

论著·基础研究

# 尼莫地平对大鼠星形胶质细胞 $\beta$ 淀粉样蛋白转运功能的影响及可能机制<sup>▲</sup>

刘 洁 米亚静

(西安医学院基础医学部细胞与遗传教研室, 陕西省西安市 710021, 电子邮箱: 1181418262@qq.com)

**【摘要】 目的** 探讨尼莫地平对大鼠星形胶质细胞(Ast) $\beta$ 淀粉样蛋白(A $\beta$ )转运功能的影响及可能机制。**方法** 利用Transwell装置共培养大鼠脑微血管内皮细胞与大鼠Ast建立体外血脑屏障模型,并分为Ast组(给予0  $\mu\text{mol/L}$  尼莫地平)、低浓度尼莫地平+Ast组(给予5  $\mu\text{mol/L}$  尼莫地平)、中浓度尼莫地平+Ast组(给予10  $\mu\text{mol/L}$  尼莫地平)、高浓度尼莫地平+Ast组(给予20  $\mu\text{mol/L}$  尼莫地平)。给予相应干预48 h后,检测跨膜电阻及荧光素-葡聚糖4000(FD4)通透性以评价血脑屏障完整性,观察A $\beta$ 跨血脑屏障由脑侧向血管侧的转运情况,检测蛋白磷酸酶2A(PP2A)活性,以及低密度脂蛋白受体相关蛋白1(LRP-1)、晚期糖基化终产物受体(RAGE)、磷酸化Tau(p-Tau)蛋白、PP2A、成对免疫球蛋白样受体B(PirB)、糖原合酶激酶3 $\beta$ (GSK3 $\beta$ )蛋白表达水平。**结果** 4组细胞的跨膜电阻、FD4通透性差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。Ast组、低浓度尼莫地平+Ast组、中浓度尼莫地平+Ast组、高浓度尼莫地平+Ast组A $\beta$ 跨血脑屏障由脑侧向血管侧转运量依次增多,Ast中LRP-1蛋白表达、PP2A活性及蛋白表达依次升高,RAGE、p-Tau、PirB、GSK3 $\beta$ 蛋白表达依次降低(均 $P < 0.05$ )。**结论** 尼莫地平可促进大鼠Ast中A $\beta$ 的外向转运,减少Tau蛋白磷酸化,这可能其与下调RAGE、PirB、GSK3 $\beta$ 蛋白表达,上调LRP-1、PP2A蛋白表达有关。

**【关键词】** 阿尔茨海默病;尼莫地平;星形胶质细胞; $\beta$ 淀粉样蛋白;转运;大鼠

**【中图分类号】** R 745.7 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 0253-4304(2020)17-2264-05

**DOI:** 10.11675/j.issn.0253-4304.2020.17.18

## Effect of nimodipine on $\beta$ -amyloid protein transport function in rat astrocytes and its potential mechanism

LIU Jie, MI Ya-jing

(1 Department of Cell and Genetics, School of Basic Medicine, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China)

**【Abstract】 Objective** To explore the effect of nimodipine on the transport function of  $\beta$ -amyloid protein (A $\beta$ ) in rat astrocytes (Ast) and its potential mechanism. **Methods** Rat brain microvascular endothelial cells and rat Ast were co-cultured using Transwell device for establishing an *in-vitro* model of blood-brain barrier, and the cells were divided into Ast group (0  $\mu\text{mol/L}$  nimodipine), low-concentration nimodipine + Ast group (5  $\mu\text{mol/L}$  nimodipine), moderate-concentration nimodipine + Ast group (10  $\mu\text{mol/L}$  nimodipine) and high-concentration nimodipine + Ast group (20  $\mu\text{mol/L}$  nimodipine). After corresponding intervention for 48 hours, transepithelial electrical resistance and permeability of fluorescein-dextran 4000 (FD4) were detected to evaluate blood-brain barrier integrity, the lateral cerebroventricular-to-lateral vascular transport of A $\beta$  crossing blood-brain barrier was observed, protein phosphatase 2A (PP2A) activity as well as the expression levels of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1), receptor of advanced glycation endproducts (RAGE), phosphorylated Tau (p-Tau) protein, PP2A, paired immunoglobulin-like receptor B (PirB) and glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) protein was detected. **Results** No statistically significant difference was found in transepithelial electrical resistance or FD4 permeability among the four groups ( $P > 0.05$ ). The lateral cerebroventricular-to-lateral vascular transport of A $\beta$  crossing blood-brain barrier increased, the expression of LRP-1 protein and the activity and protein expression of PP2A in Ast increased, and the expression of RAGE,

<sup>▲</sup>基金项目:国家自然科学基金(81873740);西安医学院教育教学改革研究项目(2016JG-39)

作者简介:刘洁(1979~),女,硕士,讲师,研究方向:神经退行性疾病。

通信作者:米亚静(1982~),女,博士,副教授,研究方向:神经退行性疾病,电子邮箱:miyajing@163.com。

p-Tau, PirB and GSK3 $\beta$  proteins decreased in the order of the Ast group, the low-concentration nimodipine + Ast group, the moderate-concentration nimodipine + Ast group and the high-concentration nimodipine + Ast group (all  $P < 0.05$ ).

**Conclusion** Nimodipine can promote the outward transport of A $\beta$  in rat Ast and reduce the phosphorylation of Tau protein, which may be related to down-regulation of RAGE, PirB and GSK3 $\beta$  proteins expression and up-regulation of LRP-1 and PP2A proteins expression.

**【Key words】** Alzheimer's disease, Nimodipine, Astrocyte,  $\beta$ -amyloid protein, Transport, Rat

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种常见的神经系统变性疾病, 主要临床表现为慢性、进行性加重的认知功能障碍, 是老年期痴呆最常见的类型<sup>[1]</sup>。AD 的主要病理变化为细胞外  $\beta$  淀粉样蛋白 ( $\beta$ -amyloid protein, A $\beta$ ) 异常聚集形成淀粉样斑块, 神经元内微管相关蛋白 Tau 过度磷酸化形成神经原纤维缠结, 以及神经元和突触变性或丢失<sup>[2-3]</sup>。目前, AD 的病因和发病机制尚未明确, 缺乏有效治疗手段<sup>[4]</sup>。研究表明, 蛋白磷酸酶 2A (protein phosphatase 2A, PP2A) 活性的抑制、海马组织糖原合酶激酶 3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3 $\beta$ , GSK3 $\beta$ ) 表达的增加与微管相关蛋白 Tau 的过度磷酸化密切相关<sup>[5]</sup>; 敲除成对免疫球蛋白样受体 B 蛋白 (paired immunoglobulin-like receptor B, PirB) 基因或阻断其表达, 能促进脊髓损伤动物的神经再生, 并缓解 A $\beta$  对 AD 的影响<sup>[6]</sup>; 促进低密度脂蛋白相关受体 1 (low-density lipoprotein receptor-related protein 1, LRP-1) 表达有助于 A $\beta$  经血脑屏障外流<sup>[7]</sup>。尼莫地平是第二代二氢吡啶类钙通道阻滞剂, 因具有脂溶性高等特点<sup>[8]</sup>, 目前已被广泛应用于治疗脑出血、蛛网膜下腔出血等脑血管疾病。本研究通过共培养大鼠脑微血管内皮细胞 (brain microvascular endothelial cell, BMEC) 与大鼠星形胶质细胞 (astrocyte, Ast) 建立体外血脑屏障模型, 探讨不同浓度尼莫地平对血脑屏障模型的 A $\beta$  转运功能、PP2A 活性和蛋白表达以及兔抗鼠晚期糖基化终产物受体 (receptor for advanced glycation endproducts, RAGE)、LRP-1、PirB、GSK3 $\beta$ 、磷酸化 Tau (phosphorylated Tau, p-Tau) 蛋白表达的影响, 并分析其作用机制, 以期为临床上更好地治疗和控制 AD 提供参考。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂与仪器** 大鼠 Ast、大鼠 BMEC、动物 Ast 培养基、内皮细胞培养基均购自上海中乔新舟生物科技有限公司 (批号: R1800、R1000、1831、1021)。A $\beta$ 1-42 多肽购自苏州强耀生物科技有限公司 (批号: 04010011827); 尼莫地平注射液购自山东新华制药股份有限公司 (国药准字 H10950226); V2460 试剂盒购

自上海抚生实业有限公司 (批号: FS-ELISA-12595, 规格: 96T/48T); 二甲基亚砜、LRP-1、RAGE、p-Tau、PP2A、PirB、GSK3 $\beta$  单克隆抗体购自美国 Sigma 公司 (批号: SIGMAD2650、RAB2984、RAB3015、RAB3409、RAB3145、RAB2973、RAB3047);  $\beta$ -肌动蛋白一抗购自北京百奥莱博科技有限公司 (批号: 20161220); 聚偏二氟乙烯膜购自上海生工生物工程有限公司 (批号: F619537); 辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 二抗购自上海生工生物工程有限公司 (批号: D110098); 蛋白提取试剂盒、二喹啉甲酸蛋白检测试剂盒购自美国 Thermo 公司 (批号: C510003、C503021); 蛋白凝胶成像仪购自 Bio-Rad 公司 (型号: Gel Doc XR +); Transwell 装置 (孔径 3.0  $\mu$ m) 购自北京萌壮科技有限公司 (批号: 3415); A $\beta$ 1-42 多肽酶联免疫吸附测定试剂盒、荧光素-葡聚糖 4000 (fluorescein-dextran 4000, FD4) 及六氟异丙醇均购自 Sigma 公司 (批号: RAB1864、RAB1832、RAB1609); 三气培养箱购自北京美华仪科技有限公司 (型号: MHY-29976); Millicell-ERS 电阻仪购自北京明阳科华生物科技有限公司 (型号: MERS00002); 荧光分光光度计购自天津良益科技有限公司 (型号: LYF-300)。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 体外血脑屏障模型的建立:** 参照文献[9] 利用 Transwell 装置共培养 Ast 和 BMEC, 建立体外血脑屏障模型。将 Ast 调整为  $3 \times 10^4$  个/ $\text{cm}^2$  后种植在涤纶膜下层, 便于细胞终足充分形成, 2 d 后将 BMEC 调整为  $4 \times 10^4$  个/ $\text{cm}^2$  后种植在涤纶膜上层。BMEC 侧为血管侧, Ast 侧为脑侧。使用显微镜观察到细胞融合后, 用 Millicell-ERS 电阻仪测定跨膜电阻, 当跨膜电阻达到  $(300 \pm 13.6) \Omega/\text{cm}^2$  时, 提示体外血脑屏障模型建立成功。

**1.2.2 A $\beta$ 1-42 工作液的制备:** 参照文献[10] 制备 A $\beta$ 1-42 工作液。将 1 mg A $\beta$ 1-42 多肽溶于 1 mL 六氟异丙醇溶液中, 充分溶解后, 化学通风橱内自然风干。将风干物在 100% 二甲基亚砜中重悬配成 1 mmol/L 储存液, 于  $-80^\circ\text{C}$  冰箱中储存, 临用前用动

物 Ast 培养基稀释成工作液,终浓度为 2  $\mu\text{mol/L}$ 。

1.2.3 药物处理:利用上述已建好的体外血脑屏障模型,Ast 组(设为对照组)用动物 Ast 培养基于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  下培养 48 h,收集细胞备用;低、中、高浓度尼莫地平 + Ast 组分别加入含终浓度为 5  $\mu\text{mol/L}$ 、10  $\mu\text{mol/L}$ 、20  $\mu\text{mol/L}$  的尼莫地平动物 Ast 培养基,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  下培养 24 h,更换新鲜动物 Ast 培养基继续于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  下培养 24 h,收集各组 Ast 备用。

1.2.4 跨膜电阻及 FD4 通透性的检测:(1)各组细胞按 1.2.3 处理后 24 h,加入新鲜的动物 Ast 培养基。用 Millicell-ERS 电阻仪测定跨膜电阻值,减去无细胞的共培养池涤纶膜的跨膜电阻值,即得出细胞层跨膜电阻值。实验重复 6 次。(2)各组细胞按 1.2.3 处理后,将含终浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$  FD4 的动物 Ast 培养基置于脑侧作用 60 min,收集血管侧培养基,置于荧光分光光度计专用 96 孔板,于激发波长 480 nm、发射波长 520 nm 处测量,根据标准曲线计算 FD4 浓度。实验重复 6 次。

1.2.5  $\text{A}\beta$  跨血脑屏障模型转运率的测定:取 1.2.3 各组细胞,脑侧添加含 2  $\mu\text{mol/L}$   $\text{A}\beta_{1-42}$  多肽的 Ast 培养基,血管侧添加普通培养基。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  下培养 60 min 后,取 50  $\mu\text{L}$  血管侧培养基,采用  $\text{A}\beta_{1-42}$  多肽酶联免疫吸附测定试剂盒检测血管侧培养基中  $\text{A}\beta_{1-42}$  多肽含量。实验重复 6 次。

1.2.6 PP2A 活性的检测:取 1.2.3 各组细胞,采用 V2460 试剂盒检测各组细胞中 PP2A 活性,操作步骤严格按照说明书进行。实验重复 6 次。

1.2.7 Ast 细胞 RAGE、LRP-1、PirB、PP2A、GSK3 $\beta$ 、p-Tau 蛋白表达的检测:按照蛋白提取试剂盒说明书提取 1.2.3 各组 Ast 细胞中的总蛋白,采用二喹啉甲酸蛋白试剂盒测定各组 Ast 细胞总蛋白含量。采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离等量蛋白质,将蛋白质转聚偏二氟乙烯膜上,添加 LRP-1、RAGE、p-Tau、PP2A、PirB、GSK3 $\beta$ 、 $\beta$  肌动蛋白一抗(1:500),4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱孵育过夜。磷酸缓冲液洗涤后添加辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5000),常温下孵育 2 h。采用 Tanon 600 图像分析系统对 LRP-1、RAGE、P-Tau、PP2A、PirB、GSK3 $\beta$  蛋白水平进行定量分析。实验重复 6 次。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用方差分析,两两比较采用 LSD- $t$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 尼莫地平对血脑屏障模型完整性的影响 4 组的跨膜电阻和 FD4 通透性比较,差异无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。见表 1。

表 1 4 组血脑屏障模型完整性相关指标比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	$n$	跨膜电阻 ( $\Omega/\text{cm}^2$ )	FD4 通透性 ( $\text{pmol/mL}$ )
Ast 组	6	305.48 $\pm$ 30.12	45.03 $\pm$ 4.68
低浓度尼莫地平 + Ast 组	6	306.21 $\pm$ 30.23	46.17 $\pm$ 4.73
中浓度尼莫地平 + Ast 组	6	306.53 $\pm$ 30.34	45.38 $\pm$ 4.89
高浓度尼莫地平 + Ast 组	6	306.49 $\pm$ 30.47	47.19 $\pm$ 4.91
$F$ 值		0.002	0.239
$P$ 值		1.000	0.868

2.2 尼莫地平对  $\text{A}\beta$  跨血脑屏障模型外向转运的影响 Ast 组、低浓度尼莫地平 + Ast 组、中浓度尼莫地平 + Ast 组、高浓度尼莫地平 + Ast 组  $\text{A}\beta$  跨血脑屏障模型外向转运依次增多(均  $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 4 组  $\text{A}\beta$  跨血脑屏障模型外向转运情况比较( $\bar{x} \pm s$ ,  $\text{pg/mg}$ )

组别	$n$	$\text{A}\beta_{1-42}$ 多肽含量
Ast 组	6	475.37 $\pm$ 9.94
低浓度尼莫地平 + Ast 组	6	493.57 $\pm$ 9.81 <sup>a</sup>
中浓度尼莫地平 + Ast 组	6	512.36 $\pm$ 10.27 <sup>ab</sup>
高浓度尼莫地平 + Ast 组	6	526.49 $\pm$ 11.06 <sup>abc</sup>
$F$ 值		28.140
$P$ 值		< 0.001

注:与 Ast 组相比, a  $P < 0.05$ ; 与低浓度尼莫地平 + Ast 组相比, b  $P < 0.05$ ; 与中浓度尼莫地平 + Ast 组相比, c  $P < 0.05$ 。

2.3 尼莫地平对 Ast 细胞中 PP2A 活性的影响 Ast 组、低浓度尼莫地平 + Ast 组、中浓度尼莫地平 + Ast 组、高浓度尼莫地平 + Ast 组 Ast 细胞中 PP2A 活性依次升高(均  $P < 0.05$ )。见表 3。

表 3 4 组 Ast 的 PP2A 活性比较 [ $\bar{x} \pm s$ ,  $\text{pmol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ ]

组别	$n$	PP2A 活性
Ast 组	6	1.03 $\pm$ 0.12
低浓度尼莫地平 + Ast 组	6	1.27 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>
中浓度尼莫地平 + Ast 组	6	1.52 $\pm$ 0.10 <sup>ab</sup>
高浓度尼莫地平 + Ast 组	6	1.96 $\pm$ 0.13 <sup>abc</sup>
$F$ 值		70.966
$P$ 值		< 0.001

注:与 Ast 组相比, a  $P < 0.05$ ; 与低浓度尼莫地平 + Ast 组相比, b  $P < 0.05$ ; 与中浓度尼莫地平 + Ast 组相比, c  $P < 0.05$ 。

2.4 尼莫地平对 Ast 细胞中 LRP-1、RAGE、p-Tau、PP2A、PirB、GSK3β 蛋白表达的影响 Ast 组、低浓度尼莫地平 + Ast 组、中浓度尼莫地平 + Ast 组、高浓度

尼莫地平 + Ast 组 Ast 中的 LRP-1、PP2A 蛋白相对表达水平依次升高, RAGE、p-Tau、PirB、GSK3β 蛋白相对表达水平依次降低(均  $P < 0.05$ )。见表 4、图 1。

表 4 4 组 Ast 中 LRP-1、RAGE、p-Tau、PP2A、PirB、GSK3β 蛋白相对表达水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	LRP-1	RAGE	p-Tau	PP2A	PirB	GSK3β
Ast 组	6	0.96 ± 0.05	0.34 ± 0.04	1.06 ± 0.05	1.08 ± 0.02	3.54 ± 0.12	0.98 ± 0.03
低浓度尼莫地平 + Ast 组	6	1.08 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.25 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.92 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.19 ± 0.03 <sup>a</sup>	3.17 ± 0.13 <sup>a</sup>	0.82 ± 0.02 <sup>a</sup>
中浓度尼莫地平 + Ast 组	6	1.21 ± 0.03 <sup>ab</sup>	0.16 ± 0.02 <sup>ab</sup>	0.79 ± 0.03 <sup>ab</sup>	1.32 ± 0.03 <sup>ab</sup>	2.86 ± 0.11 <sup>ab</sup>	0.73 ± 0.03 <sup>ab</sup>
高浓度尼莫地平 + Ast 组	6	1.34 ± 0.05 <sup>abc</sup>	0.11 ± 0.03 <sup>abc</sup>	0.64 ± 0.04 <sup>abc</sup>	1.48 ± 0.04 <sup>abc</sup>	2.53 ± 0.10 <sup>abc</sup>	0.62 ± 0.02 <sup>abc</sup>
F 值		86.053	65.053	117.182	187.526	83.670	213.769
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 Ast 组相比, a  $P < 0.05$ ;与低浓度尼莫地平 + Ast 组相比, b  $P < 0.05$ ;与中浓度尼莫地平 + Ast 组相比, c  $P < 0.05$ 。

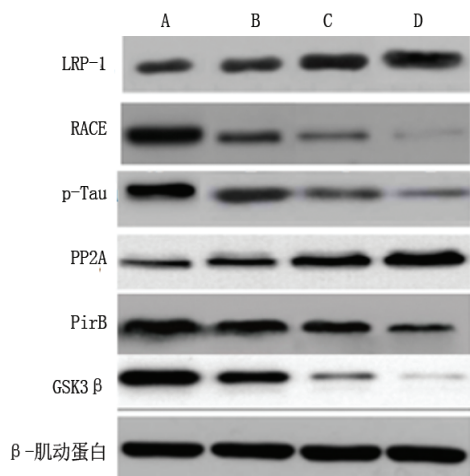


图 1 4 组 Ast 中 LRP-1、RAGE、p-Tau、PP2A、PirB、GSK3β 蛋白表达情况  
注:A 为 Ast 组, B 为低浓度尼莫地平 + Ast 组, C 为中浓度尼莫地平 + Ast 组, D 为高浓度尼莫地平 + Ast 组。

### 3 讨论

AD 是临床常见的退行性疾病,发病与年龄密切相关,发病人群以 60 岁以上老人为主<sup>[7]</sup>。随着我国人口老龄化进程加速,AD 发病率逐年升高,65 岁以上人群 AD 发生率为 13%,85 岁以上人群 AD 发病率则高达 45%,预计到 2050 年世界范围内将有超过 8 000 万人遭受 AD 困扰<sup>[11]</sup>,这给社会带来沉重负担。Aβ 是由 39~42 个氨基酸构成的短肽,为淀粉样前体蛋白的水解产物,其是 AD 发病的主要影响因素<sup>[12]</sup>,但具体的作用机理尚未完全阐明。本研究结果显示, Ast 组、低浓度尼莫地平 + Ast 组、中浓度尼莫地平 + Ast 组、高浓度尼莫地平 + Ast 组 Aβ 跨血脑屏障模型外向转运依次增多(均  $P < 0.05$ ),呈剂量依赖性,另外 4 组的跨膜电阻、FD4 通透性差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),即各浓度尼莫地平均不影响血脑

屏障模型的完整性,因此血管侧 Aβ<sub>1-42</sub> 多肽含量增多并非因血脑屏障破坏导致 Aβ 漏出所致,这提示尼莫地平在一定程度上可促进 Aβ 外向转运,减少 Aβ 在脑内的沉积。

研究显示,在 AD 早期 Ast 被持续、广泛激活<sup>[13]</sup>。激活的 Ast 可结合、摄取并降解胞外 Aβ,从而减少 Aβ 在细胞外的沉积<sup>[14]</sup>。大脑中存在多种受体可介导 Aβ 转运,其中 RAGE 作为一种多配体受体,可与 Aβ 结合,促使 Aβ 穿过血脑屏障进入大脑并积聚;LRP-1 作为清道夫受体,可帮助 Aβ 经血脑屏障外流,在 Aβ 清除过程中发挥重要作用<sup>[7]</sup>。RAGE、LRP-1 作为一对重要的逆向转运体,在维持脑 Aβ 平衡中发挥关键作用:LRP-1 水平升高、RAGE 水平降低会促进 Ast 中 Aβ 外向转运,抑制 Aβ 内向转运,可促进 AD 发病<sup>[15]</sup>。但具体作用机制尚不清楚。本研究结果显示, Ast 组、低浓度尼莫地平 + Ast 组、中浓度尼莫地平 + Ast 组、高浓度尼莫地平 + Ast 组 Ast 中 LRP-1 蛋白表达依次升高, RAGE 蛋白表达依次降低(均  $P < 0.05$ )。这提示尼莫地平可剂量依赖性地上调星型胶质细胞中 LRP-1 蛋白表达,下调 RAGE 蛋白表达,从而促进 Aβ 跨血脑屏障模型的外向转运,减少 Aβ 在 Ast 内的沉积,表明尼莫地平可能对 AD 患者具有一定的治疗作用。

AD 的主要病理特征包括细胞外 Aβ 沉积形成神经炎性斑,以及细胞内 Tau 蛋白磷酸化、聚集形成神经元纤维缠结<sup>[16]</sup>。研究表明,脑内 Aβ 沉积可增加 Tau 蛋白过度磷酸化,引起脑内神经元纤维缠结大量形成,进而引发 AD<sup>[17]</sup>。GSK-3β、PP2A 是与 AD 发病密切相关的两种蛋白磷酸酶<sup>[18]</sup>,降低 PP2A 蛋白表达,可增加 GSK3β 活性<sup>[19]</sup>,进而加剧 Aβ 在胞内沉

积<sup>[20]</sup>。研究显示,逍遥散可上调 PP2A 蛋白表达、下调 GSK-3 $\beta$  蛋白表达,抑制可溶性 A $\beta$  前体蛋白在神经元内的沉积<sup>[17]</sup>,阻止 AD 进程。PirB 是一种免疫球蛋白样受体,可通过与 A $\beta$  结合,减少胞浆 PP2A 蛋白表达,激活 GSK3 $\beta$ ,进而增加 A $\beta$  在胞内的沉积<sup>[21]</sup>。本研究结果显示,Ast 组、低浓度尼莫地平 + Ast 组、中浓度尼莫地平 + Ast 组、高浓度尼莫地平 + Ast 组 Ast 中 PP2A 活性及其蛋白表达依次升高,p-Tau、PirB、GSK3 $\beta$  蛋白表达依次降低( $P < 0.05$ ),提示尼莫地平可上调 Ast 中 PP2A 蛋白表达并促进其活化,同时下调 p-Tau、GSK3 $\beta$ 、PirB 蛋白表达,从而抑制 A $\beta$  在 Ast 内的沉积,抑制 Tau 蛋白过度磷酸化,推测尼莫地平可能是通过减少神经炎症斑及神经元纤维缠结的形成,阻碍 AD 进展。

综上所述,尼莫地平可提高 Ast 中 A $\beta$  的转运能力,减少 Tau 蛋白磷酸化,其机制可能与其下调 RAGE、PirB、GSK3 $\beta$  表达,促进 PP2A、LRP-1 蛋白表达有关。

## 参 考 文 献

[1] Ambastha AK, Leong TY, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. A deep learning approach to neuroanatomical characterisation of Alzheimer's disease [J]. Stud Health Technol Inform, 2017, 245: 1 249.

[2] Chen B, Zhang J, Wang S, et al. Amyloid- $\beta$  derived from the brain of the Alzheimer's disease transgenic mouse is resistant to proteolytic digestion due to its conformation [J]. J Mol Neurosci, 2017, 62(3/4): 412 - 419.

[3] Wegmann S, Eftekharzadeh B, Tepper K, et al. Tau protein liquid-liquid phase separation can initiate tau aggregation [J]. EMBO J, 2018, 37(7): e98049.

[4] 高晨皓, 孙争宇, 张杰文. 线粒体动力学失衡与阿尔茨海默病发病机制的相关性研究进展 [J]. 中华神经医学杂志, 2019, 18(4): 337 - 343.

[5] Zhang Y, Ma RH, Li XC, et al. Silencing rescues Tau pathologies and memory deficits through rescuing PP2A and inhibiting GSK-3 $\beta$  signaling in human Tau transgenic mice [J]. Front Aging Neurosci, 2014, 6: 123.

[6] 吴贵勋, 袁欣, 李洪忠, 等. PirB 在中枢神经轴突再生中的作用及机制研究进展 [J]. 神经解剖学杂志, 2016, 32(6): 777 - 780.

[7] 杨烁, 赵崑, 王海涛. 载脂蛋白 E 及其受体调控阿尔茨海默病的研究进展 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2018, 35(6): 569 - 571.

[8] Singh A, Verma P, Raju A, et al. Nimodipine attenuates the parkinsonian neurotoxin, MPTP-induced changes in the calcium binding proteins, calpain and calbindin [J]. J Chem Neuroanat, 2019, 95: 89 - 94.

[9] Park R, Kook SY, Park JC, et al. A $\beta$ 1-42 reduces P-glycoprotein in the blood-brain barrier through RAGE-NF- $\kappa$ B signaling [J]. Cell Death Dis, 2014, 5(6): e1299.

[10] 刘园园, 杜晞, 刘凤娟, 等. ThT 结合试验法检测 A $\beta$ <sub>42</sub> 聚集情况的条件探讨 [J]. 中国输血杂志, 2018, 31(4): 356 - 361.

[11] Wälti MA, Ravotti F, Arai H, et al. Atomic-resolution structure of a disease-relevant A $\beta$ (1-42) amyloid fibril [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, 113(34): E4976 - E4984.

[12] 郭小岚, 孙悦, 时政. 阿尔茨海默病中靶向  $\beta$ -淀粉样蛋白药物的研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2018, 27(12): 1 364 - 1 371.

[13] 王丁, 张海波, 宫平, 等. 小胶质细胞在阿尔茨海默病中的作用及机制 [J]. 中国新药杂志, 2018, 27(10): 1 144 - 1 148.

[14] Yao Y, Huang JZ, Chen Y, et al. Effects and mechanism of amyloid  $\beta$ 1-42 on mitochondria in astrocytes [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(5): 6 997 - 7 004.

[15] Ma LY, Fei YL, Wang XY, et al. The research on the relationship of RAGE, LRP-1, and A $\beta$  accumulation in the hippocampus, prefrontal lobe, and amygdala of STZ-induced diabetic rats [J]. J Mol Neurosci, 2017, 62(1): 1 - 10.

[16] Gratuze M, El Khoury NB, Turgeon A, et al. Tau hyperphosphorylation in the brain of ob/ob mice is due to hypothermia: importance of thermoregulation in linking diabetes and Alzheimer's disease [J]. Neurobiol Dis, 2017, 98: 1 - 8.

[17] 赵唯贤, 李高申, 王保伟, 等. 逍遥散对阿尔茨海默病大鼠海马 CA3 区 PP-2A、GSK-3 $\beta$  表达的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2014, 32(5): 623 - 626.

[18] Jin N, Zhu H, Liang X, et al. Sodium selenate activated Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and repressed amyloid- $\beta$  formation in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease [J]. Exp Neurol, 2017, 297: 36 - 49.

[19] Xiong Y, Jing XP, Zhou XW, et al. Zinc induces protein phosphatase 2A inactivation and tau hyperphosphorylation through Src dependent PP2A (tyrosine 307) phosphorylation [J]. Neurobiol Aging, 2013, 34(3): 745 - 756.

[20] Zhao J, Li X, Chen X, et al. GRK5 influences the phosphorylation of tau via GSK3 $\beta$  and contributes to Alzheimer's disease [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(7): 10 411 - 10 420.

[21] Wang Y, Yang R, Gu J, et al. Cross talk between PI3K-AKT-GSK-3 $\beta$  and PP2A pathways determines tau hyperphosphorylation [J]. Neurobiol Aging, 2015, 36(1): 188 - 200.

(收稿日期: 2020-04-12 修回日期: 2020-07-25)