

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.10.007

SB239063 对 APPswe/PS1dE9 小鼠 A β 生成的调控作用及机制研究*严琪 杜婴 赵超 张卓 杨艾利 苗建亭^Δ 李柱一^Δ

(第四军医大学附属唐都医院神经内科 陕西 西安 710038)

摘要 目的:探讨 p38MAPK 抑制剂 SB239063 对 AD 模型小鼠认知功能障碍及其脑内 β -淀粉样蛋白(beta-amyloid protein, A β)表达情况的影响。**方法:**采用 6 月龄 APPswe/PS1dE9(APP/PS1)双转基因雄性 AD 模型小鼠及同龄野生型(WT)C57BL/6J 小鼠为研究对象,将小鼠随机分为 SB239063-WT 治疗组、WT 对照组、SB239063-APP/PS1 治疗组和 APP/PS1 对照组,治疗组小鼠接受腹腔注射 SB239063 药物溶液(用 3%DMSO 生理盐水溶液溶解,给药剂量为 15 mg/kg),对照组小鼠接受腹腔注射相应体积的 3%DMSO 生理盐水溶液,1 次/日连续给药 6 周。采用 Morris 水迷宫、蛋白质印迹法(Western Blot)和酶联免疫吸附法(ELISA)分别评估各组小鼠学习记忆功能、A β 含量及其相关酶 β -位点 APP 裂解酶 1(BACE1)、早老素 1(PS1)的表达水平。**结果:**水迷宫结果显示,与 APP/PS1 对照组相比,SB239063 慢性治疗可以明显缩短 APP/PS1 小鼠找到隐藏平台所需的潜伏期($P<0.01$),增加 APP/PS1 小鼠在目标象限停留时间百分比($P<0.01$)和穿越原平台区域的次数($P<0.01$);ELISA 结果显示,给予 SB239063 治疗能够显著减少 AD 小鼠脑内可溶性 A β 1-42($P<0.05$)、A β 1-40($P<0.05$)和 A β 寡聚体($P<0.01$)的含量;Western blot 结果显示,给予 SB239063 治疗后 APP/PS1 小鼠脑内皮层和海马组织中的 p-p38MAPK($P<0.01$)、BACE1($P<0.01$)、PS1($P<0.01$)的表达水平明显下降。**结论:**SB239063 可能通过下调 p38MAPK 的磷酸化水平抑制 BACE1 和 PS1 的表达,从而减少 A β 的生成并且改善 AD 小鼠的学习记忆功能损害,提示 SB239063 对 A β 所造成的病理损害具有潜在的治疗作用。

关键词:阿尔茨海默病;p38 丝裂原活化蛋白激酶; β 淀粉样蛋白; β 位点 APP 裂解酶 1;早老素 1

中图分类号:Q95-3;R749.16 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)10-1827-07

The Effect and Molecular Mechanisms of SB239063 on Regulating A β Generation in APPswe/PS1dE9 Mice*YAN Qi, DU Ying, ZHAO Chao, ZHANG Zhuo, YANG Ai-li, MIAO Jian-ting^Δ, LI Zhu-yi^Δ

(Department of Neurology, Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the efficacy and molecular mechanisms of SB239063 on cognitive deficits and A β generation in APPswe/PS1dE9 mice. **Methods:** Six-month-old male APPswe/PS1dE9 mice and their wild-type littermates were randomized into SB239063-treated groups and control groups respectively. The treated groups received SB239063 (dissolved in 3% DMSO at a dose of 15mg/kg) once per day by intraperitoneal injection, whereas the control groups received an equal volume of 3% DMSO once per day by intraperitoneal injection. Six weeks after the treatments, the spatial learning and memory ability of all mice were evaluated by the Morris water maze test, the levels of soluble A β were detected with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits, the expression of crucial enzymes in the production of A β were tested with western blot method. **Results:** Compared with the vehicle-treated APPswe/PS1dE9 mice, the escape latency in reaching the hidden-platform were significantly decreased ($P<0.01$), while the percentage of time spend in the target quadrant ($P<0.01$) and the frequency of crossing the platform ($P<0.01$) were potently increased in SB239063-treated APPswe/PS1dE9 mice ($P<0.01$). Meanwhile, the levels of soluble A β 1-42 ($P<0.05$), A β 1-40 ($P<0.05$) and A β oligomers ($P<0.01$) were dramatically decreased in SB239063-treated APPswe/PS1dE9 mice versus the control group. In addition, the expression of p-p38MAPK, BACE1 and PS1 in APPswe/PS1dE9 mice were markedly reduced by SB239063 treatment ($P<0.01$). **Conclusion:** SB239063 can reverse cognitive impairments and A β toxicity by decreasing the expression of BACE1 and PS1 which may result from inhibition of p-p38MAPK. Our findings provide that SB239063 may be a promising therapeutic strategy for the treatment of AD.

Key words: Alzheimer's disease; P38MAPK; β -amyloid; BACE1; PS1

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; R749.16 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)10-1827-07

* 基金项目:国家自然科学基金项目(面上项目)(81471111)

作者简介:严琪(1987-),硕士研究生,主要研究方向:阿尔茨海默病,E-mail: 15202423709@163.com

^Δ 通讯作者:苗建亭(1967-),博士生导师,教授,主要研究方向:阿尔茨海默病,E-mail: jtmiao@fmmu.edu.cn,电话:029-84778342

李柱一(1962-),博士生导师,教授,主要研究方向:重症肌无力,E-mail: lizhu yi@fmmu.edu.cn,电话:029-84777443

(收稿日期:2016-10-25 接受日期:2016-11-20)

前言

β 淀粉样蛋白 (β -amyloid, A β) 是阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 的主要病理产物之一, 有研究证明病理状态下 A β 的大量沉积所引起的神经细胞功能损伤是由丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPKs) 家族所介导, p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 mitogen-activated protein kinase, p38MAPK) 则属于 MAPKs 家族中的一员^[10]。p38MAPK 能够被多种病理因素 (如缺血、缺氧、氧化应激、炎症因子等) 激活, 参与炎症、心脑血管疾病、神经退行性疾病、肿瘤、疼痛等多种疾病的病理过程^[12]。大量实验数据表明, A β 寡聚体可以显著活化 p38MAPK, 诱导 p38MAPK 信号通路激活导致神经细胞凋亡、认知功能障碍发生以及神经毒性作用^[3-7], 但其中的机制仍不明确。本研究通过应用 p38MAPK 特异性抑制剂 SB239063, 探究在 APPswe/PS1dE9 (APP/PS1) 转基因小鼠体内抑制 p38MAPK 信号通路后对 A β 生成的影响及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 6 月龄 SPF 级雄性 APPswe/PS1dE9 双转基因小鼠 18 只, 购自北京华康康生物科技股份有限公司 (许可证号: SCXK (京) 2014-0004), 6 月龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 18 只, 购自第四军医大学实验动物中心。SPF 级环境饲养, 小鼠自由摄取饲料和饮水, 12 小时交替照明。

1.1.2 实验试剂与仪器 SB239063、p-p38(D-8) 抗体、BACE1 (61-3E7) 抗体、Presenilin 1 (N-19) 抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司; 二甲基亚砜 (DMSO) 购自美国 Sigma 公司; 蛋白酶抑制剂混合片剂、磷酸酶抑制剂混合片剂购自德国 Roche 公司; BCA 蛋白定量试剂盒、辣根过氧化物酶标记兔抗山羊 IgG (H+L) 抗体购自晶彩生物科技有限公司; p38MAPK (D13E1) 抗体购自美国 Cell Signal Technology 公司; β -actin 抗体、辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG (H+L) 抗体、辣根酶标记山羊抗兔 IgG (H+L) 抗体购自中杉金桥公司; Human A β 42 ELISA Kit、Human A β 40 ELISA Kit 购自美国 invitrogen 公司; Human Amyloid β Oligomers (82E1-specific) Assay Kit 购自日本 IBL 公司。Morris 水迷宫设备购自上海欣软信息科技有限公司; 超速离心机购自美国 Beckman Coulter 公司; 超声波破碎仪购自美国 SONICS 公司; 多功能酶标仪购自美国 Molecular Devices 公司; Western-blot 实验设备购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组及给药 APPswe/PS1dE9 转基因小鼠和野生型 C57BL/6J 小鼠被分为四组 (每组 9 只): APPswe/PS1dE9 小鼠 SB239063 治疗组, APPswe/PS1dE9 小鼠对照组, C57BL/6J 小鼠 SB239063 治疗组, C57BL/6J 小鼠对照组。将 SB239063 用 3% DMSO 生理盐水溶液完全溶解, 治疗组小鼠接受腹腔注射 SB239063 药物, 剂量为 15 mg/kg^[8], 对照组小鼠接受相应体积的腹腔注射 3% DMSO 生理盐水溶液, 1 次/日, 连续给药 6 周。

1.2.2 Morris 水迷宫实验 第一阶段 -- 定位巡航实验, 为期 5

天, 每天将每只小鼠依次从四个象限分别放入水中, 若小鼠在 60 秒内找到隐藏平台并停留 10 秒以上视为成功, 若 60 秒内未找到隐藏平台则人工引导小鼠至平台上并停留 10 秒以上, 每只小鼠从入水到找到平台所用时间即为逃逸潜伏期, 由跟踪摄像机和电脑软件自动分析并记录。定位巡航实验结束后间隔 24 小时, 进行第二阶段 -- 空间探索实验。移除水面下平台, 四个象限的标志牌、小鼠入水位置和顺序均维持不变, 小鼠每一次入水后均游泳 60 秒, 由软件自动记录小鼠在每个象限所停留的时间以及精确穿越原有平台所在位置的频次。第三阶段 -- 可视平台实验, 将平台位置移动至原来所在象限的对侧, 并且露出水面 1 cm, 其他实验操作条件均不变, 电脑软件自动记录每只小鼠找到平台所需的时间。

1.2.3 制备脑组织 用 1% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔注射麻醉小鼠后将四肢固定, 暴露心脏, 从心尖将灌注针插入主动脉, 同时剪开右心耳, 预冷的 0.9% 生理盐水灌注, 观察肝脏颜色变为灰白即可。断头取脑, 在冰上将皮层和海马分离, 先置于液氮中速冻, 继而将脑组织存放于 -80℃ 冰箱保存。

1.2.4 Western-blot 将四组小鼠的皮层和海马组织用 TBS 裂解液 (NaCl 150 mM, Tris 50 mM, pH 7.4, 每 10 mL 裂解液中含有 1 片蛋白酶抑制剂 + 1 片磷酸酶抑制剂) 研磨成组织匀浆, 超声波破碎仪加速组织裂解, 用超速离心机以 100,000 × g 转速 4℃ 真空条件下离心 80 min, 取上清, BCA 蛋白定量, 皮层组织按 20 μ g/孔, 海马组织按 10 μ g/孔的蛋白量进行 SDS-PAGE 垂直电泳后, 设置转膜电流为 250 mA, 时间 150 min, 将蛋白转移至 PVDF 膜上, 2% BSA 封闭 45 min, 分别用 p38MAPK 抗体 (1:1000 稀释), p-p38 抗体 (1:1000 稀释), BACE1 抗体 (1:500 稀释), PS1 抗体 (1:500 稀释), β -actin 抗体 (1:1000 稀释) 4℃ 孵育过夜。用 1× TBST 将膜清洗 3 次, 10 min/次, 根据一抗的种属来源选择相对应的二抗 (1:5000 稀释) 室温孵育 2 h, 再用 1× TBST 将膜清洗 3 次, 10 min/次, 使用 ECL 化学发光法和 Image Lab 软件进行条带显影和灰度值分析。

1.2.5 ELISA 标本处理方法同 Western-blot, 取 APPswe/PS1dE9 转基因小鼠治疗组和对照组样本, 使用 Human A β 42 ELISA 检测试剂盒、Human A β 40 ELISA 检测试剂盒、Human Amyloid β Oligomers 检测试剂盒, 按照操作说明书分别检测样本中可溶性 A β 1-42、A β 1-40 和 A β 寡聚体的浓度值, 每份样本所测得的浓度值与其所对应的蛋白定量结果的比值即为每个样本中 A β 1-42、A β 1-40 以及 A β 寡聚体的含量。

1.2.6 统计学分析 使用 SPSS19.0 软件对所有实验数据进行统计学分析, 规定显著性水平为 0.05, 数据均采用均数 (mean) $\pm$ 标准误 (SEM) 形式表示。Morris 水迷宫定位巡航实验数据采用重复测量数据的双因素方差分析法进行统计学分析。空间探索实验、去平台实验、Western-blot 实验四组数据间比较采用单因素方差分析法, 两组之间多重比较时, 若方差齐性检验 $P > 0.05$ 则使用 LSD 检验法, 若方差齐性检验 $P < 0.05$ 则使用 Dunnett T3 检验法。ELISA 实验数据采用配对 t 检验。

2 结果

2.1 SB239063 能够改善 APPswe/PS1dE9 转基因小鼠的空间学习记忆功能损害

通过 Morris 水迷宫实验对四组小鼠的空间学习和记忆能力进行测试。在定位巡航实验阶段, APPswe/PS1dE9 转基因小鼠寻找到隐藏平台所需的逃逸潜伏期明显高于其余三组小鼠 (见图 1A、B, $P < 0.05$), 即使接受训练后该组小鼠游泳的轨迹仍无明确方向性, 并且寻找隐藏平台所游的距离更长 (见图 1F), 然而接受 SB239063 治疗的 APPswe/PS1dE9 转基因小鼠找到隐藏平台的每日平均潜伏期均小于转基因对照组, 尤其在训练第 5 天, 接受 SB239063 治疗的转基因小鼠的潜伏期时间与对照组的转基因小鼠相比显著降低 (见图 1B, $P < 0.01$), 同时游泳的轨迹图显示给药组 APPswe/PS1dE9 小鼠经过训练后寻找

隐藏平台的方向性更明确, 所游的距离更短 (见图 1G)。在空间探索阶段, APPswe/PS1dE9 转基因小鼠在目标象限停留时间百分比明显低于野生型 C57BL/6J 小鼠 (见图 1C, $P < 0.05$), 然而经过 SB239063 治疗的 APP/PS1 小鼠在原来平台所在的目标象限停留的时间百分比明显高于对照组 APP/PS1 小鼠 (见图 1C, $P < 0.01$); 同时, 治疗组 APPswe/PS1dE9 转基因小鼠精确穿越平台的次数明显多于对照组 APPswe/PS1dE9 转基因小鼠 (见图 1D, $P < 0.01$)。可视平台实验中, 四组小鼠到达平台的潜伏期无明显差异 (见图 1E, $P > 0.05$)。

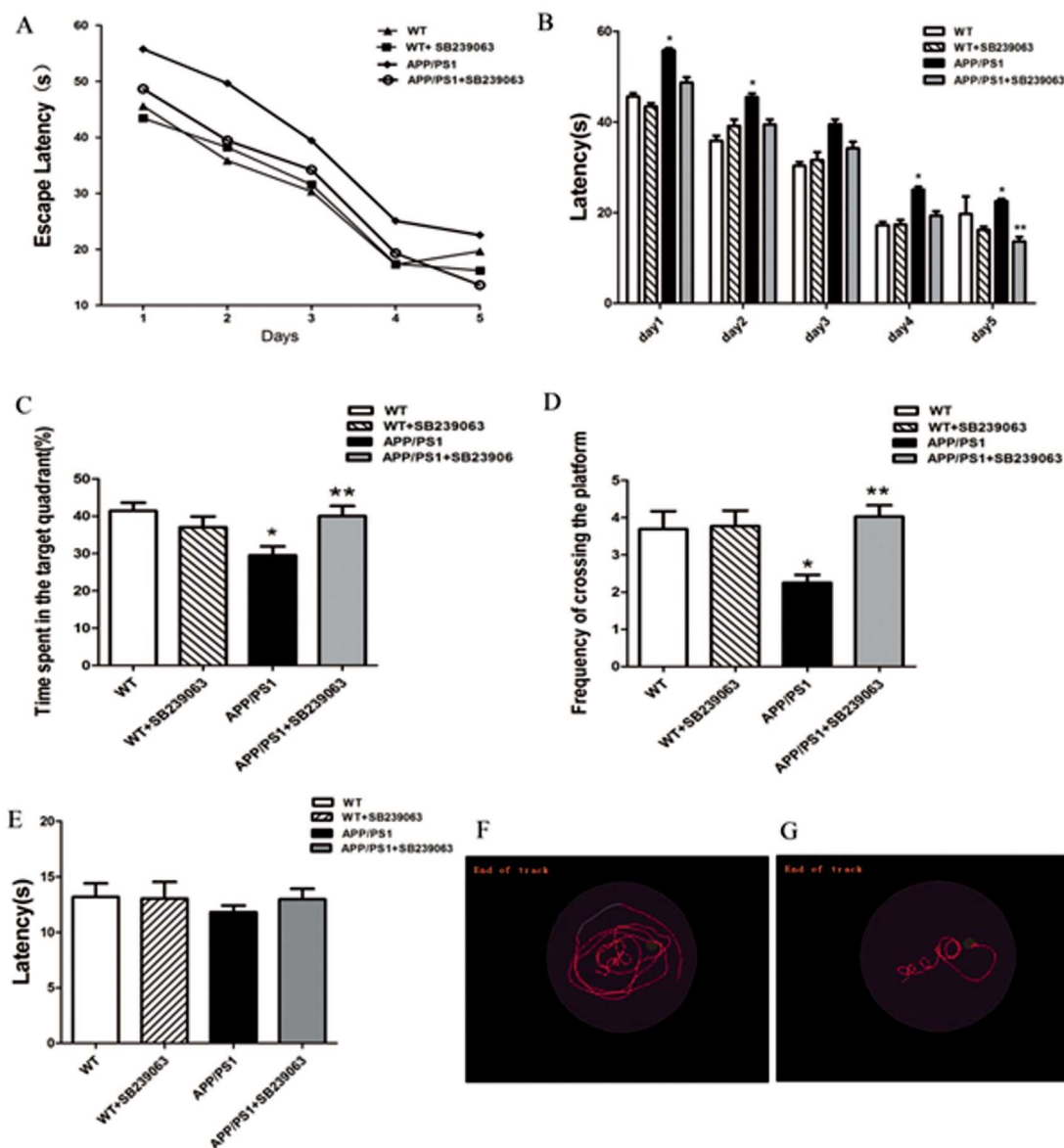


图 1 SB239063 能够改善 APPswe/PS1dE9 转基因小鼠的空间学习记忆能力损害

Fig.1 SB239063 treatment improves spatial learning and memory impairment in APPswe/PS1dE9 mice

注: A 和 B: 四组小鼠寻找隐藏平台的逃逸潜伏期比较情况。C: 四组小鼠在目标象限停留时间百分比情况。D: 四组小鼠精确穿越原平台区域的次数比较。E: 可视平台实验中各组小鼠逃逸潜伏期比较。F: APP/PS1 对照组小鼠寻找隐藏平台的轨迹图。G: 接受 SB239063 治疗的 APP/PS1 小鼠寻找隐藏平台的轨迹图。

Note: A and B: The escape latency in the hidden platform trail for 5 days. C: The percentage of time spent in the target quadrant. D: Frequency of crossing the former platform location. E: The escape latency in the visible platform trail. F: The track of the vehicle-treated APP/PS1 mice in the hidden platform trail. G: The track of the SB239063-treated APP/PS1 mice in the hidden platform trail. Values represent mean $\pm$ SEM ($n=9$, each group). * $P < 0.05$, compared with the wild type mice; ** $P < 0.01$, compared with the APP/PS1 group.

2.2 SB239063 能够降低 APPswe/PS1dE9 转基因小鼠脑组织中磷酸化 p38MAPK(p-p38)的含量

与 C57 BL/6J 小鼠相比,APPswe/PS1dE9 转基因小鼠皮层和海马组织的 p-p38 含量均显著增加(见图 2A 和 B, $P<0.01$),

然而经过 SB239063 治疗后,APPswe/PS1dE9 转基因小鼠皮层、海马组织中 p-p38 含量与未经治疗的转基因小鼠相比明显减少(见图 2A 和 B, $P<0.01$)。同时 p38MAPK 蛋白表达量在四组小鼠脑中无显著差异(见图 2A 和 C, $P>0.05$)。

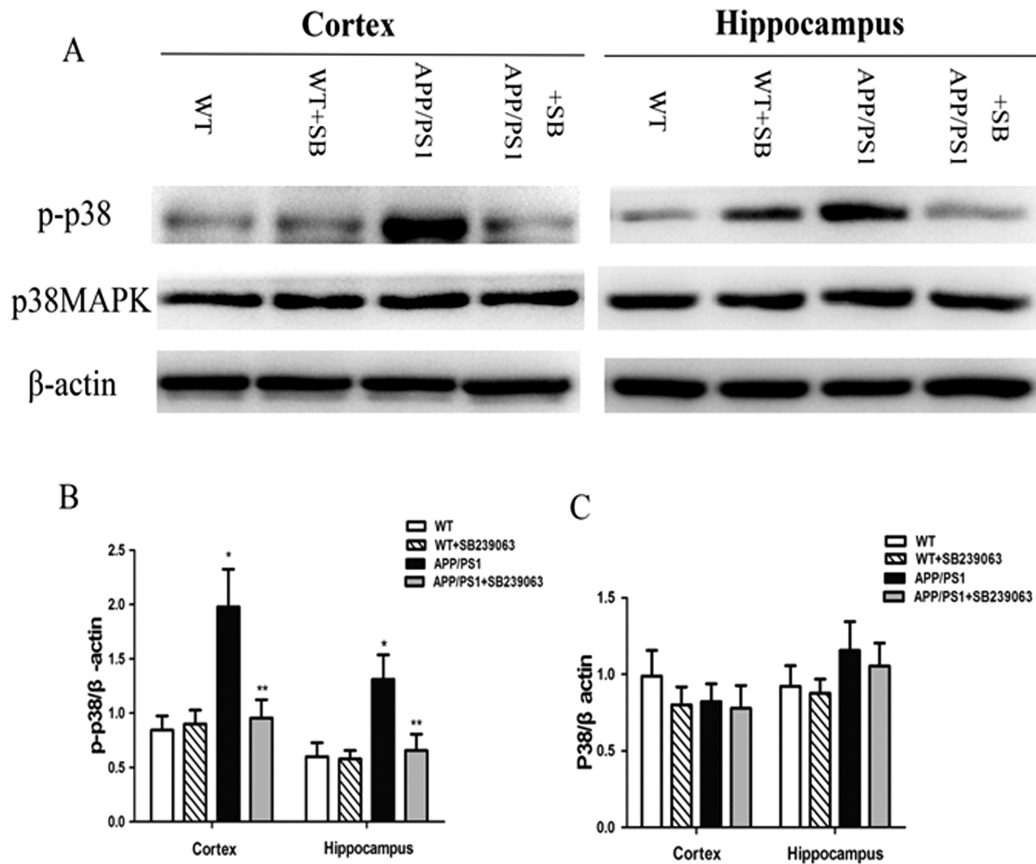


图 2SB239063 能够降低 APPswe/PS1dE9 转基因小鼠脑组织中磷酸化 p38MAPK(p-p38)的含量

Fig.2 SB239063 treatment inhibits p38MAPK Phosphorylation in APPswe/PS1dE9 mice

注:A:四组小鼠皮层和海马组织中 p-p38 和 p38MAPK 的 Western 条带, β -actin 作为内参。B:皮层和海马组织中 p-p38/ β -actin 灰度值的比值。

C:皮层和海马组织中 p38/ β -actin 灰度值的比值。

Note: A: Representative Western blot bands of p38MAPK and p-p38 in the brain homogenates of wild-type mice and APP/PS1 mice treated with vehicle and SB239063, β -actin was used as a loading control. B: Densitometric quantification of p-p38. C: Densitometric quantification of p38. The columns represent the mean $\pm$ SEM (n=9, each group). * $P<0.01$, compared with the wild type mice; ** $P<0.01$, compared with the APP/PS1 group.

2.3 SB239063 能够降低 APPswe/PS1dE9 转基因小鼠脑内 $A\beta$ 水平

应用 ELISA 方法分别检测 SB239063 治疗组和对照组 APPswe/PS1dE9 转基因小鼠脑内 $A\beta$ 的变化情况。我们发现治疗组 APPswe/PS1dE9 小鼠大脑皮层和海马中可溶性 $A\beta$ 1-42、 $A\beta$ 1-40 的含量均显著低于对照组的 APPswe/PS1dE9 小鼠(见图 3A 和 B, $P<0.01$)。APPswe/PS1dE9 转基因小鼠经过 SB239063 治疗后,大脑皮层和海马中的 $A\beta$ 寡聚体含量与对照组相比也明显降低(见图 3C,皮层 $P<0.01$,海马 $P<0.05$)。

2.4 SB239063 能够抑制 $A\beta$ 生成过程中的关键酶 BACE1 和 PS1 的表达

通过 western-blot 方法,APPswe/PS1dE9 转基因小鼠脑内 BACE1 的表达水平远高于野生型小鼠(见图 4A 和 B, $P<0.01$),经过 SB239063 治疗后,AD 小鼠脑内 BACE1 的表达水平与对照组 AD 小鼠相比显著降低(见图 4A 和 B,皮层 $P<$

0.001,海马 $P<0.01$)。APPswe/PS1dE9 转基因小鼠脑内 PS1 的表达水平明显高于野生型小鼠(见图 4A 和 C, $P<0.01$),经过 SB239063 治疗后,治疗组转基因小鼠脑内 PS1 的表达水平与对照组转基因小鼠相比显著降低(见图 4A 和 C, $P<0.01$)。

3 讨论

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种以进行性认知功能障碍和主管学习记忆功能的脑区神经退行性病变为主要特征的不可逆性大脑功能障碍性疾病^[12], $A\beta$ 的生成和沉积是促进 AD 发生和发展的关键因素。 $A\beta$ 的异常聚集具有神经毒性,能够导致一系列复杂的病理改变包括神经元功能异常、神经纤维缠结、炎症反应、细胞凋亡、突触缺失,最终出现认知功能障碍等阿尔茨海默病的临床症状^[9]。p38MAPK 在去磷酸化状态下是失活的,在多种细胞外因子的刺激下经过经典的 MAPKkinasekinase (MAP3K)-MAP kinase kinase (MKK) 信号

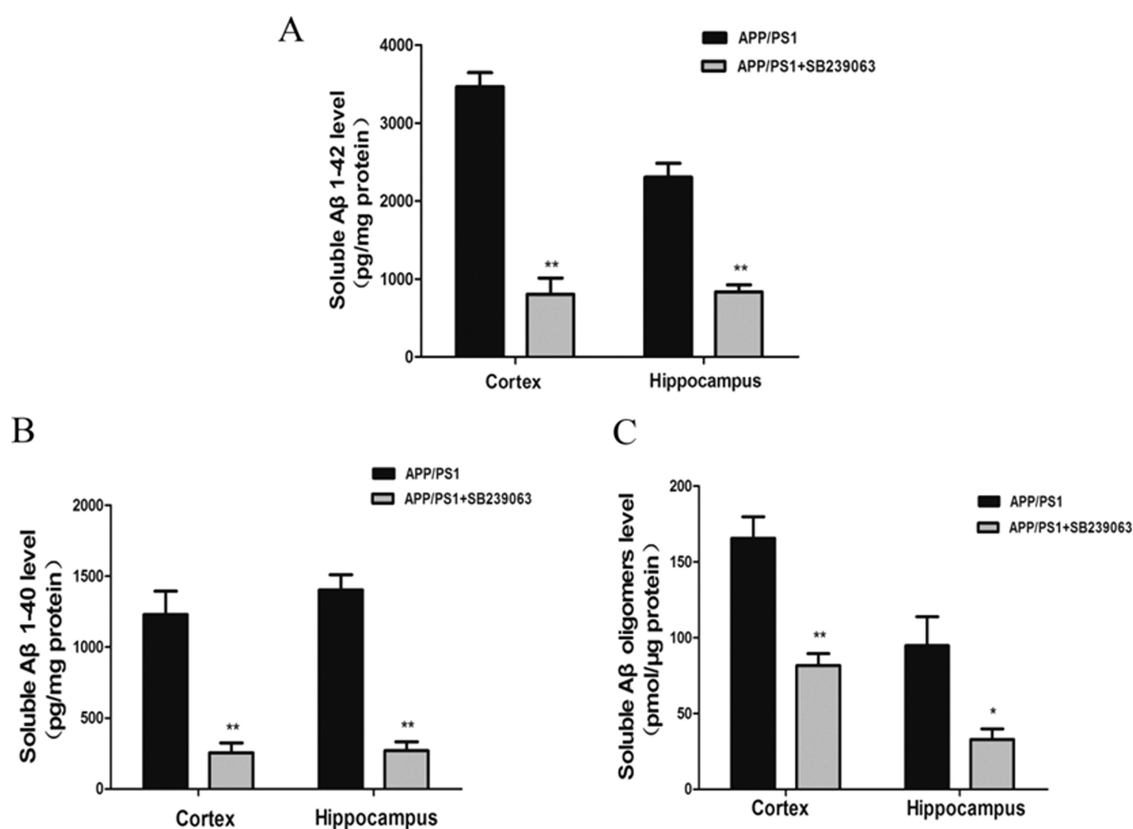


图 3 SB239063 能够降低 APPswe/PS1dE9 转基因小鼠脑内 Aβ 水平

Fig.3 SB239063 treatment decrease brain Aβ levels in APPswe/PS1dE9 mice

注:接受 SB239063 治疗的 APP/PS1 小鼠皮层和海马组织中的可溶性 Aβ1-42(A), Aβ1-40(B) 和 Aβ 寡聚体(C)水平分别与 APP/PS1 对照组比较情况。

Note: The levels of soluble Aβ1-42(A), Aβ1-40(B) and Aβ oligomers(C) of APP/PS1 mice treated with SB239063 in both cerebral cortex and hippocampus compared with control transgenic mice. Data were expressed as the mean ± SEM (n=9, each group). *P < 0.05, **P < 0.01, versus the APP/PS1 group.

通路完成了磷酸化,被活化的 p38 MAPK 能够作用于下游的转录因子、蛋白激酶、胞内蛋白、核蛋白等底物参与到多种疾病的病理过程中^[1,15]。本实验对 APPswe/PS1dE9 转基因小鼠和野生型 C57 BL/6J 小鼠给予 SB239063 处理后,发现四组小鼠脑组织中总 p38MAPK 含量并无改变,而治疗组 APPswe/PS1dE9 转基因小鼠脑中磷酸化 p38MAPK(p-p38)的表达量较对照组明显降低,表明 SB239063 是通过抑制 AD 小鼠脑内 p38MAPK 的磷酸化来阻断 p38MAPK 信号通路的。已有研究表明,Aβ 在脑组织中的过度沉积所导致的神经毒性作用与 p38MAPK 信号通路密切相关^[16],Xu 等^[10]实验证明,将 Aβ25-35 经侧脑室注射进大鼠脑内能够激活 p38MAPK 并且提高 caspase-3 的水平,进而导致海马 CA1 和 CA3 区域的神经元的缺失;在高血压所致脑功能损伤的模型小鼠体内给予 p38MAPK 抑制剂 SKF86002 后,模型小鼠脑内海马长时程增强(long-term potentiation, LTP)损伤程度和记忆能力均得到了明显改善^[11],以上报道均提示 p38MAPK 信号通路在神经细胞突触重塑过程中发挥着关键作用,同时也参与了神经退行性疾病的病理过程。本次实验为了探究 SB239063 对 Aβ 生成的影响,分别检测了治疗组和对照组 APPswe/PS1dE9 转基因小鼠脑内可溶性 Aβ 的含量,发现 SB239063 可以显著减少 Aβ1-42 和 Aβ1-40 的含

量,同时明显降低了 Aβ 寡聚体的沉积量。以上证据提示 p38MAPK 很可能成为治疗阿尔茨海默病的重要靶点。

在 AD 模型小鼠体内已经证实,Aβ 寡聚体的聚集能够导致神经细胞突触功能缺失和记忆形成过程受损^[17],突触可塑性则是学习记忆能力形成的神经生物学基础^[11,17]。我们使用 SB239063 特异性抑制 p38MAPK 信号通路后,应用 Morris 水迷宫实验发现,APPswe/PS1dE9 小鼠的空间学习和记忆力严重受损,这一点从寻找平台的潜伏期明显长于野生型小鼠和在空间探索阶段其在目标象限停留时间的百分比明显短于野生对照组就可以得到证实。然而经过 SB239063 治疗后,APPswe/PS1dE9 小鼠无论是在定位巡航实验中寻找平台的潜伏期指标还是空间探索实验中在目标象限停留时间百分比以及精确穿越平台所在区域指标上与对照组转基因小鼠相比均表现出了显著的优势,证明 SB239063 在 APPswe/PS1dE9 小鼠体内能够有效降低 Aβ 聚集所引起的神经毒性作用,从而显著提高 AD 小鼠的学习能力和记忆力,具有较好的神经保护作用。

Aβ 是由淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 依次经过 β 分泌酶和 γ 分泌酶的水解作用后形成的产物,参与 APP 蛋白裂解的 β 分泌酶主要是 β-位点 APP 裂解酶 1 (β-site APP-cleaving enzyme 1, BACE1)^[13],γ 分泌酶则是由多个亚基组

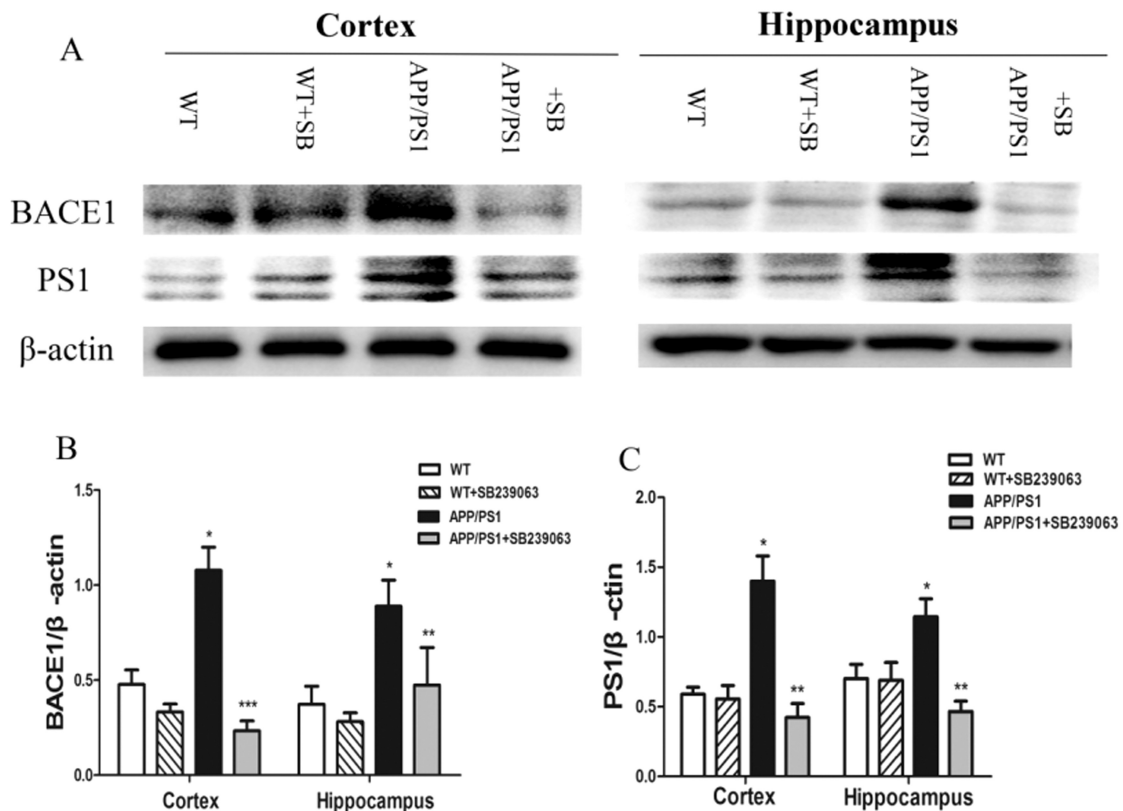


图 4SB239063 能够抑制 A β 生成过程中的关键酶 BACE1 和 PS1 的表达

Fig.4 SB239063 treatment reduces the expression of BACE1 and PS1

注:A:四组小鼠皮层和海马组织中 BACE1 和 PS1 的 Western 条带, β -actin 作为内参。B:皮层和海马组织中 BACE1/ β -actin 灰度值的比值。C:皮层和海马组织中 PS1/ β -actin 灰度值的比值。

Note: A: Representative Western blot bands of BACE1 and PS1 in the brain homogenates of wild-type mice and APP/PS1 mice treated with vehicle and SB239063, β -actin was used as a loading control. B: Densitometric quantification of BACE1. C: Densitometric quantification of PS1. The columns represent the mean $\pm$ SEM (n=9, each group). *P < 0.01, versus the wild type mice. ** P < 0.01, ***P < 0.001, versus the APP/PS1 group.

成的蛋白酶复合物,早老素 1 (presenilin 1,PS1)是其主要催化亚基^[14]。在 APP 逐步裂解为 A β 的过程中,BACE1 是 A β 生成的限速酶,PS1 在该过程中也起着相当重要的作用^[13,14]。目前,旨在通过抑制 BACE1 的活性而降低 A β 的生成是 AD 治疗药物研发的重要靶点,BACE1 竞争性抑制剂能够显著改善阿尔茨海默病模型动物的认知功能,并且有望进入临床试验阶段^[19]。为进一步探究 SB239063 能够减少 A β 生成的机制,我们对治疗组和对照组小鼠脑组织中的 BACE1、PS1 表达量分别进行了检测,发现野生型小鼠脑内 BACE1、PS1 表达量很低,AD 模型小鼠脑内的 BACE1、PS1 含量显著增加,经过 SB239063 药物处理后 AD 小鼠皮层和海马组织中 BACE1、PS1 的表达量明显降低。因此,我们的试验结果显示 SB239063 不仅可以抑制 BACE1 的表达,还能够显著降低 PS1 的活性。在生成 A β 的过程中,BACE1 将 APP 裂解成 sAPP β 和 99 个碱基组成的膜相关片段(membrane-bound 99-residue C-terminal fragment, C99),C99 继而被 γ 分泌酶裂解为长度为 36-43 个氨基酸的 A β 片段,被释放的 A β 片段迅速组合成疏水性的毒性寡聚体(oligomers),诱导淀粉样斑块形成及神经毒性作用^[20-23]。与现有的 BACE1 抑制剂相比,SB239063 不仅能够减少 BACE1 的表达量,还能降低 γ 分泌酶的活性,从而更加有效的抑制病理状

态下 APP 向致病性 A β 转化的代谢途径,这一实验结果为 SB239063 被进一步研发成为阻止 A β 生成的药物提供了研究基础。

综上所述,我们的研究显示 SB239063 的神经保护作用很可能是通过抑制 p38MAPK 的磷酸化从而阻断了 AD 小鼠脑内 p38MAPK 信号通路,进一步下调了 A β 形成过程中的关键酶 BACE1 和 PS1 的表达水平,达到减少 A β 生成,减轻 A β 导致的神经毒性作用的目的,最终显著改善了阿尔茨海默病模型小鼠的认知功能障碍。这些结果为 SB239063 进一步被研发成为治疗阿尔茨海默病的新药物提供了实验理论基础,也为临床防治阿尔茨海默病提供了新策略。

参考文献(References)

- [1] Lydia R Coulthard, Danielle E White, Dominic L Jones, et al. p38MAPK: stress responses from molecular mechanisms to therapeutics[J]. Trends Mol Med, 2009, 15(8): 369-379
- [2] Flávio Roberto Pinsetta, Carlton Anthony Taft, Carlos Henrique Tomich de Paula da Silva, et al. Structure- and ligand-based drug design of novel p38-alpha MAPK inhibitors in the fight against the Alzheimer's disease [J]. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2014, 32(7): 1047-1063
- [3] Jin Y, En-zhi Yan, Ying Fan, et al. Sodium ferulate prevents

- amyloid-beta-induced neurotoxicity through suppression of p38MAPK and up regulation of ERK-1/2 and Akt/protein kinase B in rat hippocampus [J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2005, 26 (8): 943-951
- [4] Jane E Swatton, Lynda A Sellers, Richard LM Faull, et al. Increased MAP kinase activity in Alzheimer's and Down syndrome but not in schizophrenia human brain [J]. *European Journal of Neuroscience*, 2004, 19(10): 2711-2719
- [5] Gail VW Johnson, Craig DC Bailey. The p38MAP kinase signaling pathway in Alzheimer's disease [J]. *Experimental Neurology*, 2003, 183(2): 263-268
- [6] Huang J, Chen YJ, Bian WH, et al. Unilateral amyloid-beta 25-35 injection into the rat amygdala increases the expressions of aberrant tau phosphorylation kinases [J]. *Chinese Medical Journal*, 2010, 123 (10): 1311-1314
- [7] Ghasemi R, Zarifkar A, Rastegar K, et al. Repeated intra-hippocampal injection of beta-amyloid 25-35 induces a reproducible impairment of learning and memory: considering caspase-3 and MAPKs activity[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2014, 726(3): 33-40
- [8] F C Barone, E A Irving, A M Ray, et al. SB239063, a Second-Generation p38 Mitogen Activated Protein Kinase Inhibitor, Reduces Brain Injury and Neurological Deficits in Cerebral Focal Ischemia [J]. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2001, 296(2): 312-321
- [9] Steffen Roßner, Magdalena Sastre, Krystyn Bourne, et al. Transcriptional and translational regulation of BACE1 expression-Implications for Alzheimer's disease [J]. *Progress in Neurobiology*, 2006, 79(2): 95-111
- [10] Y Xu, Da Hong Cao, Gui-Mei Wu, et al. Involvement of p38MAPK activation by NMDA receptors and non-NMDA receptors in amyloid- β peptide-induced neuronal loss in rat hippocampal CA1 and CA3 subfields[J]. *Neuroscience Research*, 2014, 85(8): 51-57
- [11] Hai-long Dai, Wei-yuan Hu, Li-hong Jiang, et al. P38 MAPK Inhibition Improves Synaptic Plasticity and Memory in Angiotensin II-dependent Hypertensive Mice[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 27600
- [12] Andrea Megill, Trinh Tran, Kiara Eldred, et al. Defective age-dependent metaplasticity in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *J Neuroscience*, 2015, 35(32): 11346-11357
- [13] Kathryn M Munro, Amelia Nash, Martina Pignoni, et al. Functions of the Alzheimer's disease Protease BACE1 at the Synapse in the Central Nervous System [J]. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2016, 60(3): 305-315
- [14] Aitana Sogorb-Esteve, Marí a-Salud Garcí a-Aylló n, Juan Fortea, et al. Cerebrospinal fluid Presenilin-1 increases at asymptomatic stage in genetically determined Alzheimer's disease [J]. *Molecular Neurodegeneration*, 2016, 11(1): 66
- [15] Ana Cuenda, Simon Rousseau. P38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, 1773(8): 1358-1375
- [16] Lenka Munoz, Alaina J Ammit. Targeting p38 MAPK pathway for the treatment of Alzheimer's disease [J]. *Neuropharmacology*, 2010, 58(3): 561-568
- [17] Niels R Reindersa, Yvonne Pao, Maria C Rennera, et al. Amyloid- β effects on synapses and memory require AMPA receptor subunit GluA3 [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(42): 6526-6534
- [18] Ales Stuchlik. Dynamic learning and memory, synaptic plasticity and neurogenesis: an update[J]. *Frontiers Behavioral Neuroscience*, 2014, 8: 106
- [19] Vassar R, Kuhn P H, Haass C, et al. Function, therapeutic potential and cell biology of BACE proteases: current status and future prospects[J]. *Neurochemistry*, 2014, 130(1): 4-28
- [20] Wei Hong Toh, Paul A Gleeson. Dysregulation of intracellular trafficking and endosomal sorting in Alzheimer's disease: controversies and unanswered questions [J]. *Biochem. J*, 2016, 473, 1977-1993
- [21] Wang H, Li R, Shen Y. β -secretase: its biology as a therapeutic target in diseases[J]. *Trends Pharmacology Science*, 2013, 34(4): 215-225
- [22] Dislich B, Lichtenthaler S F. The Membrane-Bound Aspartyl Protease BACE1: Molecular and Functional Properties in Alzheimer's disease and beyond[J]. *Front Physiol*, 2012, 3: 8
- [23] Sun X, Bromley-Brits K, Song W. Regulation of β -site APP-cleaving enzyme 1 gene expression and its role in Alzheimer's disease [J]. *J Neurochem*, 2012, 120(1): 62-70

(上接第 1809 页)

- He Hai-long, Ye Xiao-jian, Li Jia-shun, et al. Experimental study on a model of chronic cervical cord compression myelopathy[J]. *Journal of Spine Surgery*, 2006, 4(1): 38-41
- [22] Sarabia-Estrada R, Zadnik PL, Molina CA, et al. A rat model of metastatic spinal cord compression using human prostate adenocarcinoma: histopathological and functional analysis [J]. *Spine J*, 2013, 13(11): 1597-1606
- [23] 张红利, 沈霖. 颈椎病兔模型 TNF- α 、SP、NPY、CGRP 的变化及意义[J]. *数理医药学杂志*, 2012, 25(4): 410-412
- Zhang Hong-li, Shen Lin. Changes and Significance of TNF- α , SP, NPY and CGRP in Cervical Spondylosis Rabbit Model [J]. *Journal of Mathematical Medicine*, 2012, 25(4): 410-412
- [24] 周长嵩, 安春厚. 大鼠脊髓慢性压迫损伤模型的建立[J]. *生物骨科材料与临床研究*, 2011, 8(5): 8-11
- Zhou Chang-song, An Chun-hou. Establishment of rat chronic spinal cord compression injury model[J]. *Biomedical Materials and Clinical Research*, 2011, 8(5): 8-11