

研究论文

PTK2B通过LRP-1对A β 诱导的认知功能障碍小鼠血液和脑组织中A β 水平及其行为的影响

郝凯敏, 刘镇, 王浩玉, 李坤, 祁文秀*

山西医科大学汾阳学院, 汾阳 032200

摘要: 本文旨在探讨*ptk2b*基因及其表达产物PTK2B (protein tyrosine kinase 2 beta)蛋白与低密度脂蛋白受体相关蛋白1 (low density lipoprotein receptor-related protein-1, LRP-1)的关系, 分析认知功能障碍小鼠血液和脑组织中的A β 变化与*ptk2b*基因的关系。将64只三月龄C57BL/6J小鼠随机分成实验组和对照组, 所有动物均行侧脑室插管术。实验组小鼠均经侧脑室(i.c.v.)注射凝聚态A β_{1-42} (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 3.6 μL)建立认知功能障碍模型, 3 d后, 分别注射PTK2B抑制剂PF431396 (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$, A β + PF组)、PTK2B激动剂PMA (18.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$, A β + PMA组)、LRP-1抑制剂RAP (0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, A β + RAP组)以及生理盐水(A β + NS组); 对照组则经侧脑室插管注射NS, 3 d后分别i.c.v.注射等量的PF431396 (PF组)、PMA (PMA组)、RAP (RAP组)以及NS (NS组)。每组均注射2 μL 。注射1周后用Morris水迷宫对小鼠进行认知行为学功能检测, 用免疫组织化学、ELISA以及Western blot检测血液和海马组织中A β_{1-42} 、LRP-1、PTK2B的表达水平, 用qRT-PCR检测海马*ptk2b* mRNA的表达。结果显示, A β 诱导的认知功能障碍模型小鼠海马组织中A β_{1-42} 水平升高, 血液中则降低, 同时海马中LRP-1蛋白表达水平下调, 海马PTK2B和*ptk2b* mRNA的表达水平则上调; PTK2B抑制剂可下调认知功能障碍小鼠海马的PTK2B以及*ptk2b* mRNA的表达, 上调海马LRP-1表达, 降低海马组织中A β_{1-42} 水平, 而升高血液中A β_{1-42} 水平, 同时改善小鼠的认知功能; PTK2B激动剂的作用则相反。用LRP-1抑制剂干预下调海马中的LRP-1水平后, 海马A β_{1-42} 水平升高而血液中A β_{1-42} 水平则降低, 同时小鼠的认知行为学功能则明显降低, 而海马中PTK2B以及*ptk2b* mRNA表达却没有明显变化。以上结果提示, PTK2B可能通过下调认知功能障碍模型小鼠脑组织中的LRP-1而升高海马组织A β_{1-42} 水平、降低血液中的A β_{1-42} 水平, 进而影响其认知功能。

关键词: 阿尔茨海默病; 淀粉样 β 蛋白; 低密度脂蛋白受体相关蛋白1; PTK2B; C57BL/6J小鼠

中图分类号: R742

PTK2B affects the levels of A β in blood and brain and behavioral functions via targeting LRP-1 transporter in A β -induced cognitive dysfunction mice

HAO Kai-Min, LIU Zhen, WANG Hao-Yu, LI Kun, QI Wen-Xiu*

Fenyang College of Shanxi Medical University, Fenyang 032200, China

Abstract: The aim of the present study was to explore the correlation between *ptk2b*/PTK2B (protein tyrosine kinase 2 beta, a *ptk2b*-encoded protein) and the level of low density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1), as well as to uncover the relationship between the changes in beta amyloid protein (A β) levels in blood and brain and the expression of *ptk2b* in A β -induced cognitive dysfunction mice. A total of 64 3-month-old C57BL/6J mice were divided randomly into the experimental group and control group. All mice underwent the intracerebroventricular (i.c.v.) intubation. Mice in the experimental group received the i.c.v. infusion of oligomeric A β_{1-42} (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 3.6 μL) to construct the cognitively impaired models, and three days later, those mice were further injected with PF431396 (an inhibitor of PTK2B, 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$, A β + PF group), phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA, an agonist of PTK2B, 18.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$, A β + PMA group), RAP (an inhibitor of LRP-1, 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, A β + RAP group) or normal saline (A β + NS group). For mice in the

Received 2020-10-09 Accepted 2021-01-25

This work was supported by the Natural Science Foundation of Shanxi Province, China (No. 201801D121348) and Scientific Research of Fenyang College of Shanxi Medical University (No. 2020B02).

*Corresponding author. Tel: +86-358-2892014; E-mail: fycqwx@163.com

control group, they underwent the i.c.v. infusion of NS, and 3 days later, they were additionally injected with PF431396 (PF group), PMA (PMA group), RAP (RAP group) or NS (NS group) in the volume of 2 μ L. One week later, all mice were subjected to the determination of behavioral function in Morris water maze and the measurement of expression of $A\beta_{1-42}$, LRP-1 and PTK2B in blood and hippocampus using immunohistochemistry (IHC) staining, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blot, and the measurement of mRNA expression of *ptk2b* in hippocampus using qRT-PCR. The results showed that the infusion of $A\beta$ induced an increase of $A\beta_{1-42}$ level in hippocampus and a decrease in blood, with the down-regulation of LRP-1 protein expression in hippocampus and up-regulation of mRNA and protein expression of *ptk2b* in hippocampus. For cognitively impaired mice, intervention of PF431396 caused the down-regulation of protein and mRNA expression of *ptk2b* in the hippocampus, while LRP-1 in hippocampus was up-regulated with a decrease in the level of $A\beta_{1-42}$ in hippocampus and an increase in the level of $A\beta_{1-42}$ in the blood, as well as significant improvement in cognitive function, while the administration of PMA resulted in the opposite changes. Moreover, the administration of RAP triggered the down-regulation of LRP-1 expression in hippocampus and an increase in the level of $A\beta_{1-42}$ in hippocampus and a decrease in the level of $A\beta_{1-42}$ in blood, with the deterioration of the behavioral functions, while protein and mRNA expression of *ptk2b* in hippocampus showed no evident changes. These results suggest that, in cognitively impaired mice, PTK2B, possibly via down-regulating LRP-1, increases the $A\beta_{1-42}$ level in brain, but decreases the $A\beta_{1-42}$ level in blood, thereby deteriorating the cognitive and behavioral functions of mice.

Key words: Alzheimer's disease; beta amyloid protein; low density lipoprotein receptor-related protein-1; PTK2B; C57BL/6J mice

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种进行性的神经退行性疾病, 是老年人群中最常见的痴呆形式之一。AD 病理性标志物是老年斑和神经原纤维缠结, 细胞外老年斑主要含有聚集的 β 淀粉样蛋白 (beta amyloid protein, $A\beta$)。研究表明, $A\beta$ 是 AD 生物标志物的主要成分^[1]。 $A\beta$ 的积累会导致氧化应激、炎症、突触的改变和认知功能障碍^[2]。在正常情况下, 脑内 $A\beta$ 的产生和清除处于动态平衡状态。 $A\beta$ 清除障碍可能会加重 AD 的发展^[3]。

在 AD 动物模型或临床病例上的研究显示, 随着年龄的增加, AD 模型动物或患者血液中 $A\beta_{1-42}$ 降低, 而脑组织则增加^[4], 这可能与 $A\beta$ 清除障碍有关。脑内 $A\beta$ 的清除方式主要是通过血脑屏障 (blood brain barrier, BBB) 的转运机制将 $A\beta$ 由脑组织转入到外周血液并清除, 或由血液转入到脑组织来维持平衡^[5]。转运 $A\beta$ 由脑组织流出到外周血液的主要是在低密度脂蛋白受体相关蛋白 1 (low density lipoprotein receptor-related protein-1, LRP-1)、磷酸化糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 和由血液流入到脑组织的晚期糖基化终末产物受体 (receptor for advanced glycation end products, RAGE) 作用下完成的^[6]。研究显示, 随着 AD 的发展和时间的延续, 脑内 LRP-1 和 P-gp 表达明显下降, 而 LRP-1 在 AD 早期就出现较明显的下降^[7]。研究显示, 在 AD 动物模型中脑内 $A\beta$ 与 LRP 受体之间具有负性相关性^[8], 但导致 LRP 变化的机制仍不清楚。

ptk2b 基因可能是晚发型 AD 的易感基因^[9, 10], 其编码的 PTK2B (protein tyrosine kinase 2 beta) 蛋白

是一种富含脯氨酸的非受体酪氨酸蛋白激酶, 与中枢神经系统的信息传递有直接或间接的关系^[11]。研究表明, PTK2B 能够充当 Tau 毒性的早期标记物和体内调节剂, 从而影响 AD 的发生^[12]。前期研究显示, 在 $A\beta$ 诱导的认知功能障碍大鼠海马中 PTK2B 表达升高, 且伴随有 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体和 Tau 蛋白磷酸化水平的升高^[13]。但是, 在 AD 中 PTK2B 蛋白导致 $A\beta$ 变化的机制, 血液和脑组织中 $A\beta$ 水平的变化是否因 PTK2B 引起 LRP-1 的变化所致, 这些都还是未知的。

为了探讨 PTK2B 和 LRP-1 与 AD 血液和脑组织中生物标记物及其认知行为学的关系, 本研究利用侧脑室注射 $A\beta_{1-42}$ 诱导认知障碍小鼠为研究对象, 侧脑室注射 PTK2B 抑制剂、激动剂以及 LRP-1 抑制剂, 分析 PTK2B 通过 LRP-1 对血液和海马组织中 $A\beta_{1-42}$ 水平以及小鼠认知行为学功能的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 64 只 3 月龄雄性 C57BL/6J 小鼠 (22~25 g) 由山西医科大学动物实验中心提供, 合格证号: SCXK(晋)2015-0001。本研究的动物实验方案经山西医科大学动物伦理委员会审批。动物放置于 SPF 清洁级动物房分笼饲养, 每笼 2 只, 温度设置为 (24 \pm 2) $^{\circ}$ C, 湿度保持 (50 \pm 10)%, 光照昼夜节律 12 h/12 h 交替循环。动物自由进食及饮水, 每日定时清扫笼舍换气。小鼠适应环境一周后开始实验。

1.2 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体的制备 根据实验室以往的制备方法^[14], 六氟异丙醇中加入 $A\beta_{1-42}$ (ab120301,

Abcam), 室温条件下振荡使其充分溶解, 用氮气吹干, 加入 5 μ L 二甲亚砜和 45 μ L D-PBS, 37 $^{\circ}$ C 烘箱孵育 36 h, 分装后 -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.3 动物处理 将 64 只 C57BL/6J 小鼠随机分为 8 组, 每组 8 只。所有小鼠腹腔注射麻醉 (1% 戊巴比妥钠, 35 mg/kg), 固定在脑立体定位仪上, 根据小鼠脑图谱于右侧脑室 (前凶后 0.5 mm, 旁开 1.1 mm, 深度 1.5 mm) 进行侧脑室插管术^[15]。术后 3 天给小鼠连续腹腔注射抗生素以防感染、单笼饲养、常规喂养。

术后 3 天待动物状态恢复良好, 随机将动物分成 4 个实验组和 4 个对照组。实验组动物分别经侧脑室 (intracerebroventricular, i.c.v.) 注射聚集态 A β_{1-42} (0.1 μ g/mL, 3.6 μ L) 制备认知功能障碍模型, 3 天后, 分别 i.c.v. 注射 PTK2B 抑制剂 PF431396 (15 μ g/mL, 4278, Tocris Bioscience, A β + PF 组)、PTK2B 激动剂 Phorbol-12-myristate-13-acetate (18.75 μ g/mL, Abs9107, Absin, A β + PMA 组)、LRP-1 抑制剂 RAP (0.2 μ g/mL, 4480-LR, R&D Systems, A β + RAP 组)、以及生理盐水 (A β + NS 组); 对照组动物则 i.c.v. 注射 NS, 3 天后, 各组分别 i.c.v. 注射等量的 PF (PF 组)、PMA (PMA 组)、RAP (RAP 组) 和 NS (NS 组)。每只动物均注射 2 μ L, 药物注射后补充注射 2 μ L NS 以使药物全部进入脑室。

1.4 水迷宫检测 Morris 水迷宫 (软件: Smart 3.0, Panlab 公司, 西班牙; 仪器: 淮北正华生物仪器有限公司) 为直径 120 cm、高 90 cm 的圆形宫体, 内壁为白色, 逃生平台放入第一象限, 放适量的水使水面高于平台 1 cm, 加入钛白粉, 水面呈白色、加温, 水温维持在 (20 \pm 2) $^{\circ}$ C。除空间探索试验移除平台外, 平台距桶壁边缘均保持相同。在实验开始前一天, 为使小鼠熟悉环境, 上午和下午分别自由游泳 120 s。Morris 水迷宫检测分两部分进行, 共 6 天, 前 5 天为定位航行试验, 第 6 天为空间探索试验。定位航行试验: 随机选取某一象限的中心使小鼠面朝池壁缓慢进入水中, 设定最长游泳时间为 60 s, 记录小鼠在 60 s 内找到水下隐藏平台的逃避潜伏期来检测小鼠的空间学习能力。在 60 s 内小鼠若没有找到平台, 则将其放在平台上停留 10 s, 计时为 60 s; 若小鼠在 60 s 内找到平台, 在平台上停留 10 s 后停止试验。休息 5 min 后, 将小鼠随机放入其他象限, 直到完成所有象限。连续进行 5 d, 每天两次。空间探索试验: 撤去水下平台, 将小鼠连续 4 次随

机放入不同的象限, 小鼠自由游泳 60 s, 检测小鼠在目标象限 (即原平台所在象限) 停留的时间及穿越平台的次数, 上、下午各检测 1 次, 取其平均值作为小鼠记忆能力的检测指标。

1.5 组织处理 水迷宫测试结束后, 所有小鼠进行腹腔麻醉, 心脏取血, 室温放置 20 min, 3 000 r/min 离心, 取血液上清, 进行 ELISA 检测。生理盐水灌注心脏, 彻底清除小鼠体内血液, 断头取脑, 在冰上快速分离海马。将右侧海马放入 -80 $^{\circ}$ C 冰箱冻存; 将左侧海马放置于 4% 的多聚甲醛固定 24 h, 用脱水机 (ASP200S, 徕卡显微系统上海贸易有限公司, 中国) 进行酒精梯度脱水、二甲苯脱脂透明、浸蜡、包埋机 (Kedee, 浙江金华科迪仪器设备有限公司) 包埋组织, 蜡块放 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.6 ELISA 检测血清中 A β_{1-42} 含量 按说明书标准品建立标准曲线, 在包被有 A β_{1-42} 抗体的微量酶标板 (MM-44561M1, 酶免, 江苏) 内分别加入 10 μ L 血清、40 μ L 样品稀释液, 37 $^{\circ}$ C 温育 30 min, 充分洗板 5 次; 加入酶标试剂 50 μ L, 37 $^{\circ}$ C 温育 30 min, 反复洗板 5 次; 加入显色剂 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 避光显色 10 min; 加入终止液 50 μ L 终止反应。空白孔调零, 15 min 内用酶标仪在 450 nm 波长读取光密度 (OD 值), 根据曲线方程求出血清中 A β_{1-42} 的浓度。

1.7 Western blot 检测海马 A β_{1-42} 、LRP-1、PTK2B 蛋白表达水平 取海马组织按 100:1 加入哺乳动物蛋白抽提液 (博士德, 武汉)、PMSF (博士德, 武汉), 超声破碎仪研磨破碎组织, 13 800 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 15 min。取上清, 用 BCA 试剂盒 (博士德, 武汉) 测定蛋白浓度, SDS-PAGE 电泳分离后转膜, 将膜放置于 5% 脱脂奶粉中封闭, 按照蛋白分子量大小说剪条带, 分别加入小鼠抗大鼠 A β 单克隆抗体 (1:1 000, NBP2-13075, Novus Biologicals)、兔抗大鼠 LRP-1 多克隆抗体 (1:40 000, ab92544, Abcam)、兔抗大鼠 PTK2B 多克隆抗体 (1:1 000, ab-402, Sigma-Aldrich) 或 β -actin 抗体 (1:5 000, AP0060, Bioworld Technology Inc.), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 洗膜 3 次, 加二抗, 室温下孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次, 将免疫复合物和超敏发光液 (博士德, 武汉) 混合反应、曝光。用 Image J 1.46 进行积分光密度 (integral optical density, IOD) 分析, 以目的蛋白与 β -actin 比值作为目的蛋白相对表达含量。

1.8 免疫组织化学检测海马 LRP-1 和 PTK2B 免疫阳性物的表达 将包埋好的海马组织蜡块通过切

片机(RM2135, Feica, 德国)连续冠状切片, 片厚 4 μm , 每个蜡块选取 6 张切片, 捞片后用烤箱烤干。将切片放入二甲苯、酒精梯度脱水、脱蜡; 放入蒸馏水浸泡 10 min; 再放入 0.3% 的 H_2O_2 - 甲醇浸泡 30 min; 用 PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 将切片放入枸橼酸缓冲液微波炉大火加热 8 min、停止 7 min、中火加热 7 min、静置冷却至室温; 再用 PBS 洗 3 次(5 min/次); 滴加 BSA, 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 30 min; 分别滴加兔抗大鼠 PTK2B 多克隆抗体(1:100)或兔抗大鼠 LRP-1 多克隆抗体(1:100)于 4 $^\circ\text{C}$ 过夜; PBS 洗 3 次(5 min/次); 加对应的二抗, 室温孵育 30 min; 加 SABC, 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 30 min; PBS 洗 3 次(5 min/次); 用 DAB(博士德, 武汉)显色 13~15 min, 蒸馏水洗涤终止反应; 酒精、二甲苯梯度脱水、透明, 中性树脂封片。以细胞质或细胞膜出现棕黄色颗粒为阳性, 每张切片在高倍视野(40 \times)下随机选取海马 CA3 区 5 个视野, 用捷达成像分析系统(JD801, 江苏捷达)和 Image-pro plus 6.0 软件分析 LRP-1 和 PTK2B 免疫阳性反应物(LRP-1-LI, PTK2B-LI)的 IOD 值, 取其平均值进行分析。

1.9 qRT-PCR 检测海马 *ptk2b* mRNA 表达含量

用 PrimerBlast (NCBI, Bethesda, MD) 针对靶基因 *ptk2b* 设计引物和内参, *ptk2b*: 上游引物: 5'-CACAGT-GCAGACAGAGATCCA-3', 下游引物: 5'-CCCTAT-TCGCCCACTCAG-3'; 内参 GAPDH: 上游引物: 5'-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3', 下游引物: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'。使用 TRIzol 法提取 RNA, 加入反转录混合液, 42 $^\circ\text{C}$ 孵育 60 min、80 $^\circ\text{C}$ 孵育 10 min, 将 RNA 反转录成 cDNA, -20 $^\circ\text{C}$ 保存。根据标准曲线确定扩增效率, 确定样品质量 100 ng, 引物浓度 0.7 $\mu\text{mol/L}$, 用 10 μL 反应体系进行反应。预变性 94 $^\circ\text{C}$, 5 min, 变性 94 $^\circ\text{C}$, 30 s, 退火延伸 60 $^\circ\text{C}$, 60 s, 共 40 个循环。用 Bio-Rad CFX Manager (Bio-Rad, USA) 软件进行分析, 靶基因的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算。

1.10 统计学分析 所有数据均以 mean \pm SD 表示。应用 SPSS 24.0 软件对数据进行统计学分析。Morris 水迷宫定位航行试验中逃避潜伏期采用双因素方差分析(two-way ANOVA); 其余实验各组之间的数据比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, 当 $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠认知行为学检测结果

在小鼠的定位航行试验(图 1A)和空间探索试验(图 1B、C、D)中, 各对照组的各项结果之间均没有明显差异($P > 0.05$); 动物寻找平台的平均潜伏期, 在各实验组第 3 天开始出现统计学差异, 各实验组与各自对照组比较均明显延长(第三天, $F = 5.17$; 第四天, $F = 56.29$; 第五天, $F = 82.7$; 均 $P < 0.001$)。A β 诱导的认知障碍模型小鼠(A β + NS 组)与其对照组(NS 组)比较, 各行为学能力均明显降低(定位航行试验, $P < 0.001$; 穿越平台次数和穿越平台所在象限时间, 均 $P < 0.001$), 游泳轨迹杂乱。各实验组之间比较, 应用 PTK2B 抑制剂(A β + PF 组)可明显提高模型小鼠(A β + NS 组)的定位航行试验($P < 0.001$)和空间探索试验(穿越平台次数, $P < 0.01$; 穿越平台所在象限时间, $P < 0.001$)中的行为学能力, 游泳轨迹更接近平台; 而 PTK2B 激动剂(A β + PMA 组)(定位航行试验, $P < 0.001$; 穿越平台次数, $P < 0.01$; 穿越平台所在象限时间, $P < 0.05$)和 LRP-1 抑制剂(A β + RAP 组)(定位航行试验, $P < 0.001$; 穿越平台次数, $P < 0.01$; 穿越平台所在象限时间, $P < 0.05$)降低了模型小鼠的认知行为学能力, 游泳轨迹更加杂乱。

以上结果表明, 应用 PTK2B 抑制剂可提高模型小鼠的认知行为学功能, 而 LRP-1 抑制剂则降低其认知行为学功能。

2.2 血清中 A β_{1-42} 含量

应用 ELISA 检测血清中 A β_{1-42} 水平显示(图 2), 各对照组之间均没有统计学差异(均为 $P > 0.05$), 而 A β 模型小鼠(A β + NS 组)与其对照组(NS 组)比较, 血清中 A β_{1-42} 水平则明显降低($P < 0.001$)。各实验组之间比较, 应用 PTK2B 抑制剂后(A β + PF 组)血清中 A β_{1-42} 水平均较 A β + NS 组明显升高($P < 0.01$); PTK2B 激动剂的作用则相反($P < 0.05$); 而应用 LRP-1 抑制剂后(A β + RAP 组), 血清中 A β_{1-42} 水平则明显低于 A β + NS 组($P < 0.05$)。结果可见, A β 模型小鼠血清 A β_{1-42} 水平明显低于正常对照组, 抑制 PTK2B 可升高模型小鼠血清中的 A β_{1-42} 水平, 而抑制 LRP-1 则降低了模型小鼠血清中的 A β_{1-42} 水平。

2.3 海马组织 A β_{1-42} 、PTK2B、LRP-1 蛋白表达水平

用 Western blot 检测各组海马组织中 A β_{1-42} 、PTK2B 和 LRP-1 蛋白表达水平(图 3), 结果显示, 各对照组之间比较均没有统计学差异(均为 $P >$

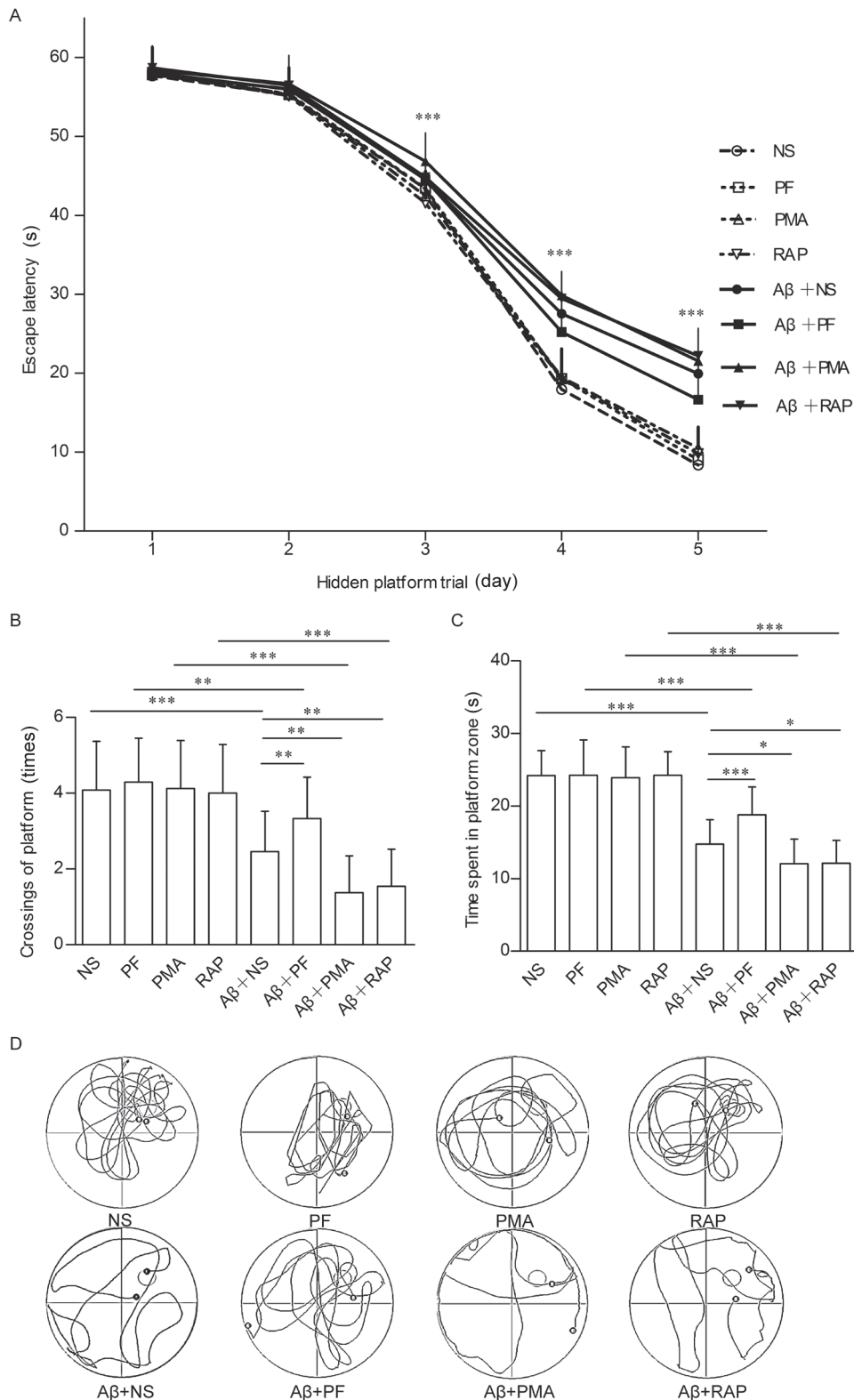


图 1. 小鼠水迷宫检测结果

Fig. 1. Results of the Morris water maze of mice in eight groups. *A*: The average of escape latency (s) of the mice in eight groups in hidden platform trials (3rd day: Two-way ANOVA: $F = 5.17$, $***P < 0.001$; 4th day: Two-way ANOVA: $F = 56.29$, $***P < 0.001$; 5th day: Two-way ANOVA: $F = 82.7$, $***P < 0.001$); *B*: The average of crossings (times) of platform of mice in eight groups; *C*: The average of time (s) spent in the platform quadrant of mice in eight groups; *D*: Representative images showing the swimming path of mice in eight groups in the probe trial. Data are presented as mean \pm SD ($n = 8$ /group). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

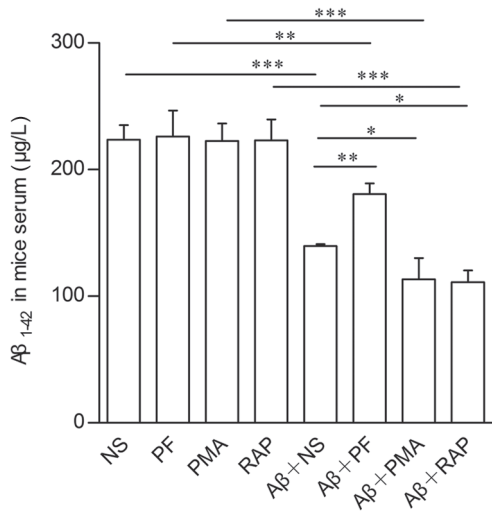


图 2. 小鼠血清中Aβ₁₋₄₂含量

Fig. 2. Levels of Aβ₁₋₄₂ in serum of the mice in eight groups detected by ELISA. Data are presented as mean ± SD ($n = 6$ /group). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

0.05)；而模型组的 Aβ₁₋₄₂ 和 PTK2B 蛋白表达水平均较其对照组 ($P < 0.001$) 明显升高，但 LRP-1 则降低 ($P < 0.001$)。各实验组之间比较，应用 PTK2B 抑制剂下调 PTK2B 表达后 ($P < 0.05$)，海马组织中 Aβ₁₋₄₂ 蛋白表达水平降低 ($P < 0.01$)，而 LRP-1 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$)；PTK2B 激动剂上调 PTK2B 表达后 ($P < 0.001$)，Aβ₁₋₄₂ 和 LRP-1 表达发生了相反的变化 (均 $P < 0.001$)；应用 LRP-1 抑制剂下调 LRP-1 表达后 ($P < 0.001$)，海马组织中 Aβ₁₋₄₂ 蛋白表达水平则升高 ($P < 0.001$)，但 PTK2B 表达水平没有显著变化 ($P > 0.05$)。可见，PTK2B 抑制剂可上调模型小鼠海马中的 LRP-1 表达，同时海马组织中 Aβ₁₋₄₂ 的含量降低；而下调 LRP-1 后海马中 Aβ₁₋₄₂ 的含量升高，但 PTK2B 表达则不受影响。

2.4 小鼠海马PTK2B和LRP-1免疫阳性细胞表达水平

PTK2B 和 LRP-1 免疫阳性细胞染色显微照片

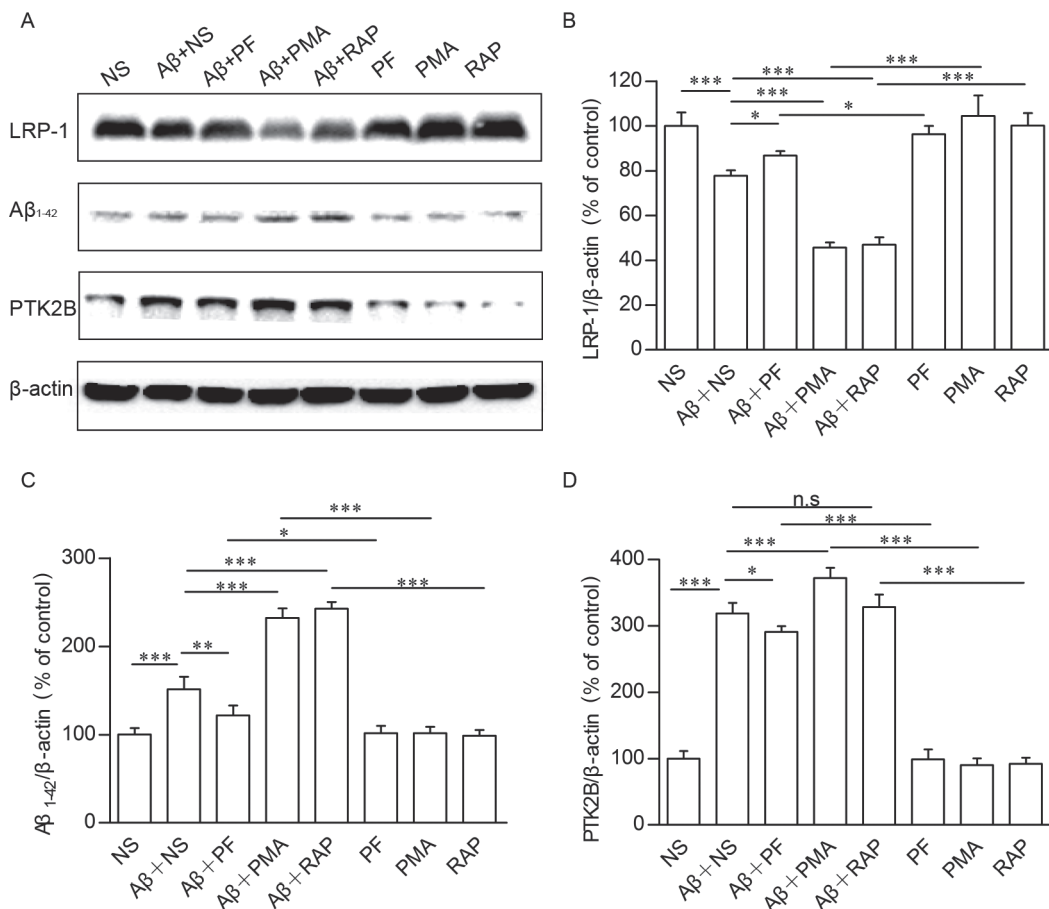


图 3. 小鼠海马组织Aβ₁₋₄₂、PTK2B、LRP-1蛋白表达含量

Fig. 3. Levels of LRP-1, Aβ₁₋₄₂ and PTK2B in hippocampus in eight groups detected by Western blot. A–D: Representative immunoblot images and levels of LRP-1, Aβ₁₋₄₂ and PTK2B normalized to β-actin and compared with the control group (%) in eight groups. Data are presented as mean ± SD ($n = 3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; n.s, no significant difference.

(图 4A、C) 和 PTK2B-LI、LRP-1-LI 的 IOD 结果显示 (图 4B、D), 几个指标的 IOD 值在各对照组之间比较均没有统计学差异 (均为 $P > 0.05$), 模型组海马组织 PTK2B-LI 的 IOD 值较其对照组明显升高 ($P < 0.001$), 而 LRP-1 则明显降低 ($P < 0.001$)。各实验组之间比较, 应用 PTK2B 抑制剂下调模型组 PTK2B 的表达后 ($P < 0.05$), LRP-1 的表达则明显升高 ($P < 0.05$); PTK2B 激动剂的作用则相反 (PTK2B, $P < 0.001$; LRP-1, $P < 0.05$); 应用 LRP-1 抑制剂可下调模型组 LRP-1 表达 ($P < 0.05$), 但 PTK2B-LI 表达没有显著变化 ($P > 0.05$)。可见, 下调模型小鼠海马组织中 PTK2B-LI 表达后, 上调了 LRP-1 表达; 而下调 LRP-1 后, PTK2B 的表达则不受影响。

2.5 小鼠海马组织 *ptk2b* mRNA 表达含量

各组海马组织中的 *ptk2b* mRNA 表达结果 (图 5) 显示, 各对照组之间比较没有统计学差异 (均为 $P > 0.05$), 而模型组海马 *ptk2b* mRNA 明显较其对照组升高 ($P < 0.001$)。各实验组之间比较, 与模型组比较, *ptk2b* mRNA 表达量在 PTK2B 抑制剂组降低 ($P < 0.05$), 在 PTK2B 激动剂组则升高 ($P < 0.001$), 而在 LRP-1 抑制剂组中则没有明显变化 ($P > 0.05$)。

3 讨论

近年来, 由于血液检测的侵入性小, 成本低, 也更容易获得等因素, 越来越多的研究将血液检测

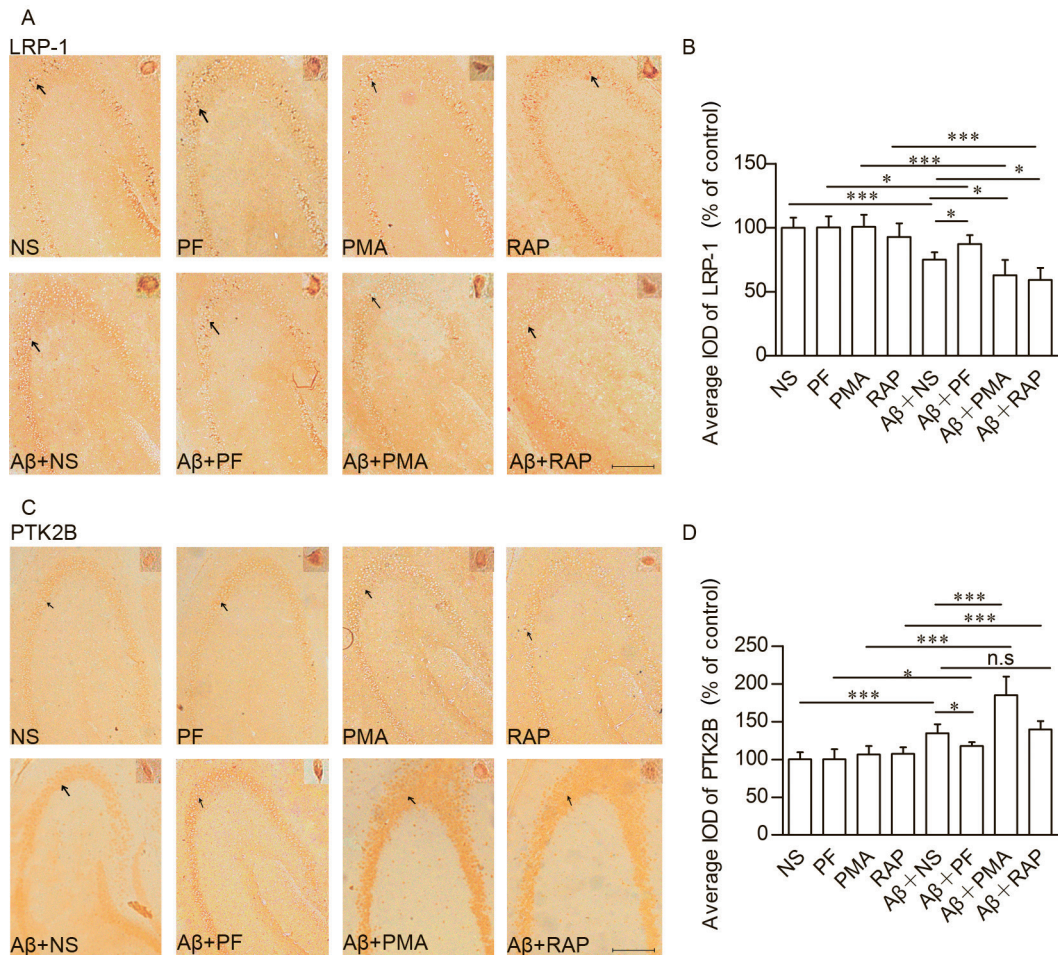


图 4. 小鼠海马PTK2B和LRP-1免疫阳性细胞表达水平

Fig. 4. Results of immunohistochemistry staining of LRP-1 and PTK2B in mouse hippocampus in eight groups. A–B: Representative images showing immunoreactivity and the average IODs compared with the control group (%) of LRP-1 in the hippocampus CA3 area in eight groups. C–D: Representative images showing immunoreactivity and the average IODs compared with the control group (%) of PTK2B in the hippocampus CA3 area in eight groups. The arrows indicate LRP-1 (A) or PTK2B (C) immunopositive cells. Scale bar, 250 μ m. Data are presented as mean \pm SD ($n = 6$ /group). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; n.s, no significant difference.

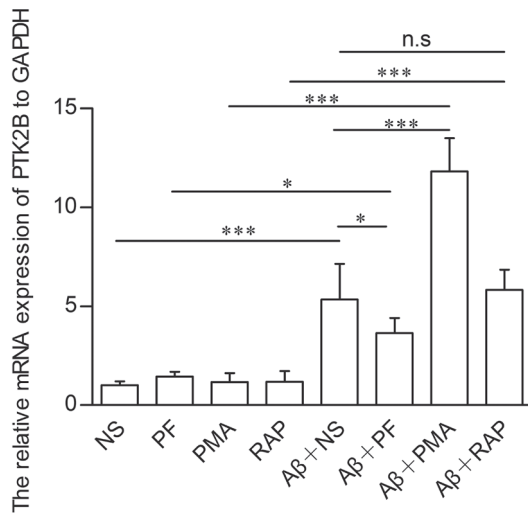


图 5. 小鼠海马组织 *ptk2b* mRNA 表达含量

Fig. 5. Results of mRNA expression of *ptk2b* in hippocampus of the mice in eight groups detected by qRT-PCR. Expression of *ptk2b* mRNA was normalized by GAPDH. Data are presented as mean ± SD ($n = 3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; n.s, no significant difference.

当做一种筛查 AD 的工具。研究显示, 较低的血液 $A\beta_{1-42}$ 含量与较高的 AD 风险之间存在着相关性^[16]。Nation 等对 539 名轻度认知功能障碍 (mild cognitive impairment, MCI) 患者和 503 名 AD 患者研究发现, MCI 和痴呆期的血浆 $A\beta_{1-42}$ 和脑脊液 $A\beta_{1-42}$ 之间存在相关性, 并与认知能力下降的风险相关, 该结果提示血浆和脑脊液中 $A\beta$ 变化可能因血-脑运输的机制发生了病理变化所致^[17]。Zlokovic 等^[18] 的在体研究显示, 在小鼠尾状核注射同位素标记的 $A\beta$, 血浆中发现有完整的 $A\beta$ 标记物; 而敲除 BBB 的 LRP-1, 动物脑内 $A\beta$ 含量增加 1 倍。

脑内 $A\beta$ 的清除由 LRP-1 将 $A\beta$ 由脑组织转运到外周血液并清除出体内^[5, 6]。本研究结果显示, 在 $A\beta$ 诱导的认知功能障碍小鼠海马组织中 $A\beta_{1-42}$ 水平升高, 血液中的 $A\beta_{1-42}$ 水平则降低, 海马组织中 LRP-1 的表达也下降; 而应用 LRP-1 特异性抑制剂 RAP 下调海马中 LRP-1 的表达后, 血液中 $A\beta_{1-42}$ 则进一步下降, 而海马中 $A\beta_{1-42}$ 则上升。因此我们推测, 在认知功能障碍小鼠血液和海马组织中 $A\beta_{1-42}$ 水平的变化可能与转运 $A\beta$ 流出的蛋白 LRP-1 的变化有关。

研究显示, 侧脑室应用 $A\beta_{1-42}$ 构建的认知障碍模型大鼠海马组织中 $A\beta_{1-42}$ 水平明显升高, 同时海

马 *ptk2b* 基因的 mRNA 和 PTK2B 蛋白表达水平均明显升高^[13, 14]。Liu 等研究显示, AD 是一种全身性疾病, 除了中枢器官变性外, 很多外周器官也发生了变性和 $A\beta$ 增加, 而临床上利用血液透析可有效地降低 $A\beta$ 水平^[19]。由此我们推测, AD 的认知功能障碍可能是 *ptk2b* 基因过表达, 引发弥漫性、全身的可溶性 $A\beta$ 变化所致。那么, 由 AD 的易感基因 *ptk2b* 编码的 PTK2B 蛋白表达水平异常是否是导致模型鼠海马组织和血液中 $A\beta$ 变化的原因, 而 PTK2B 与 LRP-1 之间存在什么关系, 目前还不清楚。

本研究结果显示, 应用 PF431396 抑制 PTK2B 后认知障碍模型小鼠海马组织中的 LRP-1 蛋白表达水平上调, 同时, 小鼠海马组织 $A\beta_{1-42}$ 水平下降, 而其血液中的 $A\beta_{1-42}$ 水平则升高, 小鼠的认知行为学功能也改善了; 应用 LRP-1 抑制剂 RAP 下调模型小鼠海马组织 LRP-1 表达后, 其海马中 $A\beta_{1-42}$ 水平升高而其血液中的 $A\beta_{1-42}$ 水平则降低, 但海马中的 PTK2B 表达没有受影响, 同时其认知行为学功能也降低了。各组的 *ptk2b* 基因的 mRNA 表达结果与 PTK2B 蛋白的表达结果一致。因此我们推测, *ptk2b* 基因表达产物 PTK2B 蛋白可能是通过下调 LRP-1, 从而降低了脑组织中的 $A\beta_{1-42}$ 向血液的排出, 导致脑组织中 $A\beta_{1-42}$ 聚集, 进而使其行为学功能下降。

PTK2B 是如何调控 LRP-1 的? 研究显示, *ptk2b* 基因的表达产物 Pyk2 (PTK2B) 与 LRP-1 共同在某些心血管活动的发生中发挥重要作用^[20]。非受体酪氨酸激酶 Src 可通过调控 LRP 活性负性调控 Wnt 信号通路从而在疾病中发挥作用^[21]。也有研究显示, 在人血管平滑肌细胞 (human vascular smooth muscle cell, hVSMC) 中, 缺氧可导致 PTK2B 持续磷酸化, 同时 LRP-1 过表达, 使用小 RNA 干扰技术敲除 LRP-1 或使用 Src 激酶抑制剂 PP2 治疗 hVSMC, 可削弱缺氧诱导的 PTK2B 磷酸化^[22]。可见, PTK2B 与 LRP-1 在疾病的发生过程中具有相互作用, 但是, 二者的关系是正相关还是负相关还存在争议。同时, 目前还没有 PTK2B 与 LRP-1 在 AD 中直接作用关系的报道。研究显示, 应激或老化等因素的刺激可激活 AD 的易感基因 *ptk2b*, 使其表达产物 PTK2B 水平升高^[23], 通过酪氨酸激酶信号通路降低 LRP-1 蛋白磷酸化水平, 从而下调 LRP-1 表达水平^[24]; 同时, 在 AD 动物模型中, 由于 BBB 功能的病理学变化, 其 LRP-1 水平下调^[5], 导致脑组织中的 $A\beta_{1-42}$

水平升高, 进一步上调 PTK2B^[13], 从而正反馈调控 AD 的发生。

综上所述, 本研究结果显示, 在 A β 诱导的认知功能障碍小鼠海马组织中 *ptk2b* 基因的 mRNA 及 PTK2B 蛋白的表达明显增加, 而 LRP-1 表达水平下降, 提示 PTK2B 通过下调 BBB 转运 A β 流出的 LRP-1 蛋白表达水平而导致脑组织中 A β 聚集, 进而抑制其认知行为学功能。但是, PTK2B 如何调控 A β 转运清除机制, 还需要进一步的研究探讨。

参考文献

- 1 Palmqvist S, Insel PS, Stomrud E, Janelidze S, Zetterberg H, Brix B, Eichenlaub U, Dage JL, Chai X, Blennow K, Mattsson N, Hansson O. Cerebrospinal fluid and plasma biomarker trajectories with increasing amyloid deposition in Alzheimer's disease. *EMBO Mol Med* 2019; 11(12): e11170.
- 2 Tu S, Okamoto S, Lipton SA, Xu H. Oligomeric A β -induced synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 2014; 9: 48.
- 3 Dunkelmann T, Teichmann K, Ziehm T, Schemmert S, Frenzel D, Tusche M, Dammers C, Jürgens D, Langen KJ, Demuth HU, Shah NJ, Kutzsche J, Willuweit A, Willbold D. A β oligomer eliminating compounds interfere successfully with pEA β (3-42) induced motor neurodegenerative phenotype in transgenic mice. *Neuropeptides* 2018; 67: 27-35.
- 4 Shibata M, Yamada S, Kumar SR, Calero M, Bading J, Frangione B, Holtzman DM, Miller CA, Strickland DK, Ghiso J, Zlokovic BV. Clearance of Alzheimer's amyloid- β 1-40 peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J Clin Invest* 2000; 106(12): 1489-1499.
- 5 Marques MA, Kulstad JJ, Savard CE, Green PS, Lee SP, Craft S, Watson GS, Cook DG. Peripheral amyloid- β levels regulate amyloid- β clearance from the central nervous system. *J Alzheimers Dis* 2009; 16(2): 325-329.
- 6 Zlokovic BV. Clearing amyloid through the blood-brain barrier. *J Neurochem* 2004; 89(4): 807-811.
- 7 Osgood D, Miller MC, Messier AA, Gonzalez L, Silverberg GD. Aging alters mRNA expression of amyloid transporter genes at the blood-brain barrier. *Neurobiol Aging* 2017; 57: 178-185.
- 8 Cecon E, Lhomme T, Maurice T, Luka M, Chen M, Silva A, Wauman J, Zabeau L, Tavernier J, Prévot V, Dam J, Jockers R. Amyloid beta peptide is an endogenous negative allosteric modulator of leptin receptor. *Neuroendocrinology* 2021; 111(4): 370-387.
- 9 Wang X, Lopez OL, Sweet RA, Becker JT, DeKosky ST, Barmada MM, Demirci FY, Kamboh MI. Genetic determinants of disease progression in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2015; 43(2): 649-655.
- 10 Salazar SV, Cox TO, Lee S, Brody AH, Chyung AS, Haas LT, Strittmatter SM. Alzheimer's disease risk factor Pyk2 mediates amyloid- β -induced synaptic dysfunction and loss. *J Neurosci* 2019; 39(4): 758-772.
- 11 Brys Z, Pluhar A, Kis JT, Buda B, Szabo A. Network analysis of neurotransmitter related human kinase genes: possible role of SRC, RAF1, PTK2B? *Neuropsychopharmacol Hung* 2013; 15(3): 165-171.
- 12 Li C, Götz J. Pyk2 is a novel Tau tyrosine kinase that is regulated by the tyrosine kinase Fyn. *J Alzheimers Dis* 2018; 64(1): 205-221.
- 13 Liu Z, Hao KM, Wang HY, Qi WX. Histone deacetylase-6 modulates amyloid beta-induced cognitive dysfunction rats by regulating PTK2B. *Neuroreport* 2020; 31(10): 754-761.
- 14 Wang HY, Liu Z, Wang YL, Qi WX. Nitric oxide modulates the cognitive function of beta-amyloid cognitive dysfunction rats by S-nitrosylation of histone deacetylase. *Acta Medica Mediterr* 2019; 35: 2751-2759.
- 15 Liu Y, Du T, Zhang W, Lu W, Peng Z, Huang S, Sun X, Zhu X, Chen C, Qian L, Wen L, Xu P, Zhang Y. Modified Huang-Lian-Jie-Du decoction ameliorates A β synaptotoxicity in a murine model of Alzheimer's disease. *Oxid Med Cell Longev* 2019; 2019: 8340192.
- 16 Yaffe K, Weston A, Graff-Radford NR, Satterfield S, Simonsick EM, Younkin SG, Younkin LH, Kuller L, Ayonayon HN, Ding J, Harris TB. Association of plasma beta-amyloid level and cognitive reserve with subsequent cognitive decline. *JAMA* 2011; 305(3): 261-266.
- 17 Nation DA, Sweeney MD, Montagne A, Sagare AP, D'Orazio LM, Pachicano M, Sepelband F, Nelson AR, Buennagel DP, Harrington MG, Benzinger TLS, Fagan AM, Ringman JM, Schneider LS, Morris JC, Chui HC, Law M, Toga AW, Zlokovic BV. Blood-brain barrier breakdown is an early biomarker of human cognitive dysfunction. *Nat Med* 2019; 25(2): 270-276.
- 18 Zlokovic BV, Deane R, Sagare AP, Bell RD, Winkler EA. Low-density lipoprotein receptor-related protein-1: a serial clearance homeostatic mechanism controlling Alzheimer's amyloid β -peptide elimination from the brain. *J Neurochem* 2010; 115(5): 1077-1089.
- 19 Liu YH, Giunta B, Zhou HD, Tan J, Wang YJ. Immunotherapy for Alzheimer disease: the challenge of adverse effects. *Nat Rev Neurol* 2012; 8(8): 465-469.
- 20 Grossi M, Bhattachariya A, Nordström I, Turczyńska KM, Svensson D, Albinsson S, Nilsson BO, Hellstran P. Pyk2 inhibition promotes contractile differentiation in arterial smooth muscle. *J Cell Physiol* 2017; 232(11): 3088-3102.
- 21 Qu Y, Dang S, Hou P. Gene methylation in gastric cancer.

- Clin Chim Acta 2013; 424: 53–65.
- 22 Revuelta-López E, Castellano J, Roura S, Gálvez-Montón C, Nasarre L, Benitez S, Bayes-Genis A, Badimon L, Llorente-Cortés V. Hypoxia induces metalloproteinase-9 activation and human vascular smooth muscle cell migration through low-density lipoprotein receptor-related protein 1-mediated Pyk2 phosphorylation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013; 33(12): 2877–2887.
- 23 Yan Y, Zhao A, Qui Y, Li Y, Deng Y, Yang R, Wang Y, Xu W. Genetic association of FERMT2, HLA-DRB1, CD2AP, and PTK2B polymorphisms with Alzheimer's disease risk in the southern Chinese population. *Front Aging Neurosci* 2020; 12: 16.
- 24 Gali CC, Fanaee-Danesh E, Zandl-Lang M, Albrecher NM, Tam-Amersdorfer C, Stracke A, Sachdev V, Reichmann F, Sun Y, Avdili A, Reiter M, Kratky D, Holzer P, Lass A, Kandimalla KK, Panzenboeck U. Amyloid-beta impairs insulin signaling by accelerating autophagy-lysosomal degradation of LRP-1 and IR- β in blood-brain barrier endothelial cells in vitro and in 3XTg-AD mice. *Mol Cell Neurosci* 2019; 99: 103390.