

# 山茱萸环烯醚萜苷对冈田酸拟阿尔茨海默病细胞模型 PP2A 催化亚基 C 磷酸化及其调节酶 Src 的影响

杨翠翠<sup>1</sup>, 郅学先<sup>1,2</sup>, 张丽<sup>1</sup>, 李雅莉<sup>1</sup>, 李林<sup>1\*</sup>, 张兰<sup>1\*</sup>

(1. 首都医科大学宣武医院药学部, 北京市神经药物工程技术研究中心, 北京脑重大疾病研究院, 神经变性病教育部重点实验室, 北京 100053; 2. 天津中医药大学第一附属医院分子生物学实验室, 天津 300193)

**摘要:** 微管相关蛋白 tau 的异常过度磷酸化是阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 的重要发病机制之一, 蛋白磷酸酯酶 2A (protein phosphatases 2A, PP2A) 能够促进 tau 蛋白的去磷酸化。山茱萸环烯醚萜苷 (CIG) 是室内从山茱萸中提取的主要有效部位。本实验的目的是研究 CIG 对 PP2A 活性及其相关调节酶的影响, 应用 PP2A 抑制剂冈田酸 (okadaic acid, OA) 与人神经母细胞瘤细胞株 (SK-N-SH 细胞) 孵育制备拟 AD 细胞模型; 采用 PP2A 试剂盒测定细胞内 PP2A 的活性; 应用 Western blot 方法检测 tau 蛋白磷酸化、PP2A 催化亚基 C (PP2Ac) 和 Src 的表达。结果显示: OA 与 SK-N-SH 细胞孵育 6 h 后, 显著增高 tau 蛋白的磷酸化水平, 降低 PP2A 活性, 增高 PP2Ac 和 Src 的磷酸化水平。CIG 与细胞预孵育 24 h 能够明显抑制 OA 模型细胞 tau 蛋白在 Ser 199/Ser 202 位点和 Ser 396 位点的过度磷酸化, 恢复 PP2A 活性, 抑制 PP2Ac 在 Tyr 307 位点的过度磷酸化和 Src 在 Tyr 416 位点的过度磷酸化。提示 CIG 通过抑制 Src 在 Tyr 416 位点的磷酸化降低其活性而抑制 PP2Ac 的磷酸化, 从而恢复 PP2A 活性, 促进 tau 蛋白的去磷酸化, 最终抑制 tau 蛋白异常过度磷酸化。结果说明 CIG 可能有利于治疗 AD。

**关键词:** 山茱萸环烯醚萜苷; tau 蛋白; 蛋白磷酸酯酶 2A; Src; 阿尔茨海默病

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 07-1036-06

## Effect of cornel iridoid glycoside on PP2Ac phosphorylation in okadaic acid-induced neurotoxicity cells

YANG Cui-cui<sup>1</sup>, KUAI Xue-xian<sup>1,2</sup>, ZHANG Li<sup>1</sup>, LI Ya-li<sup>1</sup>, LI Lin<sup>1\*</sup>, ZHANG Lan<sup>1\*</sup>

(1. Department of Pharmacy, Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Beijing Engineering Research Center for Nerve System Drugs, Beijing Institute for Brain Disorders, Key Laboratory for Neurodegenerative Diseases of Ministry of Education, Beijing 100053, China; 2. Laboratory of Molecular Biology, First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

**Abstract:** Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disease in the aging population. Abnormal hyperphosphorylation of tau is the main cause of AD. Protein phosphatases 2A (PP2A) can increase the hyperphosphorylation of tau. Cornel iridoid glycoside (CIG) is one of the main components extracted from *Cornus officinalis*. The aim of the present study was to investigate the effects and the underlying mechanisms of CIG on enhancing PP2A activity. SK-N-SH cells were exposed to 20 nmol·L<sup>-1</sup> okadaic acid (OA, an inhibitor of PP2A) for 6 h to induce the hyper-phosphorylation of tau, in order to define the effect of CIG on the activity

收稿日期: 2018-03-05; 修回日期: 2018-04-01.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81703729, 81473373); 北京市自然科学基金资助项目 (7164315); 北京市教委新医药学科群项目 (XK100270569); 北京市高层次卫生技术人才计划 (2014-2-014).

\*通讯作者 Tel: 86-10-83199443, E-mail: lanzhg@126.com;

Tel: 86-10-83198886, E-mail: linlixw@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0188

of PP2A and posttranslational modification of PP2A catalytic subunit C (PP2Ac). We found that OA significantly decreased PP2A activity, increased the phosphorylation of PP2Ac, and enhanced tau hyper-phosphorylation. Pre-incubation of CIG significantly attenuated the OA-induced tau hyper-phosphorylation at Ser 199/202 and Ser 396, and recovered the activity of PP2A. CIG inhibited PP2Ac phosphorylation at Tyr 307 and increased Src phosphorylation. In conclusion, the mechanism of CIG inhibition of tau hyper-phosphorylation was activation of PP2A to reduce the level of p-Src for a reduction of PP2Ac phosphorylation at Tyr307.

**Key words:** cornel iridoid glycoside; tau protein; protein phosphatase 2A; Src; Alzheimer's disease

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是老年人中最常见的中枢神经系统退行性疾病, 全世界超过 3 700 万人罹患 AD<sup>[1]</sup>。阿尔茨海默病中  $\beta$ -淀粉样蛋白 ( $\beta$ -amyloid,  $A\beta$ ) 理论在过去的 20 年一直受到科学界的认可和关注, 不断开发出许多的药物来消除  $A\beta$  斑块, 抑制  $A\beta$  聚集和沉积, 或通过抑制  $\gamma$ -分泌酶和  $\beta$ -分泌酶来降低脑内  $A\beta$  的生成, 但这些治疗策略在临床试验中均以失败而告终<sup>[2]</sup>。目前, 以拮抗 tau 蛋白磷酸化为靶点的药物研究越来越引起关注<sup>[3-5]</sup>。

Tau 蛋白是脑内一种微管相关蛋白, 其磷酸化受蛋白激酶和蛋白磷酸酯酶的调节维持平衡。蛋白磷酸酯酶 2A (protein phosphatase 2A, PP2A) 是促进 tau 蛋白去磷酸化的主要调节酶, 在抑制 AD 患者脑中 tau 蛋白过度磷酸化方面起关键作用, 研究发现, 在 AD 患者脑中 PP2A 活性明显下降<sup>[6,7]</sup>。研究 PP2A 激活剂成为目前 AD 药物研究的新策略<sup>[8,9]</sup>。

山茱萸环烯醚萜苷 (cornel iridoid glycoside, CIG) 是我室从山茱萸中提取的主要有效部位。在前期研究中发现, CIG 能够改善拟 AD 大鼠模型的学习记忆功能<sup>[10,11]</sup>, 并且在 PP2A 抑制剂冈田酸 (okadaic acid, OA) 拟 AD 细胞模型上能够抑制 tau 蛋白过度磷酸化, 保护微管结构, 减少细胞凋亡, 能够通过抑制 PP2A 催化亚基 C (PP2Ac) 的去甲基化而恢复 PP2A 的活性<sup>[12,13]</sup>。

有研究报告, PP2Ac 的翻译后修饰除了甲基化以外, 还包括磷酸化<sup>[14]</sup>。酪氨酸激酶 Src 的活化能够促进 PP2Ac 的磷酸化<sup>[15]</sup>。本实验的目的是研究 CIG 对 OA 拟 AD 细胞模型 PP2Ac 磷酸化及其调节酶 Src 的影响, 以进一步明确 CIG 恢复 PP2A 活性的机制。

## 材料与方法

**药物** CIG 由本室自行研制。山茱萸为市售 (产地: 浙江), 经提取和分离获得 CIG, 纯度为 70% (其中主要成分为莫诺苷和马钱苷), 达到国家中药、天然药物 5 类新药的要求。CIG 为棕黄色粉末, 水溶性

好。实验中采用干粉剂量, 溶解于蒸馏水, 制成药液应用。

**试剂** OA、aprotinin、leupeptin、多聚赖氨酸和 Triton X-100 (美国 Sigma-Aldrich 公司); DMEM 基础培养液、胎牛血清 (FBS) 和胰蛋白酶 (美国 Gibco BRL 公司); Opti-MEM (美国 Invitrogen 公司); RC-DC 蛋白测定试剂盒 (500-0122-MSDS, 美国 Bio-Rad 公司); PP2A 活性测定试剂盒 (美国 Promega 公司)。主要抗体详见表 1。

**Table 1** Primary antibodies used in this study. Poly-: Polyclonal; Mono-: Monoclonal; PP2Ac: Protein phosphatases 2A catalytic subunit C; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

Antibody name	Class	Clone	Action site	Company
pS 199/202	Poly-	p-Tau	Ser 199/202	Invitrogen
pS 396	Poly-	p-Tau	Ser 396	Invitrogen
Tau-5	Mono-	Total tau		Calbiochem
p-PP2Ac	Poly-	p-PP2A	Tyr 307	Santa cruz
PP2Ac	Poly-	PP2A		Santa cruz
p-Src	Poly-		Tyr 416	Invitrogen
Src	Poly-			Cell signaling
GAPDH	Mono-	GAPDH		ZSGB-BIO

**主要仪器** 二氧化碳培养箱 (Tc2323 型, 美国 SHELL/JB 公司); 全波长酶标仪 (Multiskan Spectrum, 法国巴德斯公司); 低温高速台式离心机 (Beckman 22R, 美国 Beckman 公司); 电泳仪、垂直型电泳槽、转膜仪和凝胶电泳分析系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

**细胞培养** 人神经母细胞瘤细胞株 (SK-N-SH 细胞) 在 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 培养箱内进行培养, 每 2~3 天更换 1 次培养基。细胞生长至 60%~70% 丰度时, 传代或用于实验。细胞接种于 12 孔、24 孔或 96 孔培养板中, 备用。

**细胞模型的制备及药物处理** 将不同浓度 CIG (50、100、200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 与 SK-N-SH 细胞预孵育 24 h 后弃去药液, 加入 OA (20  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 处理 6 h 后, 收集细胞并进行裂解。

**Western blot 法检测蛋白质表达** SDS-PAGE 电

泳分离蛋白, 溴酚蓝到达分离胶底部时, 结束电泳。安装湿转装置, 在转移槽的阴极铺 2 层滤纸, 小心将胶平铺于滤纸上, 并在胶上铺硝酸纤维素膜, 将剩余 2 层滤纸铺在膜的上方。接通电源, 设定 100 V, 90 min。转膜后, 硝酸纤维素膜用 Tris buffered saline with Tween 20 (TBST) 轻轻漂洗, 然后置于 5% 脱脂奶粉封闭液中, 4 °C 过夜; 弃去封闭液, TBST 洗膜 1 次。加入适当浓度的第一抗体 (抗特异蛋白质的抗体, 表 1), 置于摇床上摇动, 室温下 2 h; 倾去一抗, TBST 洗膜 3 次。加入相应的二抗, 置于摇床上摇动, 室温下 1 h; 弃去二抗, TBST 洗膜 3 次。在暗室将荧光剂 A 液和 B 液等量混合, 立即加到膜上, 每张膜 1 mL, 滚匀液体, 反应 1 min, 然后吸去多余荧光剂, 采用化学发光仪进行图像采集及分析。

**PP2A 活性测定** 按照 PP2A 活性测定试剂盒说明书进行操作。在含有 40 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 8.5)、20 mmol·L<sup>-1</sup> β-巯基乙醇 (β-mercaptoethanol, β-ME)、0.2 mmol·L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> 和 15 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> 的缓冲液中, 用磷酸化酶 b 中和 0.5 mmol·L<sup>-1</sup> [γ-32P] ATP 和 10 mg·L<sup>-1</sup> 磷酸化酶激酶, 经 30 min 孵育, 一部分被 γ-32P ATP 标记的、由磷酸化酶 b 转变的磷酸化酶 a, 经 Sephadex G-50 柱层析出, 收集含 γ-32P ATP 标记的磷酸化酶 a (标记率 > 70%), 作为 PP2A 底物, 根据 PP2A 催化的、γ-32P 标记的磷酸化酶 a 所释放 γ-32P 的释放量, 判定 PP2A 的活性。反应总体积为 20 μL, 含 50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 7.0)、10 mmol·L<sup>-1</sup> β-ME、0.1 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA、7.5 mmol·L<sup>-1</sup> caffeine、7.5 mg·L<sup>-1</sup> [γ-32P] 磷酸化酶 a、0.06 g·L<sup>-1</sup> 细胞提取物和抑制因子-1 (PP-1 的特异性抑制剂), 用 20% 三氯乙酸终止反应, 取 7 μL 反应混合物至层析纸上, 释放出 γ-32P 在 5% 三氯乙酸 (0.2 mol·L<sup>-1</sup> NaCl 溶解) 层析液中通过上行色谱法与底物分离, 经 Cerenkov 闪烁液进行闪烁计数分析。

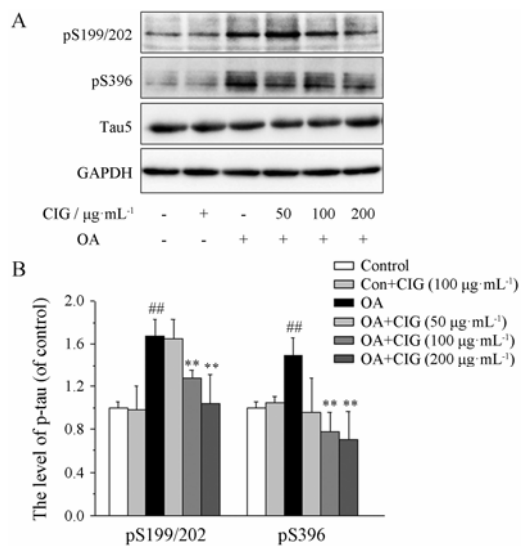
**统计学方法** 用 SPSS16.0 软件分析实验数据, 数据以均数 ± 标准误 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间样本比较应用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 以  $P < 0.05$  为差异有显著统计学意义。用 Origin 8 将数据转换为图表。

## 结果

### 1 CIG 对 OA 拟 AD 细胞模型 tau 蛋白过度磷酸化的影响

OA 是 PP2A 的特异性抑制剂。本实验将 CIG

与人神经母细胞瘤细胞株 (SK-N-SH 细胞) 预孵育 24 h 后换液, 加入 OA 处理, 6 h 后收集细胞, 应用 Western blot 法检测 tau 蛋白的磷酸化水平。结果显示, OA 能够显著增高细胞内 tau 蛋白在 Ser 199/Ser 202 (S 199/202) 位点及 Ser 396 (S 396) 位点的磷酸化 ( $P < 0.01$ ); CIG (100 和 200 μg·mL<sup>-1</sup>) 能够明显降低模型细胞内 tau 蛋白在 S 199/202 位点及 S 396 位点的磷酸化水平 ( $P < 0.01$ ); CIG (100 μg·mL<sup>-1</sup>) 对正常细胞无明显影响 (图 1)。



**Figure 1** Effect of cornel iridoid glycoside (CIG) on tau hyperphosphorylation in okadaic acid (OA)-induced cells, cells were exposed to OA for 6 h after incubation with CIG (50, 100, 200 μg·mL<sup>-1</sup>). A: The levels of tau phosphorylation at different sites were detected by Western blot. pS 199/202: Tau phosphorylation at Ser 199/Ser 202; pS 396: Tau phosphorylation at Ser 396; Tau 5: Total 5. B: Quantitative analysis of tau phosphorylation.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . ## $P < 0.01$  vs control group; \*\* $P < 0.01$  vs model group

### 2 CIG 对 OA 拟 AD 细胞模型 PP2A 活性的影响

采用试剂盒检测各组细胞内 PP2A 活性。结果显示, OA 与 SK-N-SH 细胞孵育 6 h 后, 细胞内 PP2A 活性显著降低 ( $P < 0.05$ ); CIG (50 和 100 μg·mL<sup>-1</sup>) 预孵育 24 h 能够明显恢复 OA 模型细胞内 PP2A 活性 ( $P < 0.05$ ); CIG 对正常对照细胞 PP2A 活性无影响 (表 2)。

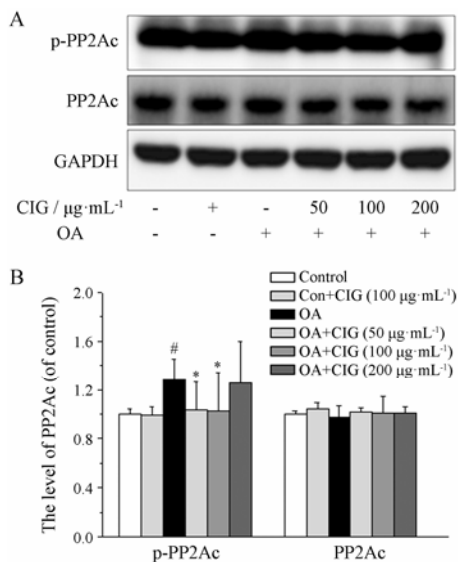
### 3 CIG 对 OA 拟 AD 细胞模型 PP2A 催化亚基 C 磷酸化水平的影响

PP2Ac 在 Tyr 307 位点的磷酸化水平增高能降低 PP2A 的活性<sup>[15-18]</sup>。为了明确 CIG 恢复 PP2A 活性的机制, 本实验采用 Western blot 方法检测磷酸化 PP2Ac (p-PP2Ac) 和总 PP2Ac 的表达。结果显示, SK-N-SH 细胞经 OA 处理后, 细胞内 PP2Ac 在 Tyr 307 位点

**Table 2** The effect of CIG on protein phosphatases 2A (PP2A) activity. The PP2A activity of control group was set as 100%.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . # $P < 0.05$  vs control group; \* $P < 0.05$  vs model group

Group	Relative activity of PP2A /%
Control	100.00 ± 5.00
Control + CIG 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	94.52 ± 1.24
Model	78.09 ± 10.35 <sup>#</sup>
Model + CIG 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	104.30 ± 9.15 <sup>*</sup>
100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	98.90 ± 9.44 <sup>*</sup>

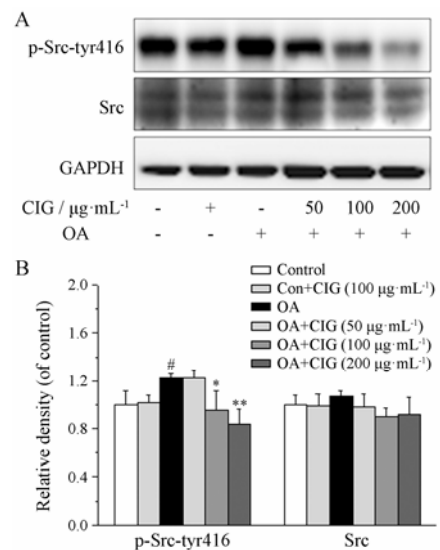
的磷酸化水平明显增高 ( $P < 0.05$ ); CIG (50 和 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 预孵育 24 h 能显著降低模型细胞 PP2Ac 的磷酸化水平 ( $P < 0.05$ , 图 2)。



**Figure 2** The effect of CIG on phosphorylation of PP2Ac in OA-induced cells, cells were exposed to OA for 6 h after the incubation with CIG (50, 100, 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). A: The levels of PP2Ac and phosphorylated PP2Ac (p-PP2Ac) at Tyr 307 site were detected by Western blot; B: Quantitative analysis of PP2Ac and p-PP2Ac.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . # $P < 0.05$  vs control group; \* $P < 0.05$  vs model group

#### 4 CIG 对 OA 拟 AD 细胞模型 Src 磷酸化水平的影响

酪氨酸激酶 Src 在 Tyr 416 位点的磷酸化能够使酶激活, 从而促进 PP2Ac 的磷酸化<sup>[14]</sup>。为了进一步探讨 CIG 抑制 PP2Ac 磷酸化的作用机制, 本实验采用 Western blot 方法测定细胞内 Src 在 Tyr 416 位点的磷酸化 (p-Src-tyr 416) 及总 Src 的表达。结果显示, SK-N-SH 细胞经 OA 处理后, Src 在 Tyr 416 位点的磷酸化水平明显增高 ( $P < 0.05$ ); CIG (100 和 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 预孵育 24 h 能够显著降低模型细胞 Src 在 Tyr 416 位点的磷酸化水平 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 见图 3。



**Figure 3** The effect of CIG on phosphorylation of Src in OA-induced cells, cells were exposed to OA for 6 h after the incubation with CIG (50, 100, 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). A: The levels of Src and phosphorylated Src (p-Src) at Ser 416 site were detected by Western blot; B: Quantitative analysis of Src and p-Src.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . # $P < 0.05$  vs control group; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs model group

#### 讨论

AD 患者主要病理特征之一是在脑中出现大量由过度磷酸化 tau 蛋白聚集形成的神经原纤维缠结, 其含量与 AD 患者的痴呆严重程度密切相关<sup>[19]</sup>, 表明过度磷酸化的 tau 蛋白在 AD 的发病机制中起重要作用。正常微管相关蛋白 tau 主要分布于细胞轴突及树突中, 具有促进管蛋白聚集成微管和维持微管结构的功能<sup>[20,21]</sup>。本实验发现, CIG 能够抑制 OA 诱导的 tau 蛋白过度磷酸化, 提示 CIG 可能通过保护微管而起到改善 AD 认知障碍的作用。

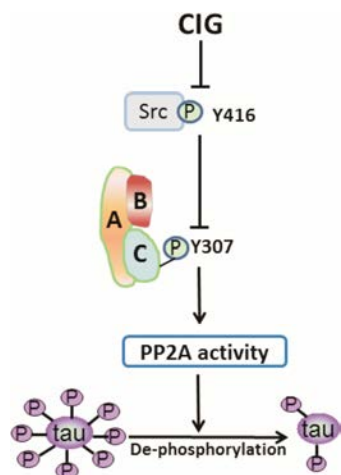
PP2A 能够很大程度地使 tau 蛋白去磷酸化, 并能恢复 tau 蛋白促进微管组装的能力<sup>[22,23]</sup>。为了明确 CIG 拮抗 tau 蛋白过度磷酸化的机制, 本实验采用 PP2A 特异性抑制剂 OA 制备拟 AD 细胞模型<sup>[24-26]</sup>, 观察 CIG 对 PP2A 的影响。结果发现, CIG 能够明显恢复 OA 模型细胞内 PP2A 的活性, 这可能是 CIG 拮抗 tau 蛋白异常过度磷酸化的重要机制。

PP2A 由结构亚基 A、调节亚基 B 及催化亚基 C 构成, C 亚基独具 PP2A 的催化活性<sup>[27]</sup>。PP2Ac 翻译后修饰异常可造成 PP2A 活性下降, PP2Ac 的翻译后修饰主要包括磷酸化和甲基化<sup>[14]</sup>。作者前期研究发现, CIG 能通过抑制 PP2Ac 的去甲基化而恢复 PP2A 的活性, 进而拮抗 tau 蛋白异常过度磷酸化<sup>[13]</sup>。本实验通过研究 CIG 对 PP2Ac 的磷酸化影响进一步揭示

CIG 恢复 PP2A 活性的机制。有研究报告, PP2Ac 在 Tyr 307 位点的磷酸化增高能够抑制 PP2A 的活性<sup>[18]</sup>。AD 脑中 PP2Ac 在 Tyr 307 位点的磷酸化明显增高, 且在皮层及海马的神经原纤维缠结中有大量磷酸化 PP2Ac 存在<sup>[16]</sup>, 提示 PP2Ac 的磷酸化和 tau 蛋白磷酸化与 AD 密切关系。本实验发现, OA 诱导 PP2Ac 在 Tyr 307 位点的磷酸化水平增高, 而 CIG 能够抑制模型细胞内 PP2Ac 在 Tyr 307 位点的过度磷酸化, 这可能是 CIG 增高 PP2A 活性的另一机制。

Src 是一种位于细胞质的非受体酪氨酸蛋白激酶, 是 Src 家族中的一员<sup>[17,28,29]</sup>。Src 在 Tyr 416 位点的磷酸化能够增加 Src 的活性, 从而促进 PP2Ac 的磷酸化<sup>[15]</sup>。本实验结果显示, OA 诱导 Src 在 Tyr 416 位点的磷酸化水平增高, 而 CIG 能够抑制模型细胞内 Src 在 Tyr 416 位点的过度磷酸化, 提示可能减低 Src 的活性, 这可能是 CIG 抑制 PP2Ac 磷酸化的机制。

综上所述, CIG 能够抑制 OA 诱导的 tau 蛋白异常过度磷酸化; 其作用机制为 CIG 通过抑制 Src 在 Tyr 416 位点的磷酸化减低其活性而降低 PP2Ac 的磷酸化, 从而恢复 PP2A 活性, 促进 tau 蛋白的去磷酸化(图 4)。本研究进一步阐明了 CIG 拮抗 tau 蛋白过度磷酸化的作用机制, 也为研发有效治疗 AD 的药物提供了实验数据。



**Figure 4** Schematic diagram of CIG inhibiting tau hyper-phosphorylation. PP2A consists of a dimeric core enzyme composed of the structure A and catalytic subunit C, and a regulatory subunit B

## References

[1] Mullane K, Williams M. Alzheimer's therapeutics: continued clinical failures question the validity of the amyloid hypothesis-but what lies beyond? [J]. *Biochem Pharmacol*, 2013, 85:

289–305.

- [2] Yin M. Full-scale setback and thinking in R&D of Alzheimer's disease drug [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2014, 49: 757–763.
- [3] Del Carmen Cárdenas-Aguayo M, Gómez-Virgilio L, DeRosa S, et al. The role of tau oligomers in the onset of Alzheimer's disease neuropathology [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2014, 5: 1178–1191.
- [4] Mullard A. BACE inhibitor bust in Alzheimer trial [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16: 155.
- [5] Wischik CM, Harrington CR, Storey JM. Tau-aggregation inhibitor therapy for Alzheimer's disease [J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 88: 529–539.
- [6] Avila J, Pallas N, Bolós M, et al. Intracellular and extracellular microtubule associated protein tau as a therapeutic target in Alzheimer disease and other tauopathies [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2016, 20: 653–661.
- [7] Pachima YI, Zhou LY, Lei P, et al. Microtubule-tau interaction as a therapeutic target for Alzheimer's disease [J]. *J Mol Neurosci*, 2016, 58: 145–152.
- [8] Suzuki K, Iwata A, Iwatsubo T. The past, present, and future of disease-modifying therapies for Alzheimer's disease [J]. *Proc Jpn Acad Ser B*, 2017, 93: 757–771.
- [9] Wu XL, Piña-Crespo J, Zhang YW, et al. Tau-mediated neurodegeneration and potential implications in diagnosis and treatment of Alzheimer's disease [J]. *Chin Med J*, 2017, 130: 2978–2990.
- [10] Ding YX, Zhang L, Ye CF, et al. Effect of cornel iridoid glycoside on learning-memory ability and synaptophysin in fimbria-fornix transected rats [J]. *Chin J New Drugs (中国新药杂志)*, 2010, 19: 133–138.
- [11] Ma D, Zhu Y, Li Y, et al. Beneficial effects of cornel iridoid glycoside on behavioral impairment and senescence status in SAMP8 mice at different ages [J]. *Behav Brain Res*, 2016, 312: 20–29.
- [12] Chu YQ, Li W, Zhang L, et al. Effects of cornus officinalis iridoid glycoside on cellular model of Alzheimer disease induced by protein phosphatase inhibitor okadaic acid [J]. *Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报)*, 2006, 22: 960–963.
- [13] Yang CC, Kuai XX, Li YL, et al. Cornel iridoid glycoside attenuates tau hyperphosphorylation by inhibition of PP2A demethylation [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013. DOI: 10.1155/2013/108486.
- [14] Hoffman A, Taleski G, Sontag E. The protein serine/threonine phosphatases PP2A, PPI and calcineurin: a triple threat in the regulation of the neuronal cytoskeleton [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2017, 84: 119–131.

- [15] Yang W, Wang X, Duan C, et al. Alpha-synuclein overexpression increases phospho-protein phosphatase 2A levels *via* formation of calmodulin/Src complex [J]. *Neurochem Int*, 2013, 63: 180–194.
- [16] Liu R, Zhou XW, Tanila H, et al. Phosphorylated PP2A (tyrosine 307) is associated with Alzheimer neurofibrillary pathology [J]. *J Cell Mol Med*, 2008, 12: 241–257.
- [17] Liu R, Zhou XW, Wang JZ. Effect of blocking tyrosine kinase Src expression on protein phosphatase 2A and tau phosphorylation [J]. *Neural Injury Funct Reconstr (神经损伤与功能重建)*, 2007, 2: 203–206.
- [18] Xiong Y, Jing XP, Liu R, et al. Zinc ions inhibits PP2A and promotes tau protein hyperphosphorylation by regulating the SRC [J]. *Chin J Pathophysiol (中国病理生理杂志)*, 2010, 26: 2052.
- [19] Yang X, Yang Y, Luo Y, et al. Hyperphosphorylation and accumulation of neurofilament proteins in transgenic mice with Alzheimer presenilin 1 mutation [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2009, 29: 497–501.
- [20] Haass C, Mandelkow E. Fyn-tau-amyloid: a toxic triad [J]. *Cell*, 2010, 142: 356–358.
- [21] Ittner LM, Ke YD, Delerue F, et al. Dendritic function of tau mediates amyloid- $\beta$  toxicity in Alzheimer's disease mouse models [J]. *Cell*, 2010, 142: 387–397.
- [22] Martin L, Latypova X, Wilson CM, et al. Tau protein phosphatases in Alzheimer's disease: the leading role of PP2A [J]. *Ageing Res Rev*, 2013, 12: 39–49.
- [23] Taleski G, Sontag E. Protein phosphatase 2A and tau: an orchestrated 'Pas de Deux' [J]. *FEBS Lett*, 2018, 592: 1079–1095.
- [24] Ikehara T, Imamura S, Yoshino A, et al. PP2A inhibition assay using recombinant enzyme for rapid detection of okadaic acid and its analogs in shellfish [J]. *Toxins (Basel)*, 2010, 2: 195–204.
- [25] Messner DJ, Romeo C, Boynton A, et al. Inhibition of PP2A, but not PP5, mediates p53 activation by low levels of okadaic acid in rat liver epithelial cells [J]. *J Cell Biochem*, 2006, 99: 241–255.
- [26] Rahman MM, Rumzhum NN, Morris JC, et al. Basal protein phosphatase 2A activity restrains cytokine expression: role for MAPKs and tristetraprolin [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 10063.
- [27] Hu Y, Guo J. PP2A regulation subunits and their substrates [J]. *J Med Mol Biol (医学分子生物学杂志)*, 2008, 5: 169–173.
- [28] Ding MQ. Advances in research of non-receptor tyrosine kinase Src in brain ischemia [J]. *Chin Contin Med Edu (中国继续医学教育)*, 2015, 7: 169–170.
- [29] Liu R, Zhou XW, Wang JZ. Effect of Blocking Tyrosine Kinase Src Expression on Protein Phosphatase 2A and Tau Phosphorylation [C] // Proceedings of Hubei province and Wuhan pathophysiological association's 14th annual seminar. Wuhan: Hubei Science and Technology Association, 2008.