

A β_{1-42} 诱导 K_{ATP} 亚基 SUR1/Kir6.2 蛋白表达的 信号转导通路研究

李艳菊 张戈 王晓静 邢孝民 马国诏

【摘要】 目的 分析探讨 β -淀粉样蛋白 1~42 (A β_{1-42}) 诱导 ATP 敏感性钾离子通道 (K_{ATP}) 亚基 SUR1/Kir6.2 蛋白表达上调的潜在信号转导机制。方法 采用免疫细胞化学法鉴定原代培养的大鼠皮质和海马神经元, 实验组分别加入 0.50 $\mu\text{mol/L}$ 核因子- κB (NF- κB) 抑制剂 SN50、2 $\mu\text{mol/L}$ p38 丝裂原激活蛋白激酶 (MAPK) 抑制剂 SB203580 或者 2 $\mu\text{mol/L}$ 蛋白激酶 C (PKC) 抑制剂 CTC, 于 30 min 后分别加入 2 $\mu\text{mol/L}$ A β_{1-42} , 培养 72 h 后采用 Western blotting 法检测 K_{ATP} 亚基 SUR1/Kir6.2 蛋白的相对表达量。结果 (1) NF- κB 抑制剂 SN50: SN50 + A β_{1-42} 组 SUR1/Kir6.2 蛋白表达量低于对照组 ($t = 6.237, P = 0.010; t = 7.136, P = 0.004$) 和 A β_{1-42} 组 ($t = 12.620, P = 0.000; t = 18.580, P = 0.000$), SN50 组 SUR1/Kir6.2 蛋白相对表达量低于对照组 ($t = 12.240, P = 0.000; t = 4.906, P = 0.034$)、A β_{1-42} 组 ($t = 18.620, P = 0.000; t = 16.350, P = 0.000$) 和 SN50 + A β_{1-42} 组 ($t = 6.002, P = 0.012$)。 (2) p38 MAPK 抑制剂 SB203580: SB203580 + A β_{1-42} 组 SUR1/Kir6.2 蛋白相对表达量低于 A β_{1-42} 组 ($t = 13.010, P = 0.000; t = 8.506, P = 0.001$), 仅 Kir6.2 蛋白相对表达量高于对照组 ($t = 7.537, P = 0.003$); SB203580 组 SUR1/Kir6.2 蛋白相对表达量低于对照组 ($t = 8.089, P = 0.002; t = 19.380, P = 0.000$)、A β_{1-42} 组 ($t = 18.870, P = 0.000; t = 35.430, P = 0.000$) 和 SB203580 + A β_{1-42} 组 ($t = 5.869, P = 0.014; t = 26.920, P = 0.000$)。 (3) PKC 抑制剂 CTC: CTC + A β_{1-42} 组 SUR1 蛋白相对表达量高于对照组 ($t = 4.756, P = 0.040$)、但低于 A β_{1-42} 组 ($t = 15.170, P = 0.000$), CTC 组 SUR1 蛋白相对表达量低于对照组 ($t = 24.000, P = 0.000$)、A β_{1-42} 组 ($t = 43.930, P = 0.000$) 和 CTC + A β_{1-42} 组 ($t = 28.760, P = 0.000$); CTC + A β_{1-42} 组 Kir6.2 蛋白相对表达量低于对照组 ($t = 15.000, P = 0.000$) 和 A β_{1-42} 组 ($t = 24.140, P = 0.000$), CTC 组 Kir6.2 蛋白相对表达量低于对照组 ($t = 9.429, P = 0.001$) 和 A β_{1-42} 组 ($t = 18.570, P = 0.000$)、但高于 CTC + A β_{1-42} 组 ($t = 5.571, P = 0.018$)。结论 NF- κB 、p38 MAPK 和 PKC 信号转导通路参与 A β_{1-42} 上调大鼠皮质和海马神经元 K_{ATP} 亚基 SUR1/Kir6.2 蛋白的表达。

【关键词】 淀粉样 β 肽类; 钾通道; NF- κB ; p38 丝裂原活化蛋白激酶类; 蛋白激酶 C; 印迹法, 蛋白质; 细胞, 培养的

The effect of signal pathways on the neural K_{ATP} subunits SUR1/Kir6.2 expression induced by A β_{1-42}

LI Yan-ju¹, ZHANG Ge², WANG Xiao-jing¹, XING Xiao-min¹, MA Guo-zhao³

¹Department of Rehabilitation Medicine, ²Department of Gastroenterology, The Second Affiliated Hospital of Shandong First Medical University, Taian 271000, Shandong, China

³Department of Neurology, Shanghai East Hospital Tongji University, Shanghai 200120, China

Corresponding author: MA Guo-zhao (Email: maguozhao@163.com)

【Abstract】 Objective To investigate the potential signal transduction mechanism of β -amyloid protein 1-42 (A β_{1-42}) induced up-regulation of ATP sensitive potassium channel K_{ATP} subunit SUR1/Kir6.2 proteins expression. **Methods** The primary cultured cortical and hippocampal neurons of rats were

doi: 10.3969/j.issn.1672-6731.2021.11.005

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (项目编号: 30870874); 国家自然科学基金资助项目 (项目编号: 30600202)

作者单位: 271000 泰安, 山东第一医科大学第二附属医院康复医学科 (李艳菊、王晓静、邢孝民), 消化内科 (张戈); 200120 上海, 同济大学附属东方医院神经内科 (马国诏)

通讯作者: 马国诏, Email: maguozhao@163.com

identified by immunocytochemistry. The experimental groups were added with 0.50 $\mu\text{mol/L}$ nuclear factor- κB (NF- κB) inhibitor SN50, 2 $\mu\text{mol/L}$ p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) inhibitor SB203580 or 2 $\mu\text{mol/L}$ protein kinase C (PKC) inhibitor CTC, 2 $\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{1-42}$ (30 min later), respectively. Western blotting was used to detect the protein expression of K_{ATP} subunit SUR1/Kir6.2 after 72 h of culture.

Results 1) NF- κB inhibitor SN50: SUR1/Kir6.2 proteins of K_{ATP} subunit in SN50 + $\text{A}\beta_{1-42}$ group were lower than that in control group ($t = 6.237, P = 0.010$; $t = 7.136, P = 0.004$) and $\text{A}\beta_{1-42}$ group ($t = 12.620, P = 0.000$; $t = 18.580, P = 0.000$), but the SUR1 protein expression of K_{ATP} subunit in SN50 + $\text{A}\beta_{1-42}$ group was higher than that in SN50 group ($t = 6.002, P = 0.012$). SUR1/Kir6.2 proteins of K_{ATP} subunit in SN50 group were lower than that in control group ($t = 12.240, P = 0.000$; $t = 4.906, P = 0.034$) and $\text{A}\beta_{1-42}$ group ($t = 18.620, P = 0.000$; $t = 16.350, P = 0.000$). 2) p38 MAPK inhibitor SB203580: the proteins expression of K_{ATP} subunit SUR1/Kir6.2 in SB203580 + $\text{A}\beta_{1-42}$ group were lower than that in $\text{A}\beta_{1-42}$ group ($t = 13.010, P = 0.000$; $t = 8.506, P = 0.001$), but higher than that in SB203580 group ($t = 5.869, P = 0.014$; $t = 26.920, P = 0.000$), but the expression of K_{ATP} subunit Kir6.2 protein in SB203580 + $\text{A}\beta_{1-42}$ group was higher than that in control group ($t = 7.537, P = 0.003$). The SUR1/Kir6.2 proteins expression of K_{ATP} subunit in SB203580 group were lower than that in control group ($t = 8.089, P = 0.002$; $t = 19.380, P = 0.003$) and $\text{A}\beta_{1-42}$ group ($t = 18.870, P = 0.000$; $t = 35.430, P = 0.000$). 3) PKC inhibitor CTC: the SUR1 protein expression of K_{ATP} subunit in CTC + $\text{A}\beta_{1-42}$ group was higher than that in control group ($t = 4.756, P = 0.040$) and in CTC group ($t = 28.760, P = 0.000$), but lower than that in $\text{A}\beta_{1-42}$ group ($t = 15.170, P = 0.000$). The SUR1 protein expression of K_{ATP} subunit in CTC group was lower than that in control group ($t = 24.000, P = 0.000$), $\text{A}\beta_{1-42}$ group ($t = 43.930, P = 0.000$) and CTC + $\text{A}\beta_{1-42}$ group. The protein expression of K_{ATP} subunit Kir6.2 in CTC + $\text{A}\beta_{1-42}$ group was lower than that in control group ($t = 15.000, P = 0.000$), $\text{A}\beta_{1-42}$ group ($t = 24.140, P = 0.000$) and CTC group ($t = 5.571, P = 0.018$). The expression of K_{ATP} subunit Kir6.2 protein in CTC group was lower than that in control group ($t = 9.429, P = 0.001$) and in $\text{A}\beta_{1-42}$ group ($t = 18.570, P = 0.000$). **Conclusions** NF- κB , p38 MAPK and PKC signaling pathways are involved in $\text{A}\beta_{1-42}$ up-regulation of SUR1/Kir6.2 proteins expression of K_{ATP} subunit in cortical and hippocampal neurons of rats.

【Key words】 Amyloid beta-peptides; Potassium channels; NF-kappa B; p38 mitogen-activated protein kinases; Protein kinase C; Blotting, western; Cells, cultured

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30870874, 30600202).

Conflicts of interest: none declared

阿尔茨海默病是老年人最常见的神经变性病, 典型病理改变为 β -淀粉样蛋白($\text{A}\beta$)沉积^[1]。大量证据表明, $\text{A}\beta$ 可以导致细胞膜去极化、线粒体功能障碍和氧化应激反应,上述变化反过来进一步刺激 $\text{A}\beta$ 的生成和沉积^[2-3]。线粒体ATP敏感性钾离子通道(K_{ATP})的开放可以保护神经元免受 $\text{A}\beta$ 的细胞毒性作用^[4]。 K_{ATP} 广泛表达于不同脑区,其亚基决定不同脑区对缺氧、氧化应激、神经毒性和血糖代谢等的耐受性不同^[5]。 $\text{A}\beta_{1-42}$ 和ATP可以上调 K_{ATP} 亚基SUR1/Kir6.2蛋白的表达^[4-6]。业已证实,信号转导通路阿尔茨海默病的发病机制有关,目前已知核因子- κB (NF- κB)、p38丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)和蛋白激酶C(PKC)信号转导通路阿尔茨海默病的病理生理学机制密切相关,如NF- κB 信号转导通路在阿尔茨海默病患者中表达增强^[7];阿尔茨海默病患者脑组织p38 MAPK磷酸化水平升高,与 $\text{A}\beta$ 斑块和神经原纤维缠结(NFTs)有关^[8-9]; $\text{A}\beta$ 寡聚体还可以破坏PKC信号转导通路^[10]等。进

一步研究信号转导通路对 $\text{A}\beta_{1-42}$ 上调 K_{ATP} 亚基SUR1/Kir6.2蛋白表达的影响,可以为通过信号转导通路靶向治疗阿尔茨海默病提供理论依据^[11]。基于此,本研究旨在探讨NF- κB 、p38 MAPK和PKC信号转导通路在原代培养的大鼠皮质和海马神经元 $\text{A}\beta_{1-42}$ 上调 K_{ATP} 亚基SUR1/Kir6.2蛋白表达中的作用,以期对上述信号转导通路对神经元的作用提供新思路,同时也为研究防治阿尔茨海默病药物提供新视角。

材料与方法

一、实验材料

1. 实验动物 出生24 h内的Wistar种系新生大鼠200只,雌雄不限,由山东大学实验动物中心提供(许可证号:SCXK鲁20090001),控制温度(21 $^{\circ}\text{C}$)、光照(12 h昼-12 h夜)和相对湿度(50%~60%)。

2. 设备与仪器 (1)主要药品与试剂: $\text{A}\beta_{1-42}$ 人工重组蛋白(规格0.10 mg)、SN50(规格1 mg)、

SB203580(规格 1 mg)、多聚赖氨酸(规格 10 mg)、白屈菜红碱(CTC,规格 5 mg)均购自美国 Sigma 公司, Neurobasal 培养基、胎牛血清(FBS,规格 500 ml)均系美国 Gibco 公司产品, B27 细胞培养添加剂(规格 10 ml)购自美国 Invitrogen 公司, DMEM 高糖培养基(规格 500 ml)购自美国 HyClone 公司, 链霉抗生素蛋白-生物素-过氧化物酶复合物(SABC)免疫组化检测试剂盒、二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒均系武汉博士德生物工程有限公司产品, I 抗工作液包括山羊抗大鼠胆碱乙酰转移酶(ChAT)抗体(规格 0.10 ml, 滴度 1:100)、兔抗大鼠 Kir6.2 多克隆抗体(规格 0.10 ml, 滴度 1:500)和兔抗大鼠 SUR1 多克隆抗体(规格 0.10 ml, 滴度 1:500), 以及内参照物甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)购自美国 Santa Cruz 公司, 辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG II 抗(规格 0.10 ml, 滴度 1:500)、生物素标记的兔抗山羊 IgG II 抗(规格 0.10 ml, 滴度 1:200)购自北京中杉金桥生物技术有限公司, MgCl₂、CaCl₂、KCl、NaHCO₃、Na₂HPO₄·12H₂O(均为分析纯)固体粉末样试剂为天津市广成化学试剂有限公司产品, NaCl、KH₂PO₄(均为分析纯)固体粉末样试剂购自国药集团化学试剂有限公司, 二辛可宁酸(BCA)检测试剂盒购自上海博彩生物科技有限公司, 放射免疫沉淀法(RIPA)裂解液、苯甲基磺酰氟(PMSF;规格 1 ml, 浓度 100 mmol/L)购自上海碧云天生物技术有限公司, 电化学发光(ECL)发光液购自美国 Millipore 公司。(2)主要设备与仪器:光学显微镜(IM50)为德国 Leica 公司产品, CO₂培养箱为日本 SUNYO 株式会社产品。

二、研究方法

1. 原代神经细胞培养 将新生大鼠从培养环境取出,于实验室无菌条件下,头颈部消毒,以无菌剪刀在其枕下颈部行一倒“T”字口按皮肤、颅骨逐层剪开,剥除脑膜后分离出皮质、海马。75%乙醇溶液消毒后,在无菌条件下用显微镊分离大脑皮质和海马, D-Hanks 溶液清洗,制备 1 mm×1 mm×1 mm 脑组织切片,以 0.125%胰蛋白酶消化 10 min,终止消化后采用 300 目不锈钢网过滤;过滤液离心,以离心半径 5 cm、转速 1000 r/m 离心 5 min,获得原代神经细胞,以细胞密度为 3×10⁶/ml 种植于多聚赖氨酸包被的 60 mm 培养皿(37℃培养箱,95%空气和 5%CO₂)中,24 h 后更换培养基(98% Neurobasal 培养基+2%B27+1%青霉素和链霉素)。以 5 μmol/L 阿

糖胞苷处理细胞,抑制神经胶质细胞增殖,培养 3~5 d 后显微镜下观察到存活细胞即为原代神经细胞培养成功。

2. 免疫细胞化学法鉴定胆碱能神经元 爬片生长的神经细胞培养至第 7 天,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 5 min×3 次,4%多聚甲醛于 4℃固定 30 min,磷酸盐缓冲液浸泡 35 min,滴加山羊抗大鼠 ChAT I 抗(1:100),4℃过夜,于室温孵育 30 min,磷酸盐缓冲液洗涤;滴加兔抗山羊 IgG II 抗(1:200),37℃孵育 1 h,磷酸盐缓冲液洗涤;滴加 SABC,室温下 20 min,后磷酸盐缓冲液洗涤 5 min×4 次,苏木精染色。光学显微镜下随机观察 10 个高倍视野(×400),胞质呈棕色的阳性神经元即为胆碱能神经元。

3. 实验分组与 Western blotting 法检测蛋白相对表达量 严格无菌条件下将 Aβ₁₋₄₂人工重组蛋白 0.10 mg 溶解于 0.50 mol/L 二甲基亚砜(DMSO)溶液中,以磷酸盐缓冲液(pH 值=7.4)稀释,即为 Aβ₁₋₄₂原液,置于 37℃恒温箱内孵育 72 h 进行老化处理,4℃贮存备用,以培养细胞之前用血清稀释,细胞培养液中 DMSO 终浓度不超过 0.10%(此浓度不会对细胞产生不利影响)。培养的神经元随机分为对照组、Aβ₁₋₄₂组、SN50/SB203580/CTC+Aβ₁₋₄₂组和 SN50/SB203580/CTC 组,培养 7 d。对照组采用等体积磷酸盐缓冲液和培养基培养;Aβ₁₋₄₂组采用 Aβ₁₋₄₂(2 μmol/L)^[4]处理;SN50/SB203580/CTC+Aβ₁₋₄₂组采用 SN50(0.50 μmol/L)或 SB203580(2 μmol/L)或 CTC(2 μmol/L)进行处理,并于 30 min 后加入 Aβ₁₋₄₂(2 μmol/L);SN50/SB203580/CTC 组分别采用 SN50(0.50 μmol/L)或者 SB203580(2 μmol/L)或者 CTC(2 μmol/L)处理,培养 72 h 后,收集细胞行 Western blotting 检测。以冰磷酸盐缓冲液洗掉培养液,按照 RIPA 裂解液-PMSF 蛋白酶抑制剂体积比 100:1 配制细胞裂解液,冰浴裂解细胞 30 min,收集蛋白,于 4℃、离心半径 5 cm、10 000 r/min 离心 10 min,再以 BCA 法检测蛋白浓度。取 40 μg 总蛋白上清液行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),经电泳转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,用 5%脱脂奶粉封闭 1 h,兔抗大鼠 SUR1(1:500)或兔抗大鼠 Kir6.2(1:500) I 抗 4℃摇动封闭一夜。室温下以 0.05% TBST 溶液冲洗 3 次,并与辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG II 抗在稀释的 TBST 溶液(1:3000)中培养 1 h,冲洗。采用 ECL 发光液显色,以 GAPDH 作为内参照物,再采用 NIH 图像(1.34 版)对

染色后的目的蛋白光密度值(OD 值, 280 nm)进行分析。

4. 统计分析方法 采用 Graphpad Prism 8.3 统计软件进行数据处理与分析。正态性检验采用 Shapiro-Wilk 检验, 呈正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析, 两两比较行 LSD-*t* 检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

ChAT 免疫细胞化学法显示, 呈棕色的阳性神经元为胆碱能神经元(图 1), 占全部培养细胞 $>90\%$ 。

不同处理组 K_{ATP} 亚基 SUR1 蛋白 ($P = 0.000$) 和 Kir6.2 蛋白 ($P = 0.000$) 相对表达量差异有统计学意义(表 1), 其中, SN50 + $A\beta_{1-42}$ 组和 SN50 组 SUR1 蛋白相对表达量均低于对照组 ($P = 0.010, 0.000$) 和 $A\beta_{1-42}$ 组 ($P = 0.000, 0.000$), SN50 组亦低于 SN50 + $A\beta_{1-42}$ 组 ($P = 0.012$; 表 2, 图 2), 表明 NF- κ B 抑制剂 SN50 可降低 $A\beta_{1-42}$ 诱导的 K_{ATP} 亚基 SUR1 蛋白的表达; SN50 + $A\beta_{1-42}$ 组和 SN50 组 Kir6.2 蛋白相对表达量低于对照组 ($P = 0.004, 0.034$) 和 $A\beta_{1-42}$ 组 ($P = 0.000, 0.000$), 而 SN50 组与 SN50 + $A\beta_{1-42}$ 组差异无统计学意义 ($P = 0.441$; 表 2, 图 3), 表明 NF- κ B 抑制剂 SN50 亦可降低 $A\beta_{1-42}$ 诱导的 K_{ATP} 亚基 Kir6.2 蛋白的表达。

不同处理组 K_{ATP} 亚基 SUR1 蛋白 ($P = 0.000$) 和 Kir6.2 蛋白 ($P = 0.000$) 相对表达量差异有统计学意义(表 3), 其中, SB203580 + $A\beta_{1-42}$ 组 SUR1 蛋白相对表达量仅低于 $A\beta_{1-42}$ 组 ($P = 0.000$), SB203580 组 SUR1 蛋白相对表达量低于对照组 ($P = 0.002$)、 $A\beta_{1-42}$ 组 ($P = 0.000$) 和 $A\beta_{1-42}$ + SB203580 组 ($P = 0.014$; 表 4, 图 4), 表明 p38 MAPK 抑制剂 SB203580 可以降低 $A\beta_{1-42}$ 诱导的 K_{ATP} 亚基 SUR1 蛋白的表达; SB203580 + $A\beta_{1-42}$ 组 Kir6.2 蛋白相对表达量低于 $A\beta_{1-42}$ 组 ($P = 0.001$), 但高于对照组 ($P = 0.003$), SB203580 组 Kir6.2 蛋白相对表达量低于对照组 ($P = 0.003$), $A\beta_{1-42}$ 组 ($P = 0.000$) 和 SB203580 + $A\beta_{1-42}$ 组 ($P = 0.000$; 表 4, 图 5), 表明 p38 MAPK 抑制剂 SB203580 可以影响 $A\beta_{1-42}$ 诱导的 K_{ATP} 亚基 Kir6.2 蛋白的表达。

不同处理组 K_{ATP} 亚基 SUR1 蛋白 ($P = 0.000$) 和 Kir6.2 蛋白 ($P = 0.000$) 相对表达量差异有统计学意

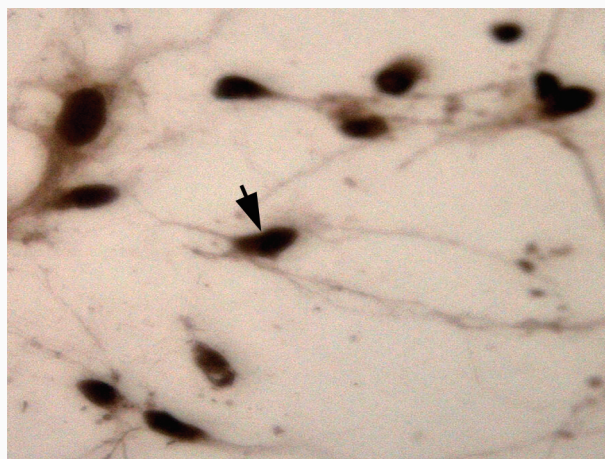


图 1 光学显微镜观察可见胞质呈棕色的胆碱能神经元(箭头所示) 苏木精染色 $\times 400$

Figure 1 Optical microscopy showed the brown cytoplasm of cholinergic neurons (arrow indicates). Hematoxylin staining $\times 400$

义(表 5), 其中, CTC + $A\beta_{1-42}$ 组 SUR1 蛋白相对表达量高于对照组 ($P = 0.040$), 但低于 $A\beta_{1-42}$ 组 ($P = 0.000$), CTC 组 SUR1 蛋白相对表达量低于对照组 ($P = 0.000$)、 $A\beta_{1-42}$ 组 ($P = 0.000$) 和 CTC + $A\beta_{1-42}$ 组 ($P = 0.000$; 表 6, 图 6), 表明 PKC 抑制剂 CTC 可以影响 $A\beta_{1-42}$ 诱导的 K_{ATP} 亚基 SUR1 蛋白的表达; CTC + $A\beta_{1-42}$ 组 Kir6.2 蛋白相对表达量低于对照组 ($P = 0.000$) 和 $A\beta_{1-42}$ 组 ($P = 0.000$), CTC 组 Kir6.2 蛋白相对表达量低于对照组 ($P = 0.001$) 和 $A\beta_{1-42}$ 组 ($P = 0.000$), 但高于 CTC + $A\beta_{1-42}$ 组 ($P = 0.018$; 表 6, 图 7), 表明 PKC 抑制剂 CTC 可以影响 $A\beta_{1-42}$ 诱导的 K_{ATP} 亚基 Kir6.2 蛋白的表达。

讨 论

$A\beta$ 诱导的神经毒性作用在阿尔茨海默病发病机制中发挥关键作用^[12]。有研究显示, 过度氧化应激反应和自由基毒性作用是阿尔茨海默病的发生机制之一^[13]。 $A\beta$ 可以诱发过度氧化应激反应, 后者打破自由基产生与消除的动态平衡, 加速细胞凋亡^[14]。 β 修饰细胞膜脂质和蛋白质氧化, 增加活性氧(ROS), 降低线粒体功能和 ATP 酶活性, 其可导致细胞能量代谢以及膜电位失调, 降低细胞活性^[15]。此外, 环孢素 A、促红细胞生成素以及 ATP 敏感的钾离子通道开放剂可能对 β 诱导的神经毒性具有保护作用^[16-17]。

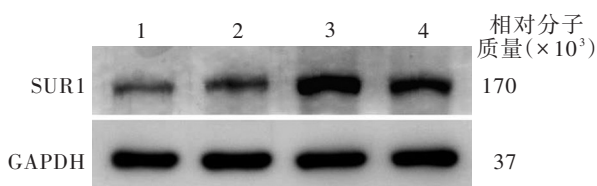
K_{ATP} 是一种多蛋白复合物, 由 Kir6.1/Kir6.2 和

表 1 不同处理组 SUR1 蛋白和 Kir6.2 蛋白相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s, \times 10^3$)

Table 1. Comparison of SUR1 and Kir6.2 proteins expression in different treatment groups ($\bar{x} \pm s, \times 10^3$)

组别	例数	SUR1 蛋白	Kir6.2 蛋白
对照组(1)	3	96.20 ± 5.89	117.33 ± 6.18
Aβ ₁₋₄₂ 组(2)	3	122.43 ± 6.55	168.67 ± 6.02
SN50 + Aβ ₁₋₄₂ 组(3)	3	70.56 ± 5.50	85.33 ± 6.94
SN50组(4)	3	45.88 ± 4.78	95.33 ± 6.18
F 值		37.940	68.640
P 值		0.000	0.000

Aβ₁₋₄₂, β-amyloid protein 1-42, β-淀粉样蛋白 1~42



GAPDH, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; 1, SN50 组; 2, SN50 + Aβ₁₋₄₂ 组; 3, Aβ₁₋₄₂ 组; 4, 对照组

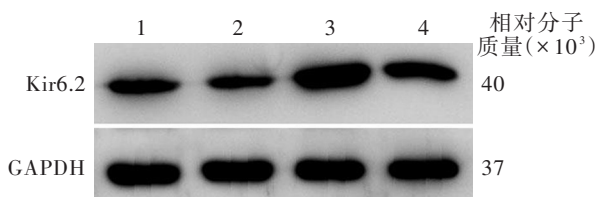
图 2 Western blotting 法显示, SN50 + Aβ₁₋₄₂ 组和 SN50 组 SUR1 蛋白相对表达量低于对照组和 Aβ₁₋₄₂ 组, SN50 组亦低于 SN50 + Aβ₁₋₄₂ 组

Figure 2 Western blotting showed the expression of K_{ATP} subunit SUR1 in SN50 + Aβ₁₋₄₂ group and SN50 group was lower than that in control group and Aβ₁₋₄₂ group, and the expression of SUR1 protein in SN50 group was lower than that in SN50 + Aβ₁₋₄₂ group.

表 2 不同处理组 SUR1 蛋白和 Kir6.2 蛋白相对表达量的两两比较

Table 2. Pairwise comparison of SUR1 and Kir6.2 proteins expression in different treatment groups

组间两两比	SUR1 蛋白		Kir6.2 蛋白	
	t 值	P 值	t 值	P 值
(1) : (2)	6.380	0.009	11.450	0.000
(1) : (3)	6.237	0.010	7.136	0.004
(1) : (4)	12.240	0.000	4.906	0.034
(2) : (3)	12.620	0.000	18.580	0.000
(2) : (4)	18.620	0.000	16.350	0.000
(3) : (4)	6.002	0.012	2.230	0.441



GAPDH, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; 1, SN50 组; 2, SN50 + Aβ₁₋₄₂ 组; 3, Aβ₁₋₄₂ 组; 4, 对照组

图 3 Western blotting 法显示, SN50 + Aβ₁₋₄₂ 组和 SN50 组 Kir6.2 蛋白相对表达量低于对照组和 Aβ₁₋₄₂ 组, 而 SN50 组与 SN50 + Aβ₁₋₄₂ 组无明显差异

Figure 3 Western blotting showed the expression of K_{ATP} subunit Kir6.2 in SN50 + Aβ₁₋₄₂ group and SN50 group was lower than that in control group and Aβ₁₋₄₂ group, but there was no significant difference of Kir6.2 between SN50 group and SN50 + Aβ₁₋₄₂ group.

SUR1/SUR2 不同亚基组成, 形成 1 : 1 异质八聚体。K_{ATP} 可通过降低心肌细胞、神经元和其他可兴奋细胞的兴奋性, 在细胞膜中发挥重要作用。在线粒体中, K_{ATP} 参与线粒体膜电位的调节, 并调节 ATP 和活性氧的生成^[18]。针对原代培养大鼠胆碱能神经元的研究发现, 不同时间段(实验 24、48 和 72 小时) Aβ₁₋₄₂ 可诱导 K_{ATP} 亚基表达的差异性增加, 同时抑制 K_{ATP} 电流。而二氮嗪预激活线粒体 K_{ATP} 可逆转上述变化^[19]; 此外, 亦有研究显示, 暴露于 Aβ₁₋₄₂ 24 小时不影响 K_{ATP} 亚基 SUR1/Kir6.2 蛋白的表达^[5,20]。

本研究结果显示, 与对照组相比较, Aβ₁₋₄₂ 诱导 72 小时可显著增加原代培养神经元中 K_{ATP} 亚基 SUR1/Kir6.2 蛋白的表达, 可能是由于 Aβ₁₋₄₂ 引起的氧化应激反应持续存在, 可导致线粒体功能障碍、细胞代谢紊乱、细胞内 ATP 下降; 鉴于 K_{ATP} 亚基 SUR1/Kir6.2 对 ATP 较为敏感^[6], 随着细胞内 ATP 下降, K_{ATP} 亚基 SUR1/Kir6.2 蛋白表达量显著升高。此外, Aβ₁₋₄₂ 可通过非特异性信号转导通路激活神经

胶质细胞, 进一步刺激 K_{ATP} 亚基 SUR1/Kir6.2 蛋白表达而诱导神经炎症反应。K_{ATP} 亚基 SUR1/Kir6.2 的活化和表达升高, 可能是防止 Aβ₁₋₄₂ 细胞毒性破坏正常细胞膜电位和自发电活性而产生的生理反应。

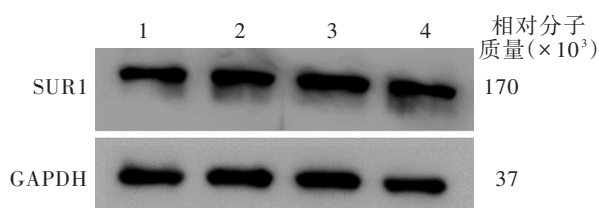
NF-κB 是一种普遍存在的核转录因子。活化的 NF-κB 通过调节基因表达、免疫反应和细胞凋亡信号转导通路转移至细胞核中, 从而参与疾病的病理生理学过程^[21]。有证据证明, 阿尔茨海默病患者神经元内 NF-κB 活性显著升高^[8,22]。Mattson 等^[23]通过诱导锰超氧化物歧化酶(MnSOD)抑制过氧亚硝基阴离子生成和膜脂质过氧化, 以探讨 NF-κB 抗凋亡机制。NF-κB 抑制剂 SN50 是包含 41 个氨基酸残基的肽类, SN50 含有穿透细胞的 P50 核定位序列, 可特异性地阻止 NF-κB 从细胞质转移至细胞核, 从而抑制 NF-κB 的 DNA 结合活性。本研究 SN50 + Aβ₁₋₄₂ 组 K_{ATP} 亚基 SUR1/Kir6.2 蛋白相对表达量低于 Aβ₁₋₄₂ 组, 表明 SN50 可以降低 Aβ₁₋₄₂ 诱导的 K_{ATP} 亚基 Kir6.2/SUR1 蛋白的表达。推测其原因, 可能是由于

表3 不同处理组 SUR1 蛋白和 Kir6.2 蛋白相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s, \times 10^3$)

Table 3. Comparison of SUR1 and Kir6.2 proteins expression in different treatment groups ($\bar{x} \pm s, \times 10^3$)

组别	例数	SUR1 蛋白	Kir6.2 蛋白
对照组(1)	3	72.67 ± 2.49	145.33 ± 4.11
Aβ ₁₋₄₂ 组(2)	3	95.33 ± 3.68	195.00 ± 4.08
SB203580 + Aβ ₁₋₄₂ 组(3)	3	68.00 ± 2.16	168.67 ± 4.64
SB203580组(4)	3	55.67 ± 3.30	85.33 ± 4.64
F 值		62.210	228.500
P 值		0.000	0.000

Aβ₁₋₄₂, β-amyloid protein 1-42, β-淀粉样蛋白 1~42



GAPDH, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; 1, SB203580 组; 2, SB203580 + Aβ₁₋₄₂ 组; 3, Aβ₁₋₄₂ 组; 4, 对照组

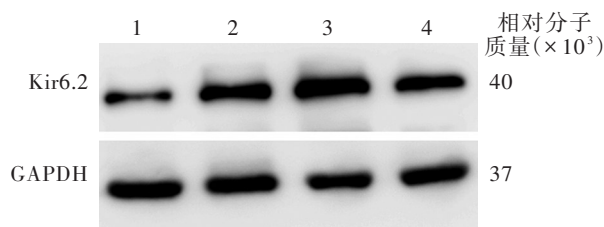
图4 Western blotting 法显示, SB203580 + Aβ₁₋₄₂ 组 SUR1 蛋白相对表达量仅低于 Aβ₁₋₄₂ 组, SB203580 组 SUR1 蛋白相对表达量低于对照组、Aβ₁₋₄₂ 组和 SB203580 + Aβ₁₋₄₂ 组

Figure 4 Western blotting showed the expression of K_{ATP} subunit SUR1 in SB203580 + Aβ₁₋₄₂ group was lower than that in Aβ₁₋₄₂ group, the expression of K_{ATP} subunit SUR1 protein in SB203580 group was lower than that in control group, Aβ₁₋₄₂ group and SB203580 + Aβ₁₋₄₂ group.

表4 不同处理组 SUR1 蛋白和 Kir6.2 蛋白相对表达量的两两比较

Table 4. Pairwise comparison of SUR1 and Kir6.2 proteins expression in different treatment groups

组间两两比	SUR1 蛋白		Kir6.2 蛋白	
	t 值	P 值	t 值	P 值
(1) : (2)	10.790	0.000	16.040	0.000
(1) : (3)	2.221	0.445	7.537	0.003
(1) : (4)	8.089	0.002	19.380	0.000
(2) : (3)	13.010	0.000	8.506	0.001
(2) : (4)	18.870	0.000	35.430	0.000
(3) : (4)	5.869	0.014	26.920	0.000



GAPDH, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; 1, SB203580 组; 2, SB203580 + Aβ₁₋₄₂ 组; 3, Aβ₁₋₄₂ 组; 4, 对照组

图5 Western blotting 法显示, SB203580 + Aβ₁₋₄₂ 组 Kir6.2 蛋白相对表达量低于 Aβ₁₋₄₂ 组, 但高于对照组; SB203580 组 Kir6.2 蛋白相对表达量低于对照组、Aβ₁₋₄₂ 组和 SB203580 + Aβ₁₋₄₂ 组

Figure 5 Western blotting showed expression of K_{ATP} subunit Kir6.2 protein in SB203580 + Aβ₁₋₄₂ group was lower than that in Aβ₁₋₄₂ group, but higher than that in control group, while expression of K_{ATP} subunit Kir6.2 protein in SB203580 group was lower than that in control group, Aβ₁₋₄₂ group and SB203580 + Aβ₁₋₄₂ group.

SN50通过抑制 NF-κB 的核移位干扰其生成,从而抑制 κB 基序的激活以及 Aβ₁₋₄₂ 生成有关的基因转录,降低 Aβ₁₋₄₂ 的神经毒性作用,间接影响 K_{ATP} 亚基蛋白的表达。本研究结果显示,SN50 组 K_{ATP} 亚基 SUR1 蛋白相对表达量低于对照组、Aβ₁₋₄₂ 组,表明 SN50 对 Aβ₁₋₄₂ 诱导的 K_{ATP} 亚基 SUR1 蛋白表达增加的抑制作用是非特异性的;而 SN50 组与 SN50 + Aβ₁₋₄₂ 组 K_{ATP} 亚基 Kir6.2 蛋白相对表达量差异无统计学意义,表明 SN50 对 Aβ₁₋₄₂ 诱导的 K_{ATP} 亚基 Kir6.2 蛋白表达增加的抑制作用具有特异性。因此推测, NF-κB 信号转导通路部分参与 K_{ATP} 亚基 SUR1/Kir6.2 蛋白的表达。

MAPK 是一类丝氨酸/苏氨酸激酶,参与细胞外信号如生长因子、有丝分裂原和应激细胞的增殖、分化和细胞存活,而在哺乳动物中 p38 MAPK 即为 MAPKs 的成员之一^[24]。正常情况下, p38 MAPK 位

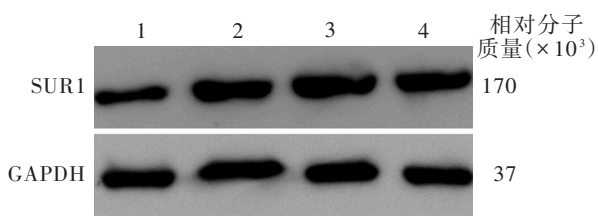
于细胞质内,一旦激活迅速转入细胞核,激活活化转录因子,后者与顺式作用元件结合,引起凋亡相关基因大量表达,与细胞延迟性死亡关系密切^[25], p38 主要依靠促炎性因子、应激刺激等激活,此外,还可被脂多糖及革兰阳性菌细胞壁成分激活^[26-27]。研究表明, Aβ 可以刺激培养的细胞激活 p38 MAPK 和 MAPK 激活的蛋白激酶-2(MAPKAP-2),从而上调炎性因子如白细胞介素-1(IL-1)/肿瘤坏死因子-α(TNF-α)的产生^[28-30]。在人类阿尔茨海默病脑组织和转基因小鼠模型中,激活的 p38 MAPK 主要定位于神经元纤维缠结、Aβ 斑块和神经胶质细胞中^[9]。在神经变性病中, Aβ 过度刺激可导致炎性介质释放增加,导致周围神经炎症和神经毒性作用^[31]及神经元凋亡。SB203580 是一种吡啶异喹啉啉唑化合物,是最常用的 p38 MAPK 特异性抑制剂,主要是作用于 p38 MAPK 上 ATP 结合活性位点 T160^[32],通过抑制

表 5 不同处理组 SUR1 蛋白和 Kir6.2 蛋白相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s, \times 10^3$)

Table 5. Comparison of SUR1 and Kir6.2 proteins expression in different treatment groups ($\bar{x} \pm s, \times 10^3$)

组别	例数	SUR1 蛋白	Kir6.2 蛋白
对照组(1)	3	110.33 ± 2.49	129.00 ± 2.49
Aβ ₁₋₄₂ 组(2)	3	139.67 ± 2.05	150.33 ± 2.05
CTC + Aβ ₁₋₄₂ 组(3)	3	117.33 ± 2.05	94.00 ± 2.07
CTC组(4)	3	75.00 ± 1.63	107.00 ± 1.63
<i>F</i> 值		331.900	113.000
<i>P</i> 值		0.000	0.000

Aβ₁₋₄₂, β-amyloid protein 1-42, β-淀粉样蛋白 1~42



GAPDH, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; 1, CTC 组; 2, CTC + Aβ₁₋₄₂ 组; 3, Aβ₁₋₄₂ 组; 4, 对照组

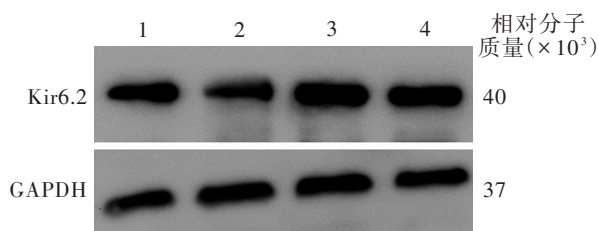
图 6 Western blotting 法显示, CTC + Aβ₁₋₄₂ 组 SUR1 蛋白相对表达量高于对照组, 但低于 Aβ₁₋₄₂ 组; CTC 组 SUR1 蛋白相对表达量低于对照组、Aβ₁₋₄₂ 组和 CTC + Aβ₁₋₄₂ 组

Figure 6 Western blotting showed the expression of K_{ATP} subunit SUR1 in CTC + Aβ₁₋₄₂ group was higher than in control group, but lower than that in Aβ₁₋₄₂ group, while the expression of K_{ATP} subunit SUR1 in CTC group was lower than that in control group, Aβ₁₋₄₂ group and CTC + Aβ₁₋₄₂ group.

表 6 不同处理组 SUR1 蛋白和 Kir6.2 蛋白相对表达量的两两比较

Table 6. Pairwise comparison of SUR1 and Kir6.2 proteins expression in different treatment groups

组间两两比	SUR1 蛋白		Kir6.2 蛋白	
	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
(1) : (2)	19.930	0.000	9.143	0.001
(1) : (3)	4.756	0.040	15.000	0.000
(1) : (4)	24.000	0.000	9.429	0.001
(2) : (3)	15.170	0.000	24.140	0.000
(2) : (4)	43.930	0.000	18.570	0.000
(3) : (4)	28.760	0.000	5.571	0.018



GAPDH, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; 1, CTC 组; 2, CTC + Aβ₁₋₄₂ 组; 3, Aβ₁₋₄₂ 组; 4, 对照组

图 7 Western blotting 法显示, CTC + Aβ₁₋₄₂ 组 Kir6.2 蛋白相对表达量低于对照组和 Aβ₁₋₄₂ 组; CTC 组 Kir6.2 蛋白相对表达量低于对照组和 Aβ₁₋₄₂ 组, 但高于 CTC + Aβ₁₋₄₂ 组

Figure 7 Western blotting showed the expression of K_{ATP} subunit Kir6.2 in CTC + Aβ₁₋₄₂ group was lower than that in control group and Aβ₁₋₄₂ group, while the expression of Kir6.2 protein in CTC group was lower than that in control group, Aβ₁₋₄₂ group, but higher than that in CTC + Aβ₁₋₄₂ group.

p38 MAPK 与 ATP 结合而使其失去激酶活性, 从而抑制 p38 MAPK 信号转导通路。SB203580 通过与 p38 MAPK 的 ATP 结合, 较易抑制 p38α 和 p38β 的活性。虽然抑制 p38 MAPK 的自体磷酸化, 但上游 MAPK 磷酸化能力并未受到影响。利用这种化学性质, SB203580 已被用于鉴定培养细胞中 p38 MAPK 的自磷酸化^[33-34]。本研究结果显示, 与 Aβ₁₋₄₂ 组相比, SB203580 + Aβ₁₋₄₂ 组的 K_{ATP} 亚基 SUR1/Kir6.2 蛋白相对表达量均降低, 表明 SB203580 可以显著降低 Aβ₁₋₄₂ 诱导的 SUR1/Kir6.2 蛋白的表达。分析其原因, 可能是由于 Aβ 斑块引起其周围神经胶质细胞增生激活, 释放炎症因子, 激活 p38 MAPK, p38 MAPK 迅速转移至细胞核, 激活转录因子, 导致 K_{ATP} 亚基 SUR1/Kir6.2 mRNA 表达升高, 表明活化的 p38 MAPK 不仅有促神经炎症作用, 导致 SUR1/Kir6.2 mRNA 表达升高, 而且对周围神经元也有神经毒性作用。而 SB203580 位于 ATP 结合位点, 导致 p38 MAPK 失去与 ATP 结合的能力, 不仅降低 Aβ 的细胞

毒性作用, 而且显著降低 Aβ₁₋₄₂ 诱导的 SUR1/Kir6.2 蛋白表达量。因此, p38 MAPK 信号转导通路也参与 Aβ₁₋₄₂ 细胞毒性作用导致的 K_{ATP} 亚基 SUR1/Kir6.2 蛋白表达量的升高。在本研究中, SB203580 组 K_{ATP} 亚基 SUR1/Kir6.2 蛋白表达均低于对照组、Aβ₁₋₄₂ 组和 SB203580 + Aβ₁₋₄₂ 组, 表明 SB203580 对 Aβ₁₋₄₂ 诱导的 Kir6.2 蛋白表达升高的抑制作用是非特异性的, 而 SB203580 + Aβ₁₋₄₂ 组与对照组相比, SUR1 蛋白相对表达量无明显差异, 表明 SB203580 对 Aβ₁₋₄₂ 诱导的 K_{ATP} 亚基 SUR1 蛋白表达升高有特异性抑制作用。因此认为, p38 MAPK 信号转导通路部分参与 Aβ 诱导的 K_{ATP} 亚基 SUR1/Kir6.2 蛋白的表达。

PKC 是一类依赖磷脂的丝氨酸/苏氨酸激酶, 至少由 12 种同工酶组成^[35]。静息状态下, PKC 以无活性形式存在于细胞质中^[36], 而应激状态下, PKC 转移至细胞膜而被激活。研究表明, 佛波醇-12-肉豆蔻酸酯-13-乙酸酯 (phorbol-12-myristate-13-acetate) 是一种非特异性 PKC 激活剂, 可降低神经元 Aβ 水

平^[37]。PKC 调节 α -分泌酶,尤其是 PKC 的 α 同工酶和 ϵ 同工酶,PKC 介导的 α -分泌酶激活在阿尔茨海默病的治疗上具有 3 个有益结局:增加可溶性淀粉样前体蛋白 α (sAPP α)产生,减少 A β ,通过 PKC 介导的下游底物磷酸化增强记忆力^[38-39]。本研究采用 CTC 处理细胞后,与 A β_{1-42} 组相比,CTC + A β_{1-42} 组 K_{ATP}亚基 SUR1/Kir6.2 蛋白相对表达量均降低,表明 CTC 可以降低 A β_{1-42} 诱导的 SUR1/Kir6.2 蛋白的表达。其可能机制是,PKC 从细胞质到细胞膜的激活促进各种蛋白质磷酸化,包括离子通道蛋白的丝氨酸或苏氨酸残基,从而改变 K_{ATP}通道蛋白的构象和门控动力学,升高 K_{ATP}亚基 SUR1/Kir6.2 蛋白的表达。PKC 抑制剂 CTC 抑制一系列蛋白磷酸化作用,从而降低 K_{ATP}亚基蛋白的表达,以调节离子通道的开关。因此,PKC 信号转导通路也参与神经元 K_{ATP}亚基 SUR1/Kir6.2 蛋白表达的升高。本研究结果显示,与 A β_{1-42} 组相比,CTC 组 K_{ATP}亚基 SUR1/Kir6.2 蛋白表达均降低,表明 CTC 对 A β_{1-42} 诱导的 K_{ATP}亚基表达的抑制作用是非特异性的;与 CTC + A β_{1-42} 组相比,CTC 组 K_{ATP}亚基 SUR1 蛋白表达降低,而 K_{ATP}亚基 Kir6.2 蛋白则相反,表明 CTC 对 A β_{1-42} 诱导的 Kir6.2 蛋白表达的抑制作用是特异性的,提示 PKC 仅部分参与 A β_{1-42} 诱导的 K_{ATP}亚基蛋白的表达。

K_{ATP}在阿尔茨海默病中具有潜在的神经保护作用。我们的前期研究表明,原代培养的胆碱能神经元暴露于 A β_{1-42} 72 小时,导致 K_{ATP}亚基表达的差异性增加。在本研究中,NF- κ B、p38 MAPK 和 PKC 信号转导通路均部分参与 A β_{1-42} 诱导的 K_{ATP}亚基 SUR1/Kir6.2 蛋白的表达,抑制上述信号转导通路可以降低神经元 K_{ATP}亚基 SUR1/Kir6.2 蛋白的表达。表明 NF- κ B、p38 MAPK 和 PKC 信号转导通路在 A β_{1-42} 诱导的 SUR1/Kir6.2 蛋白的表达方面发挥关键作用,为下一步从信号转导通路方面研究防治阿尔茨海默病药物靶点提供新的理论视角。

利益冲突 无

参 考 文 献

- [1] Kawasumi M, Hashimoto Y, Chiba T, Kanekura K, Yamagishi Y, Ishizaka M, Tajima H, Niikura T, Nishimoto I. Molecular mechanisms for neuronal cell death by Alzheimer's amyloid precursor protein-relevant insults [J]. *Neurosignals*, 2002, 11: 236-250.
- [2] Watson D, Castaño E, Kokjohn TA, Kuo YM, Lyubchenko Y, Pinsky D, Connolly ES Jr, Esh C, Luehrs DC, Stine WB, Rowse LM, Emmerling MR, Roher AE. Physicochemical characteristics of soluble oligomeric Abeta and their pathologic role in Alzheimer's disease [J]. *Neurol Res*, 2005, 27:869-881.
- [3] Carrotta R, Di Carlo M, Manno M, Montana G, Picone P, Romancino D, San Biagio PL. Toxicity of recombinant beta-amyloid prefibrillar oligomers on the morphogenesis of the sea urchin *Paracentrotus lividus* [J]. *FASEB J*, 2006, 20:1916-1917.
- [4] Ma G, Fu Q, Zhang Y, Gao J, Jiang J, Bi A, Liu K, Du Y, Chen C, Cui Y, Lu L. Effects of Abeta1-42 on the subunits of KATP expression in cultured primary rat basal forebrain neurons [J]. *Neurochem Res*, 2008, 33:1419-1424.
- [5] Yamada S, Kane GC, Behfar A, Liu XK, Dyer RB, Faustino RS, Miki T, Seino S, Terzic A. Protection conferred by myocardial ATP-sensitive K⁺ channels in pressure overload-induced congestive heart failure revealed in KCNJ11 Kir6.2-null mutant [J]. *J Physiol*, 2006, 577(Pt 3):1053-1065.
- [6] Lefer DJ, Nichols CG, Coetzee WA. Sulfonylurea receptor 1 subunits of ATP-sensitive potassium channels and myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2009, 19:61-67.
- [7] Yu Y, Zhou L, Sun M, Zhou T, Zhong K, Wang H, Liu Y, Liu X, Xiao R, Ge J, Tu P, Fan DS, Lan Y, Hui C, Chui D. Xyloside G reduces amyloid- β induced neurotoxicity by inhibiting NF- κ B signaling pathway in neuronal cells [J]. *J Alzheimers Dis*, 2012, 30:263-275.
- [8] Ferrer I. Stress kinases involved in tau phosphorylation in Alzheimer's disease, tauopathies and APP transgenic mice [J]. *Neurotox Res*, 2004, 6:469-475.
- [9] Zhu X, Rottkamp CA, Hartzler A, Sun Z, Takeda A, Boux H, Shimohama S, Perry G, Smith MA. Activation of MKK6, an upstream activator of p38, in Alzheimer's disease [J]. *J Neurochem*, 2001, 79:311-318.
- [10] Kim HJ, Kim JH, Chae SC, Park YC, Kwon KS, Hong ST. Soluble oligomeric Abeta disrupts the protein kinase C signaling pathway [J]. *Neuroreport*, 2004, 15:503-507.
- [11] Sattiraju S, Reyes S, Kane GC, Terzic A. K(ATP) channel pharmacogenomics: from bench to bedside [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2008, 83:354-357.
- [12] Selkoe DJ. Clearing the brain's amyloid cobwebs [J]. *Neuron*, 2001, 32:177-180.
- [13] Liu J, Yin F, Zheng X, Jing J, Hu Y. Geniposide, a novel agonist for GLP-1 receptor, prevents PC12 cells from oxidative damage via MAP kinase pathway [J]. *Neurochem Int*, 2007, 51: 361-369.
- [14] Patel JR, Brewer GJ. Age-related differences in NFkappaB translocation and Bcl-2/Bax ratio caused by TNFalpha and Abeta42 promote survival in middle-age neurons and death in old neurons [J]. *Exp Neurol*, 2008, 213:93-100.
- [15] Tickler AK, Wade JD, Separovic F. The role of Abeta peptides in Alzheimer's disease [J]. *Protein Pept Lett*, 2005, 12:513-519.
- [16] Zeng X, Wang T, Jiang L, Ma G, Tan S, Li J, Gao J, Liu K, Zhang Y. Diazoxide and cyclosporin A protect primary cholinergic neurons against beta-amyloid (1-42)-induced cytotoxicity [J]. *Neurol Res*, 2013, 35:529-536.
- [17] Zhi-Kun S, Hong-Qi Y, Zhi-Quan W, Jing P, Zhen H, Sheng-Di C. Erythropoietin prevents PC12 cells from beta-amyloid-induced apoptosis via PI3K/Akt pathway [J]. *Transl Neurodegener*, 2012, 1:7.
- [18] Liu D, Slevin JR, Lu C, Chan SL, Hansson M, Elmér E, Mattson MP. Involvement of mitochondrial K⁺ release and cellular efflux in ischemic and apoptotic neuronal death [J]. *J Neurochem*, 2003, 86:966-979.
- [19] Tan S, Ma G, Li Y, Li J, Yao W, Ren X, Liu X, Gao J. Effects of A β 1-42 on the current of KATP channels in cultured

- cholinergic neurons[J]. *Neurol Res*, 2012, 34:707-713.
- [20] Ma G, Gao J, Fu Q, Jiang L, Wang R, Zhang Y, Liu K. Diazoxide reverses the enhanced expression of KATP subunits in cholinergic neurons caused by exposure to $A\beta_{1-42}$ [J]. *Neurochem Res*, 2009, 34:2133-2140.
- [21] Elfering SL, Sarkela TM, Giulivi C. Biochemistry of mitochondria nitric-oxide synthase[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277:38079-38086.
- [22] Geng L, Zhang T, Liu W, Chen Y. Inhibition of miR-128 Abates $A\beta$ -mediated cytotoxicity by targeting PPAR- γ via NF- κ B inactivation in primary mouse cortical neurons and neuro2a cells[J]. *Yonsei Med J*, 2018, 59:1096-1106.
- [23] Mattson MP, Culmsee C, Yu Z, Camandola S. Roles of nuclear factor kappaB in neuronal survival and plasticity [J]. *J Neurochem*, 2000, 74:443-456.
- [24] Cuadrado A, Nebreda AR. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling[J]. *Biochem J*, 2010, 429:403-417.
- [25] Barone FC, Irving EA, Ray AM, Lee JC, Kassis S, Kumar S, Badger AM, Legos JJ, Erhardt JA, Ohlstein EH, Hunter AJ, Harrison DC, Philpott K, Smith BR, Adams JL, Parsons AA. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase provides neuroprotection in cerebral focal ischemia [J]. *Med Res Rev*, 2001, 21:129-145.
- [26] Ossum CG, Lauritsen AN, Karotki DG, Hoffmann EK. Differential role for ERK2 in anoxia-induced activation of transcription and translation of Hsp70 in NIH 3T3 cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2011, 27:109-120.
- [27] Shukla D, Saxena S, Jayamurthy P, Sairam M, Singh M, Jain SK, Bansal A, Ilavazaghan G. Hypoxic preconditioning with cobalt attenuates hypobaric hypoxia-induced oxidative damage in rat lungs[J]. *High Alt Med Biol*, 2009, 10:57-69.
- [28] Munoz L, Ralay Ranaivo H, Roy SM, Hu W, Craft JM, McNamara LK, Chico LW, Van Eldik LJ, Watterson DM. A novel p38 alpha MAPK inhibitor suppresses brain proinflammatory cytokine up-regulation and attenuates synaptic dysfunction and behavioral deficits in an Alzheimer's disease mouse model[J]. *J Neuroinflammation*, 2007, 4:21.
- [29] Kim SH, Smith CJ, Van Eldik LJ. Importance of MAPK pathways for microglial pro-inflammatory cytokine IL-1 beta production[J]. *Neurobiol Aging*, 2004, 25:431-439.
- [30] Bachstetter AD, Xing B, de Almeida L, Dimayuga ER, Watterson DM, Van Eldik LJ. Microglial p38alpha MAPK is a key regulator of proinflammatory cytokine up-regulation induced by toll-like receptor (TLR) ligands or beta-amyloid (Abeta)[J]. *J Neuroinflammation*, 2011, 8:79.
- [31] Bodles AM, Barger SW. Secreted beta-amyloid precursor protein activates microglia via JNK and p38 - MAPK [J]. *Neurobiol Aging*, 2005, 26:9-16.
- [32] Kikuchi M, Tenneti L, Lipton SA. Role of p38 mitogen-activated protein kinase in axotomy-induced apoptosis of rat retinal ganglion cells[J]. *J Neurosci*, 2000, 20:5037-5044.
- [33] Ge B, Gram H, Di Padova F, Huang B, New L, Ulevitch RJ, Luo Y, Han J. MAPKK-independent activation of p38alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38alpha [J]. *Science*, 2002, 295:1291-1294.
- [34] Li J, Miller EJ, Ninomiya-Tsuji J, Russell RR 3rd, Young LH. AMP-activated protein kinase activates p38 mitogen-activated protein kinase by increasing recruitment of p38 MAPK to TAB1 in the ischemic heart[J]. *Circ Res*, 2005, 97:872-879.
- [35] D'Cruz BJ, Fertig KC, Filiano AJ, Hicks SD, DeFranco DB, Callaway CW. Hypothermic reperfusion after cardiac arrest augments brain-derived neurotrophic factor activation [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2002, 22:843-851.
- [36] Xu SZ, Bullock L, Shan CJ, Cornelius K, Rajanna B. PKC isoforms were reduced by lead in the developing rat brain [J]. *Int J Dev Neurosci*, 2005, 23:53-64.
- [37] Fu H, Dou J, Li W, Cui W, Mak S, Hu Q, Luo J, Lam CS, Pang Y, Youdim MB, Han Y. Promising multifunctional anti-Alzheimer's dimer bis(7)-cognitin acting as an activator of protein kinase C regulates activities of alpha-secretase and BACE-1 concurrently[J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 623:14-21.
- [38] Lanni C, Mazzucchelli M, Porrello E, Govoni S, Racchi M. Differential involvement of protein kinase C alpha and epsilon in the regulated secretion of soluble amyloid precursor protein [J]. *Eur J Biochem*, 2004, 271:3068-3075.
- [39] Alkon DL, Epstein H, Kuzirian A, Bennett MC, Nelson TJ. Protein synthesis required for long-term memory is induced by PKC activation on days before associative learning [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102:16432-16437.

(收稿日期:2021-11-16)

(本文编辑:袁云)

欢迎订阅 2022 年《中国现代神经疾病杂志》

《中国现代神经疾病杂志》为国家卫生健康委员会主管、中国医师协会主办的神经病学类专业期刊。办刊宗旨为:理论与实践相结合、普及与提高相结合,充分反映我国神经内外科临床科研工作重大进展,促进国内外学术交流。所设栏目包括述评、专论、论著、临床病理报告、应用神经解剖学、神经影像学、循证神经病学、流行病学调查研究、基础研究、临床研究、综述、临床医学图像、病例报告、临床病理(例)讨论、新技术新方法等。

《中国现代神经疾病杂志》为北京大学图书馆《中文核心期刊要目总览》2017 年版(即第 8 版)和 2020 年版(即第 9 版)核心期刊以及国家科技部中国科技论文统计源期刊,国内外公开发行。中国标准连续出版物号:ISSN 1672-6731, CN 12-1363/R。国际大 16 开型,彩色插图,48 页,月刊,每月 25 日出版。每期定价 15 元,全年 12 册共计 180 元。2022 年仍由邮政局发行,邮发代号:6-182。请向全国各地邮政局订阅,亦可直接向编辑部订阅(免邮资费)。

编辑部地址:天津市津南区吉兆路 6 号天津市环湖医院 A 座二楼西区,邮政编码:300350。

联系电话:(022)59065611,59065612;传真:(022)59065631。网址:www.xdjb.org(中文),www.ejcn.org(英文)。