

· 基础研究 ·

甲基苯丙胺通过 L 型钙通道致皮层神经元病理性蛋白 APP 及 p-Tau 过表达

胡 歆^{1,2}, 吕梦倩³, 王 宇⁴, 蒋 雷⁵, 王 军³, 夏峥嵘⁶, 夏 雷^{1*}

¹江苏省肿瘤医院, 江苏省肿瘤防治研究所, 南京医科大学附属肿瘤医院病理科, 江苏 南京 210000; ²南京医科大学第一临床医学院, ³公共卫生学院, ⁴转化医学研究院, 江苏 南京 211166; ⁵南京医科大学第一附属医院急诊科, 江苏 南京 210029; ⁶南京医科大学基础医学院, 江苏 南京 211166

[摘 要] 目的:探讨甲基苯丙胺(methamphetamine, METH)暴露引起的阿尔兹海默病(Alzheimer's disease, AD)样改变,阐述 L 型钙通道在该病理样改变中的作用。方法:借助原代培养的神经元,利用 Western blot 法,观察 METH(0、30、100、300、1 000 $\mu\text{mol/L}$)暴露后引起 AD 样病理性蛋白淀粉样蛋白前体(amyloid precursor protein, APP)、磷酸化 Tau 蛋白(p-Tau)的表达,并观察钙通道抑制剂硝苯地平作用后 APP、p-Tau 表达的改变。结果:APP 和 p-Tau 的表达随 METH 作用浓度和时间的增加而增高,具有剂量和时间依赖性。钙通道抑制剂硝苯地平(nifedipine, NIF)预先孵育后, METH 引起的 AD 样改变明显改善。结论: METH 暴露可引起 AD 病理性改变, L 型钙通道抑制剂可部分逆转上述改变,因而 L 型钙通道可能作为对 METH 作用的干预靶点,具有潜在的干预价值。

[关键词] METH; APP; p-Tau; 硝苯地平; AD 样改变

[中图分类号] R749.16

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)04-491-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20190405

Involvement of the L-type Ca^{2+} channel in methamphetamine-induced APP and p-Tau upregulation

Hu Xin^{1,2}, Lü Mengqian³, Wang Yu⁴, Jiang Lei⁵, Wang Jun³, Xia Zhengrong⁶, Xia Lei^{1*}

¹Department of Pathology, Jiangsu Cancer Hospital & Jiangsu Institute of Cancer Research & Affiliated Cancer Hospital of NMU, Nanjing 210000; ²the First School of Clinical Medicine, ³School of Public Health, ⁴Institute of Translational Medicine, NMU, Nanjing 211166; ⁵Emergency Department, the First Affiliated Hospital of NMU, Nanjing 210029; ⁶School of Basic Medical Sciences, NMU, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the Alzheimer disease (AD)-like changes caused by methamphetamine (METH) exposure, and to elucidate the role of L-type calcium channels in this pathological change. **Methods:** After primary cultured neurons were exposed to METH (0, 30, 100, 300, and 1 000 $\mu\text{mol/L}$), Western blotting assay was performed to investigate the expression of AD-like pathological protein amyloid precursor protein (APP) and p-Tau with or without the treatment of nifedipine. **Results:** After METH treatment, APP and p-Tau increased in a dose-dependent manner. Meanwhile, with a certain concentration of METH cultured with the neurons, the level of APP and p-Tau was increased in a time-dependent manner. After pre-incubation with the calcium channel inhibitor nifedipine (NIF), the METH-induced AD-like changes were significantly improved. **Conclusion:** METH exposure can cause AD pathological protein changes and L-type calcium channel inhibitor can partially reverse the adverse changes, therefore, L-type calcium channel may be a potential intervention target for METH with the potential intervention value.

[Key words] METH; APP; p-Tau; nifedipine; Alzheimer-like changes

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(04):491-494, 519]

[基金项目] 国家自然科学基金(81701872, 81673213); 江苏省自然科学基金(BK20151557)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: yzdxl10660839@163.com

阿尔兹海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种慢性伴随人记忆力丧失的神经退行性疾病。目前 β -淀粉样蛋白(amyloid β , A β)的过度积累和Tau蛋白的异常磷酸化是导致该病发生的两大主要学说^[1]。AD的发生与多种有害环境和不良生活习惯密切相关。例如,甲基苯丙胺(methamphetamine, METH, 俗称冰毒)的滥用。METH可特异作用于纹状体,导致帕金森样改变^[2],但METH是否引起AD样改变,目前鲜有报道。研究显示,经L型电压门控钙通道(L-type voltage dependent calcium channel, L-VDCC)流入的Ca²⁺可引起胞内钙超载,不仅导致A β 蛋白前体(amyloid precursor protein, APP)表达上调,A β 生成增多^[3-4],还可造成Tau蛋白的过度磷酸化^[5],聚集形成神经纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFTs),这说明Ca²⁺与METH的神经毒性关联紧密。因而,本研究拟用L-VDCC抑制剂硝苯地平,观察钙通道在METH引起AD样改变中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

孕18 d SPF级SD大鼠购于南京医科大学实验动物中心。动物饲养于人工环境中:湿度30%~50%,温度20~26℃,明暗交替12 h/12 h,自由饮水进食(实验动物使用许可证号:SYXK2015-0015,动物实验伦理证号:IACUC-1705017)。

Neurobasal medium、B27购自美国Gibco公司,RIPA蛋白裂解液、硝苯地平、cocktail蛋白酶抑制剂、 β -actin抗体购自美国Sigma Aldrich公司,BCA蛋白定量试剂盒购自美国Thermo Scientific公司,甲基苯丙胺来自中国食品药品检定研究院,一抗:APP抗体、p-Tau抗体、Tau抗体来自美国Abcam公司。二抗:HRP标记的Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)及HRP Goat Anti-Mouse IgG(H+L)(Jackson Immuno公司,美国),PVDF膜及ECL发光液(Millipore公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 原代神经元培养

孕18 d SD大鼠,七氟烷麻醉后断头处死,取胎鼠,分离左右大脑半球皮质,置于HBSS缓冲液,经蛋白酶胰酶消化后,分别经100 μ m及40 μ m细胞网筛过滤,离心,加神经元培养液,按以 2×10^6 个/mL的细胞密度接种,每3 d进行半量换液,第8~10天获得成熟神经元,进行相应实验。

1.2.2 蛋白免疫印迹

神经元细胞经相应处理后,经蛋白裂解液裂

解,提取细胞总蛋白,采用BCA法测定蛋白质浓度,并进行蛋白电泳。每个泳道加入30 μ g蛋白,电泳后将蛋白转至PVDF膜,用5%脱脂奶粉进行封闭,一抗4℃过夜孵育,二抗常温孵育2 h,反复清洗后,将ECL发光液A液和B液混合(1:1),均匀覆于膜上,置于凝胶成像系统成像进行曝光。所有蛋白免疫印迹结果至少细胞建模3次,每批样本重复3次。

1.3 统计学方法

所有数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,利用SPSS17.0软件进行统计学分析,Graphpad Prism5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检验或Dunnett T3检验, $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 METH诱导APP高表达及L型钙通道在其中的作用

不同浓度的METH(0、30、100、300、1 000 μ mol/L)与神经元共孵48 h,利用Western blot法检测AD病理蛋白A β 前体大分子蛋白APP的蛋白表达。结果显示,100 μ mol/L及以上浓度的METH作用神经元后,APP表达显著增高,且随着METH剂量增高,APP蛋白表达上调,差异具有统计学意义(图1A, $P < 0.05$)。为观察METH作用神经元后APP表达的时间性特征,将300 μ mol/L METH与神经元孵育不同时间点(0、12、24、48、72、96 h),结果显示,METH处理48 h后,APP在神经元中的表达显著升高,且该效应随时间延长而增强,在该实验设置的几个观察时间点中,96 h时APP的表达最高(图1B)。上述实验证明METH上调APP的表达具有特异性。

此外,利用L型钙通道特异性抑制剂硝苯地平(NIF, 5 μ mol/L)预孵神经元0.5 h后,发现METH作用48 h后引起APP的上调被明显抑制(图1C),提示L型钙通道参与METH对APP的调节作用。

2.2 METH诱导p-Tau高表达及L型钙通道在其中的作用

高度磷酸化的Tau蛋白(p-Tau)聚集是AD样改变的另一重要特征。我们的研究发现,100、300、1 000 μ mol/L METH可显著增加神经元p-Tau的磷酸化程度(图2A, $P < 0.05$)。而在低浓度30 μ mol/L METH作用后,p-Tau的磷酸化同样表现为上调趋势,尽管未显示出统计学差异。METH作用引起的p-Tau的表达随剂量增高而表达增高。同时,p-Tau磷酸化的改变随时间延长而上调,表现为:300 μ mol/L

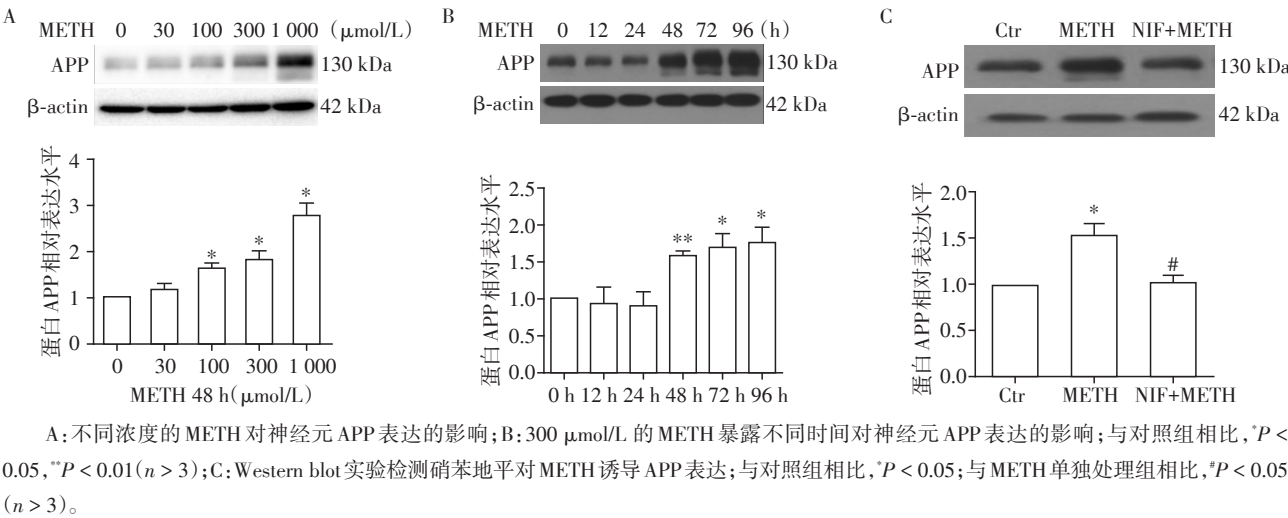


图1 硝苯地平抑制METH诱导APP高表达

Figure 1 METH-induced high expression of APP was inhibit by nifedipine treatment

的 METH 作用于神经元细胞不同时间点 (0、12、24、48、72、96 h) 后, p-Tau 表达从 48 h 及以后明显增加, 类似地, Tau 蛋白表达亦表现为类似的结果, 具有显著性差异 (图 2B, $P < 0.05$)。

L 型钙通道抑制剂硝苯地平 5 $\mu\text{mol/L}$ 处理细胞 0.5 h, 再将其与 300 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 METH 共孵

48 h 后, 与 METH 处理组比较, 神经元中 p-Tau 的表达显著降低 ($P < 0.05$, 图 2C)。

3 讨论

目前, 关于 AD 的发病理论主要涉及由 APP 大量切割产生 $A\beta$ 堆积形成的 β 淀粉样沉淀及由 p-Tau

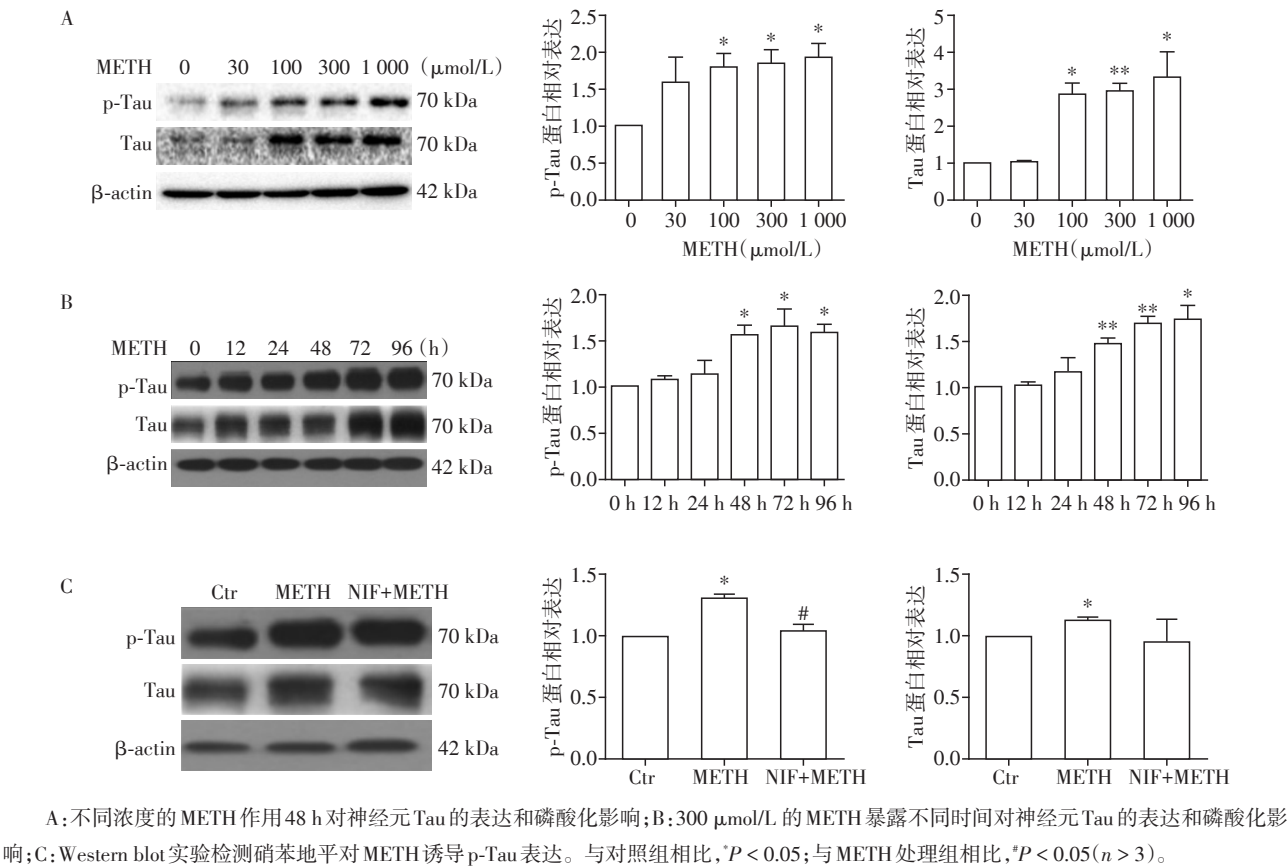


图2 硝苯地平抑制METH诱导Tau表达

Figure 2 METH-induced Tau expression was decreased by nifedipine treatment

高度磷酸化引起NFTs导致的神经病理性改变^[6]。有研究显示,细胞内 Ca^{2+} 稳态异常可使 $\text{A}\beta$ 生成增加^[7],引发AD样病变。同时神经元细胞内的 Ca^{2+} 超载被认为参与了NFTs的形成^[8],且相关研究证明高浓度的胞浆 Ca^{2+} 会促进Tau的过度磷酸化^[9],形成NFTs,破坏神经元调控与神经递质运输过程。但钙稳态失调是否参与了METH引起的神经损伤尤其关于AD病理性蛋白APP和p-Tau的调节仍不明确。我们既往研究显示,METH可引起神经元细胞内钙浓度的增高,导致细胞内部钙稳态的紊乱,继而引起神经元的凋亡。而在此过程中,利用L型钙通道抑制剂硝苯地平可有效降低METH引起的神经元损伤^[10]。基于上述研究,我们发现,METH暴露后同样引起了AD样病理性改变,表现为 $\text{A}\beta$ 前体病理性蛋白APP表达上调,p-Tau磷酸化显著增高。但在该过程中,L型钙通道是否参与METH引起的病理性蛋白高表达仍然未知。

Ca^{2+} 是机体各项生理活动不可或缺的物质,它作为细胞信号转导中一种重要的第二信使,参与维持细胞膜两侧生理电位、调节神经-肌肉传导功能、控制神经突触间信号转导过程等^[11-12]。细胞外 Ca^{2+} 进入胞内主要通过L-VDCC,它是电压依赖型钙通道中最重要的一种亚型,又称二氢吡啶类药敏感型钙通道,其广泛分布于树突、神经元胞体和突触后膜,参与钙信号的调节^[13]。最近的研究表明,L-VDCC介导的细胞内钙稳态失衡与AD、帕金森病、老年痴呆等神经退行性病变密切相关^[14]。Chan等^[15]的研究表明,L型钙通道阻滞剂可以有效降低细胞内多巴胺含量,从而减轻神经元损伤。

Gant^[16]所在课题组将治疗性药物FK506结合蛋白FKBP1b高表达于小鼠海马神经元后,可部分逆转因年老因素导致的钙稳态异常和认知能力下降。而最近的一项研究中,Zhang等^[17]利用共培养手段,发现齐墩果酸能有效降低 $\text{A}\beta$ 诱导的神经炎症因子的释放,继而降低神经元中L型钙通道引起的钙离子内流,起到防治AD样病变的作用,值得一提的是,L型钙通道激动剂可破坏齐墩果酸的神经保护作用,提示L型钙通道在引起AD样改变中发挥重要作用。该研究与我们的研究结果类似,即METH引起的AD病理性蛋白APP及p-Tau的上调与L型钙通道引起的外钙内流相关,表现为硝苯地平作用后,METH引起的APP及p-Tau的高表达现象显著被抑制,提示钙稳态破坏可作为METH引起神经毒性的一个潜在干预方向,而L型钙通道可为METH的

干预提供潜在靶点,具有较为重要的应用意义。另外,在该研究中仍存在较多需改善之处,该研究的观察终点是APP及p-Tau的上调,其导致的病理学效应仍需在动物行为学中进一步验证,而METH如何引起APP及p-Tau上调,钙离子作为第二信使如何发挥对APP及p-Tau的调节作用,其机制仍未阐述。后续我们将围绕上述问题,进一步阐述METH引起AD样病理性改变的机制。

[参考文献]

- [1] Frozza RL, Lourenco MV, De Felice FG, et al. Challenges for Alzheimer's disease therapy: insights from novel mechanisms beyond memory defects[J]. *Front Neurosci*, 2018, 12:37
- [2] 黄汉昌,姜瑞瑞,林婧,等.阿尔茨海默病发生机制及其治疗药物研究进展[J]. *中国老年学杂志*, 2011, 31(15):2993-2997
- [3] Pierrot N, Ghisdal P, Caumont AS, et al. Intraneuronal amyloid-beta1-42 production triggered by sustained increase of cytosolic calcium concentration induces neuronal death[J]. *J Neurochem*, 2004, 88(5):1140-1150
- [4] Itkin A, Dupres V, Dufrêne YF, et al. Calcium ions promote formation of amyloid β -peptide (1-40) oligomers causally implicated in neuronal toxicity of Alzheimer's disease[J]. *PLoS One*, 2011, 6(3):e18250
- [5] Anekonda TS, Quinn JF. Calcium channel blocking as a therapeutic strategy for Alzheimer's disease: the case for isradipine[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1812(12):1584-1590
- [6] 金佳利,刘学源. Sigma-1受体与阿尔茨海默病关系的研究进展[J]. *同济大学学报(医学版)*, 2015, 36(5):129-132
- [7] Bezprozvanny I, Mattson MP. Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. *Trends Neurosci*, 2008, 31(9):454-463
- [8] 陈国华,梅瑰,邱昕,等.黄连解毒汤对APP/PSI双转基因AD小鼠脑组织IL-6、IL-1 β 水平及SP、NFTs数量的干预作用[J]. *中华神经免疫学和神经病学杂志*, 2011, 18(5):352-356
- [9] Zempel H, Thies E, Mandelkow E, et al. Abeta oligomers cause localized Ca^{2+} elevation, missorting of endogenous Tau into dendrites, Tau phosphorylation, and destruction of microtubules and spines[J]. *J Neurosci*, 2010, 30(36):11938-11950
- [10] 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,

(下转第519页)

- role of let-7 d in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Am J Resp Crit Care*,2010,182(2):220-229
- [18] Urushiyama H, Terasaki Y, Nagasaka S, et al. Role of $\alpha 1$ and $\alpha 2$ chains of type IV collagen in early fibrotic lesions of idiopathic interstitial pneumonias and migration of lung fibroblasts[J]. *Lab Invest*,2015,95(8):872-885
- [19] Zhu C, Kim K, Wang X, et al. Hepatocyte Notch activation induces liver fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Sci Transl Med*,2018,10(468):eaat0344
- [20] Zhang K, Han X, Zhang Z, et al. The liver-enriched lnc-LFAR1 promotes liver fibrosis by activating TGF β and Notch pathways[J]. *Nat commun*,2017,8(1):144
- [21] Cao Z, Lis R, Ginsberg M, et al. Targeting of the pulmonary capillary vascular niche promotes lung alveolar repair and ameliorates fibrosis[J]. *Nat Med*,2016,22(2):154-162
- [22] Chen X, Li WX, Chen Y, et al. Suppression of SUN2 by DNA methylation is associated with HSCs activation and hepatic fibrosis[J]. *Cell Death Dis*,2018,9(10):1021
- [23] Page A, Paoli P, Moran Salvador E, et al. Hepatic stellate cell transdifferentiation involves genome-wide remodeling of the DNA methylation landscape[J]. *J Hepatol*,2016,64(3):661-673
- [24] Li M, Hong W, Hao C, et al. SIRT1 antagonizes liver fibrosis by blocking hepatic stellate cell activation in mice[J]. *FASEB J*,2018,32(1):500-511
- [25] Zheng H, You Y, Hua M, et al. Chlorophyllin modulates gut microbiota and inhibits intestinal inflammation to ameliorate hepatic fibrosis in mice[J]. *Front Physiol*,2018,9:1671
- [26] Hu YB, Ye XT, Zhou QQ. Sestrin 2 attenuates rat hepatic stellate cell (HSC) activation and liver fibrosis via an mTOR/AMPK - dependent mechanism[J]. *Cell Physiol Biochem*,2018,51(5):2111-2122
- [27] Huang Q, Wei J, Wei L, et al. Role of RKIP in human hepatic stellate cell proliferation, invasion, and metastasis[J]. *J Cell Biochem*,2018,120(4):6168-6177
- [28] Li Z, Wang J, Zeng Q, et al. Long noncoding RNA HOTTIP promotes mouse hepatic stellate cell activation via downregulating miR - 148a[J]. *Cell Physiol Biochem*,2018,51(6):2814-2828
- [29] Zheng J, Mao Y, Dong P, et al. Long noncoding RNA HOTTIP mediates SRF expression through sponging miR - 150 in hepatic stellate cells[J]. *J Cell Mol Med*,2019,23(2):1572-1580
- [30] Zhu L, Ren T, Zhu Z, et al. Thymosin- $\beta 4$ mediates hepatic stellate cell activation by interfering with circRNA - 0067835/miR - 155/FoxO3 signaling pathway[J]. *Cell Physiol Biochem*,2018,51(3):1389-1398
- [收稿日期] 2018-10-16

(上接第494页)

- 36(11):1460-1467
- [11] Chang DC, Meng C. A localized elevation of cytosolic free calcium is associated with cytokinesis in the zebrafish embryo[J]. *J Cell Biol*,1995,131(6 Pt 1):1539-1545
- [12] Xu N, Luo KQ, Chang DC. Ca²⁺ signal blockers can inhibit M/A transition in mammalian cells by interfering with the spindle checkpoint[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2003,306(3):737-745
- [13] 冯珊娜,王远航,蔡文锋,等. 硝苯地平调控 JunB 表达拮抗敲除 L-型电压依赖型钙通道 H9c2 细胞缺氧/复氧损伤的研究[J]. 汕头大学医学院学报,2018,31(2):69-71
- [14] Wojda U, Salinska E, Kuznicki J. Calcium ions in neuronal degeneration[J]. *IUBMB Life*,2008,60(9):575-590
- [15] Chan CS, Guzman JN, Ilijic E, et al. 'Rejuvenation' protects neurons in mouse models of Parkinson's disease[J]. *Nature*,2007,447(7148):1081-1086
- [16] Gant JC, Chen KC, Kadish I, et al. Reversal of aging-related neuronal Ca²⁺ dysregulation and cognitive impairment by delivery of a transgene encoding FK506-binding protein 12.6/1b to the hippocampus[J]. *J Neurosci*,2015,35(30):10878-10887
- [17] Zhang L, Xia R, Jia J, et al. Oleanolic acid protects against cognitive decline and neuroinflammation-mediated neurotoxicity by blocking secretory phospholipase A2 IIA-activated calcium signals[J]. *Mol Immunol*,2018,99:95-103
- [收稿日期] 2018-09-28