

二苯乙烯苷对冈田酸诱导的 NG108-15 细胞 tau 蛋白磷酸化的干预作用

谭俊杰¹, 吴文雪², 廖艳花², 苏彦兆¹, 李振中², 黄健², 黄忠仕²

(1. 广西中医药大学药学院, 广西 南宁 530200;

2. 右江民族医学院, 广西 百色 533000)

摘要:目的 观察二苯乙烯苷(TSG)对冈田酸诱导的 NG108-15 细胞增殖及磷酸激酶 PP2A、PP2B、PP5 和 tau 蛋白磷酸化的影响,探讨其抗老年痴呆的作用机制。**方法** 采用 MTT 法观察 TSG 作用于冈田酸诱导的 NG108-15 细胞 24 h 的增殖情况。取对数生长期的 NG108-15 细胞,将其分为正常组,模型组,以及 TSG 低、中、高剂量(50 nmol · L⁻¹、100 nmol · L⁻¹、200 nmol · L⁻¹)组。利用 AO/EB 双荧光染色法检测 TSG 对细胞凋亡的影响;蛋白质免疫印迹法(Western Immunoblotting)检测 PP2A、PP2B、PP5、tau 和 P-tau 的表达。qRT-PCR 法检测 PP2A、PP2B mRNA 的变化。免疫荧光(immunofluorescence)检测 PP2A、PP2B 和 tau 蛋白表达和分布。**结果** TSG 能够增强冈田酸诱导的 NG108-15 细胞的增殖能力,呈一定的剂量依赖;与模型组比较,TSG 能抑制冈田酸对 NG108-15 细胞的衰老。TSG 能提高 PP2A、PP2B、PP5 蛋白和降低 P-tau 蛋白的表达;此外,还能提高 PP2A、PP2B mRNA 的转录水平。**结论** 二苯乙烯苷能提高 NG108-15 细胞的抗衰老能力,降低 tau 蛋白的异常磷酸化,其机制可能是与参与下调 tau 蛋白磷酸化的磷酸酶有关。

关键词:二苯乙烯苷;NG108-15 细胞;磷酸化 tau 蛋白;蛋白磷酸酶 2A;蛋白磷酸酶 2B;蛋白磷酸酶 5

中图分类号:R965.2

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2019)02-0121-06

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2019.02.001

Intervention effect of tetrahydroxy stilbene glycoside on tau protein phosphorylation in NG108-15 cells induced by Okadaic acid

Tan Junjie¹, Wu Wenxue², Liao Yanhua², Su Yanzhao¹, Li Zhenzhong², Huang Jian², Huang Zhongshi²

(1. College of Pharmacy, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530200, Guangxi, China;

2. Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To observe the effect of tetrahydroxy stilbene glycoside (TSG) on proliferation of NG108-15 cells induced by Okadaic acid and phosphokinase PP2A, PP2B, PP5 and phosphorylation of tau protein, and explore the mechanism of its anti-Alzheimer's disease. **Methods** MTT assay was used to observe the effects of TSG on proliferation of NG108-15 cells induced by Okadaic acid at 24 h. NG108-15 cells at logarithmic growth stage were taken and divided into normal a group, a model group, and TSG low-, medium- and high-dose (50 nmol · L⁻¹, 100 nmol · L⁻¹, 200 nmol · L⁻¹) groups. The effect of TSG on cell apoptosis was detected by AO/EB double fluorescence staining. The expressions of protein phosphatase 2A (PP2A), protein phosphatase 2B (PP2B), protein phosphatase 5 (PP5), tau and P-tau were detected by western Immunoblotting. The changes of mRNA of PP2A and PP2B were measured by qRT-PCR. The expression and distribution of PP2A, PP2B and tau protein were detected by immunofluorescence. **Results** TSG could enhance the proliferation of NG108-15 cells induced by Okadaic acid in a dose-dependent manner. Compared with the model

基金项目:国家自然科学基金(81860709);广西自然科学基金(2016GXNSFAA380249)

第一作者简介:谭俊杰(1992-),男,在读硕士研究生,研究方向:抗老年痴呆药物研究,E-mail:412544784@qq.com

通信作者简介:黄忠仕(1970-),男,教授,硕士研究生导师,研究方向:抗老年痴呆药物研究,E-mail:hzs1004@163.com

group, TSG could inhibit the senescence of NG108-15 cells induced by Okadaic acid. TSG could increase the expression of PP2A, PP2B and PP5 protein and reduce the expression of P-tau protein. In addition, TSG could also increase the transcription of PP2A, PP2B mRNA. **Conclusion** TSG can improve the anti-aging ability of NG108-15 cells and reduce the abnormal phosphorylation of tau protein, and the mechanism may be related to phosphatases involved in the down-regulation of tau protein phosphorylation.

Key words: tetrahydroxy stilbene glycoside; NG108-15 cells; phosphorylated tau protein; protein phosphatase 2A (PP2A); protein phosphatase 2B PP2B (PP2B); protein phosphatase 5 (PP5)

阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD),又叫老年性痴呆,是一种伴有进行性认知障碍的神经退行性疾病。主要表现为渐进性记忆障碍、认知功能障碍、人格改变及语言障碍等神经精神症状^[1]。AD的病理改变主要包括 β 蛋白沉积和神经原纤维缠结(NFTs)^[2]。NFTs主要由过度磷酸化的tau蛋白组成,tau蛋白的过度磷酸化和异常聚集,再加上其转换清除能力下降,从而形成神经纤维缠结^[3],NFTs与AD临床的病理表现程度呈现出很高的相关性。因此tau蛋白的磷酸化和去磷酸化异常在AD的发病机制中发挥重要的作用,调节tau蛋白表达及其磷酸化水平是治疗AD药物的重要靶点之一。

何首乌作为一种著名的中草药,在中国、日本和韩国的传统医学中早已有运用。其主要化学成分为二苯乙烯苷类化合物、蒽醌类化合物及聚合原花青素等^[4]。二苯乙烯苷是何首乌中的主要生物活性成分,其代表成分为2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷(tetrahydroxy stilbene glucoside, TSG),分子量是406.39,具有保护神经、提高学习记忆力、抗衰老、防治老年痴呆、舒张血管、保护肝脏、降血脂、抗炎、抗肿瘤等生物活性^[5]。本实验以冈田酸(Okadaic acid, OA)诱导的NG108-15细胞为模型,观察二苯乙烯对AD发病关键物质tau蛋白及其磷酸激酶的影响。

1 材料

1.1 细胞株 NG108-15大小鼠神经瘤混合细胞购自中国科学院上海细胞生物所。

1.2 主要仪器 实时荧光定量PCR仪(原应用生物系统公司);CO₂细胞培养箱(美国Thermo Forma公司,Scientific3111);Odyssey双色红外荧光扫描成像系统(美国LICOR公司,Sa);连续光谱扫描式酶标仪(香港分子仪器公司,SpectraMaxPlus384);荧光倒置显微镜(日本Olympus公司,CKX-41)。

1.3 药物与试剂 二苯乙烯苷(tetrahydroxy stilbene glucoside)购自Sigma公司(批号#017M4703V);冈田酸购于Sigma公司(批号#SLBS1501V);高糖DMEM培养基购自美国gibco公司(批号:8118348);胎牛血清购自AUSGENEX(批号:FBSSA00418-2);青链霉素混合液购于北京索莱宝

科技有限公司(批号:20181123);MTT;BIOSHARP公司(批号:2016106);兔抗tau(批号:00036062)、兔抗PP2A(批号:00003450)、兔抗PP2B(批号:00050052)、多克隆抗体PP5(批号:00051499)、兔抗 β -actin单克隆抗体(批号:00057922),上述抗体均购于美国Proteintech Group公司;兔抗P-tau单克隆抗体购于Cell Signaling公司(批号:1);Western一抗稀释液购于碧云天生物技术公司(批号:082118180821);Western二抗稀释液购于碧云天生物技术公司(批号:061418180703);Trizol购于TaKaRa宝生物工程(大连)有限公司(批号:AA7101-1);PCR试剂盒购于TaKaRa宝生物工程(大连)有限公司(批号:AI21777A);逆转录试剂盒购于TaKaRa宝生物工程(大连)有限公司(批号:AI12361A)。

2 实验步骤

2.1 细胞培养传代冻存 NG108-15细胞用10%胎牛血清和1%青链霉素混合液与DMEM配成完全培养基,培养于细胞培养箱中。每天观察细胞生长状态。待生长至85%后,用胰酶将细胞消化吹打取出,以800 r/min,5 min离心细胞悬液,离心后加入完全培养基,反复吹打使之成单细胞悬液,将细胞悬液分装至2~3个培养瓶中,置于37℃、5% CO₂培养箱中继续培养。将对数期细胞消化离心,以血清:二甲基亚砷=9:1的比例配制冻存液,置于-80℃冰箱中保存。

2.2 MTT法检测细胞增殖 取对数生长期的NG108-15细胞,以每孔 6×10^3 个细胞接种于96孔板,每孔100 μ l的含10% FBS完全培养基,置于37℃、5% CO₂培养箱中孵育培养24 h后,弃去培养液,每孔加含不同浓度10 nmol·L⁻¹、20 nmol·L⁻¹、40 nmol·L⁻¹、80 nmol·L⁻¹、160 nmol·L⁻¹ OA的培养液100 μ l,同时未经处理的细胞为正常对照组,每组设6个复孔,继续培养24 h后,每孔加10 μ l 5 mg·L⁻¹的MTT,置于37℃、5% CO₂培养箱中避光孵育4 h,弃去上清液,每孔加入100 μ l二甲基亚砷,室温低速振荡10 min,于酶标仪490 nm处测量吸光度值。按公式计算抑制率:抑制率=(1-实验组OD值/空白对照组OD值)×100%。

2.3 细胞分组及给药方式 将细胞分成5组:正常对

照组,模型组,TSG低、中、高剂量组。TSG低、中、高剂量组给予药物预处理24h,再加入OA,继续培养24h。具体分组如下(以下所示浓度均为终浓度):

A. 正常对照组:NG108-15细胞+DMEM完全培养液。

B. 模型组:NG108-15细胞+OA(80 nmol·L⁻¹)。

C. TSG低剂量组:NG108-15细胞+TSG 50 nmol·L⁻¹+OA(80 nmol·L⁻¹)。

D. TSG中剂量组:NG108-15细胞+TSG 100 nmol·L⁻¹+OA(80 nmol·L⁻¹)。

E. TSG高剂量组:NG108-15细胞+TSG 200 nmol·L⁻¹+OA(80 nmol·L⁻¹)。

2.4 细胞总蛋白的提取 吸弃6孔板中的培养液,PBS清洗2次,以RIPA高效裂解液:蛋白酶抑制剂:磷酸酶抑制剂=100:1:1配制蛋白裂解液,混匀后每孔加入150 μl,置于冰上裂解30 min,收集孔内液体,12000 r/min,4℃离心15 min,取上清,置于-80℃冰箱保存备用。利用微量核酸检测仪测定细胞蛋白浓度,以裂解液调零。测定完成蛋白浓度后,将细胞蛋白与5×SDS-PAGE蛋白上样缓冲液按照比例为1:4充分混合,95~100℃煮沸5 min,冷却至室温后直接用于蛋白质免疫印迹检测或者置于-20℃冰箱保存。

2.5 蛋白质免疫印迹法(Western Immunoblotting)

将提取的变性后的蛋白用10%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,用100 mA电流120 min湿法转至PVDF膜上。TBST洗膜3次后,于4℃冰箱中孵育一抗过夜。一抗稀释的比例分别为β-actin(1:5000)、PP2A(1:1000)、PP2B(1:1000)、PP5(1:1000)、tau(1:1000)、P-tau(1:1000)。TBST洗膜3次,HRP标记二抗(1:10000)37℃摇床避光孵育2 h。TBST避光洗膜3次,采用odessey双色红外成像系统进行扫膜。结果以目的条带与对应内参条带光密度值表示,采用ImageJ2×软件进行定量分析。

2.6 qRT-PCR法检测PP2A、PP2B mRNA的表达

2.6.1 引物设计与合成 根据NCBI Gene Bank中Mus PP2A、PP2B、GAPDH基因全序列,设计、合成引物及鉴定由TaKaRa宝生物工程有限公司,引物序列见表1。

表1 PP2A和PP2B的引物序列

基因	序列	Product size/bp
Mus GAPDH	Forward 5'-TGTGTCCTCGTGGATCTGA-3'	150
	Reverse 5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3'	
Mus PP2A	Forward 5'-TCTGGGCAAAGACAACACCATC-3'	126
	Reverse 5'-ATGCCAATCACCTCGTTCACAC-3'	
Mus PP2B	Forward 5'-TGTACACGGTGGTTGTCTCCAG-3'	87
	Reverse 5'-GGCCATAAGCAGGTGGTTC-3'	

2.6.2 Trizol法抽提细胞总RNA 用RNase-free水稀释RNA,以0.1%RNase-free水调零,取2 μl RNA在核酸测定仪上检测总RNA浓度及A260/A280比值,以判断总RNA的纯度,A260/A280的值在1.8~2.1之间,说明RNA纯度较纯,无杂质蛋白等污染,可进行下一步去除基因组DNA反应和反转录反应。qRT-PCR结果以小鼠GAPDH为内参,采用2^{-ΔΔCt}法进行相对定量分析。

2.7 免疫荧光检测PP2A、PP2B和tau蛋白的表达

将处于对数生长期的细胞消化离心,用强酸浸泡盖玻片过夜,取出盖玻片经蒸馏水洗干净,烘干后经高压灭菌,烘干后放于6孔板中,以1×10⁵个/孔的数量接种于孔内,置于37℃、5% CO₂的培养箱中培养24 h后按上述方法给药,吸去培养基,PBS浸洗3次,每次5 min。在4%多聚甲醛常温固定20 min,PBS洗3次,每次5 min。在0.2% TritonX-100室温通透5 min,PBS洗3次,每次5 min。滴加5%BSA-PBS进行封闭,把装有玻片的培养板放于湿盒中,室温孵育1 h后,用滤纸将多余的BSA-PBS溶液吸去,注意不要干片。在玻片上滴加50 μl稀释后的目的蛋白PP2A、PP2B、tau一抗,将培养板放于湿盒中,于4℃冰箱过夜。PBS洗3次,每次5 min。在玻片上滴加50 μl荧光二抗,将培养板放于湿盒中室温避光孵育1 h。PBS洗3次,每次5 min,在玻片上滴加50 μl的DAPI复染细胞核,将培养板放于湿盒中室温避光孵育5 min。取出玻片,晾干,滴加封片剂。放到荧光显微镜下观察。

2.8 统计学方法 采用SPSS 22.0统计软件,数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行检验,以P<0.05表示差异有统计学意义,P<0.01表示差异有显著统计学意义。

3 实验结果

3.1 MTT法检测细胞增殖实验

3.1.1 OA对NG108-15细胞存活率的影响 实验结果显示,OA能抑制NG108-15细胞增殖,且随着OA浓度的增加抑制作用越明显,40 nmol·L⁻¹OA能够使细胞存活率与正常对照组细胞存活率比较降至81.21%(P<0.05),80 nmol·L⁻¹OA能够使细胞存活率与正常对照组细胞存活率比较降至51.81%(P<0.01),细胞生存率随着OA浓度的增加而降低,并接近IC₅₀且降低趋势明显。因此选择80 nmol·L⁻¹OA作为后续实验诱导建立阿尔兹海默症细胞模型的浓度。具体见图1。

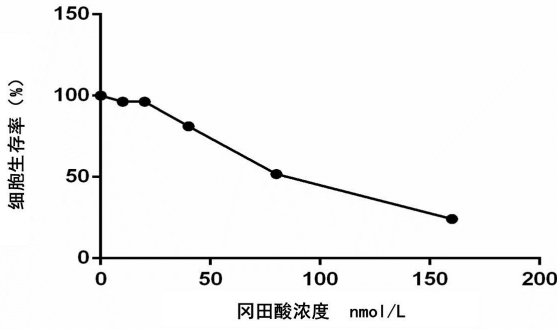


图1 MTT法检测OA对NG108-15细胞的抑制作用($\bar{x} \pm s, n=5$)

3.1.2 TSG对OA诱导NG108-15细胞损伤存活率的影响 NG108-15细胞经过 $80 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ OA作用24h后,生存率明显降低,与正常对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。OA作用24h前给予不同剂量TSG均能增加细胞的生存率,与模型组比较均具有显著性差异。具体见图2。

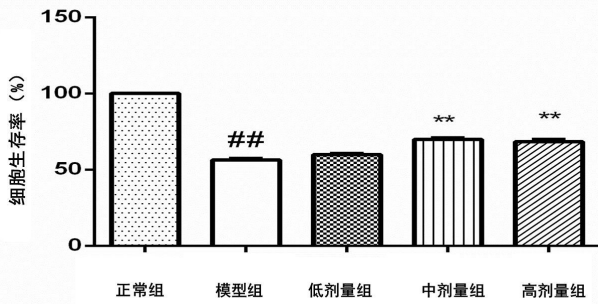


图2 MTT法检测TSG对冈田酸诱导的NG108-15细胞的作用($\bar{x} \pm s, n=5$)

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$

3.2 Western Immunoblotting法检测TSG对冈田酸诱导的NG108-15细胞PP2A、PP2B、PP5、tau和P-tau蛋白表达的影响 实验结果显示,与正常组比较,模型组能提高NG108-15细胞PP2A、PP2B、PP5和P-tau蛋白的表达($P < 0.01$),tau的蛋白水平无明显变化。经TSG预处理再给予冈田酸诱导后,以 β -actin为内参,TSG能上调NG108-15细胞的PP2A、PP2B、PP5蛋白表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),以tau为参照,TSG能下调P-tau/tau的比值($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),P-tau在tau中的表达含量降低。结果见图3、图4。

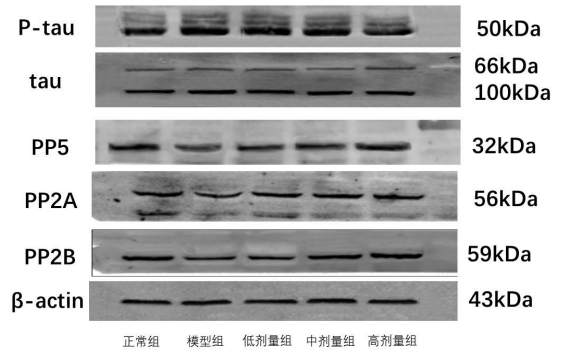


图3 Western Immunoblotting蛋白印迹图

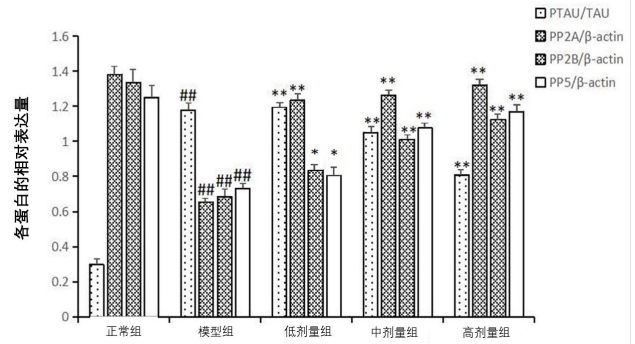


图4 TSG预处理对诱导的NG108-15细胞蛋白质的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:与模型组比较,** $P < 0.01$;与正常组比较,## $P < 0.01$

3.3 TSG对OA诱导的NG108-15细胞PP2A和PP2B mRNA水平的影响 实验结果显示,与正常对照比较,OA能降低PP2A和PP2B mRNA的表达($P < 0.001$)。经TSG处理后,能下调PP2A和PP2B的表达($P < 0.05$, $P < 0.01$)。仪器显示扩增曲线基数期基本稳定在同一水平,曲线整体平行性良好拐点清晰。溶解曲线体现为锐利的单一峰无异常双峰出现。说明所设计产物特异性强,无非特异性扩增和引物二聚体产生。结果见图5、图6。

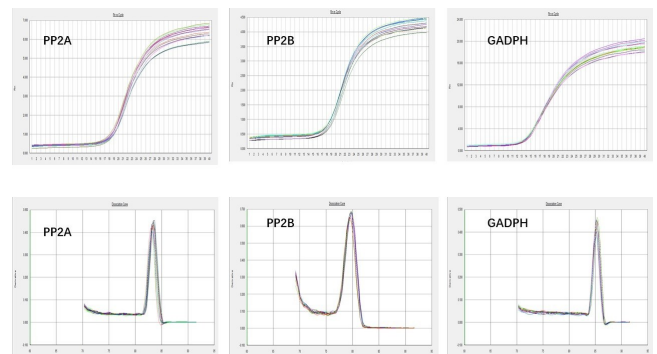


图5 PCR扩增曲线和溶解曲线

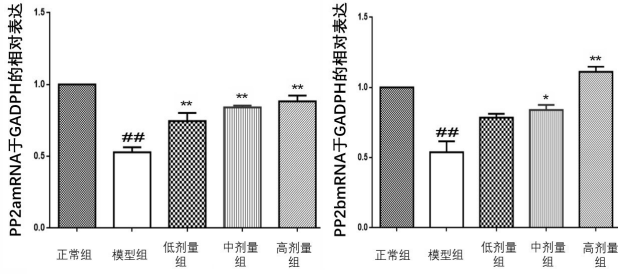


图 6 二苯乙烯苷对 NG108-15 细胞基因

PP2A 和 PP2B 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:与正常组比较,## $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$,
* * $P < 0.01$

3.4 免疫荧光测定 TSG 对冈田酸诱导的 NG108-15 细胞 PP2A、PP2B、tau 的影响 实验结果显示,与正常对照组比较,OA 能增加细胞内 PP2A、PP2B 的蛋白表达,经药物预先处理后,TSG 能上调 PP2A、PP2B 蛋白表达。结果见图 7、图 8。实验结果显示,与正常对照组比较,OA 能增加细胞内 tau 蛋白的聚集,经药物预先处理后,TSG 能减少 tau 蛋白的聚集。结果见图 9。

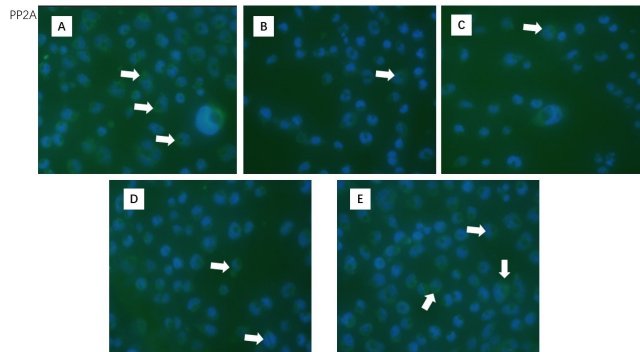


图 7 免疫荧光检测 PP2A($\times 400$)

注:A:正常组;B:模型组;C:TSG 低剂量组;D:TSG 中剂量组;
E:TSG 高剂量组

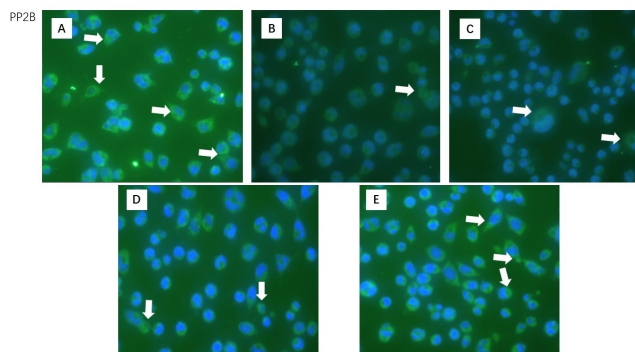


图 8 免疫荧光 PP2B($\times 400$)

注:A:正常组;B:模型组;C:TSG 低剂量组;D:TSG 中剂量组;
E:TSG 高剂量组

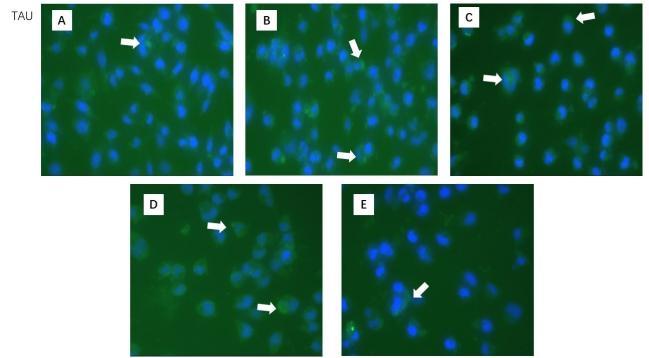


图 9 免疫荧光 tau($\times 400$)

注:A:正常组;B:模型组;C:TSG 低剂量组;D:TSG 中剂量组;
E:TSG 高剂量组

4 讨论

二苯乙烯苷作为何首乌的主要活性成分,有研究表明其能改善学习记忆功能,减少脑内淀粉样斑块和 $A\beta$ 含量,保护神经突触的结构和功能,减少神经元死亡,对 AD 的防治有着积极的作用^[6]。tau 蛋白是微管相关的主要蛋白,其主要功能是促进微管蛋白组装成微管,稳定微管结构。在 AD 的发生过程中,tau 蛋白受各种因素的影响导致过度磷酸化,过度磷酸化的 tau 蛋白失去了有效聚合的能力,从而聚合集成对螺旋细丝的形式异常地组装形成神经元纤维缠结,失去了维持微管正常形态与功能的能力,造成神经元的变性损伤^[7-8]。因此,tau 蛋白的异常磷酸化过程被认为是 AD 神经纤维变性的关键之一。通过 OA 诱导神经母瘤细胞的衰老来模拟 AD 的 tau 病理,我们在实验中观察到 tau 的磷酸化显著增加,PP2A、PP2B 和 PP5 的活性降低。TSG 给药处理后增强了 NG108-15 细胞的 PP2A、PP2B 和 PP5 活性,降低了 tau 蛋白磷酸化,从而减弱 tau 蛋白磷酸化。tau 蛋白磷酸化程度是由体内的多种磷酸化的特异性蛋白激酶和脱磷酸化的蛋白磷酸酶(protein phosphatase,PP)两种作用间互相平衡出来的结果^[9-11]。其中主要作用在 tau 上的磷酸酶为 PP1、PP2A、PP2B 和 PP5^[12]。PP 可催化 tau 蛋白的去磷酸化,有研究^[13]发现 AD 病理模型 PP 的活性水平却发生明显降低,蛋白激酶活性水平未发生明显改变,但 tau 的磷酸化水平却明显上升,说明 PP 在 tau 蛋白磷酸化状态调节中起重要作用。PP2A 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸化酶,在蛋白去磷酸化修饰调控中起到很大作用,参与调节真核细胞中大部分的磷酸化过程。tau 作为 PP2A 的底物,PP2A 活性降低,导致 P-tau 蛋白去磷酸下降,tau 过度磷酸化^[14],从而过度磷酸的 tau 沉积形成神经元纤维缠结^[15]。有研究^[16]发现,血液中的 PP2A 活性降低,tau 蛋白的

磷酸化增强,形成神经元纤维缠结并影响其他的相关通路,最终导致出现认知障碍。在本实验中能观察到,OA诱导的NG108-15细胞给予TSG预处理后,细胞存活率增加。表明TSG能增加冈田酸诱导NG108-15细胞损伤的细胞模型的存活率,降低细胞损害。在Western blot法检测中,经OA诱导后P-tau磷酸化蛋白表达量增多,PP2A、PP2B和PP5蛋白磷酸酶表达下降,可推测出导致tau蛋白过度磷酸化的重要原因可能是蛋白酶失调导致的。在qRT-PCR的检测中,也能看出PP2A和PP2B的mRNA上调。经二苯乙烯苷干预后,tau过度磷酸化程度减弱,PP2A、PP2B、PP5蛋白增加。因此,我们推测出,二苯乙烯苷可能是通过上调磷酸酶的相关基因转录和蛋白表达水平,从而减少tau蛋白的磷酸化水平。

综上所述,二苯乙烯苷能上调磷酸酶的相关基因转录和蛋白表达水平,减少tau蛋白的磷酸化水平,增加细胞的抗衰老能力,提高细胞存活率。但二苯乙烯苷对调节tau蛋白磷酸化的蛋白磷酸激酶和蛋白磷酸酶之间的相互作用机制尚不清楚,后期实验中仍需对调控tau蛋白磷酸化的蛋白磷酸激酶调控因子与蛋白磷酸酶的相互作用机制进行进一步研究。

参考文献:

[1] Zhou Y, Shi J, Chu D, et al. Relevance of Phosphorylation and Truncation of tau to the Etiopathogenesis of Alzheimer's Disease[J]. *Frontiers in aging neuroscience*, 2018, 10:27.

[2] Musi N, Valentine JM, Sickora KR, et al. tau protein aggregation is associated with cellular senescence in the brain[J]. *Aging Cell*, 2018, 17(6):e12840.

[3] Cárdenas-Aquayo Mdel C, Gómez-Virgilio L, DeRosa S, et al. The Role of tau Oligomers in the Onset of Alzheimer's Disease Neuropathology [J]. *ACS Chemical Neuroscience*, 2014, 5(12):1178-1191.

[4] 袁炜,高增平,杨建波,等. 何首乌化学成分的研究[J]. *中草药*, 2017, 48(4):631-634.

[5] 陈冰冰,姜爱玲,张岩. 何首乌有效成分二苯乙烯苷的药理活性研究进展[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2016, 21(6):710-715.

[6] 黄蕊,杨翠翠,李林,等. 二苯乙烯苷对APP/PS1小鼠老年斑形成和炎症反应的影响[J]. *中国康复理论与实践*, 2018, 24(1):2-10.

[7] Bejanin A, Schonhaut DR, LaJoie R, et al. tau pathology and neurodegeneration contribute to cognitive impairment in Alzheimer's disease[J]. *Brain*, 2017, 140(12):3286-3300.

[8] He Z, Guo JL, McBride JD, et al. Amyloid- β plaques enhance Alzheimer's brain tau-seeded pathologies by facilitating neuritic plaque tau aggregation[J]. *Nature Medicine*, 2018, 24(1):29-38.

[9] Ma RH, Zhang Y, Hong XY, et al. Role of Microtubule-associated Protein tau Phosphorylation in Alzheimer's Disease [J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2017, 37(3):307-312.

[10] Yang C, Li X, Gao W, et al. Cornel Iridoid Glycoside Inhibits tau Hyperphosphorylation via Regulating Cross-Talk Between GSK-3 β and PP2A Signaling[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2018, 9:682.

[11] THEENDAKARA V, BREDESEN DE, RAO RV. Downregulation of protein phosphatase 2A by apolipoprotein E: Implications for Alzheimer's disease[J]. *Molecular & Cellular Neurosciences*, 2017, 83:83-91.

[12] Liu F, Grundke-iqbal I, Iqbal K, et al. Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation[J]. *Eur J Neurosci*, 2005, 22(8):1942-1950.

[13] Majd S, Majd Z, Koblar S, et al. Beta estradiol and norepinephrine treatment of differentiated SH-SY5Y cells enhances tau phosphorylation at (Ser 396) and (Ser 262) via AMPK but not mTOR signaling pathway[J]. *Molecular & Cellular Neuroscience*, 2018, 88:201-211.

[14] Park HJ, Lee KW, Oh S, et al. Protein Phosphatase 2A and Its Methylation Modulating Enzymes LCMT-1 and PME-1 Are Dysregulated in tauopathies of Progressive Supranuclear Palsy and Alzheimer Disease[J]. *J Neuro-pathol Exp Neurol*, 2018, 77(2):139-148.

[15] Xiao N, Zhang F, Zhu B, et al. CDK5-mediated tau accumulation triggers methamphetamine-induced neuronal apoptosis via endoplasmic reticulum-associated degradation pathway[J]. *Toxicology Letters*, 2018, 292:97-107.

[16] 李骏,朱常勤,梁金玲,等. 糖尿病患者血液中tau磷酸化和总tau蛋白水平及PP2A活性与糖尿病后认知功能障碍研究[J]. *标记免疫分析与临床*, 2018, 25(2):167-170.

收稿日期:2019-02-18;修回日期:2019-03-21