

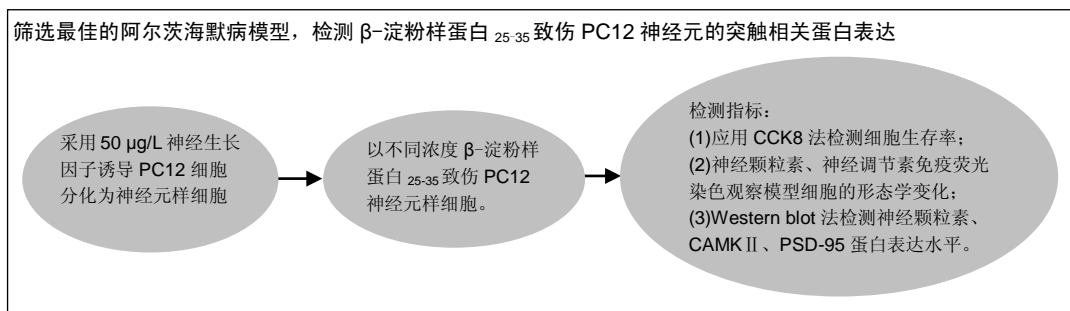
β -淀粉样蛋白₂₅₋₃₅致伤对PC12神经元突触相关蛋白表达的影响

张爽¹, 黄昕艳², 刘爽³, 李艳君³, 赵锦程³ (佳木斯大学, ¹药学院, ³基础医学院, 黑龙江省佳木斯市 154007; ²佳木斯大学附属第二医院, 黑龙江省佳木斯市 154007)

引用本文: 张爽, 黄昕艳, 刘爽, 李艳君, 赵锦程. β -淀粉样蛋白₂₅₋₃₅致伤对PC12神经元突触相关蛋白表达的影响[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(2):224-229.

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2016.02.013 ORCID: 0000-0002-7563-0184(赵锦程)

文章快速阅读:



张爽, 女, 1989 年生, 汉族, 在读硕士, 主要从事神经退行性变机制研究。

通讯作者: 赵锦程, 教授, 佳木斯大学基础医学院, 黑龙江省佳木斯市 154007

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:2095-4344
(2016)02-00224-06
稿件接受: 2015-11-30
<http://www.crter.org>

文题释义:

β 淀粉样蛋白: 是由淀粉样前体蛋白经 β -和 γ -分泌酶的蛋白水解作用而产生的含有 39-43 个氨基酸的多肽。它可由多种细胞产生, 循环于血液、脑脊液和脑间质液中, 大多与伴侣蛋白分子结合, 少数以游离状态存在。人体内 β 淀粉样蛋白最常见的亚型是 β 淀粉样蛋白₁₋₄₀ 和 β 淀粉样蛋白₁₋₄₂。在人脑脊液和血中, β 淀粉样蛋白₁₋₄₀ 分别比 β 淀粉样蛋白₁₋₄₂ 的含量水平高 10 倍和 1.5 倍, β 淀粉样蛋白₁₋₄₂ 具有更强的毒性, 且更容易聚集, 从而形成 β 淀粉样蛋白沉淀的核心, 引发神经毒性作用。

突触: 是一个神经元的冲动传到另一个神经元或传到另一细胞间的相互接触的结构。突触是神经元之间在功能上发生联系的关键部位, 也是信息传递的关键部位。在光学显微镜下观察, 可以看到一个神经元的轴突末梢经过多次分支, 最后每一小支的末端膨大呈杯状或球状, 叫做突触小体。这些突触小体可以与多个神经元的细胞体或树突相接触, 形成突触。从电子显微镜下观察, 可以看到, 这种突触是由突触前膜、突触间隙和突触后膜 3 部分构成。

摘要

背景: 脑内 β -淀粉样蛋白的聚集可诱导神经细胞凋亡, 大量神经元及突触的缺失和功能的损害尚无有效的干预手段, 提高突触可塑性为治疗早期阿尔茨海默病提供重要方向。

目的: 筛选最佳的阿尔茨海默病模型, 检测 β -淀粉样蛋白₂₅₋₃₅致伤 PC12 神经元的突触相关蛋白表达。

方法: 采用 50 μ g/L 神经生长因子诱导 PC12 细胞分化为神经元样细胞, 以不同浓度 β -淀粉样蛋白₂₅₋₃₅致伤 PC12 神经元样细胞。应用 CCK8 法检测细胞生存率。神经颗粒素、神经调节素免疫荧光染色观察模型细胞的形态学变化, Western blot 法检测神经颗粒素、CAMK II、PSD-95 蛋白表达水平。

结果与结论: 随着 β -淀粉样蛋白₂₅₋₃₅ 浓度增高和作用时间的延长, PC12 神经元生存率呈剂量依赖性降低; 可见突触长度变短、神经元萎缩、神经元彼此连接疏松; 神经颗粒素、CAMK II、PSD-95 蛋白表达均下调。结果提示, 10 μ mol/L β -淀粉样蛋白₂₅₋₃₅、48 h 是筛选早期 PC12 神经元阿尔茨海默病细胞模型的最佳干预浓度和时间。

关键词:

组织构建; 组织工程; PC12 细胞株; β -淀粉样蛋白; 神经元; 阿尔茨海默病; 突触后致密物; 突触可塑性

主题词:

淀粉样蛋白; 突触蛋白类; 阿尔茨海默病

基金资助:

黑龙江省教育厅科研项目(1251666); 佳木斯大学基础研究重点项目(12Z1201502); 佳木斯大学研究生科技创新项目(LZZ2014_030)

缩略语:

β -淀粉样蛋白: amyloid beta-protein, A β ; 神经颗粒素: neurogranin, Ng; 神经调节素: neuromodulin,

Nm; 钙调素依赖性蛋白激酶 II: calmodulin kinase II, CaMK II

Zhang Shuang¹, Huang Xin-yan², Liu Shuang³, Li Yan-jun³, Zhao Jin-cheng³ (¹College of Pharmacy, Jiamusi University, Jiamusi 154007, Heilongjiang Province, China; ²Second Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi 154007, Heilongjiang Province, China; ³Basic Medical College, Jiamusi University, Jiamusi 154007, Heilongjiang Province, China)

Zhang Shuang, Studying for master's degree, College of Pharmacy, Jiamusi University, Jiamusi 154007, Heilongjiang Province, China

Corresponding author: Zhao Jin-cheng, Professor, Basic Medical College of Jiamusi University, Jiamusi 154007, Heilongjiang Province, China

Subject headings: Amyloid; Synapsins; Alzheimer Disease

Funding: the Scientific Research Project of Heilongjiang Educational Department, No. 1251666; the Basic Research Project of Jiamusi University, No. 12Z1201502; the Graduate Scientific Innovation Project of Jiamusi University, No. LZ22014_030

Effects of amyloid-beta 25-35 on expression of synapse-associated proteins in PC12 neurons

Abstract

BACKGROUND: An amyloid-beta ($A\beta$) aggregation in the brain can induce nerve cell apoptosis, loss of synapses and functional damage. However, there is still no effective intervention. Improving the synaptic plasticity provides an important direction for the treatment of early Alzheimer's disease.

OBJECTIVE: To screen the best model of Alzheimer's disease and to explore the expression of synapse-associated proteins in $A\beta_{25-35}$ -injured PC12 neurons.

METHODS: PC12 cells were induced by 50 $\mu\text{g/L}$ nerve growth factor to differentiate into neuronal-like cells. Then, these cells were treated with $A\beta_{25-35}$ at different concentrations. Consequently, cell survival rate was detected using cell counting kit-8; neurogranin and neuregulin immunofluorescence stainings were used to observe morphological changes of model cells; western blot used to detect the expression level of neurogranin, calmodulin kinase II, postsynaptic density-95 proteins.

RESULTS AND CONCLUSION: Over time, the survival rate of PC12 neurons induced by $A\beta_{25-35}$ was decreased in a dose-dependent manner. Shortened synaptic length, neuronal atrophy and sparsely interconnected neurons were visible. Expression levels of neurogranin, calmodulin kinase II and postsynaptic density-95 proteins were all down-regulated. These findings indicate that to screen the cell model of Alzheimer's disease, the optimal concentration and interventional time of $A\beta_{25-35}$ are 10 $\mu\text{mol/L}$ and 48 hours, respectively.

Cite this article: Zhang S, Huang XY, Liu S, Li YJ, Zhao JC. Effects of amyloid-beta 25-35 on expression of synapse-associated proteins in PC12 neurons. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(2):224-229.

0 引言 Introduction

阿尔茨海默病是一种以进行性记忆和认知功能损伤为特征的神经系统退行性疾病,其典型的神经病理学特征是老年斑以及细胞内tau蛋白过度磷酸化形成的神经纤维缠结。 β -淀粉样蛋白(amyloid beta-protein, $A\beta$)是老年斑的最主要成分。其三维结构呈 β 型折叠,具有强自聚性,易形成极难溶解的沉淀^[1]。 $A\beta$ 的生成与清除失衡是导致神经元变性和痴呆的主要原因。针对阿尔茨海默病病变的早期,大量神经元及突触的缺失和功能的损害尚无有效的干预手段。突触可塑性及其相关蛋白在阿尔茨海默病发病中的作用日益受到重视。

神经颗粒素(neurogranin, Ng)是一种神经元特异性蛋白,主要存在于大脑皮质、海马和嗅球,多数神经颗粒素积聚于树突的胞质内,少量神经颗粒素与突触后膜的致密斑有着疏松的联系,可作为一种中枢神经系统病变树突受损的一种标记物^[2-3]。

神经调节素(neuromodulin, Nm, 又称GAP-43)是神经组织特有的一种磷酸蛋白,特异性分布于突触前膜上,国际上将GAP-43列为研究神经生长发育和损伤修复等神经可塑性的首选分子探针。

钙调素依赖性蛋白激酶 II (calmodulin kinase II, CaMK II),是一种多功能蛋白激酶,在调节神经兴奋性和神经功能方面有特异性作用,在突触中分布密集,是突触后致密区(postsynaptic density, PSD)的主要成分^[4-5]。

突触后致密区是突触后膜结构中的蛋白质复合物,是突触后信号转导和整合的结构基础。PSD-95是突触后致密区上的细胞支架蛋白,具有提高调节突触成簇,促进突触传递的作用^[6-8],此突触相关蛋白可以较好地反映突触损伤程度。

PC12细胞是大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤克隆的细胞株,膜

上有神经生长因子神经生长因子受体,受神经生长因子诱导长出神经突起,分化为具有交感神经元特性的细胞,是常用的神经细胞株。因此,本实验旨在采用神经生长因子诱导PC12细胞分化为神经元样细胞,以不同浓度的 $A\beta_{25-35}$ 不同时间致伤PC12神经元样细胞,通过观察细胞生存率、细胞的形态学变化及突触相关蛋白表达变化,筛选 $A\beta_{25-35}$ 致伤PC12神经元阿尔茨海默病细胞模型的最佳干预浓度和时间,为研究阿尔茨海默病神经元损伤,提高突触可塑性,改善阿尔茨海默病的病理生理学过程寻找新的治疗靶点。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 PC12细胞体外培养实验。

1.2 时间及地点 2014年4月至2015年7月在佳木斯大学118实验楼“神经细胞培养室”完成。

1.3 材料 PC12细胞株(中国科学院上海细胞库);1640培养基、胎牛血清(Hyclone公司);CCK8试剂盒(贝博生物有限公司);神经生长因子(厦门北大之路生物工程有限公司);兔抗大鼠Ng多克隆抗体、FITC标记的兔抗大鼠Nm多克隆抗体、Cy3标记的山羊抗兔二抗(北京博奥森公司);兔抗大鼠CAMK II、PSD-95多克隆抗体、小鼠抗大鼠GAPDH单克隆抗体、HRP标记的山羊抗兔、山羊抗小鼠二抗(Proteintech公司);低温离心机(BECKMAN COULTER公司);激光共聚焦显微镜(OLYMPUS公司);Western blot电泳仪、转膜槽(Tanon公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 PC12细胞培养 PC12细胞用含1640培养基加入体积分数10%的胎牛血清(FBS)在37℃、体积分数5% CO₂培养箱内进行培养,每2 d 更换1次培养基,四五天可传一代。经文献查阅,终浓度为50 $\mu\text{g/L}$ 的神经生长因子作用

表1 不同浓度及时间 β -淀粉样蛋白₂₅₋₃₅对PC12神经元CCK-8吸光度及细胞存活率的影响 $(\bar{x} \pm s, n=5)$

Table 1 Effects of different concentrations and interventional time of amyloid-beta 25-35 on absorbance value and cell survival rate of PC12 neurons

组别	A 值			生存率(%)		
	24 h	4 h	72 h	24 h	48 h	72 h
对照组	0.979±0.037	0.995±0.020	0.965±0.097	100	100	100
5 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.945±0.013 ^a	0.922±0.029	0.904±0.013	96.52±0.013 ^b	92.66±0.030 ^b	93.68±0.013 ^b
10 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.821±0.009 ^a	0.765±0.020 ^a	0.642±0.030 ^a	83.86±0.008 ^b	76.88±0.020 ^b	66.53±0.031 ^b
20 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.726±0.010 ^a	0.635±0.014 ^a	0.603±0.018 ^a	74.11±0.010 ^b	63.82±0.014 ^b	62.49±0.019 ^b

表注: 随着 β -淀粉样蛋白₂₅₋₃₅浓度及作用时间的增加, PC12神经元CCK8吸光度明显降低, 细胞生存率明显降低。与对照组相比, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ 。

PC12细胞4-7 d可诱导分化为神经元^[9], 当细胞贴壁24 h后换液为含有神经生长因子的1640培养基培养, 血清浓度降低至体积分数5%以减少PC12细胞的增殖。

1.4.2 $A\beta_{25-35}$ 寡聚体的制备 参照文献^[10]将 $A\beta_{25-35}$ 和六氟异丙醇(HFIP)提前放在冰盒上预冷, 每1 mg $A\beta_{25-35}$ 加入220 μL HFIP, 该步骤在冰上操作。盖上管盖在室温放置60 min, 使 $A\beta_{25-35}$ 充分溶解。将溶解好的 $A\beta_{25-35}$ 放回冰上10 min后置于通风橱内挥发、过夜。次日打开通风橱排风2 h。大体可见片状沉淀。在超净台内向其离心管加入44 μL 二甲基亚砜, 吹打混匀后, 每管加9 386 μL 无酚红DMEM/F12 培养基。4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育24 h。隔日低温离心机4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心10 min后, 转移上清液至新管, 分装放入-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱储存, 储存浓度为100 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.4.3 CCK8法检测细胞生存率 收集对数期细胞, 将细胞悬液100 μL 接种到96孔板中, 种植密度为每孔5 000个, 置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数5% CO_2 孵育过夜。24 h后用50 $\mu\text{g/L}$ 神经生长因子诱导分化5 d。分别用5, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ 低、中、高3个浓度, 致伤PC12神经元24, 48, 72 h及空白对照。每组设定5个复孔。每孔加入10 μL CCK-8溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育4 h, 450 nm波长下酶标仪测各孔的A值^[11]。各重复孔的A值取平均数。细胞生存率(%)=致伤细胞A/对照细胞A $\times 100$ 。

1.4.4 免疫荧光双标法检测细胞Ng、Nm的形态学变化 6孔板中预先放置经高温高压灭菌好的盖玻片。用0.1%多聚赖氨酸包被玻片, 取对数生长期PC12细胞以 1×10^5 接种在6孔板内, 24 h细胞贴壁后用50 $\mu\text{g/L}$ 神经生长因子诱导分化5 d。 $A\beta_{25-35}$ 致伤神经元48 h后吸去培养基, 预温的PBS轻轻洗涤2次。40 g/L多聚甲醛室温固定15 min^[12-13]。PBS洗涤3次, 10 min/次。0.2% Tritonx-100室温透膜20 min, PBS洗涤3次, 山羊血清室温封闭45 min, 弃去封闭液, 加入抗体稀释液稀释的绿色荧光FITC标记的一抗Nm (1 : 100), 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。次日PBS洗涤细胞3次。加入无荧光标记的一抗Nm (1 : 100)作用4 h后, PBS清洗2次, 5 min/次, 加入含有红色荧光Cy3标记的二抗山羊抗兔 (1 : 200)作用1 h, PBS清洗2次, 加入DAPI染核, 封固。激光共聚焦显微镜下观察。

表2 β -淀粉样蛋白₂₅₋₃₅对PC12神经元Ng、CaMK II、PSD-95蛋白表达含量的影响 $(\bar{x} \pm s, n=3)$

Table 2 Effects of amyloid-beta 25-35 on the protein expression of neurogranin, calmodulin kinase II and postsynaptic density-95 in PC12 neurons

组别	Ng	CaMK II	PSD-95
对照组	0.93±0.21	0.98±0.11	0.86±0.12
模型组	0.55±0.18 ^a	0.60±0.17 ^a	0.55±0.20 ^a

表注: 与对照组相比, ^a $P < 0.05$ 。Ng: 神经颗粒素; CaMK II: 钙调素依赖性蛋白激酶 II; PSD-95: 突触后致密区细胞支架蛋白。

1.4.5 Western blot检测突触相关蛋白Ng、CAMK II和PSD-95蛋白的表达 将 3×10^5 PC12细胞接种到6孔板中, 24 h后加入终浓度为50 $\mu\text{g/L}$ 神经生长因子诱导分化5 d。标记为对照组和实验组。实验组采用10 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ 干预细胞48 h后一起收集细胞蛋白。弃去培养液, 加200 μL 含PMSF的蛋白裂解液(按1 mL裂解液加10 μL PMSF, 现用现配4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷), 冰袋上裂解30 min, 12 000 r/min 离心5 min, BCA法测蛋白浓度^[14-15]。取上清液40 μL 加入蛋白上样缓冲液10 μL , 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸5 min, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。每孔上样20 μg 进行SDS-PAGE聚丙烯酰胺凝胶电泳, 用半湿转膜仪270 mA电转90 min 将蛋白转移到PVDF膜上。含5%脱脂奶粉的TBST 溶液37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭60 min后4 $^{\circ}\text{C}$ 抗体孵育GAPDH (1 : 1 000)、Ng (1 : 300)、CAMK II (1 : 300)、PSD-95 (1 : 500)。次日 TBST 洗膜3次。每次10 min。加HRP标记的二抗 (1 : 5 000) 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h, 再用TBST洗膜3次, 15 min/次, 最后加入ECL发光液, 暗室曝光, 显影定影, 扫描图像, 用凝胶图像处理系统对X光胶片上的条带进行灰度分析, 以目的条带与内参GAPDH灰度值的比值作为半定量结果。

1.5 主要观察指标 ①不同浓度 $A\beta_{25-35}$ 不同时间致伤PC12神经元细胞存活率的变化。②致伤后的PC12神经元经免疫荧光染色后的形态学变化及突触相关蛋白的表达变化。

1.6 统计学分析 使用SPSS 19.0统计软件分析数据, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异采用单样本方差分析, 显著性以 P 值表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 不同浓度及时间 $A\beta_{25-35}$ 对PC12神经元细胞生存率的影响 随着 $A\beta_{25-35}$ 浓度及作用时间的增加, PC12神经元CCK8吸光度明显降低($P < 0.05$), 细胞生存率明显降低($P < 0.05$)。见图1、表1。

2.2 $A\beta_{25-35}$ 对PC12神经元细胞形态学的影响 50 $\mu\text{g/L}$ 神经生长因子诱导分化5 d后, PC12细胞长出数目不等长短不一的多个突起, 形成神经网络。10 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ 干预PC12神经元 48 h后与对照组相比, 细胞质开始浓缩, 细胞体积缩小, 核膜内陷, 突触长度变短, 神经元胞体萎缩, 神经细胞彼此连接疏松。见图2, 3。

2.3 $A\beta_{25-35}$ 对PC12神经元细胞突触相关蛋白表达的影响 10 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ 干预PC12神经元48 h后提取总蛋白行聚丙烯酰胺凝胶电泳可发现模型组蛋白表达含量均明显下调。见图4、表2。

3 讨论 Discussion

阿尔茨海默病是1906年由德国医生Alois Alzheimer首先报道^[11], 至今它的确切病因仍不清楚。1992年Hardy和Higgins在《Science》撰文, 首次提出 β 淀粉样蛋白($A\beta$)级联学说(Amyloid cascade hypothesis)^[12], 近10余年来大量病理学、遗传学和转基因动物等方面的证据表明, $A\beta$ 是阿尔茨海默病发病的中心环节^[13-15], $A\beta$ 聚集后损伤突触、激活胶质细胞和星形细胞、损伤神经元、最后出现痴呆。

近期有研究表明, $A\beta$ 在形成纤维性沉积前的中间状态即 $A\beta$ 寡聚体亦可产生神经毒性作用, 即可溶性的 $A\beta$ 与突触丧失有较强的关联^[16-17]。在阿尔茨海默病临床早期主要表现为显著的记忆损害, 资料表明这一表现起始于海马突触功效的微弱改变, 且发现在阿尔茨海默病发病早期还未出现明显的老年斑之前, 其认知功能的减退与可溶性 $A\beta$ 水平及突触功能障碍密切相关^[18-22], 而此改变早于显著神经元退行性变。动物实验研究表明, $A\beta$ 寡聚体可以在生理水平明显抑制大鼠海马的突触传递^[23-24], 可溶性 $A\beta$ 寡聚体是导致阿尔茨海默病患者脑内突触功能障碍和突触丢失的主要效应物, 而突触丧失是阿尔茨海默病痴呆的结构基础, 新皮质突触丧失达40%时将出现痴呆^[25-26]。

本实验结果发现, CCK8法测得的细胞生存率与吸光度A值成正比。加入10 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ 后细胞生存率明显下降, 且随着 $A\beta_{25-35}$ 剂量和作用时间的增加, 细胞存活率呈剂量依赖性趋势下降, 差异有显著性意义($P < 0.05$), 加入 $A\beta_{25-35}$ 5 $\mu\text{mol/L}$ 时细胞各时间点存活率无显著差异($P > 0.05$)。在10 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ 干预48 h后细胞存活率下降趋势明显增高, 且用20 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta$ 干预时细胞损伤过于严重。故筛选10 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ 作为早期阿尔茨海默病模型。免疫荧光图片证实了 $A\beta_{25-35}$ 对神经元突触的损伤程度, 镜下可见神经元彼此连接疏松, 突触长度变短。本研

究进一步探讨突触相关蛋白Ng、CAMK II、PSD-95表达的影响。结果发现在 $A\beta_{25-35}$ 致伤PC12神经元48 h后蛋白均明显表达下调。提示突触相关蛋白的表达下调与阿尔茨海默病有重要关系。

突触作为神经细胞间的连接末梢, 一般被用来代表神经可塑性。它包括结构和功能两方面的变化。突触结构的可塑性包括突触连接的形成与消退、突触活性区数量与面积的改变、突触间隙的变化以及各种亚细胞结构的改变等^[27-29]。伴随人体衰老以及神经退行性疾病的发展可见突起的数量明显减少, 神经网络之间的联结疏松, 学习记忆能力下降。突触功能的可塑性主要表现为突触传递功能的增强或减弱, 与学习记忆密切相关^[30-32]。因此, 研究突触相关蛋白的改变对于阐明阿尔茨海默病早期的发病机制及为后续选择相关阻断剂改善突触可塑性具有重要意义。

致谢: 感谢赵锦程教授、刘爽老师和黄昕艳老师对实验的指导提出宝贵的建议, 感谢其他实验工作人员对实验的帮助和支持。

作者贡献: 第一作者负责实验的实施、文章的撰写, 通讯作者负责论文的审校, 其余作者负责实验的指导。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 没有与相关伦理道德冲突的内容。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 本刊实行双盲外审制度, 文章经国内小同行外审专家审核, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] Liao D, Miller EC, Teravskis PJ. Tau Acts as a Mediator for Alzheimer's Disease-Related Synaptic Deficits. *Eur J Neurosci*. 2014;39(7): 1202-1213.
- [2] Kovalevich J, Corley G, Yen W, et al. Cocaine decreases expression of neurogranin via alterations in thyroid receptor/retinoid X receptor signaling. *J Neurochem*. 2012;121(2): 302-313.
- [3] Zhong L, Kaleka KS, Gerges NZ. Neurogranin phosphorylation fine-tunes long-term potentiation. *Eur J Neurosci*. 2011;33(2): 244-250.
- [4] Burger LL, Haisenleder DJ, Aylor KW, et al. Regulation of Intracellular Signaling Cascades by GnRH Pulse Frequency in the Rat Pituitary: Roles for CaMK II, ERK, and JNK Activation. *Biol Reprod*. 2008;79(5):947-953.
- [5] Waggner CT, Dupree JL, Elgersma Y. CaMKII β Regulates Oligodendrocyte Maturation and CNS Myelination. *J Neurosci*. 2013;33(25):10453-10458.

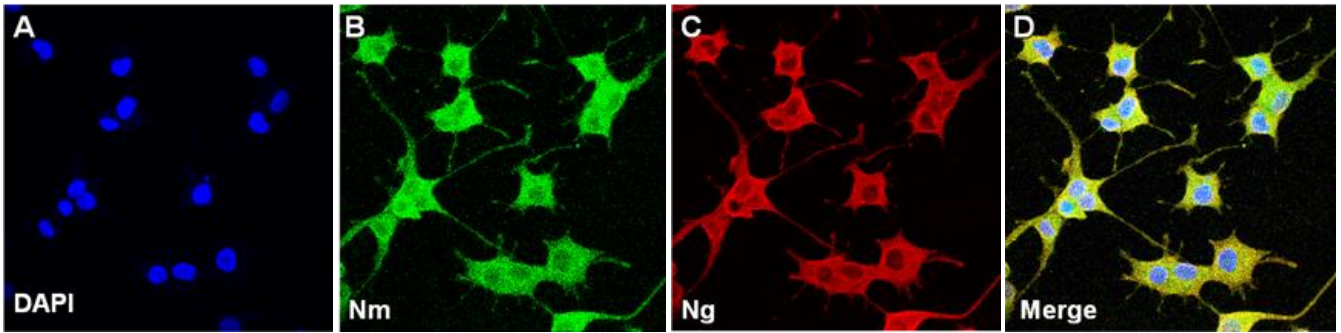


图 2 对照组 PC12 神经元的神经颗粒素(Ng)、神经调节素(Nm)鉴定(免疫荧光, $\times 600$)

Figure 2 Neurogranin and neuregulin identification of PC12 neurons in the control group (immunofluorescence, $\times 600$)

图注: 图中 A 为 DAPI 染核呈现蓝色; B 为 Nm 绿色荧光 FITC 染色; C 为 Ng 红色荧光 Cy3 染色; D 为 A, B, C 的重叠。

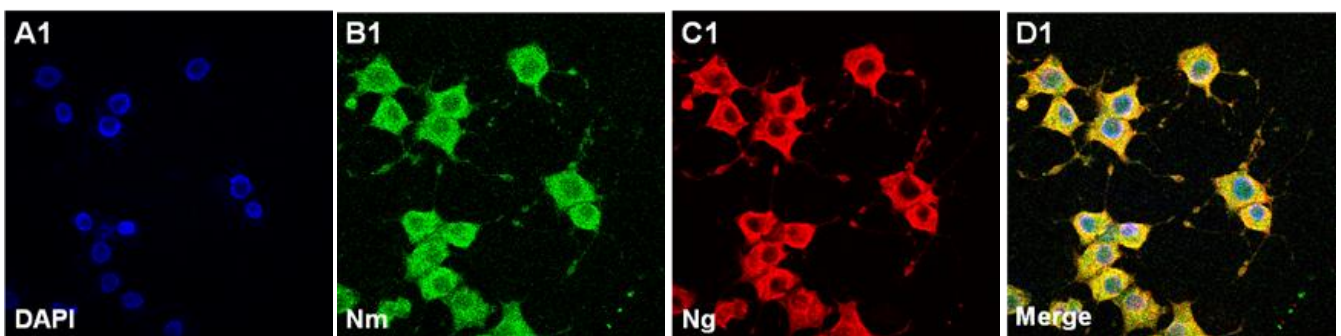


图 3 10 $\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{25-35}$ 干预 PC12 神经元 48 h 后神经颗粒素(Ng)、神经调节素(Nm)鉴定(免疫荧光, $\times 600$)

Figure 3 Neurogranin and neuregulin identification of PC12 neurons under intervention of 10 $\mu\text{mol/L}$ amyloid-beta 25-35 for 48 hours (immunofluorescence, $\times 600$)

图注: 图中 A1 为 DAPI 染核呈现蓝色; B1 为 Nm 绿色荧光 FITC 染色; C1 为 Ng 红色荧光 Cy3 染色。D1 为 A1, B1, C1 的重叠。

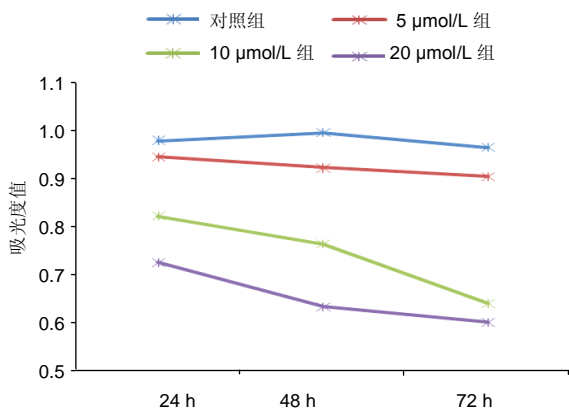


图 1 不同浓度及时间 β 淀粉样蛋白₂₅₋₃₅ 对 PC12 神经元 CCK-8 吸光度数值的影响

Figure 1 Effects of different concentrations and interventional time of amyloid-beta 25-35 on absorbance value of PC12 neurons detected by cell counting kit-8

图注: 随着 β 淀粉样蛋白₂₅₋₃₅ 浓度及作用时间的增加, PC12 神经元 CCK8 吸光度明显降低 ($P < 0.05$)。

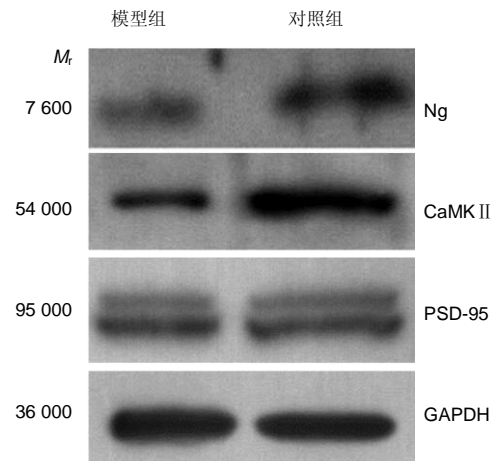


图 4 应用 Western blot 检测 β 淀粉样蛋白₂₅₋₃₅ 对 PC12 神经元 Ng、CaMK II、PSD-95 蛋白表达的影响

Figure 4 Effects of amyloid-beta 25-35 on the protein expression of neurogranin, calmodulin kinase II and postsynaptic density-95 in PC12 neurons detected by western blot assay

图注: Ng: 神经颗粒素; CaMK II: 钙调素依赖性蛋白激酶 II; PSD-95: 突触后致密区细胞支架蛋白。

- [6] Tsai NP, Wilkerson JR, Guo W, et al. Multiple autism-linked genes mediate synapse elimination via proteasomal degradation of a synaptic scaffold PSD-95. *J Cell.* 2012;151(7): 1581-1594.
- [7] Bonnet SA, Akad DS, Samaddar T, et al. Synaptic State-Dependent Functional Interplay between Postsynaptic Density-95 and Synapse-Associated Protein 102. *J Neurosci.* 2013;33(33):13398-13409.
- [8] Xu W, Schlüter OM, Steiner P, et al. Molecular dissociation of the role of PSD-95 in regulating synaptic strength and LTD. *J Neuron.* 2008;57(2):248-262.
- [9] Lee YW, Stachowiak EK, Birkaya B, et al. NGF-Induced Cell Differentiation and Gene Activation is Mediated by Integrative Nuclear FGFR1 Signaling (INFS). *J PLoS ONE.* 2013;8(7): e68931.
- [10] 王建秀, 王德生, 段淑荣. $A\beta_{25-35}$ 对PC12细胞损伤作用的研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 2007;24(2):148.
- [11] Guo YB, Shao YM, Chen J, et al. Ethyl acetate extracts of *Fructus Ligustri Lucide* induce cell apoptosis in human neuroglioma cell. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(3):3833-3840.
- [12] 唐薇婷, 冯莉, 肖波, 等. QDs-SA 和Cy3荧光标记阿尔茨海默病细胞模型 β 淀粉样蛋白的比较研究[J]. 中国临床神经科学, 2010, 18(3): 225-230.
- [13] 陈萌, 任宁, 刘文君, 等. 免疫荧光双标法在小鼠表皮干细胞分子标记筛选中的应用. 山东大学学报:医学版, 2011, 49(4):1671-7554.
- [14] Prà ID, Chiarini A, Armato U. Antagonizing amyloid- β /calcium-sensing receptor signaling in human astrocytes and neurons: a key to halt Alzheimer's disease progression?. *Neural Regen Res.* 2015; 10(2): 213-218.
- [15] Bass B, Upson S, Roy K, et al. Glycogen and amyloid-beta: key players in the shift from neuronal hyperactivity to hypoactivity observed in Alzheimer's disease?. *Neural Regen Res.* 2015; 10(7): 1023-1025.
- [16] Grasselli G, Mandolesi G, Strata P, et al. Impaired Sprouting and Axonal Atrophy in Cerebellar Climbing Fibres following In Vivo Silencing of the Growth-Associated Protein GAP-43. *PLoS One.* 2011;6(6):e20791.
- [17] Feng X, Liang N, Zhu D, et al. Resveratrol Inhibits β -Amyloid-Induced Neuronal Apoptosis through Regulation of SIRT-ROCK1 Signaling Pathway. *PLoS One.* 2013;8(3): e59888.
- [18] Alzheimer A. About a peculiar disease of the cerebral cortex. (Translated by Jarvik L and Greenson H). *J Alzheimer Dis Assoc Disord.* 1987;1:3-8.
- [19] Hardy JA, Higgins A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 1992;256(5054):184-185.
- [20] Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 2002;297(5580):353-356.
- [21] Tannenberg RK, Scott HL, Tannenberg AE, et al. Selective loss of synaptic proteins in Alzheimer's disease: evidence for an increased severity with APOE varepsilon4. *J Neurochem Int.* 2006;49(7):631-639.
- [22] Han SD, Gruhl J, Beckett L, et al. Beta Amyloid, Tau, Neuroimaging, and Cognition: Sequence Modeling of Biomarkers for Alzheimer's Disease. *J Brain Imaging Behav.* 2012;6(4):610-620.
- [23] Spencer B, Rockenstein E, Crews L, et al. Novel strategies for Alzheimer's disease treatment. *J Expert Opin Biol Ther.* 2007; 7(12):1853-1867.
- [24] Rowan MJ, Klyubin I, Wang Q, et al. Synaptic memory mechanisms: Alzheimer's disease amyloid beta-peptide-induced dysfunction. *J Biochem Soc Trans.* 2007;35(5): 1219-1223.
- [25] Malabou C. Aging and psychological plasticity: contradiction or new therapeutic challenge? *J Encephale.* 2006;32(5): S628-631.
- [26] Gengler S, Gault VA, Harriott P, et al. Impairments of hippocampal synaptic plasticity induced by aggregated beta-amyloid(25-35) are dependent on stimulation protocol and genetic background. *J Exp Brain Res.* 2007;179(4): 621-630.
- [27] Small DH. Mechanisms of synaptic homeostasis in Alzheimer's disease. *J Curr Alzheimer Res.* 2004;1(1):27-32.
- [28] Wang HW, Pasternak JF, Kuo H, et al. Soluble oligomers of beta amyloid(1-42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate gyrus. *J Brain Res.* 2002;924: 133-140.
- [29] Musiek Erik S, Holtzman D M. Origins of Alzheimer's Disease: Reconciling CSF biomarker and neuropathology data regarding the temporal sequence of $A\beta$ and tau involvement. *J Curr Opin Neurol.* 2012;25(6): 715-720.
- [30] Lacor PN, Buniel MC, Chang L, et al. Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers. *J Neurosci.* 2004;24:10191-10200.
- [31] Terry RD, Masliha E, Salmon D, et al. Physical basis Of cognitive alterations in Alzheimer's disease: Synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *J Ann Neurol.* 1991; 30(4):572-580.
- [32] Kanekiyo T, Bu G. The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 and amyloid- β clearance in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci.* 2014;6:93.