

# S24795上调星形胶质细胞内源性Cryab 抑制A $\beta$ 聚集的研究

任真奎<sup>1</sup> 杨梅<sup>1</sup> 官志忠<sup>1,2</sup> 禹文峰<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>贵州医科大学, 医学分子生物学重点实验室, 贵阳 550004; <sup>2</sup>贵州医科大学病理学教研室, 贵阳 550004)

**摘要** 该文探讨了S24795激活星形胶质细胞 $\alpha 7$ 胆碱能受体( $\alpha 7$  nicotinic receptors,  $\alpha 7$  nAChRs)上调内源性 $\alpha B$ -晶状体蛋白( $\alpha B$ -crystallin, Cryab)并抑制 $\beta$ 淀粉样蛋白(amyloid  $\beta$ , A $\beta$ )集聚的现象及其形成机制。分离24 h内新生乳鼠大脑皮质培养原代星形胶质细胞并鉴定; 体外制备A $\beta_{1-42}$ 寡聚体; 将细胞分组处理。用Western blot检测细胞内Cryab、Phospho-Akt、A $\beta$ 寡聚体的水平。结果显示, S24795可以显著上调星形胶质细胞内源性Cryab蛋白质, 该上调效应能被(methyllycaconitine, MLA)或LY294002抑制; S24795能够显著上调磷酸化Akt水平上调, 该上调效应能被MLA或LY294002抑制; 在细胞裂解液及培养基中, S24795显著增强星形胶质细胞对A $\beta$ 集聚的抑制作用, 该效应被LY294002抑制。该研究结果提示, 磷脂酰肌醇3激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)信号通路可能参与S24795激活星形胶质细胞 $\alpha 7$  nAChRs上调内源性Cryab的表达, 从而进一步抑制A $\beta$ 集聚。这为进一步研究S24795抑制A $\beta$ 集聚的可能机制提供了实验基础。

**关键词** 星形胶质细胞; 阿尔茨海默病;  $\alpha 7$ 胆碱能受体; S24795; B-晶状体蛋白;  $\beta$ 淀粉样蛋白

## S24795 Inhibit A $\beta$ Aggregation via Upregulation of Endogenous Cryab in Astrocytes

Ren Zhenkui<sup>1</sup>, Yang Mei<sup>1</sup>, Guan Zhizhong<sup>1,2</sup>, Yu Wenfeng<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Key Lab of Medical Molecular Biology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China;

<sup>2</sup>The Department of Pathology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

**Abstract** The aim of this study was to investigate the possible mechanism of S24795 on amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ) aggregation via activation  $\alpha 7$  nicotinic receptors ( $\alpha 7$  nAChRs) as well as upregulation of endogenous  $\alpha B$ -crystallin (Cryab). Primary astrocytes were separated from neonatal SD rat cerebral cortex and cultured *in vitro*. A $\beta_{1-42}$  oligomers were prepared *in vitro*. Astrocytes were divided into different groups and treated with drugs. The protein levels of Cryab, phosphorylated-Akt and A $\beta$  oligomers in the cells were detected by Western blot. Our results showed that S24795 could significantly increase the protein level of endogenous Cryab in astrocytes. The effect of upregulation of endogenous Cryab by S24795 was significantly inhibited by  $\alpha 7$  nAChR antagonist-

收稿日期: 2016-06-18 接受日期: 2016-08-29

国家自然科学基金(批准号: 81360199)、教育部科学技术研究项目(批准号: 213032A)、贵州省国际科技合作计划项目(批准号: 黔科合外G字[2013]7026号)、贵州省创新计划项目(批准号: 黔教合协同创新中心[2014]06)和2015年贵州省普通高等学校地方病和少数民族疾病防控创新团队资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0851-86762259, E-mail: wenfengyu2013@126.com

Received: June 18, 2016 Accepted: August 29, 2016

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81360199), the Scientific Research Project Fund of Ministry of Education (Grant No.213032A), the International Cooperative Project of Science and Technology Department of Guizhou Province (Grant No.[2013]7026), Innovation Project of Guizhou Province (Grant No.[2014]06) and Guizhou Province Ordinary Higher School Endemic Disease and Minority Disease Prevention and Control Innovation Team in 2015

\*Corresponding author. Tel: +86-851-86762259, E-mail: wenfengyu2013@126.com

网络出版时间: 2016-10-31 13:39:49 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20161031.1339.006.htm>

MLA. After PI3K signaling pathway was blocked by LY294002, the effect of upregulation of endogenous Cryab by S24795 was significantly inhibited. S24795 could significantly increase phosphorylated-Akt in astrocytes. The effect of upregulation of phosphorylated-Akt by S24795 was significantly inhibited by  $\alpha 7$  nAChRs antagonist-MLA. After PI3K signaling pathway was blocked by LY294002, the effect of upregulation of phosphorylated-Akt by S24795 was significantly inhibited. In cell lysate and medium, S24795 could significantly enhance astrocyte to inhibit A $\beta$  aggregation. After PI3K signaling pathway was blocked by LY294002, the effect of inhibition A $\beta$  aggregation by S24795 was significantly inhibited. Together, these data indicated that S24795 could significantly inhibit A $\beta$  aggregation via activation  $\alpha 7$  nAChRs as well as upregulation of endogenous Cryab in astrocytes. PI3K signaling pathway was likely to be involved in this process. These results provided experimental data in the study of possible mechanism by which S24795 inhibits A $\beta$  aggregation.

**Keywords** astrocytes; Alzheimer's disease;  $\alpha 7$  nAChRs; S24795;  $\alpha$ B-crystallin; amyloid  $\beta$

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种以进行性记忆和认知功能障碍为特征的中枢神经系统退行性疾病。 $\beta$ 淀粉样蛋白(amyloid  $\beta$ , A $\beta$ )聚集是AD核心发病机制, A $\beta$ 的聚集不仅可以导致神经细胞凋亡, 也可以破坏突触结构和功能, 从而导致记忆和认知功能障碍<sup>[1-3]</sup>。此外, A $\beta$ 的聚集能够激活星形胶质细胞释放细胞因子、炎性因子从而导致脑内的神经炎症<sup>[4]</sup>。因此, 阻止A $\beta$ 的聚集及其发生和发展, 对防治AD有重要意义。

星形胶质细胞 $\alpha 7$ 胆碱能受体( $\alpha 7$  nicotinic receptors,  $\alpha 7$  nAChRs)广泛分布于大脑皮质和海马的神经细胞、星形胶质细胞和小胶质细胞<sup>[5]</sup>。在AD的发病机制中,  $\alpha 7$  nAChRs通过与A $\beta$ 的相互作用而扮演了重要的病理角色<sup>[6]</sup>。近年来的研究表明,  $\alpha 7$  nAChRs可能是拮抗A $\beta$ 神经毒性的一个重要靶点<sup>[7]</sup>。

B-晶状体蛋白( $\alpha$ B-crystallin, Cryab)在大脑内具有许多重要的生理功能, 如抗炎、抗凋亡和神经保护等<sup>[8-9]</sup>。在AD大脑中, 星形胶质细胞表达的Cryab蛋白质明显上调, 并且这些上调的Cryab蛋白紧密地分布在A $\beta$ 蛋白沉积周围<sup>[10-11]</sup>。Cryab能够通过直接与A $\beta$ 直接结合等方式有效地阻止A $\beta$ 的聚集及其细胞毒性作用<sup>[12-13]</sup>。

S24795是法国诗维雅公司从一系列溴苯基吡啶衍生物提取的一种 $\alpha 7$  nAChRs部分激动剂。在体外实验中发现, S24795预处理后, 能减少A $\beta$ 与 $\alpha 7$  nAChRs之间的相互作用和抑制A $\beta$ 诱导的Tau磷酸化, 并且可能缓解A $\beta$ 介导的突触功能障碍<sup>[14-15]</sup>。A $\beta$ 与 $\alpha 7$  nAChRs之间具有高亲和力, S24795促进A $\beta$ 从A $\beta$ - $\alpha 7$  nAChR复合物中释放从而恢复 $\alpha 7$  nAChRs的部分功能<sup>[16]</sup>。但在星形胶质细胞的模型中, S24795是否能增强星形胶质细胞对A $\beta$ 聚集的抑制及其机制

尚不清楚。

我们的前期研究结果证实, 用S24795激活星形胶质细胞 $\alpha 7$  nAChRs能够显著增强星形胶质细胞对A $\beta$ 聚集的抑制, 但具体调控机制不清楚。基于Cryab蛋白质特性, 我们推测星形胶质细胞内源Cryab可能是S24795介导A $\beta$ 聚集的中间环节。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器和试剂

胎牛血清及DMEM培养基购于Gibco公司(美国)。A $\beta$ <sub>1-42</sub>肽、六氟异丙醇、DMSO、S24795、methyllycaconitine(MLA)购于Sigma公司(美国)。青-链霉素及胰蛋白酶购于Hyclone公司(美国)。6E10抗体购自BioLegend公司(美国)。鼠抗Cryab( $\alpha$ B-crystallin)单克隆抗体购自Abcam公司(美国)。辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗兔、抗鼠二抗; 鼠抗 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)单克隆抗体。PI3K/Akt信号通路的抑制剂LY294002及相关位点的抗体购于Cell Signaling Technology公司(美国)。抗体稀释液、封闭液、聚丙烯酰胺凝胶购自碧云天生物技术公司。高效显影胶片、显影液、定影液购自柯达公司。ECL-Plus试剂及聚乙烯二氟(PVDF)膜购于Millipore公司(美国)。BCA蛋白质浓度测定试剂盒购自Thermo公司(美国)。实验中所用仪器包括: 倒置显微镜(Olympus)、-80 °C冰箱(美国Thermo公司)、高速离心机(德国Eppendorf公司)、ELX 800酶标仪(美国Bio-tek公司)以及CO<sub>2</sub>培养箱(日本SANYO公司)。

### 1.2 A $\beta$ <sub>1-42</sub>寡聚体的制备

参照Klein等<sup>[17]</sup>和Ryan等<sup>[18]</sup>体外制备A $\beta$ <sub>1-42</sub>寡聚体的方法, 将预冷的六氟异丙醇(hexafluoroiso-

propanol, HFIP)加入A $\beta_{1-42}$ 粉末中,使其充分溶解后常温孵育60 min。随后为使HFIP挥发完全,将其放在常温下通风橱过夜。将干燥的肽膜于-80 °C保存,使用时取出,用DMSO溶解,再用含SDS的PBS稀释后,4 °C存放2周,冰冻高速离心(10 min、14 000  $\times$ g),上清液即为寡聚体。应用蛋白质印迹法鉴定我们制备的A $\beta_{1-42}$ 寡聚体情况,结果显示,A $\beta_{1-42}$ 寡聚体中既含有低分子量的如二聚体、三聚体等,也有高分子量的如九聚体、十二聚体等不同聚集形式。制备好的A $\beta_{1-42}$ 寡聚体会随着-80 °C条件下存放时间的变长而形成分子量更高的集聚体。在我们制备的A $\beta_{1-42}$ 寡聚体的实验条件下,98 kDa A $\beta_{1-42}$ 寡聚体是A $\beta$ 的主要聚积形式。

### 1.3 星形胶质细胞培养传代及鉴定

参照Mccarthy等<sup>[19]</sup>和Schildge等<sup>[20]</sup>的方法并改进,全部动物实验相关操作通过贵州医科大学伦理委员会批准。取24 h内新生SD(Sprague-Dawley)乳鼠的大脑皮质(由贵州医科大学动物实验中心提供),动物合格证号为SCXK(黔)2012-0001。将其大脑皮质剪成泥状,消化漂洗后,加入含1%双抗(青霉素100 U/mL,链霉素100 U/mL)、10% FBS的高糖DMEM培养基,吹打成细胞悬液,接种至培养瓶,5% CO<sub>2</sub>、37 °C恒温培养。24 h后换液,之后每3 d换1次液直至细胞铺满瓶底。培养8~9 d,纯化并传3~4代。胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)细胞免疫荧光的方法对星形胶质细胞进行染色鉴定细胞纯度。

### 1.4 分组及细胞处理

将培养好的星形胶质细胞纯化、传代并鉴定后,以 $5 \times 10^5$ 的密度种入6孔板内。将细胞分为对照组、S24795组、S24795+MLA组、A $\beta_{1-42}$ 组、S24795+A $\beta_{1-42}$ 组、S24795+LY294002组、S24795+LY294002+A $\beta_{1-42}$ 组。S24795+MLA组,预先加入MLA处理2 h,随后加入S24795; S24795+LY294002+A $\beta_{1-42}$ 组,预先加入LY294002处理2 h,随后加入S24795孵育18 h,换液后,用DMEM培养基吹洗3次,加入终浓度为1  $\mu$ mol/L的A $\beta_{1-42}$ 寡聚体继续在37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养24 h。

### 1.5 蛋白印迹法

从6孔板中收集细胞,加入细胞裂解液裂解(100  $\mu$ L/孔),在4 °C、12 000 r/min离心20 min后取上清,将提取的蛋白质用BCA蛋白质定量试剂盒定量

后分装保存(-80 °C),用Western blot方法检测Cryab、P-Akt(ser473)及A $\beta$ 蛋白质水平。12%的梯度胶电泳,蛋白质样品分离后转移至PVDF膜,5% BSA室温封闭1 h, TBS-T漂洗(10 min $\times$ 3次),加入相应一抗,4 °C孵育过夜, TBS-T漂洗(10 min $\times$ 3次)后加入辣根过氧化物酶标记二抗室温孵育1 h, TBS-T漂洗(10 min $\times$ 3次)后曝光。用Image J软件分析曝光结果,以 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)为内对照。

### 1.6 统计学分析

所有结果应用SPSS 22.0软件进行统计学分析,两组间比较采用 $t$ 检验,多组间采用One-Way ANOVA分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 S24795显著增强星形胶质细胞对A $\beta$ 聚集的抑制作用

在原代星形胶质细胞培养模型上,用 $\alpha 7$  nAChRs激动剂S24795处理细胞,能够显著增加星形胶质细胞对细胞内和细胞培养液内A $\beta$ 聚集的抑制作用(图1)。

### 2.2 S24795显著上调星形胶质细胞内源性Cryab蛋白质水平

课题组前期结果显示,S24795以5  $\mu$ mol/L刺激星形胶质细胞后,对Cryab的上调作用最为明显。以5  $\mu$ mol/L S24795处理星形胶质细胞在不同的时间段(6、12、18和24 h),对Cryab的上调效应表现出时间依赖性并且18 h达到稳定阶段,选择该时间(18 h)、浓度(5  $\mu$ mol/L)作为后继研究。S24795刺激后Cryab水平升高(图2)。

### 2.3 S24795通过激活 $\alpha 7$ 胆碱能受体而上调Cryab蛋白质水平

S24795刺激星形胶质细胞后 $\alpha 7$  nAChRs水平上调,为了探索S24795是否通过激活 $\alpha 7$  nAChRs而上调Cryab。本研究选取 $\alpha 7$  nAChRs的特异性阻断剂MLA,以(50、100和150 nmol/L) MLA预先处理星形胶质细胞2 h后,再加入5  $\mu$ mol/L S24795共同孵育18 h。MLA刺激星形胶质细胞后S24795上调内源性Cryab的效应受到抑制(图3)。

### 2.4 PI3K/Akt信号通路参与S24795激活 $\alpha 7$ nAChRs上调星形胶质细胞内源性Cryab蛋白质

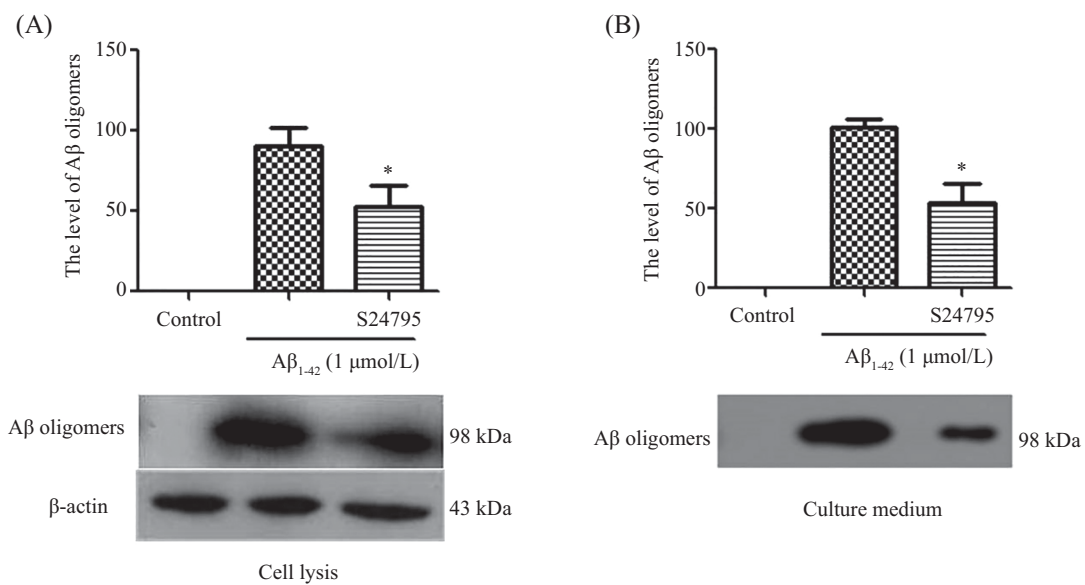
以5  $\mu$ mol/L S24795处理星形胶质细胞在不同的时间段(5、10、20和30 min),对P-Akt(ser473)蛋白质的上调效应表现出时间依赖性并且20 min达到稳

定阶段, 该时间(20 min)被选择作为后继实验(图4)。该上调作用被PI3K/Akt信号通路的抑制剂LY294002或 $\alpha 7$  nAChRs的阻断剂MLA抑制(图5)。

为进一步探索PI3K/Akt信号通路的抑制剂LY294002能否抑制星形胶质细胞内源性Cryab的上调。用LY294002预先处理星形胶质细胞2 h, 再加入S24795共同孵育18 h。星形胶质细胞内源性Cryab水平受到下调(图6)。

## 2.5 S24795显著增强星形胶质细胞对A $\beta$ 聚集的抑制作用与PI3K/Akt信号通路的激活相关

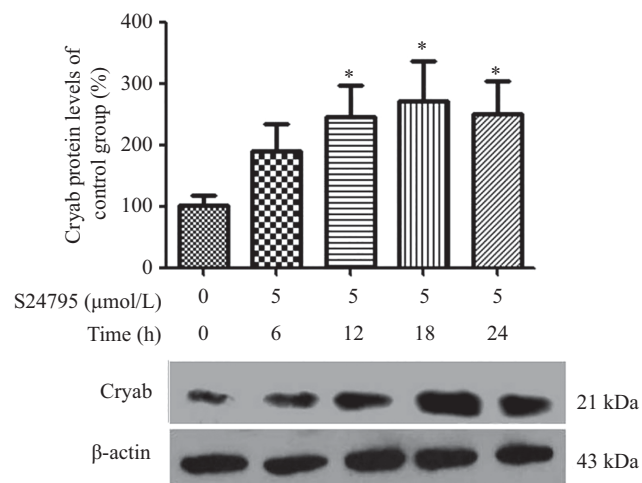
分别收集细胞裂解液及培养基。与A $\beta_{1-42}$ 组相比, (S24795+A $\beta_{1-42}$ )组的A $\beta$ 显著下调( $P < 0.01$ ); 与(S24795+A $\beta_{1-42}$ )组相比, (S24795+A $\beta_{1-42}$ +LY294002)组的A $\beta$ 显著上调( $P < 0.01$ )(图7)。此结果说明, S24795激活 $\alpha 7$  nAChRs之后, 通过PI3K/Akt信号通路上调Cryab, 从而抑制A $\beta$ 的集聚。



A: 蛋白印迹法检测细胞裂解液中A $\beta$ 蛋白质水平,  $*P < 0.05$ , 与A $\beta_{1-42}$ 组相比; B: 蛋白印迹法检测细胞培养液中A $\beta$ 蛋白质水平,  $*P < 0.05$ , 与A $\beta_{1-42}$ 组相比。  
A: A $\beta$  protein level detected by Western blot in cell lysis solution,  $*P < 0.05$  vs A $\beta_{1-42}$  group; B: A $\beta$  protein level detected by Western blot in cell culture medium,  $*P < 0.05$  vs A $\beta_{1-42}$  group.

图1 S24795对星形胶质细胞抑制A $\beta$ 聚集的影响

Fig.1 The effect of S24795 on the aggregation of A $\beta$  in astrocytes

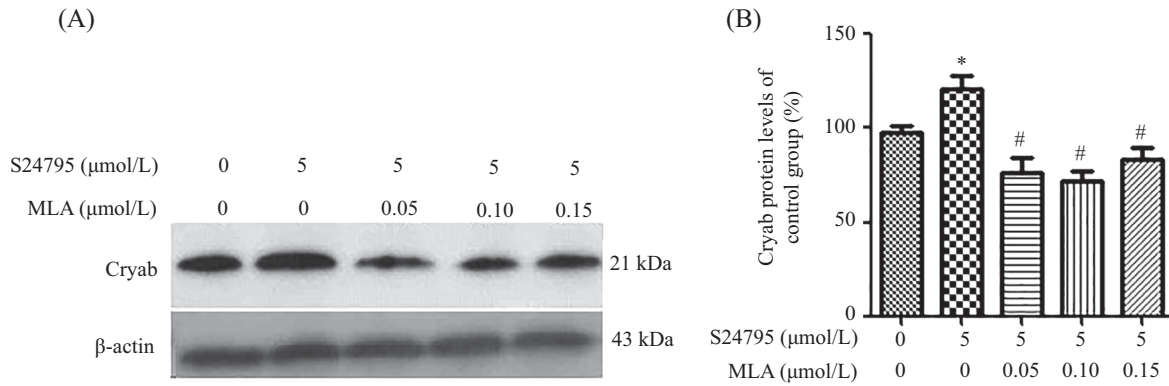


蛋白印迹法检测内源性Cryab蛋白质水平。  $*P < 0.05$ , 与对照组相比。

Cryab protein level was detected by Western blot.  $*P < 0.05$  vs control group.

图2 蛋白印迹法验证内源性Cryab蛋白质水平的上调

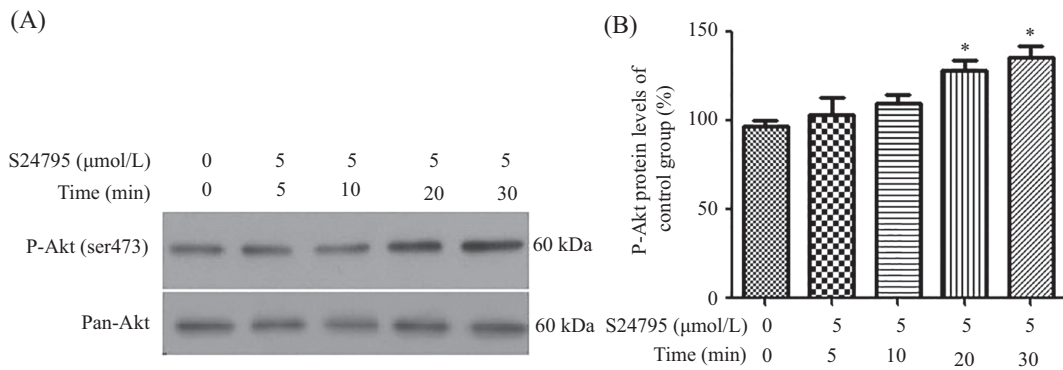
Fig.2 The up-regulation of endogenous Cryab protein level was confirmed by Western blot analysis



A、B: 蛋白印迹法检测MLA对内源性Cryab蛋白质水平的影响。\* $P < 0.05$ , 与对照组相比; # $P < 0.05$ , 与S24795组相比。  
 A,B: the effect of MLA on endogenous Cryab protein level was detected by Western blot. \* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs S24795 group.

图3 蛋白印迹法验证MLA抑制内源性Cryab蛋白质水平的表达

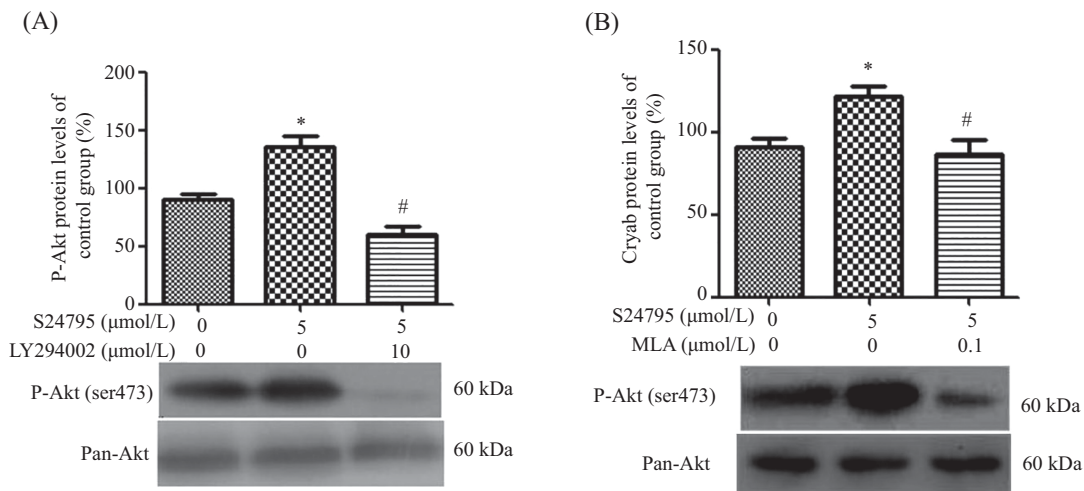
Fig.3 MLA inhibits the expression of endogenous Cryab protein by Western blot analysis



A、B: 蛋白印迹法检测S24795对P-Akt蛋白质水平的影响。\* $P < 0.05$ , 与对照组相比。  
 A,B: the effect of S24795 on P-Akt protein level was detected by Western blot. \* $P < 0.05$  vs control group.

图4 S24795上调P-Akt(ser473)蛋白质水平

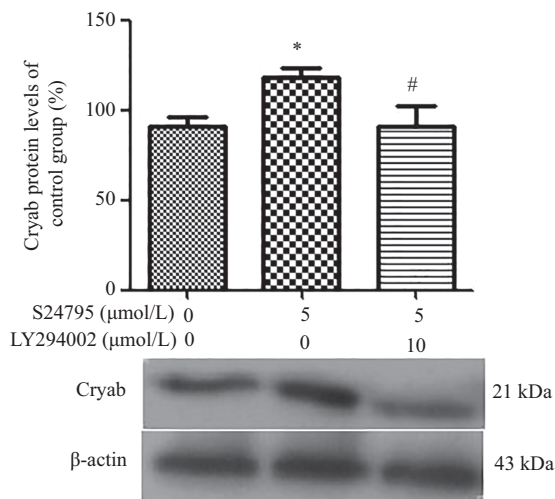
Fig.4 S24795 upregulated the protein level of P-Akt (ser473)



A、B: 蛋白印迹法检测P-Akt蛋白质的表达水平。\* $P < 0.05$ , 与对照组相比; # $P < 0.05$ , 与S24795组相比。  
 A,B: the expression level of P-Akt protein was detected by Western blot. \* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs S24795 group.

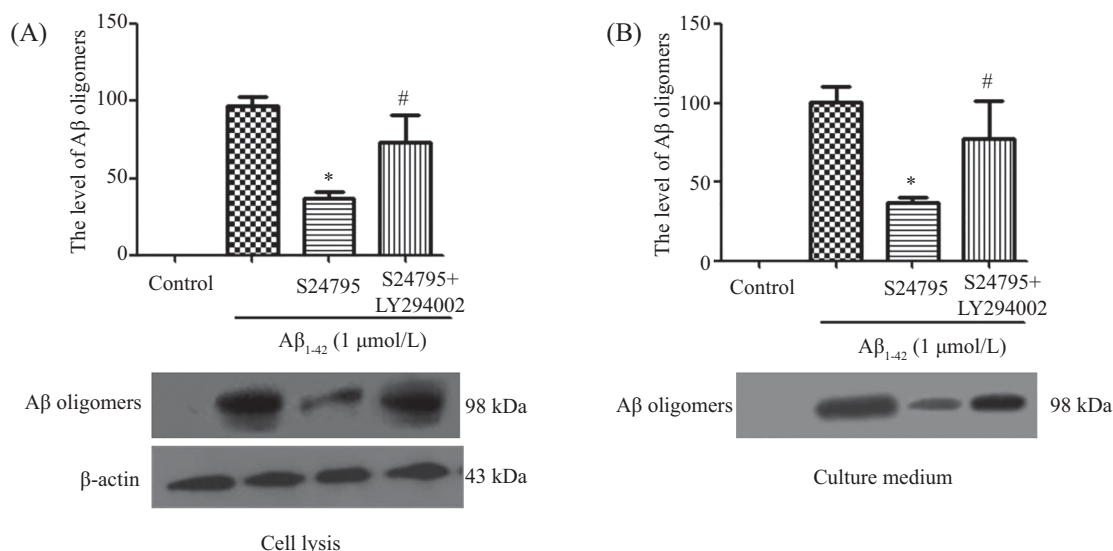
图5 LY294002或MLA对P-Akt蛋白质水平的影响

Fig.5 The effect of LY294002 or MLA on the level of P-Akt protein



蛋白印迹法检测内源性Cryab蛋白质水平。\**P*<0.05, 与对照组相比; #*P*<0.05, 与S24795组相比。  
Cryab protein level was detected by Western blot. \**P*<0.05 vs control group; #*P*<0.05 vs S24795 group.

图6 LY294002对内源性Cryab蛋白质的影响  
Fig.6 The effect of LY294002 on endogenous Cryab protein



A: 蛋白印迹法检测细胞裂解液中Aβ蛋白质水平。\**P*<0.05, 与Aβ组相比, #*P*<0.05, 与(S24795+Aβ<sub>1-42</sub>)组相比, 在细胞裂解液; B: 蛋白印迹法检测细胞培养液中Aβ蛋白质水平。\**P*<0.05, 与Aβ组相比, #*P*<0.05, 与(S24795+Aβ<sub>1-42</sub>)组相比。

A: Aβ protein level detected by Western blot in cell lysis solution, \**P*<0.05 vs Aβ group, #*P*<0.05 vs (S24795+Aβ<sub>1-42</sub>) group; B: Aβ protein level detected by Western blot in cell culture medium, \**P*<0.05 vs Aβ group, #*P*<0.05 vs (S24795+Aβ<sub>1-42</sub>) group.

图7 PI3K/Akt信号通路对Aβ聚集的影响  
Fig.7 The effect of PI3K/Akt signal pathway on Aβ aggregation

### 3 讨论

Aβ的聚集是一个多因素参与的复杂过程, 星形胶质细胞在Aβ的聚集和沉积过程中扮演重要病理角色。在中枢神经系统中星形胶质细胞数量最多而且参与重要的生理功能, 防止神经细胞损伤、提供代谢、营养支持和调节突触活动<sup>[21]</sup>。星形胶质细胞在Aβ聚集和沉积过程中具有双重病理角色。一方面, 激活的星形胶质细胞能够通过大量分泌细胞因子,

炎症因子和一氧化氮等神经毒性物质而导致AD脑内的神经炎症发生<sup>[22]</sup>; 另一方面, 活化的星形胶质细胞也能够表达与Aβ降解有关的酶, 对Aβ进行有效的吞噬和降解<sup>[23-24]</sup>。基于以上事实, 促进星形胶质细胞对Aβ聚集和沉积的抑制功能可能成为治疗AD的一个重要方向。

α7 nAChRs是配体门控离子通道家族中的成员。它由5个跨膜亚基组成, 有1个大的胞外N-端, 4

个跨膜结构域和一个胞内结构域<sup>[25-26]</sup>。 $\alpha 7$  nAChRs广泛分布于大脑皮质和海马的神经细胞、星形胶质细胞和小胶质细胞<sup>[5]</sup>。在AD的发病机制中, $\alpha 7$  nAChRs通过与A $\beta$ 的相互作用而扮演了重要的病理角色<sup>[6]</sup>。近年来的研究表明, $\alpha 7$  nAChRs可能是拮抗A $\beta$ 神经毒性的一个重要靶点。在神经细胞中, $\alpha 7$  nAChRs能够通过激活多条细胞内信号通路而拮抗A $\beta$ 导致的神经细胞凋亡<sup>[27]</sup>。我们的前期研究发现,用S24795处理星形胶质细胞后 $\alpha 7$  nAChRs的表达上调,并且能显著抑制A $\beta$ 聚集。本研究发现,S24795通过激活 $\alpha 7$ 胆碱能受体而上调Cryab蛋白质水平,由此可推测,S24795是通过激活星形胶质细胞的 $\alpha 7$  nAChRs后上调内源性Cryab从而抑制A $\beta$ 的聚集。

有研究表明,PI3K/Akt信号通路参与了 $\alpha 7$  nAChRs的神经保护功能,在阿尔茨海默病研究中发现,Akt在海马神经细胞中表达减少,继而导致神经细胞凋亡<sup>[28]</sup>。我们的实验结果发现,用S24795处理星形胶质细胞能显著上调Akt磷酸化,该上调作用被PI3K/Akt信号通路的抑制剂LY294002或 $\alpha 7$  nAChRs的阻断剂(MLA)所抑制。这说明,S24795通过激活 $\alpha 7$  nAChRs后,使PI3K/Akt信号通路激活引起细胞内相应的效应。进一步的研究发现,LY294002能抑制S24795上调内源性Cryab蛋白质水平。这些结果表明,S24795通过 $\alpha 7$  nAChRs上调星形胶质细胞内源性Cryab与PI3K/Akt信号通路的激活相关。

PI3K/Akt信号通路参与了 $\alpha 7$  nAChRs神经保护功能<sup>[29]</sup>。S24795处理星形胶质细胞后,能明显抑制A $\beta$ 的聚集,并且该作用能被PI3K/Akt信号通路的阻断剂LY294002抑制,说明PI3K/Akt信号通路参与了S24795激活 $\alpha 7$  nAChRs抑制A $\beta$ 聚集而且该过程可能有内源性Cryab蛋白的参与。有研究证实,S24795作为 $\alpha 7$  nAChR激动剂能够有效降解AD动物模型大脑内的A $\beta$ <sup>[30]</sup>,减少A $\beta$ 的沉积,该项研究结果与我们体外细胞实验结果相符,为我们的体外细胞实验的结果提供了支撑。我们的蛋白质印迹法结果没有检测到A $\beta$ 单体(4 kDa)水平的显著增加,提示A $\beta$ 寡聚体可能被进一步降解。因为在AD大脑中,星形胶质细胞表达的Cryab明显上调,并且这些上调的Cryab紧密地分布在A $\beta$ 蛋白沉积周围<sup>[10-11]</sup>。Cryab能够通过直接与A $\beta$ 直接结合等方式有效地阻止A $\beta$ 的聚集及其细胞毒性作用<sup>[12-13]</sup>。

综上所述,S24795通过激活星形胶质细胞 $\alpha 7$

nAChRs上调内源性Cryab从而抑制A $\beta$ 聚集;PI3K/Akt信号通路很可能是S24795通过星形胶质细胞 $\alpha 7$  nAChRs上调内源性Cryab从而抑制A $\beta$ 聚集过程的重要参与因素,为进一步研究Cryab蛋白可能是治疗AD的一个潜在靶点提供了一定的基础。今后将开展AD动物模型实验,动态检测AD转基因小鼠不同病理变化阶段大脑内星形胶质细胞 $\alpha 7$  nAChRs和Cryab水平的动态变化,并探讨这些因子的变化与A $\beta$ 聚集和沉积的相关性,以期为临床治疗AD找到新途径。

### 参考文献 (References)

- Rijal Upadhaya A, Capetillo-Zarate E, Kosterin I, Abramowski D, Kumar S, Yamaguchi H, *et al.* Dispersible amyloid beta-protein oligomers, protofibrils, and fibrils represent diffusible but not soluble aggregates: Their role in neurodegeneration in amyloid precursor protein (APP) transgenic mice. *Neurobiol Aging* 2012; 33(11): 2641-60.
- Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, *et al.* Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation *in vivo*. *Nature* 2002; 416(6880): 535-39.
- Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, *et al.* Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 2008; 14(8): 837-42.
- Heneka MT, O'Banion MK. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol* 2007; 184(1/2): 69-91.
- Bourdin CM, Lebreton J, Mathe-Allainmat M, Thany SH. Pharmacological profile of zacopride and new quaternarized fluorobenzamide analogues on mammalian alpha7 nicotinic acetylcholine receptor. *Bioorg Med Chem Lett* 2015; 25(16): 3184-8.
- Parri HR, Hernandez CM, Dineley KT. Research update: Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor mechanisms in Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol* 2011; 82(8): 931-42.
- Ni R, Marutle A, Nordberg A. Modulation of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor and fibrillar amyloid- $\beta$  interactions in Alzheimer's disease brain. *J Alzheimers Disease* 2013; 33(3): 1-4.
- Bhat R, Steinman L. Innate and adaptive autoimmunity directed to the central nervous system. *Neuron* 2009; 64(1): 123-32.
- Ousman SS, Tomooka BH, van Noort JM, Wawrousek EF, O'Connor KC, Hafler DA, *et al.* Protective and therapeutic role for alphaB-crystallin in autoimmune demyelination. *Nature* 2007; 448(7152): 474-9.
- Wilhelmus MM, Otte-Höller I, Wesseling P, de Waal RM, Boelens WC, Verbeek MM. Specific association of small heat shock proteins with the pathological hallmarks of Alzheimer's disease brains. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2006; 32(2): 119-30.
- Wilhelmus MM, de Waal RM, Verbeek MM. Heat shock proteins and amateur chaperones in amyloid-Beta accumulation and clearance in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 2007; 35(3):

- 203-16.
- 12 Raman B, Ban T, Sakai M, Pasta SY, Ramakrishna T, Naiki H, *et al.* AlphaB-crystallin, a small heat-shock protein, prevents the amyloid fibril growth of an amyloid beta-peptide and beta2-microglobulin. *Biochem J* 2005; 392(Pt 3): 573-81.
- 13 Wilhelmus MM, Boelens WC, Otte-Höller I, Kamps B, de Waal RM, Verbeek MM. Small heat shock proteins inhibit amyloid-beta protein aggregation and cerebrovascular amyloid-beta protein toxicity. *Brain Res* 2006; 1089(1): 67-78.
- 14 Lagostena CT. The partial alpha7 nicotine acetylcholine receptor agonist S 24795 enhances long-term potentiation at CA3-CA1 synapses in the adult mouse hippocampus. *Neuropharmacology* 2008; 54(4): 676-85.
- 15 Wang HY, Bakshi K, Shen C, Frankfurt M, Trocmé-Thibierge C, Morain P. S 24795 limits  $\beta$ -Amyloid- $\alpha$ 7 nicotinic receptor interaction and reduces Alzheimer's disease-like pathologies. *Biologic Psychiat* 2009; 67(6): 522-30.
- 16 Wang HY, Stucky A, Liu J, Shen C, Trocme-Thibierge C, Morain P. Dissociating beta-amyloid from alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor by a novel therapeutic agent, S 24795, normalizes alpha 7 nicotinic acetylcholine and NMDA receptor function in Alzheimer's disease brain. *J Neurosci Official J Society Neurosci* 2009; 29(35): 10961-73.
- 17 Klein WL. Abeta toxicity in Alzheimer's disease: Globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochem Int* 2002; 41(5): 345-52.
- 18 Ryan DA, Narrow WC, Federoff HJ. An improved method for generating consistent soluble amyloid-beta oligomer preparations for *in vitro* neurotoxicity studies. *J Neurosci Methods* 2010; 190(2): 171-9.
- 19 Mccarthy KD, de Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol* 1980; 85(3): 890-902.
- 20 Schildge S, Bohrer C, Beck K. Isolation and culture of mouse cortical astrocytes. *J Vis Exp* 2013; doi: 10.3791/50079.
- 21 Sidoryk-Wegrzynowicz M, Wegrzynowicz M, Lee E. Role of astrocytes in brain function and disease. *Toxicol Pathol* 2011; 39(1): 115-23.
- 22 Li C, Zhao R, Gao K. Astrocytes: Implications for neuro-inflammatory pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2011; 8(1): 67-80.
- 23 Pihlaja R, Koistinaho J, Malm T, Sikkilä H, Vainio S, Koistinaho M. Transplanted astrocytes internalize deposited beta-amyloid peptides in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Glia* 2008; 56(2): 154-63.
- 24 Heurling K, Buckley C, Vandenberghe R, Laere KV, Lubberink M. Separation of beta-amyloid binding and white matter uptake of (18)F-flutemetamol using spectral analysis. *Am J Nucl Med Mol Imaging* 2015; 5(5): 515-26.
- 25 Paterson D, Nordberg A. Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Prog Neurobiol* 2000; 61(1): 75-111.
- 26 Lotfipour S, Mandelkern M, Brody AL. Quantitative molecular imaging of neuronal nicotinic acetylcholine receptors in the human brain with A-85380 radiotracers. *Curr Med Imaging Rev* 2011; 7(2): 107-12.
- 27 Kawamata J, Shimohama S. Stimulating nicotinic receptors trigger multiple pathways attenuating cytotoxicity in models of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *J Alzheimers Dis* 2011; 24 Suppl 2: 95-109.
- 28 王昊飞.  $\alpha$ 7胆碱能受体激动剂DMXB对A $\beta$ 损伤认知功能的影响及其分子机制. *南京医科大学学报*(Wang Haofei. The effect of  $\alpha$ 7nAChRs agonist: DMXB on A $\beta$  damage the cognitive function and its molecular mechanism) 2009; 36(3): 57-60.
- 29 Xu J, Zhang R, Zuo P, Yang N, Ji C, Liu W, *et al.* Aggravation effect of isoflurane on Abeta(25-35)-induced apoptosis and tau hyperphosphorylation in PC12 cells. *Cell Mol Neurobiol* 2012; 32(8): 1343-51.
- 30 Wang HY, Bakshi K, Shen C, Frankfurt M, Trocmé-Thibierge C, Morain P. S24795 limits beta-amyloid-alpha7 nicotinic receptor interaction and reduces Alzheimer's disease-like pathologies. *Biologic Psychiat* 2010; 67(6): 522-30.