. *Human molecular genetics*. 2012, 21: 681-691.
- [72] Y. Luo, G. Shan, W. Guo, R. D. Smrt, E. B. Johnson, X. Li, R. L. Pfeiffer, K. E. Szulwach, R. Duan, B. Z. Barkho, W. Li, C. Liu, P. Jin and X. Zhao. Fragile x mental retardation protein regulates proliferation and differentiation of adult neural stem/progenitor cells. *PLoS genetics*. 2010, 6: e1000898.
- [73] B. E. Pfeiffer, T. Zang, J. R. Wilkerson, M. Taniguchi, M. A. Maksimova, L. N. Smith, C. W. Cowan and K. M. Huber. Fragile X mental retardation protein is required for synapse elimination by the activity-dependent transcription factor MEF2. *Neuron*. 2010, 66: 191-197.
- [74] A. Cruz-Martin, M. Crespo and C. Portera-Cailliau. Delayed stabilization of dendritic spines in fragile X mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2010, 30: 7793-7803.
- [75] S. H. Scharf, G. Jaeschke, J. G. Wettstein and L. Lindemann. Metabotropic glutamate receptor 5 as drug target for Fragile X syndrome. *Current opinion in pharmacology*. 2015, 20: 124-134.
- [76] R. Lozano, E. B. Hare and R. J. Hagerman. Modulation of the GABAergic pathway for the treatment of fragile X syndrome. *Neuropsychiatric disease and treatment*. 2014, 10: 1769-1779.
- [77] D. Z. Loesch, R. M. Huggins and R. J. Hagerman. Phenotypic variation and FMRP levels in fragile X. *Mental retardation and developmental disabilities research reviews*. 2004, 10: 31-41.
- [78] D. Z. Loesch, S. Sherwell, G. Kinsella, F. Tassone, A. Taylor, D. Amor, S. Sung and A. Evans. Fragile X-associated tremor/ataxia phenotype in a male carrier of unmethylated full mutation in the FMR1 gene. *Clinical genetics*. 2012, 82: 88-92.
- [79] Y. T. Hwang, S. M. Aliaga, M. Arpone, D. Francis, X. Li, B. Chong, H. R. Slater, C. Rogers, L. Bretherton, M. Hunter, R. Heard and D. E. Godler. Partially methylated alleles, microdeletion, and tissue mosaicism in a fragile X male with tremor and ataxia at 30 years of age: A case report. *American journal of medical genetics. Part A*. 2016, 170: 3327-3332.
- [80] K. Basuta, A. Schneider, L. Gane, J. Polussa, B. Woodruff, D. Pretto, R. Hagerman and F. Tassone. High functioning male with fragile X syndrome and fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *American journal of medical genetics. Part A*. 2015, 167A: 2154-2161.
- [81] S. Schwemmle, E. de Graaff, H. Deissler, D. Glaser, D. Wohrle, I. Kennerknecht, W. Just, B. A. Oostra, W. Doerfler, W. Vogel and P. Steinbach. Characterization of FMR1 promoter elements by in vivo-footprinting analysis. *American journal of human genetics*. 1997, 60: 1354-1362.
- [82] V. J. Peschansky, C. Pastori, Z. Zeier, D. Motti, K. Wentzel, D. Velmeshev, M. Magistri, J. L. Bixby, V. P. Lemmon, J. P. Silva and C. Wahlestedt. Changes in expression of the long non-coding RNA FMR4 associate with altered gene expression during differentiation of human neural precursor cells. *Frontiers in genetics*. 2015, 6: 263.
- [83] J. Liu, J. Chen, S. Ehrlich, E. Walton, T. White, N. Perrone-Bizzozero, J. Bustillo, J. A. Turner and V. D. Calhoun. Methylation patterns in whole blood correlate with symptoms in schizophrenia patients.

Schizophrenia bulletin. 2014, 40: 769-776.

[84] C. Pastori, V. J. Peschansky, D. Barbouth, A. Mehta, J. P. Silva and C. Wahlestedt. Comprehensive analysis of the transcriptional landscape of the human FMR1 gene reveals two new long noncoding RNAs differentially expressed in Fragile X syndrome and Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Human genetics*. 2014, 133: 59-67.

[85] M. A. Shaw, P. Chiurazzi, D. R. Romain, G. Neri and J. Gecz. A novel gene, FAM11A, associated with the FRAXF CpG island is transcriptionally silent in FRAXF full mutation. *European journal of human genetics : EJHG*. 2002, 10: 767-772.

[86] S. Lanni, M. Goracci, L. Borrelli, G. Mancano, P. Chiurazzi, U. Moscato, F. Ferre, M. Helmer-Citterich, E. Tabolacci and G. Neri. Role of CTCF protein in regulating FMR1 locus transcription. *PLoS genetics*. 2013, 9: e1003601.

[87] R. Eiges, A. Urbach, M. Malcov, T. Frumkin, T. Schwartz, A. Amit, Y. Yaron, A. Eden, O. Yanuka, N. Benvenisty and D. Ben-Yosef. Developmental study of fragile X syndrome using human embryonic stem cells derived from preimplantation genetically diagnosed embryos. *Cell stem cell*. 2007, 1: 568-577.

[88] D. Kumari and K. Usdin. Polycomb group complexes are recruited to reactivated FMR1 alleles in Fragile X syndrome in response to FMR1 transcription. *Human molecular genetics*. 2014, 23: 6575-6583.

[89] D. Colak, N. Zaninovic, M. S. Cohen, Z. Rosenwaks, W. Y. Yang, J. Gerhardt, M. D. Disney and S. R. Jaffrey. Promoter-bound trinucleotide repeat mRNA drives epigenetic silencing in fragile X syndrome. *Science*. 2014, 343: 1002-1005.

[90] M. Groh, M. M. Lufino, R. Wade-Martins and N. Gromak. R-loops associated with triplet repeat expansions promote gene silencing in Friedreich ataxia and fragile X syndrome. *PLoS genetics*. 2014, 10: e1004318.

[91] K. C. Dominick, L. K. Wink, E. V. Pedapati, R. Shaffer, J. A. Sweeney and C. A. Erickson. Risperidone Treatment for Irritability in Fragile X Syndrome. *Journal of child and adolescent psychopharmacology*. 2018.

[92] M. Qin, Z. Xia, T. Huang and C. B. Smith. Effects of chronic immobilization stress on anxiety-like behavior and basolateral amygdala morphology in Fmr1 knockout mice. *Neuroscience*. 2011, 194: 282-290.

[93] S. S. Hall. Treatments for fragile X syndrome: a closer look at the data. *Developmental disabilities research reviews*. 2009, 15: 353-360.

[94] R. R. AlOlabay, S. R. Sweha, M. Silva, B. Durbin-Johnson, C. M. Yrigollen, D. Pretto, R. J. Hagerman and F. Tassone. Molecular biomarkers predictive of sertraline treatment response in young children with fragile X syndrome. *Brain & development*. 2017, 39: 483-492.

[95] S. Castagnola, B. Bardoni and T. Maurin. The Search for an Effective Therapy to Treat Fragile X Syndrome: Dream or Reality? *Frontiers in synaptic neuroscience*. 2017, 9: 15.

[96] M. Torrioli, S. Vernacotola, C. Setini, F. Bevilacqua, D. Martinelli, M. Snape, J. A. Hutchison, F. R. Di Raimo, E. Tabolacci and G. Neri. Treatment with valproic acid ameliorates ADHD symptoms in fragile X syndrome boys. *American journal of medical genetics. Part A*. 2010, 152A: 1420-1427.

[97] C. Bagni and B. A. Oostra. Fragile X syndrome: From protein function to therapy. *American journal of medical genetics. Part A*. 2013, 161A: 2809-2821.

[98] D. Pellerin, A. Caku, M. Fradet, P. Bouvier, J. Dube and F. Corbin. Lovastatin corrects ERK pathway hyperactivation in fragile X syndrome: potential of platelet's signaling cascades as new outcome measures in clinical trials. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals*.

2016, 21: 497-508.

[99] H. Wood. Neurodevelopmental disorders: Metformin - a therapeutic option for fragile X syndrome? *Nature reviews. Neurology*. 2017, 13: 384-385.

[100] H. Sidhu, L. E. Dansie, P. W. Hickmott, D. W. Ethell and I. M. Ethell. Genetic removal of matrix metalloproteinase 9 rescues the symptoms of fragile X syndrome in a mouse model. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2014, 34: 9867-9879.

[101] Z. Liu and C. B. Smith. Lithium: a promising treatment for fragile X syndrome. *ACS chemical neuroscience*. 2014, 5: 477-483.

[102] M. Chatterjee, P. K. Kurup, C. J. Lundbye, A. K. Hugger Toft, J. Kwon, J. Benedict, M. Kamceva, T. G. Banke and P. J. Lombroso. STEP inhibition reverses behavioral, electrophysiologic, and synaptic abnormalities in Fmr1 KO mice. *Neuropharmacology*. 2018, 128: 43-53.

[103] A. Bhattacharya, M. Mamcarz, C. Mullins, A. Choudhury, R. G. Boyle, D. G. Smith, D. W. Walker and E. Klann. Targeting Translation Control with p70 S6 Kinase 1 Inhibitors to Reverse Phenotypes in Fragile X Syndrome Mice. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2016, 41: 1991-2000.

[104] M. Gomis-Gonzalez, A. Busquets-Garcia, C. Matute, R. Maldonado, S. Mato and A. Ozaita. Possible Therapeutic Doses of Cannabinoid Type 1 Receptor Antagonist Reverses Key Alterations in Fragile X Syndrome Mouse Model. *Genes*. 2016, 7.

[105] B. M. Dolan, S. G. Duron, D. A. Campbell, B. Vollrath, B. S. Shankaranarayana Rao, H. Y. Ko, G. G. Lin, A. Govindarajan, S. Y. Choi and S. Tonegawa. Rescue of fragile X syndrome phenotypes in Fmr1 KO mice by the small-molecule PAK inhibitor FRAX486. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013, 110: 5671-5676.

[106] E. Berry-Kravis, S. E. Krause, S. S. Block, S. Guter, J. Wu, S. Leurgans, P. Decle, K. Potanos, E. Cook, J. Salt, D. Maino, D. Weinberg, R. Lara, T. Jardini, J. Cogswell, S. A. Johnson and R. Hagerman. Effect of CX516, an AMPA-modulating compound, on cognition and behavior in fragile X syndrome: a controlled trial. *Journal of child and adolescent psychopharmacology*. 2006, 16: 525-540.

[107] D. Kumari and K. Usdin. Sustained expression of FMR1 mRNA from reactivated fragile X syndrome alleles after treatment with small molecules that prevent trimethylation of H3K27. *Human molecular genetics*. 2016, 25: 3689-3698.

[108] P. Chiurazzi, M. G. Pomponi, R. Willemsen, B. A. Oostra and G. Neri. In vitro reactivation of the FMR1 gene involved in fragile X syndrome. *Human molecular genetics*. 1998, 7: 109-113.

[109] R. Pietrobono, M. G. Pomponi, E. Tabolacci, B. Oostra, P. Chiurazzi and G. Neri. Quantitative analysis of DNA demethylation and transcriptional reactivation of the FMR1 gene in fragile X cells treated with 5-azadeoxycytidine. *Nucleic acids research*. 2002, 30: 3278-3285.

[110] S. Gholizadeh, J. Arsenault, I. C. Xuan, L. K. Pacey and D. R. Hampson. Reduced phenotypic severity following adeno-associated virus-mediated Fmr1 gene delivery in fragile X mice. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2014, 39: 3100-3111.

[111] N. Xie, H. Gong, J. A. Suhl, P. Chopra, T. Wang and S. T. Warren. Reactivation of FMR1 by CRISPR/Cas9-Mediated Deletion of the Expanded CGG-Repeat of the Fragile X Chromosome. *PloS one*. 2016, 11: e0165499.

[112] X. S. Liu, H. Wu, M. Krzisch, X. Wu, J. Graef, J. Muffat, D. Hnisz, C. H. Li, B. Yuan, C. Xu, Y. Li, D.

- Vershkov, A. Cacace, R. A. Young and R. Jaenisch. Rescue of Fragile X Syndrome Neurons by DNA Methylation Editing of the FMR1 Gene. *Cell*. 2018.
- [113] C. Y. Park, T. Halevy, D. R. Lee, J. J. Sung, J. S. Lee, O. Yanuka, N. Benvenisty and D. W. Kim. Reversion of FMR1 Methylation and Silencing by Editing the Triplet Repeats in Fragile X iPSC-Derived Neurons. *Cell reports*. 2015, 13: 234-241.
- [114] C. A. Erickson, M. H. Davenport, T. L. Schaefer, L. K. Wink, E. V. Pedapati, J. A. Sweeney, S. E. Fitzpatrick, W. T. Brown, D. Budimirovic, R. J. Hagerman, D. Hessler, W. E. Kaufmann and E. Berry-Kravis. Fragile X targeted pharmacotherapy: lessons learned and future directions. *Journal of neurodevelopmental disorders*. 2017, 9: 7.
- [115] V. Abella, J. Pino, M. Scotece, J. Conde, F. Lago, M. A. Gonzalez-Gay, A. Mera, R. Gomez, A. Mobasher and O. Gualillo. Progranulin as a biomarker and potential therapeutic agent. *Drug discovery today*. 2017, 22: 1557-1564.
- [116] M. Neumann, R. Rademakers, S. Roeber, M. Baker, H. A. Kretschmar and I. R. Mackenzie. A new subtype of frontotemporal lobar degeneration with FUS pathology. *Brain : a journal of neurology*. 2009, 132: 2922-2931.
- [117] B. P. Chitramuthu, H. P. J. Bennett and A. Bateman. Progranulin: a new avenue towards the understanding and treatment of neurodegenerative disease. *Brain : a journal of neurology*. 2017, 140: 3081-3104.
- [118] J. Jian, J. Konopka and C. Liu. Insights into the role of progranulin in immunity, infection, and inflammation. *Journal of leukocyte biology*. 2013, 93: 199-208.
- [119] T. L. Petkau, S. J. Neal, P. C. Orban, J. L. MacDonald, A. M. Hill, G. Lu, H. H. Feldman, I. R. Mackenzie and B. R. Leavitt. Progranulin expression in the developing and adult murine brain. *The Journal of comparative neurology*. 2010, 518: 3931-3947.
- [120] Z. Ahmed, I. R. Mackenzie, M. L. Hutton and D. W. Dickson. Progranulin in frontotemporal lobar degeneration and neuroinflammation. *Journal of neuroinflammation*. 2007, 4: 7.
- [121] T. L. Petkau and B. R. Leavitt. Progranulin in neurodegenerative disease. *Trends in neurosciences*. 2014, 37: 388-398.
- [122] S. A. Tenenbaum, C. C. Carson, P. J. Lager and J. D. Keene. Identifying mRNA subsets in messenger ribonucleoprotein complexes by using cDNA arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000, 97: 14085-14090.
- [123] K. Moisse, K. Volkening, C. Leystra-Lantz, I. Welch, T. Hill and M. J. Strong. Divergent patterns of cytosolic TDP-43 and neuronal progranulin expression following axotomy: implications for TDP-43 in the physiological response to neuronal injury. *Brain research*. 2009, 1249: 202-211.
- [124] D. Galimberti, C. Fenoglio, F. Cortini, M. Serpente, E. Venturelli, C. Villa, F. Clerici, A. Marcone, L. Benussi, R. Ghidoni, S. Gallone, D. Scalabrini, I. Restelli, F. Martinelli Boneschi, S. Cappa, G. Binetti, C. Mariani, I. Rainero, M. T. Giordana, N. Bresolin and E. Scarpini. GRN variability contributes to sporadic frontotemporal lobar degeneration. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2010, 19: 171-177.
- [125] M. Wang, G. Li, J. Yin, T. Lin and J. Zhang. Progranulin overexpression predicts overall survival in patients with glioblastoma. *Med Oncol*. 2012, 29: 2423-2431.
- [126] H. S. Suh, N. Choi, L. Tarassishin and S. C. Lee. Regulation of progranulin expression in human microglia and proteolysis of progranulin by matrix metalloproteinase-12 (MMP-12). *PloS one*. 2012, 7: e35115.

- [127] B. P. Chitramuthu, D. C. Baranowski, D. G. Kay, A. Bateman and H. P. Bennett. Progranulin modulates zebrafish motoneuron development in vivo and rescues truncation defects associated with knockdown of Survival motor neuron 1. *Molecular neurodegeneration*. 2010, 5: 41.
- [128] T. L. Petkau, S. J. Neal, A. Milnerwood, A. Mew, A. M. Hill, P. Orban, J. Gregg, G. Lu, H. H. Feldman, I. R. Mackenzie, L. A. Raymond and B. R. Leavitt. Synaptic dysfunction in progranulin-deficient mice. *Neurobiology of disease*. 2012, 45: 711-722.
- [129] A. S. Carlo. Sortilin, a novel APOE receptor implicated in Alzheimer disease. *Prion*. 2013, 7: 378-382.
- [130] R. Tanimoto, C. Palladino, S. Q. Xu, S. Buraschi, T. Neill, L. G. Gomella, S. C. Peiper, A. Belfiore, R. V. Iozzo and A. Morriore. The perlecan-interacting growth factor progranulin regulates ubiquitination, sorting, and lysosomal degradation of sortilin. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2017, 64: 27-39.
- [131] J. Gass, W. C. Lee, C. Cook, N. Finch, C. Stetler, K. Jansen-West, J. Lewis, C. D. Link, R. Rademakers, A. Nykjaer and L. Petrucelli. Progranulin regulates neuronal outgrowth independent of sortilin. *Molecular neurodegeneration*. 2012, 7: 33.
- [132] L. De Muynck, S. Herdewyn, S. Beel, W. Scheveneels, L. Van Den Bosch, W. Robberecht and P. Van Damme. The neurotrophic properties of progranulin depend on the granulin E domain but do not require sortilin binding. *Neurobiology of aging*. 2013, 34: 2541-2547.
- [133] C. Colombrita, E. Onesto, F. Megiorni, A. Pizzuti, F. E. Baralle, E. Buratti, V. Silani and A. Ratti. TDP-43 and FUS RNA-binding proteins bind distinct sets of cytoplasmic messenger RNAs and differently regulate their post-transcriptional fate in motoneuron-like cells. *The Journal of biological chemistry*. 2012, 287: 15635-15647.
- [134] S. Kumar-Singh. Progranulin and TDP-43: mechanistic links and future directions. *Journal of molecular neuroscience : MN*. 2011, 45: 561-573.
- [135] L. Tapia, A. Milnerwood, A. Guo, F. Mills, E. Yoshida, C. Vasuta, I. R. Mackenzie, L. Raymond, M. Cynader, W. Jia and S. X. Bamji. Progranulin deficiency decreases gross neural connectivity but enhances transmission at individual synapses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2011, 31: 11126-11132.
- [136] Y. Aoki, R. Manzano, Y. Lee, R. Dafinca, M. Aoki, A. G. L. Douglas, M. A. Varela, C. Sathyaprakash, J. Scaber, P. Barbagallo, P. Vader, I. Mager, K. Ezzat, M. R. Turner, N. Ito, S. Gasco, N. Ohbayashi, S. El Andaloussi, S. Takeda, M. Fukuda, K. Talbot and M. J. A. Wood. C9orf72 and RAB7L1 regulate vesicle trafficking in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Brain : a journal of neurology*. 2017, 140: 887-897.
- [137] E. Petoukhov, S. Fernando, F. Mills, F. Shivji, D. Hunter, C. Krieger, M. A. Silverman and S. X. Bamji. Activity-dependent secretion of progranulin from synapses. *Journal of cell science*. 2013, 126: 5412-5421.
- [138] J. Kocerha, N. Kouri, M. Baker, N. Finch, M. DeJesus-Hernandez, J. Gonzalez, K. Chidamparam, K. A. Josephs, B. F. Boeve, N. R. Graff-Radford, J. Crook, D. W. Dickson and R. Rademakers. Altered microRNA expression in frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 pathology caused by progranulin mutations. *BMC genomics*. 2011, 12: 527.
- [139] J. Y. Kim, D. H. Kim, J. H. Kim, Y. S. Yang, W. Oh, E. H. Lee and J. W. Chang. Umbilical cord blood mesenchymal stem cells protect amyloid-beta42 neurotoxicity via paracrine. *World journal of stem cells*. 2012, 4: 110-116.
- [140] S. Almeida, Z. Zhang, G. Coppola, W. Mao, K. Futai, A. Karydas, M. D. Geschwind, M. C. Tartaglia,

- F. Gao, D. Gianni, M. Sena-Esteves, D. H. Geschwind, B. L. Miller, R. V. Farese, Jr. and F. B. Gao. Induced pluripotent stem cell models of progranulin-deficient frontotemporal dementia uncover specific reversible neuronal defects. *Cell reports*. 2012, 2: 789-798.
- [141] J. Tao, F. Ji, F. Wang, B. Liu and Y. Zhu. Neuroprotective effects of progranulin in ischemic mice. *Brain research*. 2012, 1436: 130-136.
- [142] T. L. Petkau, S. Zhu, G. Lu, S. Fernando, M. Cynader and B. R. Leavitt. Sensitivity to neurotoxic stress is not increased in progranulin-deficient mice. *Neurobiology of aging*. 2013, 34: 2548-2550.
- [143] J. K. Gotz, C. M. Lang, C. Haass and A. Capell. Impaired protein degradation in FTL and related disorders. *Ageing research reviews*. 2016, 32: 122-139.
- [144] K. R. Smith, J. Damiano, S. Franceschetti, S. Carpenter, L. Canafoglia, M. Morbin, G. Rossi, D. Pareyson, S. E. Mole, J. F. Staropoli, K. B. Sims, J. Lewis, W. L. Lin, D. W. Dickson, H. H. Dahl, M. Bahlo and S. F. Berkovic. Strikingly different clinicopathological phenotypes determined by progranulin-mutation dosage. *American journal of human genetics*. 2012, 90: 1102-1107.
- [145] J. Decety. The neuroevolution of empathy. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2011, 1231: 35-45.
- [146] F. Hu, T. Padukkavidana, C. B. Vaegter, O. A. Brady, Y. Zheng, I. R. Mackenzie, H. H. Feldman, A. Nykjaer and S. M. Strittmatter. Sortilin-mediated endocytosis determines levels of the frontotemporal dementia protein, progranulin. *Neuron*. 2010, 68: 654-667.
- [147] M. Canuel, Y. Libin and C. R. Morales. The interactomics of sortilin: an ancient lysosomal receptor evolving new functions. *Histology and histopathology*. 2009, 24: 481-492.
- [148] X. Zhou, L. Sun, O. A. Brady, K. A. Murphy and F. Hu. Elevated TMEM106B levels exaggerate lipofuscin accumulation and lysosomal dysfunction in aged mice with progranulin deficiency. *Acta neuropathologica communications*. 2017, 5: 9.
- [149] H. Rhinn and A. Abeliovich. Differential Aging Analysis in Human Cerebral Cortex Identifies Variants in TMEM106B and GRN that Regulate Aging Phenotypes. *Cell systems*. 2017, 4: 404-415 e405.
- [150] C. Altmann, S. Hardt, C. Fischer, J. Heidler, H. Y. Lim, A. Haussler, B. Albuquerque, B. Zimmer, C. Moser, C. Behrends, F. Koentgen, I. Wittig, M. H. Schmidt, A. M. Clement, T. Deller and I. Tegeder. Progranulin overexpression in sensory neurons attenuates neuropathic pain in mice: Role of autophagy. *Neurobiology of disease*. 2016, 96: 294-311.
- [151] X. Gao, A. P. Joselin, L. Wang, A. Kar, P. Ray, A. Bateman, A. M. Goate and J. Y. Wu. Progranulin promotes neurite outgrowth and neuronal differentiation by regulating GSK-3beta. *Protein & cell*. 2010, 1: 552-562.
- [152] Z. He, A. Ismail, L. Kriazhev, G. Sadvakassova and A. Bateman. Progranulin (PC-cell-derived growth factor/acrogranin) regulates invasion and cell survival. *Cancer research*. 2002, 62: 5590-5596.
- [153] E. Y. Rosen, E. M. Wexler, R. Versano, G. Coppola, F. Gao, K. D. Winden, M. C. Oldham, L. H. Martens, P. Zhou, R. V. Farese, Jr. and D. H. Geschwind. Functional genomic analyses identify pathways dysregulated by progranulin deficiency, implicating Wnt signaling. *Neuron*. 2011, 71: 1030-1042.
- [154] C. Alquezar, N. Esteras, A. de la Encarnacion, A. Alzualde, F. Moreno, A. Lopez de Munain and A. Martin-Requero. PGRN haploinsufficiency increased Wnt5a signaling in peripheral cells from frontotemporal lobar degeneration-progranulin mutation carriers. *Neurobiology of aging*. 2014, 35: 886-898.
- [155] S. Raitano, L. Ordovas, L. De Muyneck, W. Guo, I. Espuny-Camacho, M. Geraerts, S. Khurana, K. Vanuytsel, B. I. Toth, T. Voets, R. Vandenberghe, T. Cathomen, L. Van Den Bosch, P. Vanderhaeghen, P. Van

- Damme and C. M. Verfaillie. Restoration of progranulin expression rescues cortical neuron generation in an induced pluripotent stem cell model of frontotemporal dementia. *Stem cell reports*. 2015, 4: 16-24.
- [156] A. de la Encarnacion, C. Alquezar and A. Martin-Requero. Increased Wnt Signaling and Reduced Viability in a Neuronal Model of Progranulin-Deficient Frontotemporal Lobar Degeneration. *Molecular neurobiology*. 2016, 53: 7107-7118.
- [157] L. H. Martens, J. Zhang, S. J. Barmada, P. Zhou, S. Kamiya, B. Sun, S. W. Min, L. Gan, S. Finkbeiner, E. J. Huang and R. V. Farese, Jr. Progranulin deficiency promotes neuroinflammation and neuron loss following toxin-induced injury. *The Journal of clinical investigation*. 2012, 122: 3955-3959.
- [158] F. Pickford, J. Marcus, L. M. Camargo, Q. Xiao, D. Graham, J. R. Mo, M. Burkhardt, V. Kulkarni, J. Crispino, H. Hering and M. Hutton. Progranulin is a chemoattractant for microglia and stimulates their endocytic activity. *The American journal of pathology*. 2011, 178: 284-295.
- [159] Y. Liu, L. Xi, G. Liao, W. Wang, X. Tian, B. Wang, G. Chen, Z. Han, M. Wu, S. Wang, J. Zhou, G. Xu, Y. Lu and D. Ma. Inhibition of PC cell-derived growth factor (PCDGF)/granulin-epithelin precursor (GEP) decreased cell proliferation and invasion through downregulation of cyclin D and CDK4 and inactivation of MMP-2. *BMC cancer*. 2007, 7: 22.
- [160] X. H. Bai, D. W. Wang, L. Kong, Y. Zhang, Y. Luan, T. Kobayashi, H. M. Kronenberg, X. P. Yu and C. J. Liu. ADAMTS-7, a direct target of PTHrP, adversely regulates endochondral bone growth by associating with and inactivating GEP growth factor. *Molecular and cellular biology*. 2009, 29: 4201-4219.
- [161] E. M. Gonzalez, M. Mongiat, S. J. Slater, R. Baffa and R. V. Iozzo. A novel interaction between perlecan protein core and progranulin: potential effects on tumor growth. *The Journal of biological chemistry*. 2003, 278: 38113-38116.
- [162] K. Xu, Y. Zhang, K. Ilalov, C. S. Carlson, J. Q. Feng, P. E. Di Cesare and C. J. Liu. Cartilage oligomeric matrix protein associates with granulin-epithelin precursor (GEP) and potentiates GEP-stimulated chondrocyte proliferation. *The Journal of biological chemistry*. 2007, 282: 11347-11355.
- [163] W. Tang, Y. Lu, Q. Y. Tian, Y. Zhang, F. J. Guo, G. Y. Liu, N. M. Syed, Y. Lai, E. A. Lin, L. Kong, J. Su, F. Yin, A. H. Ding, A. Zanin-Zhorov, M. L. Dustin, J. Tao, J. Craft, Z. Yin, J. Q. Feng, S. B. Abramson, X. P. Yu and C. J. Liu. The growth factor progranulin binds to TNF receptors and is therapeutic against inflammatory arthritis in mice. *Science*. 2011, 332: 478-484.
- [164] V. Baladron, M. J. Ruiz-Hidalgo, E. Bonvini, E. Gubina, V. Notario and J. Laborda. The EGF-like homeotic protein dlk affects cell growth and interacts with growth-modulating molecules in the yeast two-hybrid system. *Biochemical and biophysical research communications*. 2002, 291: 193-204.
- [165] B. Chitramuthu and A. Bateman. Progranulin and the receptor tyrosine kinase EphA2, partners in crime? *The Journal of cell biology*. 2016, 215: 603-605.
- [166] C. Altmann, V. Vasic, S. Hardt, J. Heidler, A. Haussler, I. Wittig, M. H. Schmidt and I. Tegeder. Progranulin promotes peripheral nerve regeneration and reinnervation: role of notch signaling. *Molecular neurodegeneration*. 2016, 11: 69.
- [167] Y. Zheng, O. A. Brady, P. S. Meng, Y. Mao and F. Hu. C-terminus of progranulin interacts with the beta-propeller region of sortilin to regulate progranulin trafficking. *PloS one*. 2011, 6: e21023.
- [168] X. Chen, J. Chang, Q. Deng, J. Xu, T. A. Nguyen, L. H. Martens, B. Cenik, G. Taylor, K. F. Hudson, J. Chung, K. Yu, P. Yu, J. Herz, R. V. Farese, Jr., T. Kukar and M. G. Tansey. Progranulin Does Not Bind Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptors and Is Not a Direct Regulator of TNF-Dependent Signaling or Bioactivity in Immune or Neuronal Cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for*

Neuroscience. 2013, 33: 9202-9213.

[169] N. Etemadi, A. Webb, A. Bankovacki, J. Silke and U. Nachbur. Progranulin does not inhibit TNF and lymphotoxin-alpha signalling through TNF receptor 1. *Immunology and cell biology*. 2013, 91: 661-664.

[170] B. Park, L. Buti, S. Lee, T. Matsuwaki, E. Spooner, M. M. Brinkmann, M. Nishihara and H. L. Ploegh. Granulin is a soluble cofactor for toll-like receptor 9 signaling. *Immunity*. 2011, 34: 505-513.

[171] R. N. Aravalli, S. Hu and J. R. Lokensgard. Inhibition of toll-like receptor signaling in primary murine microglia. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*. 2008, 3: 5-11.

[172] H. Scholtzova, P. Chianchiano, J. Pan, Y. Sun, F. Goni, P. D. Mehta and T. Wisniewski. Amyloid beta and Tau Alzheimer's disease related pathology is reduced by Toll-like receptor 9 stimulation. *Acta neuropathologica communications*. 2014, 2: 101.

[173] T. Neill, S. Buraschi, A. Goyal, C. Sharpe, E. Natkanski, L. Schaefer, A. Morrione and R. V. Iozzo. EphA2 is a functional receptor for the growth factor progranulin. *The Journal of cell biology*. 2016, 215: 687-703.

[174] Y. Qu, G. Zhao and H. Li. Forward and Reverse Signaling Mediated by Transmembrane Tumor Necrosis Factor-Alpha and TNF Receptor 2: Potential Roles in an Immunosuppressive Tumor Microenvironment. *Frontiers in immunology*. 2017, 8: 1675.

[175] C. Roos, A. Wicovsky, N. Muller, S. Salzmann, T. Rosenthal, H. Kalthoff, A. Trauzold, A. Seher, F. Henkler, C. Kneitz and H. Wajant. Soluble and transmembrane TNF-like weak inducer of apoptosis differentially activate the classical and noncanonical NF-kappa B pathway. *J Immunol*. 2010, 185: 1593-1605.

[176] M. Fiore, F. Angelucci, E. Alleva, I. Branchi, L. Probert and L. Aloe. Learning performances, brain NGF distribution and NPY levels in transgenic mice expressing TNF-alpha. *Behavioural brain research*. 2000, 112: 165-175.

[177] M. P. Butler, J. J. O'Connor and P. N. Moynagh. Dissection of tumor-necrosis factor-alpha inhibition of long-term potentiation (LTP) reveals a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism which maps to early-but not late-phase LTP. *Neuroscience*. 2004, 124: 319-326.

[178] K. Belarbi, T. Jopson, D. Tweedie, C. Arellano, W. Luo, N. H. Greig and S. Rosi. TNF-alpha protein synthesis inhibitor restores neuronal function and reverses cognitive deficits induced by chronic neuroinflammation. *Journal of neuroinflammation*. 2012, 9: 23.

[179] M. C. Cartford, C. Gemma and P. C. Bickford. Eighteen-month-old Fischer 344 rats fed a spinach-enriched diet show improved delay classical eyeblink conditioning and reduced expression of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) and TNFbeta in the cerebellum. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2002, 22: 5813-5816.

[180] B. T. Baune, F. Wiede, A. Braun, J. Golledge, V. Arolt and H. Koerner. Cognitive dysfunction in mice deficient for TNF- and its receptors. *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*. 2008, 147B: 1056-1064.

[181] D. Stellwagen and R. C. Malenka. Synaptic scaling mediated by glial TNF-alpha. *Nature*. 2006, 440: 1054-1059.

[182] H. Rauert, A. Wicovsky, N. Muller, D. Siegmund, V. Spindler, J. Waschke, C. Kneitz and H. Wajant. Membrane tumor necrosis factor (TNF) induces p100 processing via TNF receptor-2 (TNFR2). *The Journal*

- of biological chemistry. 2010, 285: 7394-7404.
- [183] D. Faustman and M. Davis. TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases. *Nature reviews. Drug discovery*. 2010, 9: 482-493.
- [184] A. T. Ting and M. J. M. Bertrand. More to Life than NF-kappaB in TNFR1 Signaling. *Trends in immunology*. 2016, 37: 535-545.
- [185] I. Carpentier, B. Coornaert and R. Beyaert. Function and regulation of tumor necrosis factor receptor type 2. *Current medicinal chemistry*. 2004, 11: 2205-2212.
- [186] J. Gass, M. Prudencio, C. Stetler and L. Petrucelli. Progranulin: an emerging target for FTLTD therapies. *Brain research*. 2012, 1462: 118-128.
- [187] M. Kanazawa, K. Kawamura, T. Takahashi, M. Miura, Y. Tanaka, M. Koyama, M. Toriyabe, H. Igarashi, T. Nakada, M. Nishihara, M. Nishizawa and T. Shimohata. Multiple therapeutic effects of progranulin on experimental acute ischaemic stroke. *Brain : a journal of neurology*. 2015, 138: 1932-1948.
- [188] M. A. Mines, C. J. Yuskaitis, M. K. King, E. Beurel and R. S. Jope. GSK3 influences social preference and anxiety-related behaviors during social interaction in a mouse model of fragile X syndrome and autism. *PloS one*. 2010, 5: e9706.
- [189] A. V. Franklin, M. K. King, V. Palomo, A. Martinez, L. L. McMahon and R. S. Jope. Glycogen synthase kinase-3 inhibitors reverse deficits in long-term potentiation and cognition in fragile X mice. *Biological psychiatry*. 2014, 75: 198-206.
- [190] Y. P. Zhao, J. L. Wei, Q. Y. Tian, A. T. Liu, Y. S. Yi, T. A. Einhorn and C. J. Liu. Progranulin suppresses titanium particle induced inflammatory osteolysis by targeting TNFalpha signaling. *Scientific reports*. 2016, 6: 20909.
- [191] S. Almeida, L. Zhou and F. B. Gao. Progranulin, a glycoprotein deficient in frontotemporal dementia, is a novel substrate of several protein disulfide isomerase family proteins. *PloS one*. 2011, 6: e26454.
- [192] R. M. Sare, L. Harkless, M. Levine, A. Torossian, C. A. Sheeler and C. B. Smith. Deficient Sleep in Mouse Models of Fragile X Syndrome. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2017, 10: 280.
- [193] M. R. Zielinski, Y. Kim, S. A. Karpova, R. W. McCarley, R. E. Strecker and D. Gerashchenko. Chronic sleep restriction elevates brain interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha and attenuates brain-derived neurotrophic factor expression. *Neuroscience letters*. 2014, 580: 27-31.
- [194] S. Jin, Y. Zhao, Y. Jiang, Y. Wang, C. Li, D. Zhang, B. Lian, Z. Du, H. Sun and L. Sun. Anxiety-like behaviour assessments of adolescent rats after repeated maternal separation during early life. *Neuroreport*. 2018.
- [195] R. Havekes, A. J. Park, J. C. Tudor, V. G. Luczak, R. T. Hansen, S. L. Ferri, V. M. Bruinenberg, S. G. Poplawski, J. P. Day, S. J. Aton, K. Radwanska, P. Meerlo, M. D. Houslay, G. S. Baillie and T. Abel. Sleep deprivation causes memory deficits by negatively impacting neuronal connectivity in hippocampal area CA1. *eLife*. 2016, 5.
- [196] E. G. Jones. Neuroanatomy: Cajal and after Cajal. *Brain research reviews*. 2007, 55: 248-255.
- [197] K. G. Akers, Y. Cherasse, Y. Fujita, S. Srinivasan, T. Sakurai and M. Sakaguchi. Concise Review: Regulatory Influence of Sleep and Epigenetics on Adult Hippocampal Neurogenesis and Cognitive and Emotional Function. *Stem Cells*. 2018.
- [198] M. L. Castren. Cortical neurogenesis in fragile X syndrome. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2016, 8: 160-168.
- [199] M. Wadhwa, A. Prabhakar, K. Ray, K. Roy, P. Kumari, P. K. Jha, K. Kishore, S. Kumar and U.

- Panjwani. Inhibiting the microglia activation improves the spatial memory and adult neurogenesis in rat hippocampus during 48 h of sleep deprivation. *Journal of neuroinflammation*. 2017, 14: 222.
- [200] A. Latif-Hernandez, E. Faldini, T. Ahmed and D. Balschun. Separate Ionotropic and Metabotropic Glutamate Receptor Functions in Depotentiation vs. LTP: A Distinct Role for Group1 mGluR Subtypes and NMDARs. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2016, 10: 252.
- [201] D. Mango, E. Braksator, G. Battaglia, S. Marcelli, N. B. Mercuri, M. Feligioni, F. Nicoletti, Z. I. Bashir and R. Nistico. Acid-sensing ion channel 1a is required for mGlu receptor dependent long-term depression in the hippocampus. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*. 2017, 119: 12-19.
- [202] A. Guo, L. Tapia, S. X. Bamji, M. S. Cynader and W. Jia. Progranulin deficiency leads to enhanced cell vulnerability and TDP-43 translocation in primary neuronal cultures. *Brain research*. 2010, 1366: 1-8.
- [203] H. Y. Lim, B. Albuquerque, A. Haussler, T. Myrczek, A. Ding and I. Tegeder. Progranulin contributes to endogenous mechanisms of pain defense after nerve injury in mice. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2012, 16: 708-721.
- [204] E. A. Nimchinsky, B. L. Sabatini and K. Svoboda. Structure and function of dendritic spines. *Annual review of physiology*. 2002, 64: 313-353.
- [205] T. A. Comery, J. B. Harris, P. J. Willems, B. A. Oostra, S. A. Irwin, I. J. Weiler and W. T. Greenough. Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997, 94: 5401-5404.
- [206] K. Zhang, Y. J. Li, D. Feng, P. Zhang, Y. T. Wang, X. Li, S. B. Liu, Y. M. Wu and M. G. Zhao. Imbalance between TNFalpha and progranulin contributes to memory impairment and anxiety in sleep-deprived mice. *Scientific reports*. 2017, 7: 43594.
- [207] S. A. Connor and Y. T. Wang. A Place at the Table: LTD as a Mediator of Memory Genesis. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*. 2016, 22: 359-371.
- [208] A. Michalon, M. Sidorov, T. M. Ballard, L. Ozmen, W. Spooren, J. G. Wettstein, G. Jaeschke, M. F. Bear and L. Lindemann. Chronic pharmacological mGlu5 inhibition corrects fragile X in adult mice. *Neuron*. 2012, 74: 49-56.
- [209] T. Kovacs, B. Bansagi, O. Kelemen and S. Keri. Neuregulin 1-induced AKT and ERK phosphorylation in patients with fragile X syndrome (FXS) and intellectual disability associated with obstetric complications. *Journal of molecular neuroscience : MN*. 2014, 54: 119-124.
- [210] C. A. Hoeffler, E. Sanchez, R. J. Hagerman, Y. Mu, D. V. Nguyen, H. Wong, A. M. Whelan, R. S. Zukin, E. Klann and F. Tassone. Altered mTOR signaling and enhanced CYFIP2 expression levels in subjects with fragile X syndrome. *Genes, brain, and behavior*. 2012, 11: 332-341.
- [211] B. Li, J. Ren, L. Yang, X. Li, G. Sun and M. Xia. Lithium Inhibits GSK3beta Activity via Two Different Signaling Pathways in Neurons After Spinal Cord Injury. *Neurochemical research*. 2018.
- [212] S. C. Borrie, H. Brems, E. Legius and C. Bagni. Cognitive Dysfunctions in Intellectual Disabilities: The Contributions of the Ras-MAPK and PI3K-AKT-mTOR Pathways. *Annual review of genomics and human genetics*. 2017, 18: 115-142.
- [213] O. Fanelli. Influence of phosphoserine on the performance of rats on the rotarod. *Pharmacology*. 1976, 14: 52-57.
- [214] M. D. Schechter and W. T. Chance. Non-specificity of "behavioral despair" as an animal model of depression. *European journal of pharmacology*. 1979, 60: 139-142.

- [215] M. Shehata, H. Matsumura, R. Okubo-Suzuki, N. Ohkawa and K. Inokuchi. Neuronal stimulation induces autophagy in hippocampal neurons that is involved in AMPA receptor degradation after chemical long-term depression. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2012, 32: 10413-10422.
- [216] K. C. Sheehan, J. K. Pinckard, C. D. Arthur, L. P. Dehner, D. V. Goeddel and R. D. Schreiber. Monoclonal antibodies specific for murine p55 and p75 tumor necrosis factor receptors: identification of a novel in vivo role for p75. *The Journal of experimental medicine*. 1995, 181: 607-617.
- [217] S. A. Josselyn and P. V. Nguyen. CREB, synapses and memory disorders: past progress and future challenges. *Current drug targets. CNS and neurological disorders*. 2005, 4: 481-497.
- [218] S. H. Huang, J. Wang, W. H. Sui, B. Chen, X. Y. Zhang, J. Yan, Z. Geng and Z. Y. Chen. BDNF-dependent recycling facilitates TrkB translocation to postsynaptic density during LTP via a Rab11-dependent pathway. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2013, 33: 9214-9230.
- [219] B. Decourt, D. K. Lahiri and M. N. Sabbagh. Targeting Tumor Necrosis Factor Alpha for Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer research*. 2017, 14: 412-425.
- [220] S. L. Rego, M. Swamydas, A. Kidiyoor, R. Helms, A. De Piante, A. L. Lance, P. Mukherjee and D. Dreau. Soluble tumor necrosis factor receptors shed by breast tumor cells inhibit macrophage chemotaxis. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 2013, 33: 672-681.
- [221] J. W. Koo, S. J. Russo, D. Ferguson, E. J. Nestler and R. S. Duman. Nuclear factor-kappaB is a critical mediator of stress-impaired neurogenesis and depressive behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010, 107: 2669-2674.
- [222] L. Yang, K. Lindholm, Y. Konishi, R. Li and Y. Shen. Target depletion of distinct tumor necrosis factor receptor subtypes reveals hippocampal neuron death and survival through different signal transduction pathways. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2002, 22: 3025-3032.
- [223] J. M. Godfraind, E. Reyniers, K. De Boule, R. D'Hooge, P. P. De Deyn, C. E. Bakker, B. A. Oostra, R. F. Kooy and P. J. Willems. Long-term potentiation in the hippocampus of fragile X knockout mice. *American journal of medical genetics*. 1996, 64: 246-251.
- [224] M. G. Zhao, H. Toyoda, S. W. Ko, H. K. Ding, L. J. Wu and M. Zhuo. Deficits in trace fear memory and long-term potentiation in a mouse model for fragile X syndrome. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2005, 25: 7385-7392.
- [225] M. F. Bear, K. M. Huber and S. T. Warren. The mGluR theory of fragile X mental retardation. *Trends in neurosciences*. 2004, 27: 370-377.
- [226] K. M. Harris. Structure, development, and plasticity of dendritic spines. *Current opinion in neurobiology*. 1999, 9: 343-348.
- [227] M. M. Gonzalez-Ramirez, D. A. Velazquez-Zamora, M. E. Olvera-Cortes and I. Gonzalez-Burgos. Changes in the plastic properties of hippocampal dendritic spines underlie the attenuation of place learning in healthy aged rats. *Neurobiology of learning and memory*. 2014, 109: 94-103.
- [228] Y. Hu, H. Xiao, T. Shi, J. J. Oppenheim and X. Chen. Progranulin promotes tumour necrosis factor-induced proliferation of suppressive mouse CD4(+) Foxp3(+) regulatory T cells. *Immunology*. 2014, 142: 193-201.

- [229] N. Ghosh, S. Mitra, P. Sinha, N. Chakrabarti and A. Bhattacharyya. TNFR2 mediated TNF-alpha signaling and NF-kappaB activation in hippocampus of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice. *Neuroscience research*. 2018.
- [230] H. Gao, M. C. Danzi, C. S. Choi, M. Taherian, C. Dalby-Hansen, D. G. Ellman, P. M. Madsen, J. L. Bixby, V. P. Lemmon, K. L. Lambertsen and R. Brambilla. Opposing Functions of Microglial and Macrophagic TNFR2 in the Pathogenesis of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Cell reports*. 2017, 18: 198-212.

个人简历和研究成果

个人简历

张鹏，男，1989年8月15日生，汉族，中共党员。

- 2008/09-2012/06 第四军医大学药学院药学专业，医学学士学位，本科毕业后获推免保送研究生资格。
- 2015/09-至今第四军医大学药学院药理学专业，2015年通过博连读答辩，直接攻读博士学位。

发表论文情况

1. **Kun Zhang**, Yu-jiao Li, Yan-yan Guo, Kai-yin Zheng, Qi Yang, Le Yang, Xin-shang Wang, Qian Song, Tao Chen, Min Zhuo, Ming-gao Zhao. (2017). Elevated progranulin contributes to synaptic and learning deficit due to loss of Fragile X mental retardation protein. *Brain*. 2017 Dec 1;140(12):3215-3232. doi: 10.1093/brain/awx265. (IF=10.292, article)
2. Qi Yang, Le Yang, **Kun Zhang**, Yan-Yan Guo, Shui-bing Liu, Yu-Mei Wu, Ming-gao Zhao. (2015). Increased coupling of caveolin-1 and estrogen receptor alpha contributes to the fragile X syndrome. *Ann Neurol*. doi: 10.1002/ana.24358 (co-first author, IF=9.638, article)
3. Qi Yang, Bin Feng, **Kun Zhang**, Yan-yan Guo, Zhao-hui Xu, Shui-bing Liu, Xiao-qiang Li, Ming-gao Zhao (2012). Excessive astrocytic derived neutrophin-3 contributes to abnormal neuronal dendritic development in Fragile X Syndrome. *PLoS genetics* 8, e1003172 (2012). (co-first author, IF=8.517, article)
4. **Kun Zhang**, Yu-jiao Li, Dan Feng, Peng Zhang, Ya-tao Wang, Xiang Li, Shui-bing Liu, Yu-mei Wu, Ming-gao Zhao, Imbalance between TNFalpha and progranulin contributes to memory impairment and anxiety in sleep-deprived mice. *Sci Rep*, 2017. 7: p. 43594. (IF=4.259, article)

5. **Kun Zhang**, Yujiao Li, Qi Yang, Oudeng Gerile, Le Yang, Xu-bo Li, Yan-yan Guo, Nan Zhang, Bin Feng, Shui-bing Liu, Ming-gao Zhao. Neuroprotective effects of oxymatrine against excitotoxicity partially through down-regulation of NR2B-containing NMDA receptors. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*.**20**, 343-350 (2013). (IF=2.877, article)
6. Yujiao Li, Qi Yang, **Kun Zhang**, Yan-Yan Guo, Xu-Bo Li, Le Yang, Ming-Gao Zhao, Yu-Mei Wu. Cytisine confers neuronal protection against excitotoxic injury by down-regulating GluN2B-containing NMDA receptors. *Neurotoxicology*.**34**, 219-225 (2013). (co-first author, IF=3.054, article)

参加会议及奖励

1. 2012.11 获硕士研究生二等奖学金；
2. 2013.11 获硕士研究生二等奖学金；
3. 2014 年度硕士优秀研究生；
4. 2015 年 11 月获第四军医大学研究生院博士课题资助；
5. 2016 年 7 月获海内外神经科学家研讨会优秀墙报奖；
6. 2016 年 11 月获第四军医大学研究生院博士课题优先资助；
7. 2017 年 12 月获研究生院学习成才标兵；
8. 2017 年 12 月获药理学系科研工作先进个人
9. 2018 年 1 月陕西省药理学会青年优秀论文二等奖。

课题资助情况

1. 国家自然科学基金面上项目 (31271144): 星形胶质细胞来源 NT-3 分泌过量引起脆性 X 综合症神经元发育障碍的机制研究；
2. 国家自然科学基金面上项目 (31771119): Progranulin 通过 TNFR 参与焦虑发生发展的分子机制研究；
3. 国家自然科学基金面上项目 (81771420): CB1 激动剂延长雌激素替代治疗改善学习记忆时间窗的分子机制；
4. 国家自然科学基金青年科学基金(31300877): 脆性 X 综合症模型小鼠雌激素 ER β

调节突触可塑性异常的机制研究；

5. 第四军医大学博士学位论文课题资助 6 万元，资助批准号：2015D05；

致谢

胡适说过：“怕什么真理无穷，进一寸有一寸的欢喜。”这恐怕是我这 10 年来每日每夜坚守在实验室里最真实的感受。“时间的付出”是施一公在谈研究生的首要素质时提出的。在撰写这篇论文时，我对此也是体会颇深。要说自己和别人拼智力，那我实在是惭愧之至，唯有付出百倍努力，希望不会愧对国家、母校、师长和父母的培养。不忘初心，砥砺前行，是这个时代对我们青年人的号召，只有心无旁骛、潜心笃学，才能获得真知，增长才干。时至今日，我依然记得当初入学时校长和老师们的谆谆教诲，拳拳之心。尽管人生无捷径，读书却是一条可以通往未来的坦途。时至今日，初心不变，此志不遗。

首先，我要感谢我的导师招明高教授，本研究和论文，每一步都在他的指导下完成，倾注了大量心血，经常批改我们的论文直到深夜，是我人生的榜样。他和我们一起讨论问题时活跃的思维经常能启发我们新的实验思路，这让我十分钦佩他的工作热情和旺盛精力。他精湛的业务水平，渊博的专业知识，指导我在科研的道路上前进，不仅教授了我知识，更培养了我不甘平庸，奋勇前进的习惯。在此，向导师表示崇高的敬意和衷心的感谢！再次，我要感谢我的辅导老师刘水冰副教授，您的学识、智慧、幽默和严谨让我受益匪浅。感谢吴玉梅副教授、李小强教授，他们诲人不倦、严谨求实的治学态度一直影响着我。感谢杨奇讲师，从本科时将我领进神经科学的大门。感谢我的同门杨乐讲师、冯斌讲师、李旭波博士、郭艳艳博士、王欣赏博士、李玉娇博士、李硕博士、王潞硕士、周诗萌硕士、孙婷硕士、李艳娇硕士、郑凯音硕士、岳姣硕士、关韶宇硕士在实验中给予的无私帮助和在论文撰写过程中提供的支持。感谢胡丽宁、薛金领、宋元明为实验室的正常运行所做的幕后工作。我很荣幸能再这样一个团队中学习进步。

感谢我的朋友兼大哥刘钟阳博士、王宁博士、王秀超博士、吴迪博士这些年的陪伴和鼓励，实验经验的交流分享，让我的生活充实、多彩和快乐。感谢我的父母，焉得谖草，言树之背，养育之恩，无以为报。感谢我的妻子薛蓉女士，她的支持和

理解是我最大的支柱。特别要感谢我刚出生的女儿，她在精神上给了我极大的鼓舞，成为父亲的我更觉责任的重大，字严说过“父之美德，儿之遗产”。我以后也会更加努力地学习工作，做一个好榜样。

最后，我要向在百忙之中抽出时间审阅本文的各位老师表示衷心的感谢。