

PDGFR-β/TGF-β/Smad2/3信号通路 调控阿尔茨海默病血脑屏障完整性和 学习记忆能力的分子机制研究

申杰^a,姚雪榕^a,刘越存^a,徐桂华^b

摘要 目的:分析PDGFR-β/TGF-β/Smad2/3 信号通路调控阿尔茨海默病(AD)血脑屏障(BBB)完整性和学 习记忆能力的分子机制。方法:利用APP/PS1转基因AD小鼠模型,通过水迷路及觅食试验分析学习记忆能 力;荧光免疫组织化学法检测海马区血管周细胞增殖率(ki67/desmin)、周细胞覆盖率(desmin/lectin);Western blot检测海马区血管周细胞 TGF-βR1 及其下游信号通路分子、紧密连接(TJs)蛋白的表达水平。经过外源 性PDGF-BB脑室内注射和/或TGF-βR1激酶抑制剂SB431542腹腔内注射预处理后,分别进行上述分析。构 建 AD 体外 BBB 模型,经过 PDGF-BB 和/或 SB431542 作用后,进行异硫氰酸荧光素-牛血清白蛋白 (FITC-BSA)渗透性和跨细胞电阻检测。结果:与对照组相比,APP/PS1小鼠经过虚拟平台次数明显减少,达 到终点所需时间明显延长(水迷路训练试验),投食区正确洗择率明显下降(觅食训练试验);海马区 desmin/ lectin 阳性细胞比例明显下降;TGF-βR1、p-Smad2、p-Smad3蛋白表达水平明显升高;TJs蛋白表达水平明显下 降。外源性PDGF-BB可使APP/PS1小鼠经过虚拟平台次数明显增加、达到终点所需时间明显缩短(水迷路正 式试验第28天)、投食区正确选择率明显提高(觅食正式试验第28天);海马区 desmin/lectin 阳性细胞比例明显 增加;使TGF-βR1、p-Smad2、p-Smad3蛋白表达水平明显升高;使TJs蛋白表达水平明显升高。SB431542则可 部分抑制上述作用。体外试验证明:外源性PDGF-BB可明显降低 AD 模型组的最终渗透系数,提高24 h时相 对TEER值;SB431542则可部分抑制上述作用。结论:PDGFR-β/TGF-β/Smad2/3信号通路可通过诱导周细 胞分化、覆盖,提高内皮细胞TJs的表达,调控AD血脑屏障完整性,以促进学习记忆能力恢复。 关键词 阿尔茨海默病;血小板源性生长因子受体β;转化生长因子-β;血脑屏障完整性;学习记忆能力 中图分类号 R741;R741.02 文献标识码 A DOI 10.16780/j.cnki.sjssgncj.20230309 本文引用格式:申杰,姚雪榕,刘越存,徐桂华,PDGFR-8/TGF-8/Smad2/3信号通路调控阿尔茨海默病血脑屏 障完整性和学习记忆能力的分子机制研究[J]. 神经损伤与功能重建, 2024, 19(1): 1-7.

Regulatory Mechanism of Blood-brain Barrier Integrity and Learning and Memory Ability in Alzheimer's Disease via PDGFR-β/TGF-β/Smad2/3 Signal Pathway SHEN Jie^a, YAO Xuerong^a, LIU Yuecur^a, XU Guihua^b. a. Department of Neurology, b. Department of Science and Education, Dongguan Binhaiwan Central Hospital, Guangdong 523900, China

Abstract Objective: To investigate the molecular regulatory mechanism of integrity of blood-brain barrier (BBB) and learning and memory ability in Alzheimer's disease (AD) via PDGFR-\u00b3/TGF-\u00b3/Smad2/3 signaling pathway. Methods: Using the APP/PS1 transgenic mouse model of AD, the learning and memory abilities of mice were analyzed through water maze test and food search test. The proliferation rate and pericyte coverage rate in hippocampus were measured. The level of TGF- β R1 and its downstream signal pathway molecules, and the levels of tight junctions (TJs) were analyzed. After intraventricular microinjection with exogenous PDGF-BB and/or intraperitoneal injection with SB431542, the transgenic mice were analyzed by the above methods. After PDGF-BB and/or SB431542 treatment, permeability and transcellular resistance were tested in the BBB model in vitro. Results: Compared with the control group, APP/PS1 mice showed the learning and memory disability in the water maze test and food search test, the less proportion of desmin/lectin positive cells in the hippocampus, the lower levels of TGF-B R1, p-Smad2 and p-Smad3 protein, and the lower levels of TJs. Furthermore, exogenous PDGF-BB could significantly enhance the learning and memory ability, increase the pericyte coverage rate, raise the expression levels of TGF- β R1, p-Smad2 and p-Smad3 protein, and heighten the expression levels of TJs proteins. In contrast, SB431542 could partially inhibit the above effects of PDGF-BB treatment. In vitro tests showed that exogenous PDGF-BB could significantly reduce the final permeability coefficient of AD model group and increase the relative TEER value at 24 h; SB431542 can partially inhibit the above effects. **Conclusion:** PDGFR- β /TGF- β /Smad2/3 signal pathway may play a vital role in regulating the integrity of blood-brain barrier and the recovery of learning and memory ability in AD.

Keywords Alzheimer's disease; platelet-derived growth factor receptor-beta; transforming growth factor beta; blood-brain barrier integrity; learning and memory ability

作者单位

东莞市滨海湾中心 医院 a. 神经内科, b.科教科 广东 东莞 523900 基金项目 国家自然科学基金 (血小板源性生长 因子受体-β在脑缺 血后血脑屏障修复 中的作用机制研 究, No. 81360186; PDGFR-β/TGFβ/ Smad2/3 信号通路 在调控血脑屏障完 整性的分子机制研 究,No.81860228); 东莞市社会发展科 技项目(PDGFR-β/ TGF β/Smad2/3 信 号通路在调控阿尔 茨海默病血脑屏障 完整性和神经元保 护的分子机制研 究, No. 202118009 04462;基于格林模 式的健康教育在缺 血性脑卒中患者二 级预防的应用,No. 20211800900262; 二甲双胍对帕金森 合并糖尿病患者认 知功能的影响及其 机制,No. 2021180 0900492)、东莞市 滨海湾中心医院高 水平科研孵化基金 项目(脑缺血-再灌 注后星形胶质细胞 在调控血脑屏障功 能恢复和神经保护 的分子机制研究, No. 2022001) 收稿日期 2023-04-22 通讯作者 徐桂华

xuguihua_521@

163.com

目前,阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的 病因及发病机制尚未阐明,全世界尚无有效的治疗手 段,预后不佳,家庭和社会负担重。近年大量研究已证 明AD的发生、发展与血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)损伤密切相关^[1]。研究证实AD患者大脑海马及 皮质区域的毛细血管周围神经炎症反应加剧,内皮细 胞中的吞饮小泡增加,紧密连接蛋白数量减少,基底膜 降解,周细胞数量和覆盖率降低,同时血源性IgG和纤 维蛋白漏到血管外并在脑内沉积,最终导致淀粉样蛋 白- β (amyloid- β , A β)沉积、神经原纤维缠结形成、神经 元和突触缺失[24]。因此,积极恢复BBB的完整性,抑 制Aβ沉积,改善神经元微环境已成为目前AD防治的 研究热点之一^[5]。研究表明血小板源性生长因子受体β (platelet-derived growth factor receptor-beta, PDGFR- β) 信号通路对于维持周细胞覆盖、BBB完整性和神经 功能维持有十分重要的作用[6-8]。近年,笔者的研究 证实 PDGFR-β信号通路对于 BBB 完整性和神经功 能的损伤修复有十分重要的作用,且转化生长因 \neq - β (transforming growth factor beta, TGF- β)/Smad2/3 信号通路可能参与这一过程^[9]。然而,其在AD发生过 程中潜在的分子作用机制仍尚未明确。本研究在前期 工作基础上将进一步揭示 PDGFR-β/TGF-β/Smad2/3 信号通路调控AD转基因小鼠BBB完整性和学习记忆 能力的分子机制,旨在加深对AD患者BBB损伤修复 和神经元保护机制的认识,并为这种重大慢病的防治 提供新的分子靶点和科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级雄性 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠(南京大学模式动物研究所)及同批 APP/PS1 阴性 对照小鼠,鼠龄 6月,动物合格证号:005201。繁育采 用雄鼠与雌鼠 1:1 合笼配对的方式。母鼠妊娠期约为 20 d,小鼠出生 20 d后根据其性别分笼饲养。实验小鼠由东莞市滨海湾中心医院中心动物室饲养,饮用蒸 馏水,室温 22 ℃~24 ℃。

1.1.2 主要试剂与设备 人脑微血管周细胞(human brain microvascular pericytes, HBMVPs, ACBRI 499)、

人 脑 微 血 管 内 皮 细 胞 (human brain microvascular endothelial cells, HBMVECs, ACBRI 376) 均购 自美国 Applied Cell Biology 公司。rhPDGF-BB(kx-GMP-037, 购于北京科昕嘉源生物科技有限公司), TGF-βR1激酶 抑制剂 SB431542(HY-10431, 购于广州左克生物科技

发展有限公司),大鼠ki67多克隆抗体、小鼠desmin单 克隆抗体(购于美国Dako公司),兔lectin多克隆抗体、 兔TGF-βR1多克隆抗体、兔p-smad2多克隆抗体、兔 p-smad3多克隆抗体、兔smad4多克隆抗体、兔claudin 5多克隆抗体、鼠occludin单克隆抗体(购于美国 Abcam公司),兔zo1多克隆抗体(购于美国Invitrogen 公司),鼠GAPDH单克隆抗体(购于美国Chemicon公 司);Morris水迷宫装置(DB001X,购于北京智鼠宝生 物科技公司),食物搜索测试仪(KUROBOX,购于日本 长崎表型分析公司),Multi-Beads Shocker 匀浆机(购 于日本Yasui-Kikai公司),ECL检测试剂盒(购于英国 Amersham Biosciences公司),VH Analyzer 图像处理软 件(购于日本Keyence公司),Millicell-ERS仪(购于美 国)。

1.2 方法

1.2.1 药物注射及分组 将 APP/PS1 双转基因 AD 小 鼠依据随机数字表法分为: APP/PS1 组(n=10)、(APP/ PS1+PDGF-BB)组(经 PDGF-BB 处理,n=10)、(APP/ PS1 + PDGF-BB + SB431542)组(经 PDGF-BB + SB431542处理,n=10);将 APP/PS1 阴性小鼠依据随机 数字表法分为:对照组(Control,n=10)、(Control+ PDGF-BB)组(经 PDGF-BB 处理,n=10)、(Control+ PDGF-BB+SB431542)组(经 PDGF-BB+SB431542处 理,n=10)。小鼠深度麻醉(苯巴比妥钠,50 mg/kg),固 定于脑立体定位仪,在距前囱尾部 0.5 mm、侧面 1 mm 处,钻直径约 0.7 mm 的孔,利用微量注射泵缓慢注射 rhPDGF-BB(60 ng/mL) 2 μL。注射后导管放置 5 min 以上后拔出,局部消毒、缝合、复苏。部分小鼠给予 TGF-βR1激酶抑制剂 SB431542(1 μmol/L)100 μL 腹 腔内注射。

1.2.2 Morris水迷宫实验 按文献描述的方法进行^[10]。 该装置由一个不锈钢制成的圆柱形水池和一个可移 动位置的圆柱形透明有机玻璃站台组成。水池直径 120 cm,高50 cm,站台直径12 cm,高24 cm。水池水 深25 cm(高出站台1 cm),水温(23±0.5)℃,在水池边 缘上等距离设东南西北四个标记点,将水池均等分为4 个象限。圆形水池中加入脱脂奶粉,使水浑不见低于 水面1 cm的隐藏平台,每天将小鼠面向池壁分别从 东、南、西、北四个不同象限固定入水点放入池中各一 次,直至找到并站在平台上为止,游泳超过60 s后,人 为将小鼠放至平台上10 s进行训练。观测小鼠游泳轨 迹,记录2 min内小鼠跨越原平台所在位置的次数及达 到终点所需时间。次数越少、达到终点所需时间越长, 说明小鼠的记忆力越差。正式试验的前7d为训练试验,之后每天上午同一时间段内进行正式试验,且每天的四周实物不固定。

1.2.3 觅食试验 按文献描述的方法进行^[11]。将小鼠 单独放置于食物搜索测试仪中,该装置由2个隔间组成, 休息室(80 mm×130 mm×210 mm)与观察室(240 mm× 240 mm×210 mm)用隔板隔开,小鼠可以自由穿过隔 板进入方形观察区。使用64个红外光电传感器记录 每只小鼠的重心坐标。在测定室的地板四角设置有饵 料孔,其中只有一处可获取饵料,该位置每隔4h旋转 移动一次。小鼠通常在夜间取食40次左右,期间小鼠 通过学习,可记住上次的可摄取部位,则可以正确访问 食物孔。投食区正确选择率=(正确投食区访问数/总 访问数)×100%。通过计算投食区正确选择率评估小 鼠学习记忆能力。正式试验的前7d为训练试验,之后 每天上午同一时间段内进行正式试验。

1.2.4 免疫组织荧光染色 石蜡切片经脱蜡、梯度酒 精脱水后,进行抗原修复,然后用0.01 mol/L PBST漂洗 5 min×3/次。10%BSA 37 ℃湿盒内封闭 30 min之后, 加入一抗大鼠ki67 多克隆抗体(1:100)、小鼠desmin单 克隆抗体(1:200)、兔lectin多克隆抗体(1:100),4 ℃孵 育过夜。相应二抗显色,DAPI包埋并标记细胞核,在 激光共聚焦显微镜下随机选取每张载玻片中缺血边缘 区 6 个区域采图。在每个图片中计算周细胞增殖率 (%)=[(ki67+/desmin+细胞数)/desmin+细胞数]×100%; 周细胞覆盖率(%)=(desmin+细胞数/lectin+细胞数)× 100%。

1.2.5 免疫印迹 实验鼠经苯巴比妥钠皮下注射 (50 mg/kg)深度麻醉后,进行磷酸盐缓冲液心脏灌流, 断头处死后按文献¹⁹方法分别提取小鼠总蛋白。利用液 氦、研钵粉碎脑组织,加入免疫沉淀缓冲液(3 mL/g)、 苯甲基磺酰氟(30 µL/g),使用 Multi-Beads Shocker 匀 浆机进一步匀浆(15 000 r/min),离心(4 ℃,15 000 r/ min,离心半径10 cm)15 min,提取上清液,分装、定 量、-20 ℃保存。将15 µg样本上样、电泳、转膜、封 闭,一抗4℃孵育过夜。一抗:兔TGF-βR1多克隆抗体 (1:500)、兔p-smad2多克隆抗体(1:500)、兔p-smad3多 克隆抗体(1:500)、兔 smad4 多克隆抗体(1:500)、兔 claudin 5多克隆抗体(1:500)、鼠 occludin 单克隆抗体 (1:500)、兔zo1多克隆抗体(1:500)、鼠GAPDH单克隆 抗体(1:5 000)。按照适当比例用二抗稀释液稀释辣 根过氧化物酶标记的二抗,使用ECL检测试剂盒显 色、照相。利用 VH Analyzer 图像处理软件计算目的

条带灰度值,并分别与GAPDH条带灰度值求比例,计 算相对灰度值,相对灰度值=(目的条带灰度值-背景 条带灰度值)/(GAPDH条带灰度值-背景条带灰度 值)×100%^[9]。

1.2.6 Aβ₁₋₄₂的制备 根据文献报道制备单体(Mono)、 寡聚肽(Oligo)Aβ₁₋₄₂^[12]。Aβ₁₋₄₂单体(Aβ₁₋₄₂ Mono)溶 于DMSO中,终浓度2 mmol/L, -20°C保存备用。
2 mmol/L的Aβ₁₋₄₂ Mono溶于冰冷的Opti-MEM,终浓度
100 μmol/L,轻轻吹打 30 s 后置于4°C冰箱孵育24 h 形成Aβ₁₋₄₂ Oligo,Aβ₁₋₄₂ Oligo现配现用。

1.2.7 建立体外BBB模型 按文献描述的方法进行^[13]。 首先用胶原蛋白包埋12孔 Transwell插槽的聚碳酸酯 膜(1.12 cm², 0.4 μm),分别向插槽内外加入DMEM/ F12(含10%血清)的细胞培养液,再将HBMVPs细胞 (1.5×10⁴/cm²)接种于插槽外侧面。待HBMVPs细胞生 长融合后(约48 h),再将HBMVECs细胞(1.5×10⁵/cm²) 接种于插槽内侧面,继续培养24 h后进入下一步试 验。添加0.5 μmol/L Aβ₁₄₂ Oligo 至插槽外侧面,作用 30 min,构建 AD 体外 BBB(AD 组);加入同体积的 DMEM/F12作为空白对照组。之后,根据实验要求分 别添加 rhPDGF-BB[40 ng/mL, 20 μL,(AD+PDGF-BB) 组]、SB431542[10 μmol/L, 10 μL, (AD+SB431542)组] 至插槽外侧面,作用3 h后进入下一步试验。

1.2.8 异硫氰酸荧光素-牛血清白蛋白(Fluorescein Isothiocyanate- bovine serum albumin, FITC-BSA)渗透 实验 按文献描述的方法进行^[14]。首先将BBB体外模型 的培养液换成缓冲液(含136 mmol/L NaCl、0.9 mmol/L CaCl₂, 0.5 mmol/L MgCl₂, 2.7 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L KH₂PO₄, 10 mmol/L NaH₂PO₄, 25 mmol/L Glucose, 10 mmol/L Hepes, pH 7.4), 于 37 °C 放置 30 min。在插 槽内侧(供应槽)加入50 µg/mL FITC-BSA 溶液,并即 刻抽取其中50 µL液体进行检测,设为FITC-BSA 起始 浓度。然后在不同时间点(0、30、60、120 min),分别抽 取插槽外侧(接收槽)50 µL液体进行检测,同时加入等 量缓冲液。荧光分光光度计测定 FITC-BSA 荧光度 (Ex=490 nm, Em=530 nm)。在每次测量中, 至少测试 三个带细胞的插槽和三个不带细胞的插槽,每次实验至 少重复三次。表观渗透系数(PCapp, cm/min)=(C_{R,}/t× V_R)/(C_D×A),其中C_R,是时间t时接收槽中FITC-BSA的 荧光度,V_R是接收槽中的体积(1.5 mL),C_p是供应槽中 FITC-BSA的荧光度,A是膜的面积(1.12 cm²)。最终渗 透系数(PCf)计算公示为:1/PCf=(1/PCapp)-(1/PCm), 其中PCm是FITC-BSA在无细胞涂层膜的渗透系数。

1.2.9 BBB 跨细胞电阻检测 按文献描述的方法进行^[15]。将长满HBMVPs和HBMVECs的共培养池放入 新鲜 DMEM 培养基,采用 Millicell-ERS 仪检测 TEER 值,减去无细胞生长的共培养池的多聚碳酸酯膜 TEER 值,即为细胞层 TEER 值。相对 TEER 值=(实验组 TEER 值/对照组 TEER 值)×100%。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料以(均值±标准误)表示,多组比较采用单因素方差分析,P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

A

经过虚拟平台次数/次

2.1 AD小鼠行为学及病理改变

7 d的水迷路训练试验结束时,2组经过虚拟平台 次数[对照组(5.3±0.13)次,APP/PS1组(4.8±0.42)次,n= 10, t=3.501, P=0.739)及达到终点所需时间[对照组 (16.2±4.22)s,APP/PS1组(15.3±2.34)s,n=10,t=2.776, P=0.528)差异无统计学意义。第28天水迷路试验显 示:与对照组相比,APP/PS1组小鼠经过虚拟平台次数 明显减少[对照组(10.4±1.21)次,APP/PS1组(5.3±0.32) 次,n=10,t=5.336,P=0.002)、到达终点所需时间明显延 长[对照组(5.4±0.79)s, APP/PS1组(14.4±1.23)s, n=10, t= 4.582, P=0.001), 见图1A。

7 d的觅食训练试验结束时,2组投食区正确选择 率[对照组(45.5±6.82)%, APP/PS1组(43.6±7.51)%, n= 10, t=4.218, P=0.200]差异无统计学意义。第28天觅食 试验显示,与对照组相比,APP/PS1组小鼠的投食区正 确选择率明显下降[对照组(79.2±10.25)%, APP/PS1组 (46.2±5.61)%, n=10, t=4.290, P=0.001, 图1B]。

与对照组相比, APP/PS1组小鼠海马区周细胞覆 盖率(desmin/lectin)明显下降[对照组(63.4±12.6)%, APP/PS1组(21.4±6.22)%, n=6, t=7.225, P=0.001, 图2]; 2组的周细胞增殖率(ki67/desmin)差异无统计学意义 [对照组(5.7±1.22)%, APP/PS1组(4.9±0.91)%, n=6, t= 4.732, P=0.326, 图2B]。

与对照组相比, APP/PS1组小鼠海马区 TGF-βR1、 p-Smad2、p-Smad3 蛋白表达水平明显升高, Smad4 蛋 白表达水平未见明显差异(n=3, P=0.09, 图3)。与对照 组相比, APP/PS1 组小鼠海马区 occludin、claudin-5、 zo-1蛋白表达水平明显下降(n=3; P=0.021, 图4)。

与对照组相比, AD体外模型组的FITC-BSA最终 渗透系数明显升高[对照组(1.0±0.12), AD组(4.8±

注:A:各组进行水迷路试验,在第28天计算经过虚拟平台次数和到达终点所需时间;B: 各组进行觅食试验,在第28天 计算投食区正确选择率。与对照组比较,[®]P<0.01;与APP/PS1 组比较,[®]P<0.01;与(APP/PS1+ PDGF-BB)组比较,[®]P<0.05。 图1 学习记忆试验

注:对①对照组、②APP/PS1组、③ (control + PDGF-BB)组、④APP/PS1 + PDGF-BB组、⑤(control + PDGF-BB + SB431542)组、⑥(APP/PS1 + PDGF-BB + SB431542)组海马区进行荧光免疫组化, 计算 desmin(绿色)/lectin(红色)比例(A) 和ki67(绿色)/desmin(红色)比例(B)。白 色空心箭头为增殖的周细胞;黄色空心箭 头为非增殖的周细胞;实心箭头为增殖的 内皮细胞。A:比例尺=25 µm;B:比例尺= 20 µm。与对照组比较,[®]P<0.01;与 (APP/PS1 + PDGF-BB)组比较,[®]P<0.01。

图2 海马区周细胞覆盖率和增殖率变化



0.32), n=3, t=4.382, P=0.001, 图 5A]。与对照组相比, 24 h时 AD 体外模型组的相对 TEER 值明显下降[对照 组 (169.3±15.5), AD 组 (56.2±6.4), n=3, t=5.328, P= 0.002, 图 5B]; 0 h时 2 组间的相对 TEER 值未见明显差 异。

2.2 PDGFR-β信号通路通过诱导AD血脑屏障的完整 性,促进学习记忆能力的恢复

在水迷路正式试验的第28天,与未处理APP/PS1 小鼠相比,外源性PDGF-BB使APP/PS1小鼠的经过虚 拟平台次数明显增加[APP/PS1 组(4.8±0.42)次, (APP/ PS1+PDGF-BB)组(7.3±0.45)次, n=10, t=5.822, P= 0.003,图1A]、达到终点所需时间明显缩短[APP/PS1组 (15.3±2.34)s, (APP/PS1+PDGF-BB)组(9.3±2.17)s, n= 10, t=7.210, P=0.002, 图1A]。在觅食正式试验的第28 天,投食区正确选择率明显提高[APP/PS1组(43.6± 7.51)%,(APP/PS1+PDGF-BB)组(62.4±5.63)%,n=10,t= 6.352, P=0.001, 图 1B]; 海马区周细胞覆盖率明显增 [APP/PS1 组 (21.4±6.22)%, (APP/PS1+PDGF-BB)组 (52.7±4.64)%,n=6,t=8.201,P=0.003,图2A];2组的周细 胞增殖率未见明显异常(n=6,P=0.180,图2B)。与未处 理 APP/PS1 小鼠相比, 外源性 PDGF-BB 使 TGF-βR1、 p-Smad2、p-Smad3蛋白表达水平明显升高(n=3, P= 0.002,图3);使 occludin、claudin-5、zo-1 蛋白表达水平 明显升高(n=3,P=0.001,图4)。

体外试验显示,外源性PDGF-BB可明显降低对照 组的FITC-BSA最终渗透系数[对照组(1.0±0.12),n=3; (control + PDGF-BB)组(0.67±0.13), n=3, t=2.960, P= 0.001,图5A];而且,外源性PDGF-BB可明显降低AD 体外模型组的FITC-BSA最终渗透系数[AD组(4.8± 0.32),n=3;(AD+PDGF-BB)组(2.3±0.19),n=3,t=3.302, P=0.002,图5A];同时,与(control+PDGF-BB)组相比, (AD+PDGF-BB)组的FITC-BSA最终渗透系数明显提 高(P=0.001,图5A)。

外源性 PDGF-BB 可明显提高 24 h 时对照组的相 对 TEER 值[对照组(169.3±15.5),(control+PDGF-BB)组 (289.4±21.3),n=3,t=4.338,P=0.001,图 5B];而且,外源 性 PDGF-BB 可明显提高 24 h 时 AD 组的相对 TEER 值 [APP/PS1 组(56.2±6.4),(AD+PDGF-BB)组(91.3±6.2), n=3,t=3.382,P=0.001,图 5B];同时,与(control + PDGF-BB)组相比,(AD+PDGF-BB)组的相对 TEER 值 明显下降(P=0.001,图 5B)。0 h 时各组间相对 TEER 值未见明显差异。

2.3 TGF-β/Smad2/3 信号通路可协同参与 AD 血脑屏



注:对各组小鼠海马区进行 Western blot,计算 TGF-βR1、 p-Smad2、p-Smad3、Smad4蛋白表达水平。与对照组比较,[®]P< 0.01;与APP/PS1组比较,[®]P<0.01;与(APP/PS1+PDGF-BB)组比 较,[®]P<0.01。

图3 TGF-βR1下游通路蛋白表达水平变化



注:对各组小鼠海马区进行 Western blot,计算 occludin、 claudin-5、zo-1蛋白表达水平。与对照组比较,^①P<0.01;与APP/ PS1组比较,^②P<0.01;与(APP/PS1+PDGF-BB)组比较,^③P<0.01。

图4 紧密连接蛋白表达水平变化



注:比较各组FITC-BSA最终渗透系数(A)和相对电阻值 (B)。与对照组比较,[®]P<0.01;与AD组比较,[®]P<0.01;与(AD+ PDGF-BB)组比较,[®]P<0.01。

图5 各组体外BBB模型渗透性和跨细胞电阻变化

障完整性和学习记忆能力的恢复

在行为学正式试验的第28天,与PDGF-BB处理 组相比,PDGF-BB+SB431542可部分抑制APP/PS1小 鼠学习记忆能力(P=0.001,图1)、减少周细胞覆盖率 (P<0.01,图2)、抑制TGF-βR1、p-Smad2、p-Smad3表 达(P=0.002,图3)、减低紧密连接蛋白表达(P=0.001, 图4)等。

体外试验显示, SB431542 可部分抑制 PDGF-BB 对于对照组 FITC-BSA 最终渗透系数和相对 TEER 值 的作用(*P*=0.001,图 5A); SB431542 可部分抑制 PDGF-BB对于AD组FITC-BSA最终渗透系数和相对 TEER值的作用(P=0.001,图5B)。

3 讨论

本研究利用拮抗剂和重组蛋白刺激等分子生物学 手段,进行体内及体外试验发现:PDGFR-β信号通路可 促进AD血脑屏障完整性和学习记忆能力的恢复;同 时,抑制TGF-β信号可部分降低PDGF-BB对于AD血 脑屏障损伤修复的作用。上述结果证明PDGFR-β/ TGF-β/Smad2/3信号通路可能通过调控AD患者BBB 完整性,促进学习记忆能力的恢复。

目前,大量研究已证明AD是一种BBB功能障碍 相关性疾病^[2-4]。尸检发现,与对照组相比,AD患者大 脑海马及皮质区域的周细胞数量和覆盖率均显著降 低,同时血源性IgG和纤维蛋白渗漏到血管外并在脑 内沉积,且与认知障碍严重程度相关¹¹⁰。本研究利用 APP/PS1基因突变小鼠作为AD模型,学习记忆行为学 试验(水迷路训练试验和觅食训练试验)发现,与对照 组相比,6月龄APP/PS1小鼠的学习记忆能力明显下 降,结果证明该基因突变小鼠适合作为AD模型,可进 行下一步试验。本研究也证明,APP/PS1小鼠海马区 周细胞覆盖率明显下降,而周细胞增殖率未见明显差 异,表明APP/PS1小鼠海马区血管成熟周细胞减少、而 新生周细胞不受影响。同时,本研究显示 APP/PS1小 鼠海马区 TJs 蛋白表达水平明显下降, 且结果与 Zhang 等^[17]相似,表明该小鼠BBB功能障碍可能与内皮细胞 TJs破坏有关。研究证明^[68,9],周细胞可促进TJs蛋白表 达,据此,笔者认为APP/PS1小鼠海马区TJs破坏与低 表达,可能与周细胞覆盖率下降有关。同时,体外试验 显示,AD体外模型组的渗透性明显高于对照组,且相 对TEER 值明显下降,提示 Aβ₁₄₂ Oligo 可破坏 BBB 屏 障功能,为下一步细胞研究提供试验平台。为了对前 期工作进行深入研究,本研究对周细胞和内皮细胞间 相关作用因子进行分析,发现APP/PS1小鼠海马区 TGF-βR1、p-Smad2、p-Smad3蛋白表达水平明显升高, 表明TGF-β/Smad2/3信号通路可能参与周细胞介导的 BBB 完整性修复过程,且这一结果与 Dohgu 等^[18]相 似。

基于此,本研究对APP/PS1小鼠进行外源性 PDGF-BB脑室内注射,结果发现,PDGF-BB明显改善 APP/PS1小鼠第28天的学习记忆能力,增加海马区周 细胞覆盖率,提高TGF-βR1、p-Smad2、p-Smad3蛋白表 达。同时,体外试验也显示,外源性PDGF-BB可明显 降低AD体外模型组的最终渗透系数,提高相对TEER 值。同样的,Smyth等^[19]证明PDGF-BB可通过增加周 细胞增殖,促进AD体外模型BBB的稳定性。在轻度 痴呆患者中发现,BBB损害与脑脊液中周细胞损伤 标志物——可溶性PDGFR-β(sPDGFR-β)水平升高 相关^[20]。与非携带者相比,APOE4携带AD患者的血 清中PDGF-BB水平升高,且与BBB功能障碍导致的 脑白质高信号、认知障碍程度相关^[21]。进一步研究显 示,Aβ可减弱PDGF-BB对于海马神经元的有丝分裂 作用,抑制PDGF-BB诱导PDGFR-β的磷酸化,并减弱 PDGF-BB保护神经元免受NMDA诱导的兴奋性毒性 作用^[22]。综上,PDGFR-β信号通路可促进AD的BBB 完整性和学习记忆能力恢复。

与Estrada等^[23]结果相似,本研究发现APP/PS1小 鼠海马区的TGF-BR1、p-Smad2、p-Smad3表达下降,且 TGF-B1信号通路可作为治疗AD的治疗靶点[24]。进一 步,本研究对APP/PS1小鼠进行PDGF-BB脑室内注射 和TGF-βR1激酶抑制剂SB431542腹腔内注射,结果发 现,SB431542可部分抑制 PDGF-BB 对于 APP/PS1 小 鼠学习记忆能力的促进作用、以及部分降低周细胞覆 盖率、抑制 TGF-βR1、p-Smad2、p-Smad3 表达、减少 TJs 蛋白表达等。同时,体外试验也显示,SB431542可部 分抑制PDGF-BB对于AD模型组BBB的保护作用,这 提示 PDGFR-β/TGF-β/Smad2/3 信号通路可协同参与 AD的BBB结构和完整性的维持,从而促进学习记忆 能力恢复。同样的, Porsch等^[25]利用体外原代培养人 皮肤成纤维细胞,研究上述两信号通路间的联系,结果 显示: PDGF-BB可使Smad2磷酸化,且这一过程同时 依赖于PDGFR-β和TGF-βR1两个信号通路,而TGF-β 抗体又可部分抑制p-Smad2的表达;而且,特异性抑制 PDGFR-β信号可降低TGF-βR1的稳定性,抑制Smad2 的表达,抑制细胞的游走。进一步地,TGF-β可诱导内 皮细胞PDGF-B链mRNA的表达,并使Smad2和Smad3 磷酸化^[26];且PDGF-BB可通过一个来自人α2巨球蛋白 的16个氨基酸位点与TGF-β结合,值得注意的是:该结 合位点的基因多态性与AD的发生可能有关[27]。据此, 笔者认为 AD 患者中, PDGFR-β/TGF-β/Smad2/3 信号 通路诱导周细胞分化、覆盖的协同作用被破坏,内皮细 胞TJs 表达水平下降, TJs 超微结构破坏, BBB 通透性 增加;后者致使Aβ清除率下降、生成率增加,导致脑组 织中Aβ聚集,tau蛋白、p-tau蛋白水平增加,炎症反应 加剧,造成神经元死亡,引起AD相关的临床症状。

综上所述,本研究通过体内、体外实验,首次证明

PDGFR-β/TGF-β/Smad2/3 信号通路可通过调控 AD 患者 BBB 完整性,促进学习记忆能力的恢复。因此,更好的调控该信号通路将可能成为今后 AD 患者的又一治疗新靶点。在分子机制方面,仍需进行更加深入的研究。

参考文献

[1] Soto-Rojas LO, Pacheco-Herrero M, Martínez-Gómez PA, et al. The neurovascular unit dysfunction in Alzheimer's Disease[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22: 2022. DOI: 10.3390/ijms22042022.

[2] Moon Y, Lim C, Kim Y, et al. Sex-related differences in regional blood-brain barrier integrity in non-demented elderly subjects[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22: 2860. DOI: 10.3390/ijms22062860.

[3] van de Haar HJ, Burgmans S, Jansen JF, et al. Blood-brain barrier leakage in patients with early Alzheimer's Disease[J]. Radiology, 2017, 282: 615. DOI: 10.1148/radiol.2016152244.

[4] 黄洋,曾妙,姜希娟,等. 血脑屏障与阿尔茨海默病病变的研究进展 [J].神经损伤与功能重建, 2021, 16: 466-468. DOI: 10.16780/j.cnki. sissgnci.20200394.

[5] Nation DA, Sweeney MD, Montagne A, et al. Blood-brain barrier breakdown is an early biomarker of human cognitive dysfunction[J]. Nat Med, 2019, 25: 270-276. DOI: 10.1038/s41591-018-0297-y.

[6] Armulik A, Genové G, Mäe M, et al. Pericytes regulate the blood-brain barrier[J]. Nature, 2010, 468: 557-561. DOI: 10.1038/ nature09522.

[7] Bennett HC, Kim Y. Pericytes across the lifetime in the central nervous system[J]. Front Cell Neurosci, 2021, 15: 627291. DOI: 10.3389/ fncel.2021.627291.

[8] Daneman R, Zhou L, Kebede AA, et al. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis[J]. Nature, 2010, 468: 562-566. DOI: 10.1038/ nature09513.

[9] Shen J, Xu G, Zhu R, et al. PDGFR- β restores blood-brain barrier functions in a mouse model of focal cerebral ischemia[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2019, 39: 1501-1515. DOI: 10.1177/0271678X18769515.

[10] Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory[J]. Nat Protoc, 2006, 1: 848-858. DOI: 10.1038/nprot.2006.116.

[11] Nguyen PT, Nakamura T, Hori E, et al. Cognitive and socio-emotional deficits in platelet-derived growth factor receptor- β gene knockout mice[J]. PLoS One, 2011, 6: e18004. DOI: 10.1371/journal.pone.0018004.

[12] Li B, Zhong L, Yang X, et al. WNT5A signaling contributes to A β -induced neuroinflammation and neurotoxicity[J]. PLoS One, 2011, 6: e22920. DOI: 10.1371/journal.pone.0022920.

[13] Hayashi K, Nakao S, Nakaoke R, et al. Effects of hypoxia on endothelial/pericytic co-culture model of the blood-brain barrier[J]. Regul Pept, 2004, 123: 77-83. DOI: 10.1016/j.regpep.2004.05.023.

[14] Rempe R, Cramer S, Hüwel S, et al. Transport of

poly(n-butylcyano-acrylate) nanoparticles across the blood-brain barrier in vitro and their influence on barrier integrity[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 406: 64-69. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.01.110.

[15] Srinivasan B, Kolli AR, Esch MB, et al. TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems[J]. J Lab Autom, 2015, 20: 107-126. DOI: 10.1177/2211068214561025.

[16] Senqillo JD, Winkler EA, Walker CT, et al. Deficiency in mural vascular cells coincides with blood-brain barrier disruption in Alzheimer disease[J]. Brain Pathol, 2013, 23: 303-310. DOI: 10.1111/bpa.12004.

[17] Zhang S, Zhi Y, Li F, et al. Transplantation of in vitro cultured endothelial progenitor cells repairs the blood-brain barrier and improves cognitive function of APP/PS1 transgenic AD mice[J]. J Neurol Sci, 2018, 387: 6-15. DOI: 10.1016/j. jns. 2018.01.019.

[18] Dohgu S, Takata F, Yamauchi A, et al. Brain pericytes contribute to the induction and up-regulation of bloodbrain barrier functions through transforming growth factor-beta production[J]. Brain Res, 2005, 1038: 208-215. DOI: 10.1016/j. brainres. 2005.01.027.

[19] Smyth LCD, Highet B, Jansson D, et al. Characterisation of PDGF-BB:PDGFR β signalling pathways in human brain pericytes: evidence of disruption in Alzheimer's disease[J]. Commun Biol, 2022, 5: 235. DOI: 10.1038/s42003-022-03180-8.

[20] Montagne A, Barnes SR, Sweeney MD, et al. blood-brain barrier breakdown in the aging human hippocampus[J]. Neuron, 2015, 85: 296-302. DOI: 10.1016/j. neuron. 2014.12.032.

[21] Kapoor A, Nation DA. Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Platelet-derived growth factor-BB and white matter hyperintensity burden in APOE4 carriers[J]. Cereb Circ Cogn Behav, 2022, 3: 100131. DOI: 10.1016/j. cccb.2022.100131.

[22] Liu H, Saffi GT, Vasefi MS, et al. Amyloid-β inhibits PDGFβ receptor activation and prevents PDGF-BB induced neuroprotection[J]. Curr Alzheimer Res. 2018, 15: 618-627. DOI: 10.2174/15672050156661801101 10321.

[23] Estrada LD, Oliveira-Cruz L, Cabrera D. Transforming growth factor beta type I role in neurodegeneration: implications for Alzheimer's Disease [J]. Curr Protein Pept Sci, 2018, 19: 1180-1188. DOI: 10.2174/1389203719 666171129094937.

[24] Caraci F, Battaglia G, Bruno V, et al. TGF- β 1 pathway as a new target for neuroprotection in Alzheimer's disease[J]. CNS Neurosci Ther, 2011, 7: 237-249. DOI: 10.1111/j.1755-5949.2009.00115.x.

[25] Porsch H, Mehić M, Olofsson B, et al. Platelet-derived growth factor β -receptor, transforming growth factor β type I receptor, and CD44 protein modulate each other's signaling and stability[J]. J Biol Chem, 2014, 289: 19747-19757. DOI: 10.1074/jbc.M114. 547273.

[26] Taylor LM, Khachigian LM. Induction of platelet-derived growth factor B-chain expression by transforming growth factor-beta involves transactivation by Smads[J]. J Biol Chem, 2000, 275: 16709-16716. DOI: 10.1074/jbc.275.22. 16709.

[27] Webb DJ, Roadcap DW, Dhakephalkar A, et al. A 16-amino acid peptide from human alpha2-macroglobulin binds transforming growth factor-beta and platelet-derived growth factor-BB[J]. Protein Sci, 2000, 9: 1986-1992. DOI: 10.1110/ ps.9.10.1986.

(本文编辑:王晶)