

甲基苯丙胺暴露对神经病理性蛋白 APP 及 p-tau 表达的影响

程洁¹, 蒋雷², 钱文溢¹, 肖杭¹, 王军¹, 陈旭锋^{2*}

(¹南京医科大学公共卫生学院, 江苏 南京 211166; ²南京医科大学第一附属医院急诊医学中心, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 观察甲基苯丙胺(methamphetamine, Meth)暴露后神经病理性蛋白 β -淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)及 p-tau 表达的改变。方法: 将 30 只 C57BL/6J 雄性小鼠随机分为对照组、生理盐水组、Meth 组, Meth 组腹腔注射给予 10 mg/kg 的剂量, 1 d 2 次, 连续 7 d。利用高尔基银染法观察 Meth 作用后大脑神经元数量及棘突的改变; 采用 Western blot 法检测 Meth 暴露后神经病理性蛋白 APP, p-tau 表达的改变。结果: 高尔基银染结果显示, Meth 组与生理盐水组及对照组比较, 神经元数量及棘突显著减少。通过 Western blot 发现 Meth 能剂量依赖及时间依赖性上调病理性蛋白 β -APP 及 p-tau 的表达, 具有显著性差异 ($P < 0.05$)。此外, 通过预孵 L 型钙通道的抑制剂硝苯地平, 发现 Meth 引起的 APP 及 p-tau 上调显著被抑制。结论: Meth 暴露可引起阿尔兹海默样病变, 因而该研究可为 Meth 引起认知能力下降提供部分解释。

[关键词] 甲基苯丙胺; APP; p-tau; 神经损伤

[中图分类号] R114

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)12-1548-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20171202

The effects of methamphetamine on the expression of pathological protein APP and p-tau

Cheng Jie¹, Jiang Lei², Qian Wenyi¹, Xiao Hang¹, Wang Jun¹, Chen Xufeng^{2*}

(¹School of Public Health, NJMU, Nanjing 211166; ²Department of Emergency Medicine, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of methamphetamine (Meth) on the protein expression of β -amyloid precursor protein (APP) and p-tau. **Methods:** Thirty C57BL/6J male mice were randomly divided into control group, saline treatment group and Meth treated group, then the mice were administrated intraperitoneally with 10 mg/kg Meth for 7 days and two times a day. The silver staining of Golgi apparatus was performed to investigate the number of neurons and the dendritic spines, and the pathological protein APP and p-tau were detected by western blot. **Results:** With the silver staining of Golgi apparatus, it showed that Meth significantly decreased the number of the neurons as well as the dendritic spines. With the Western blot assay, it suggested that Meth obviously up-regulated the pathological protein APP and p-tau expression in a dose- and time-dependent manner ($P < 0.05$). Intriguingly, pre-incubated with the neural cells with nifedipine, a blocker of the L-type Ca^{2+} channel, substantially attenuated Meth-mediated up-regulation of APP and p-tau. **Conclusion:** Meth exposure contributes Alzheimer's disease-like pathological changes, therefore, the present work will provide some supports for Meth-induced cognitive decline.

[Key words] methamphetamine; APP; p-tau; neural damage

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(12): 1548-1552]

2011 年中国禁毒报告显示, 全国登记在册的吸毒人员达 154.9 万, 新滋生吸毒人员 21.4 万, 其中大多低于 25 岁^[1], 而潜在吸毒人数甚至可能达到 1 000 万~1 200 万^[2]。相较于传统鸦片、海洛因等毒

品而言, 近几年来, 以甲基苯丙胺(methamphetamine, Meth, 俗称“冰毒”)为代表的新型毒品在包括我国在内的全世界范围内迅速蔓延, 2007 年联合国毒品与犯罪办公室的一项数据显示, 全世界范围内 Meth 的吸食人数约 1 500 万~1 600 万^[3], 而这一群体在 2013 年的一项统计中人数已达 5 200 万, 成为吸食人数仅次于大麻的毒品^[4]。研究显示, 大量吸食 Meth 可导致机体心、脑、肺、肝、肾等多器官的损伤, 其长期滥用还可导致严重的精神性疾病如抑郁、躁狂、自

[基金项目] 国家自然科学基金(81202230, 81673213); 江苏省自然科学基金(BK20151557); 江苏省科技厅重点病种规范化诊疗研究(BL2014088)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: cxfy@163.com

杀、暴力或具犯罪倾向,同时常伴随艾滋病及性病的传播^[3],对人类健康和社会危害极大,因此,Meth 滥用已成为社会日益严峻的公共卫生问题。神经系统是 Meth 作用的最主要靶组织,同时也因神经损伤凋亡的不可逆性,使得 Meth 的神经毒性一直是神经毒理领域的研究热点。需要注意的是,目前人们较多关注于 Meth 引起的神经急性毒性损伤,而对 Meth 引起的进行性神经病理改变仍不清楚。本研究以神经病理蛋白 β -淀粉样前体蛋白 (β -amyloid precursor protein, APP) 及 p-tau 为指标,观察 Meth 暴露后引起的神经退行性改变,为进一步阐明 Meth 神经毒性的产生机制和制定防治措施提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料

孕 18 d SPF 级 SD 大鼠,8~10 周龄 SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠均购于南京医科大学实验动物中心。动物饲养于人工环境中:恒湿 30%~50%,恒温 20~26 °C,明暗交替 12 h/12 h,自由饮水进食(实验动物使用许可证号:SCXK2016-0002,动物实验伦理证号:IACUC-1705017)。

Neurobasal medium、B27、L-谷氨酰胺、HBSS 缓冲液(Gibco 公司,美国),多聚赖氨酸、RIPA、cocktail、一抗 Anti- β -actin(Sigma Aldrich 公司,美国),一抗 Anti-APP、Anti-tau Phospho (pS199)、Anti-tau (Epitomics 公司,美国),二抗 HRP 标记的 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)、HRP Goat Anti-Mouse IgG (H+L)(Jacksonimmuno 公司,美国),PVDF 膜及 ECL 发光液(Millipore 公司,美国),高尔基染色 FD Rapid GolgiStain 试剂盒(FD Neurotechnologies 公司,美国),甲基苯丙胺来自中国食品药品检定研究院。

1.2 方法

1.2.1 原代神经元的培养

孕 18 d SD 大鼠,七氟烷麻醉后处死,取出胎鼠脑组织,置于 HBSS 缓冲液中,后经胰酶消化,血清中和后,分别过 100、40 μ m 的细胞网筛,离心,加入神经培养液重悬细胞,在包被多聚赖氨酸的培养皿中进行细胞接种,每 3 d 进行半量换液,8~12 d 可获得成熟神经元进行后续实验。

1.2.2 实验动物给药

为避免生理盐水对结果的影响,将 30 只 C57BL/6J 雄性小鼠随机分为对照组、生理盐水组、Meth 组,Meth 组腹腔注射给予 10 mg/kg 的剂量,1 d 2 次,连续 7 d,给药中间相隔 12 h。给药完成后,取

小鼠脑组织,进行后续实验。

1.2.3 高尔基染色

实验步骤按 FD Rapid GolgiStain Kit 提供的说明书操作,主要步骤如下:提前 1 d 混合 A 液和 B 液,取上清液;动物脱臼处死后,取皮层组织,生理盐水冲洗;将脑组织浸泡在 AB 混合液,避光,室温 14 d;去 AB 混合液,加 C 液浸泡,避光 3~7 d;取出脑组织-80 °C 存放;OCT 包埋组织,用冰冻切片机切 180 μ m 的海马切片,转移至多聚赖氨酸包被的载玻片上;将 D 液、E 液、双蒸水按 1:1:2 混合,孵育载玻片;清洗后,用 50%、75%、95%、100%酒精系列脱水二甲苯透明,封片,晾干后激光共聚焦显微镜观察、拍片。

1.2.4 蛋白免疫印迹

蛋白免疫印迹主要参考实验室方法^[5],细胞相应处理后,加适量含 0.2% cocktail 的蛋白裂解液(RIPA),收集裂解液,提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白质浓度后,每个泳道加入 40 μ g 蛋白,进行电泳,将蛋白转至 PVDF 膜,用 5%脱脂奶粉进行封闭,一抗 4 °C 过夜孵育,二抗常温孵育 1 h,清洗后将 ECL 发光液 A 液和 B 液混合(1:1),均匀覆于膜后,置于 Bio-Rad 凝胶成像系统成像。

1.3 统计学方法

数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,利用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,Graphpad Prism 5 软件进行作图。多组定量资料比较采用单因素方差分析检验,多组间两两比较选用 LSD-*t* 检验或 Dunnett *t*3 检验, $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

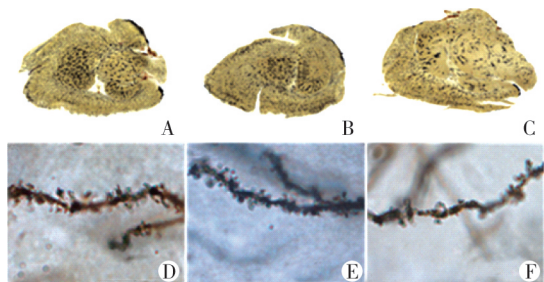
2 结果

2.1 Meth 对神经元及棘突数量的影响

通过高尔基染色法发现,对照组、生理盐水组动物神经元、树突、树突棘生长良好,未见异常(图 1A、B、D、E),顶端树突长度 (252.46 ± 21.84) μ m 和 (271.34 ± 19.23) μ m,树突棘密度分别为 (1.41 ± 0.54) 个/ μ m² 和 (1.53 ± 0.67) 个/ μ m²(表 1)。与对照组相比,Meth 组小鼠皮层神经元缺失、神经元密度减少(图 1C),树突长度 (186.98 ± 15.25) μ m,树突棘密度 (0.82 ± 0.13) 个/ μ m²,差异具有统计学意义 ($P< 0.001$),提示 Meth 可引起神经元丢失,树突棘减少,进而可能影响神经元突触可塑性。

2.2 Meth 对神经病理蛋白 APP 表达的影响

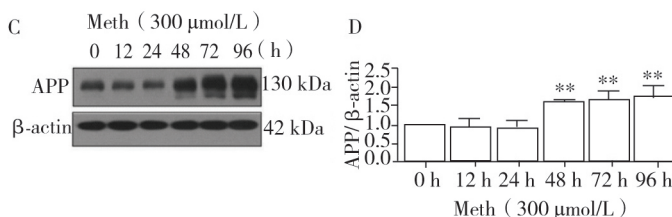
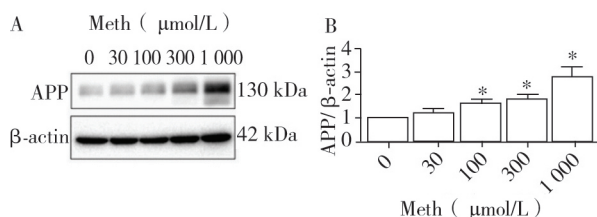
不同浓度的 Meth(0、100、300、1 000 μ mol/L)与原代神经元共孵,结果显示,Meth 可增加神经元 APP 的表达(图 2A、B, $P< 0.05$)。其中,100 μ mol/L 浓



A、D: 对照组; B、E: 生理盐水组; C、F: Meth 组。A~C: 高尔基染色后矢状位大脑切片; D~F: 高尔基染色后神经元树突棘。

图 1 Meth 对小鼠大脑神经元树突的影响
Figure 1 Influence of Meth on dendritic spines

度以上的 Meth 即可引起 APP 表达显著增多, 最大



A、B: 不同浓度的 Meth 对神经元 APP 蛋白表达的影响; C、D: 300 μmol/L 的 Meth 不同时间暴露对神经元 APP 表达的影响(与对照组相比, $P < 0.05$, $P < 0.01$; $n = 3$)。

图 2 Meth 对神经病理性蛋白 APP 的影响
Figure 2 Effects of Meth on APP protein expression

2.3 Meth 对神经病理性蛋白 p-tau 的影响

将原代培养的神经元与不同浓度(0、100、300、1 000 μmol/L)的 Meth 孵育, 结果显示, Meth 暴露可显著增加神经元总 tau 和 p-tau 的表达(图 3A~C, $P < 0.05$)。同时, 观察 Meth 作用不同时间后总 tau 及 p-tau 蛋白的表达, 结果显示, Meth 作用 48 h 后, p-tau 及总 tau 表达显著增高, 具有统计学差异(图 3D~F, $P < 0.05$)。

2.4 硝苯地平抑制 Meth 诱导的 APP 及 p-tau 高表达

钙离子稳态的改变与 APP 及 p-tau 的表达相关, 前期实验结果显示, Meth 可破坏钙离子的稳态, 导致细胞内浓度增高。L 型钙通道在神经元细胞中高度表达, 因此观察了 L 型钙通道硝苯地平对 Meth 引起 APP 及 p-tau 表达中的作用。

将神经元与 5 μmol/L 硝苯地平预孵 0.5 h, 经 Meth 处理 48 h, 观察神经病理性蛋白 APP 及 p-tau 的表达。Meth 能显著上调 APP 的表达, 而硝苯地平处理后, Meth 引起 APP 上调能力下降, 差异具有统计学意义($P < 0.05$, 图 4)。Meth 处理神经元后, p-tau 水平显著升高, 而硝苯地平作用后, p-tau 水平有所下降, 提示钙稳态的破坏在 Meth 引起的病理性蛋

表 1 皮层神经元顶树突长度和密度

Table 1 Length and density of apical dendrites ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

分组	长度 (μm)	密度 (个/μm ²)
对照组	252.46±21.84	1.41±0.54
生理盐水组	271.34±19.23	1.53±0.67
Meth 组	186.98±15.25***	0.82±0.13***

与生理盐水组比较, *** $P < 0.001$ 。

作用剂量 1 000 μmol/L Meth 引起 APP 表达的增高最为明显。此外, 选择 300 μmol/L Meth 观察 Meth 作用的时间特点, 结果显示: 神经元在 300 μmol/L Meth 作用后, APP 的表达水平在 48 h 后随作用时间的延长而明显上调(图 2 C、D), 具有显著性差异($P < 0.01$)。

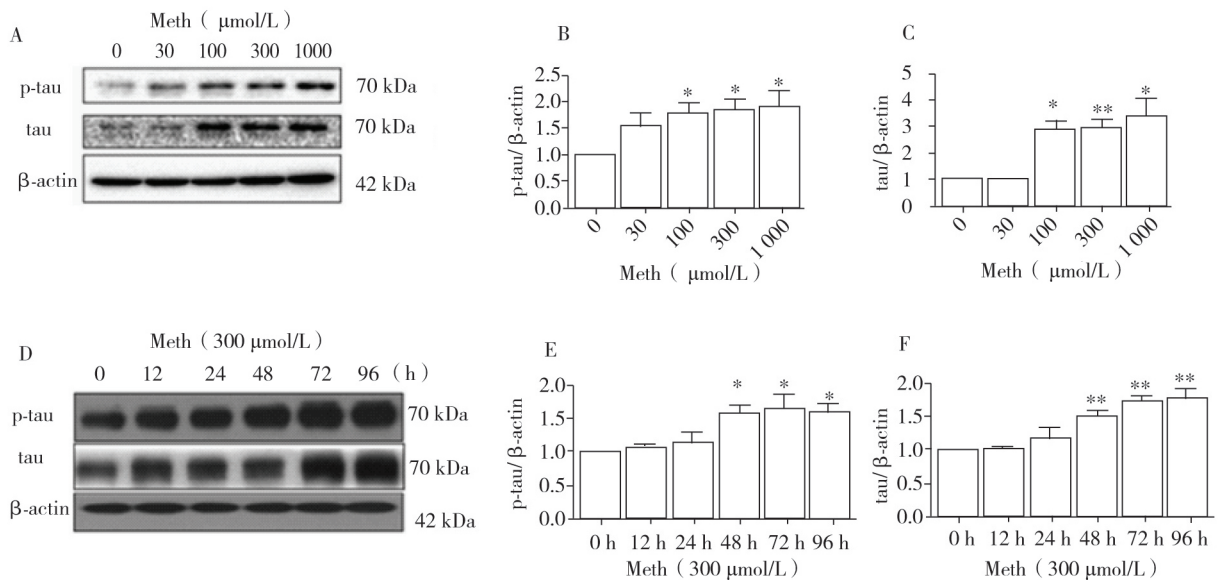
白改变的过程中可能起重要作用(图 5)。

3 讨论

神经心理学研究显示, Meth 吸食者在注意力、决策能力及工作记忆等方面存在明显缺陷^[6]。利用核磁共振(MRI)及 PET/CT 等影像学手段, 有学者发现 Meth 吸食者脑皮质体积明显减小。不仅如此, Meth 戒断后, 患者前额叶脑皮质及海马等学习记忆区与对照组比较, 体积显著缩小^[7], 以上影像学资料提示 Meth 吸食可能会影响其认知功能。与该现象相符的是, 通过高尔基银染我们发现 Meth 不仅可引起神经元数量的减少, 且树突长度、棘突数量明显减少, 提示神经元作为 Meth 的靶细胞, 在 Meth 引起认知损伤的过程中起重要作用。

Meth 引起神经元的损伤机制比较复杂, 主要涉及氧化应激损伤、兴奋性毒性及炎症反应等^[8-9], 而本研究发现 Meth 暴露可导致神经元退行病理性蛋白 APP 及 p-tau 高表达, 这为 Meth 滥用所导致的认知功能下降提供了部分解释。

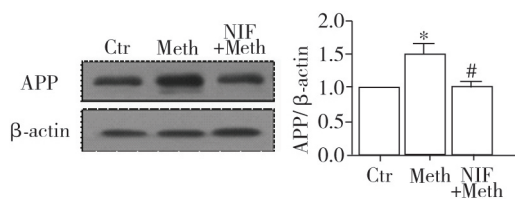
APP 作为 β-淀粉样蛋白 Aβ 的前体蛋白, 其产生是神经元损伤的重要前期特征。研究显示, APP 生



A、B、C: 不同浓度的 Meth 对神经元磷酸化 tau 及总 tau 蛋白表达的影响; D、E、F: 300 μmol/L Meth 暴露不同时间对神经元磷酸化 tau 及总 tau 蛋白表达的影响(与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; $n \geq 3$)。

图 3 Meth 对神经元 tau 蛋白表达的影响

Figure 3 Effects of Meth on tau protein expression

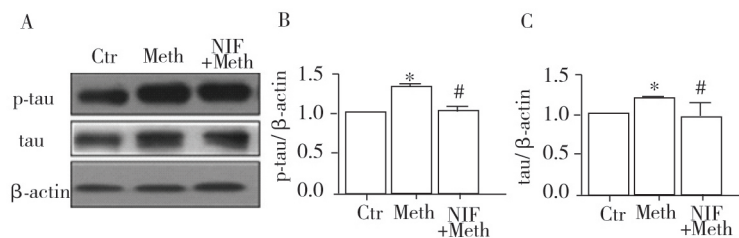


与对照组相比, * $P < 0.05$; 与 Meth 单独处理组相比, ** $P < 0.05$; $n = 3$ 。

图 4 硝苯地平抑制 Meth 诱导的 APP 高表达

Figure 4 The inhibitory effects of nifedipine on Meth-induced APP expression

Meth 长期吸食者学习记忆及认知能力下降这一现象提供了部分参考。L-型钙通道在神经元中大量表达, 在调节神经信号、递质分泌等过程中发挥重要作用。前期, 本课题组报道 Meth 作用神经元后, 细胞钙离子稳态失调, 胞内钙浓度显著升高, 钙调蛋白、钙调蛋白激酶磷酸化程度显著上调^[12], 有意思的是, 硝苯地平几乎完全阻断 Meth 引起钙浓度的升高, 提示 L-型钙通道在 Meth 引起钙稳态破坏中的作用。在本实验中, 发现预先给予硝苯地平后, Meth 引起的



A: Western blot 实验检测硝苯地平对 Meth 诱导 p-tau 表达; B、C: tau 蛋白表达灰度值标准化分析(与对照组相比, * $P < 0.05$; 与 Meth 单独处理组相比, ** $P < 0.05$; $n = 3$)。

图 5 硝苯地平抑制 Meth 诱导的 p-tau 高表达

Figure 5 The inhibitory effects of nifedipine on Meth-induced p-tau expression

成越多, 经水解反应产生的 $A\beta$ 就越多, 对神经毒性损伤越大^[10]。而作为另一神经退行性病标志蛋白 p-tau, 其高度磷酸化与脑神经元内出现神经原纤维缠结密切相关^[11]。该实验结果发现, Meth 暴露不仅可剂量依赖性地上调 APP 的表达, 同时亦可激活 tau 蛋白, 导致其磷酸化程度显著升高, 这为阐述

APP 及 p-tau 上调被部分抑制, 这与本课题组前期的报道硝苯地平可部分抑制 Meth 引起神经元凋亡蛋白 cleaved-caspase 3 的结果一致。同时也与 Het-tiarachchi 等^[13]发现硝苯地平处理神经元细胞系后, 钙调蛋白激酶磷酸化程度下降, $A\beta$ 分泌显著降低的现象一致, 提示 Meth 可能部分通过 L-型钙通道扰

乱钙稳态,继而引起 APP、p-tau 升高。

需要指出的是,本文尚有不足之处,尽管 L-型钙通道参与了病理性蛋白 APP 及 p-tau 的产生,但中间激活或产生的环节仍不清楚,且该研究仅局限于现象的观察,其机制探讨仍需深入,因而对 Meth 激活钙通道后与 APP、p-tau 上调的关键蛋白的研究可将钙离子稳态失调与病理性蛋白生成相关联,具有重要的探讨价值。

[参考文献]

[1] 中国国家禁毒委员会办公室. 2011 中国禁毒报告[R]. 北京:中国国家禁毒委员会办公室, 2011

[2] Khan U, van Nuijs AL, Li J, et al. Application of a sewage-based approach to assess the use of ten illicit drugs in four Chinese megacities [J]. *Sci Total Environ*, 2014, 487:710-721

[3] Krasnova IN, Cadet JL. Methamphetamine toxicity and messengers of death [J]. *Brain Res Rev*, 2009,60(2): 379-407

[4] Rawson RA. Current research on the epidemiology, medical and psychiatric effects, and treatment of methamphetamine use [J]. *J Food Drug Anal*, 2013,21(4):S77-S81

[5] 刘艳青,宋 词,王 军. PFOS 对 BV-2 细胞的炎性损伤及机制研究 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2017, 37(6):681-685

[6] Zhong N, Jiang H, Du J, et al. The cognitive impairments and psychological wellbeing of methamphetamine depen-

dent patients compared with health controls. [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2016,69(1):31-37

[7] London ED, Kohno M, Morales AM, et al. Chronic methamphetamine abuse and corticostriatal deficits revealed by neuroimaging [J]. *Brain Res*, 2015, 1628(Pt A):174-185

[8] Jumnonprakhon P, Govitrapong P, Tocharus C, et al. Inhibitory effect of melatonin on cerebral endothelial cells dysfunction induced by methamphetamine via NADPH oxidase-2 [J]. *Brain Res*, 2016,1650(1):84-92

[9] Frank MG, Adhikary S, Sobesky JL, et al. The danger-associated molecular pattern HMGB1 mediates the neuroinflammatory effects of methamphetamine[J]. *Brain Behav Immun*, 2016, 51(1):99-108

[10] Nixon RA. Amyloid precursor protein and endosomal-lysosomal dysfunction in Alzheimer’s disease: inseparable partners in a multifactorial disease [J]. *FASEB J*, 2017,31(7):2729-2743

[11] Zetterberg H. Review: Tau in biofluids-relation to pathology, imaging and clinical features [J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2017,43(3):194-199

[12] Chen X, Xing J, Jiang L, et al. Involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in methamphetamine-induced neural damage [J]. *J Appl Toxicol*, 2016, 36 (11): 1460-1467

[13] Hettiarachchi N, Dallas M, Al-Owais M, et al. Heme oxygenase-1 protects against Alzheimer’s amyloid-β(1-42)-induced toxicity via carbon monoxide production [J]. *Cell Death Dis*, 2014,5:e1569

[收稿日期] 2017-06-03

科技出版物中阿拉伯数字的书写规则

1. 为使多位数字便于阅读,可将数字分成组,从小数点起,向左或向右每 3 位分成 1 组,组间留空隙(约为一个汉字的 1/4),不得用逗号、圆点或其他方式。
2. 纯小数必须写出小数点前用以定位的“0”。
3. 阿拉伯数字不得与除万、亿及法定计量单位词头外的汉字数字连用。如 453 000 000 可写成 45 300 万或 4.53 亿或 4 亿 5 300 万,但不能写成 4 亿 5 千 3 百万;三千元写成 3 000 元或 0.3 万元,但不能写成 3 千元。
4. 一个用阿拉伯数字书写的数值,包括小数与百分数,不能拆开转行。
5. 表示用阿拉伯数字书写的数值范围,使用波浪号“~”。如 10%~20%, (2~6)×10³ 或 2×10³~6×10³, 30~40 km。