

· 基础研究 ·

淫羊藿苷抑制 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 N2a 细胞自噬及减少细胞内外 $A\beta$ 的实验研究姜霞¹ 王平²

摘要 目的 研究淫羊藿苷(ICA)对 β -淀粉样蛋白肽 25-35($A\beta_{25-35}$)诱导的小鼠神经瘤母细胞(N2a) $A\beta$ 含量和自噬溶酶体途径的影响。方法 N2a 细胞培养基加入不同浓度的 ICA (0.05、0.1、0.2 $\mu\text{mol/L}$) 孵育 6 h, 再将 20 $\mu\text{mol/L}$ 老化的 $A\beta_{25-35}$ 处理 24 h。实验分为 5 组: 对照组(DMSO)、AD 细胞模型组($A\beta_{25-35}$)、0.05 $\mu\text{mol/L}$ ICA 干预组($A\beta_{25-35}$ + ICA0.05)、0.1 $\mu\text{mol/L}$ ICA 干预组($A\beta_{25-35}$ + ICA0.1)、0.2 $\mu\text{mol/L}$ ICA 干预组($A\beta_{25-35}$ + ICA0.2)。将 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 的 ICA 预处理 N2a 细胞 2、4、6 h, 再加入 $A\beta_{25-35}$ 处理 24 h。收集细胞和培养基, ELISA 法测定细胞内外 $A\beta_{40}$ 及 $A\beta_{42}$ 含量; 免疫印迹法检测 LC3、P62、p70S6K 及其苏氨酸 389 位点磷酸化(p-p70S6K, 活性形式)的表达; 采用细胞免疫荧光技术观察 LC3 和 4G8(识别 $A\beta_{17-24}$ 片段)的染色强度及 LAMP2 和 4G8 共定位情况。结果 与对照组比较, AD 细胞模型组细胞存活率降低($P < 0.05$), 细胞内外 $A\beta_{42}$ 及 $A\beta_{40}$ 的含量增加($P < 0.01$, $P < 0.05$), LC3 II/LC3 I 和 P62 蛋白表达均增加($P < 0.05$), p-p70S6K 表达增加($P < 0.01$)。与 AD 细胞模型组比较, 0.05、0.1 和 0.2 $\mu\text{mol/L}$ ICA 干预组细胞活力下降($P < 0.05$), 0.2 $\mu\text{mol/L}$ ICA 干预组细胞内外 $A\beta_{42}$ 及 $A\beta_{40}$ 含量降低($P < 0.05$), 0.1 和 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 干预组 ICA LC3 II/LC3 I 和 4G8 蛋白表达降低($P < 0.05$)。0.2 $\mu\text{mol/L}$ ICA 预处理 4、6 h 可明显降低 AD 细胞模型细胞内外 $A\beta_{42}$ 和 $A\beta_{40}$ 的含量, 降低 LC3 II/LC3 I 和 P62 蛋白表达及 p-p70S6K/p70S6K($P < 0.05$)。结论 ICA 可抑制 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 N2a 细胞自噬, 降低 p70S6K 活性并减少细胞内外 $A\beta$ 。

关键词 淫羊藿苷; 小鼠神经瘤母细胞; β 样淀粉蛋白肽; 自噬

Icariin Inhibited $A\beta_{25-35}$ -induced Autophagic Systems and Decreased $A\beta$ in N2a Cells JIANG Xia¹ and WANG Ping² 1 Department of Pathology, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan (430065); 2 Institute of Gerontology, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan (430065)

ABSTRACT Objective To explore the effects of icariin (ICA) on autophagy-lysosomal pathway in β -amyloid 25-35 ($A\beta_{25-35}$)-induced Neuro2a (N2a) cells. **Methods** N2a cells were pretreated with ICA (0.05, 0.1, 0.2 $\mu\text{mol/L}$), then the cells were incubated with $A\beta_{25-35}$ for 24 h to establish AD cell model. The cultured cells were divided into 5 groups, i.e., the control group (DMSO), AD cell model group, 0.05 $\mu\text{mol/L}$ ICA group, 0.1 $\mu\text{mol/L}$ ICA group, and 0.2 $\mu\text{mol/L}$ ICA group. Furthermore, the AD cell model were pretreated with ICA (0.2 $\mu\text{mol/L}$) for 2, 4 and 6 h. $A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$ in cells extract and culture medium were determined by ELISA; Western Blot was used to detect expression of LC3, P62, p70S6K and its threonine 389 site phosphorylation (p-p70S6K, active form); the expression and distribution of LC3 and 4G8 (recognition of $A\beta_{17-24}$ fragment) was detected by Immunocytochemistry. Immunofluorescence double label of LAMP2 and 4G8 were used to analyze fusion of autophagosome and lysosome. **Results** Compared with the control group, the cell survival rate of the AD cell model group decreased ($P < 0.05$), the intracellular and extracellular contents of $A\beta_{42}$ and $A\beta_{40}$ increased ($P < 0.01$, $P < 0.05$), and the protein expression of

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 81973721; No. 81303252); 湖北省自然科学基金项目(No. 2017CFB733)

作者单位: 1. 湖北中医药大学基础医学院病理学教研室(武汉 430065); 2. 湖北中医药大学老年病研究所(武汉 430065)

通讯作者: 姜霞, Tel: 027-688890127, E-mail: jane_j_09@126.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20200928. 187

LC3 II /LC3 I as well as P62 increased ($P<0.05$), the expression of p-p70S6K increased ($P<0.01$). Compared with the AD cell model group, the cell viability of 0.05, 0.1 and 0.2 $\mu\text{mol/L}$ ICA group decreased ($P<0.05$), and the intracellular and extracellular content of $\text{A}\beta_{42}$ and $\text{A}\beta_{40}$ of the 0.2 $\mu\text{mol/L}$ ICA group decreased ($P<0.05$). 0.1 and 0.2 $\mu\text{mol/L}$ ICA group LC3 II /LC3 I and 4G8 protein expression decreased ($P<0.05$). The intracellular and extracellular $\text{A}\beta_{42}$ and $\text{A}\beta_{40}$ contents were decreased after ICA (0.2 $\mu\text{mol/L}$) pretreatment for 4 and 6 hours, and the expression of LC3 II /LC3 I and P62 as well as p-p70S6K/p70S6K decreased ($P<0.05$). **Conclusion** ICA could inhibit the autophagy, decrease the activity of p70S6K and reduce the intracellular and extracellular $\text{A}\beta$ induced by $\text{A}\beta_{25-35}$ *in vitro*.

KEYWORDS icariin; N2a cells; β -amyloid₂₅₋₃₅; autophagy

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是常见的老年痴呆, 其两大病理学特征为脑内 β -淀粉样蛋白 (β -amyloid, $\text{A}\beta$) 沉积形成的老年斑 (senile plaque, SP) 和过度磷酸化的 tau 蛋白聚集所形成的神经元纤维缠结 (neurofibrillary tangle, NFT)^[1]。AD 患者脑内错误折叠的蛋白大量聚集造成神经元和突触的损害。细胞自噬可清除这些具有毒性的长寿蛋白, 是降解变性蛋白聚集体最重要的方式^[2]。特异敲除神经元内自噬相关基因 5 (autophagy-related gene 5, Atg5) 或 Atg7 抑制自噬, 小鼠脑部出现包涵体和泛素化蛋白聚集, 伴有广泛的神经退行性病变^[3,4]。然而, 自噬在 AD 病变进展中是一把“双刃剑”^[5]。在 AD 后期, 神经元内异常蛋白逐渐增加, 诱发病理性自噬导致大量自噬体的聚集。自噬体内富含 $\text{A}\beta$ 、APP 及 γ -分泌酶, 增强自噬可使 γ -分泌酶从内质网转移至自噬体并使其活性增强, 增加胞内 $\text{A}\beta$ 的生成^[6]。中性内肽酶 (neprilysin, NEP) 和胰岛素降解酶 (insulin-degrading enzyme, IDE) 等内肽酶无法降解自噬体中的 $\text{A}\beta$, 因此这些新生的 $\text{A}\beta$ 主要依赖于溶酶体内水解酶进行清除, 部分则被释放至细胞外形成 SP^[7]。

研究表明, 在 AD 发病过程中自噬激活与自噬障碍并存。在 AD 早期阶段, 应用自噬激活剂雷帕霉素可减少 $\text{A}\beta$ 和 NFTs 形成, 改善 AD 转基因动物认知功能^[8]; 而在 SP 形成后, 则无治疗效果^[9]。AD 晚期抑制自噬可能会起到神经保护作用, 丁内酯延伸物 3BDO 可抑制自噬, 减少 $\text{A}\beta$ 的含量, 阻止认知功能损害^[10]。由此可见, 在 AD 病变发展的不同阶段自噬扮演了不同的角色。如何调控自噬, 改善自噬溶酶体功能紊乱实现自噬稳态, 是目前亟待解决的问题, 将为防治 AD 提供新的方法。

淫羊藿苷 (icariin, ICA, MW: 676.67) 是补益中药淫羊藿 (*Epimedium brevicornu* Maxim.) 主要活性成分之一, 结构上属 8-异戊烯基黄酮醇苷类化合

物。药理学研究显示, ICA 具有抗炎、抗氧化等神经保护作用。ICA 预防给药可提高快速老化小鼠 (senescence-accelerated mouse prone 8, SAMP8) 学习记忆能力并改善脑组织线粒体氧化应激^[11]。近年来, ICA 在防治 AD 中的作用也受到广泛关注: ICA 减少皮下注射氢化可的松联合侧脑室注射 $\text{A}\beta_{25-35}$ 大鼠脑内 $\text{A}\beta$ 的含量^[12]; ICA 抑制侧脑室注射 $\text{A}\beta_{1-42}$ 诱导的自噬溶酶体过度激活, 改善学习记忆和病理损伤^[13]。大量 $\text{A}\beta$ 沉积是 AD 进展的关键因素之一, $\text{A}\beta_{25-35}$ 是其中具有活性的片段, 可促进细胞凋亡、激发氧化应激, 近期发现其可破坏血脑屏障导致神经毒性^[14]。本实验采用 20 $\mu\text{mol/L}$ 老化的 $\text{A}\beta_{25-35}$ 体外诱导 N2a 细胞自噬激活, 研究 ICA 对该 AD 模型细胞内外 $\text{A}\beta$ 含量和自噬的影响, 并初步探讨其作用机制。

材料与方法

1 细胞 小鼠神经瘤母细胞 (Neuro2A, N2a 细胞) 由华中科技大学同济医学院王建枝教授惠赠, 来自教育部神经系统重大疾病重点实验室细胞库。

2 药物及试剂 ICA 购于中国药品生物制品检定所 (货号: YZ-110737-20Mg, 批号: 110737-200312), HPLC 检测纯度 98% 以上, 先溶于 DMSO, 再溶于蒸馏水, 配成浓度为 1 mol/L 储备液, DMSO 终浓度不超过 0.1%, 正压过滤除菌, 4 $^{\circ}\text{C}$ 备用。 $\text{A}\beta_{25-35}$ (货号: A4559-1MG, 批号: 112M4775V)、苯甲磺酰氟 (phenylmethylsulfonyl fluorid, PMSF, 货号: P7626-1G)、丙烯酰胺 (Acrylamide, Arc, 货号: A9099-100G)、N,N-亚甲基双丙烯酰胺 (Bis-Acrylamide, Bis, 货号: 146072-100G)、三羟甲基氨基甲烷 (tris-hydroxymethylaminomethane, Tris, 货号: 1083820500) 及四甲基乙二胺 (tetramethylethylenediamine, TEMED 货号: T7024-100ML) 购于美国 Sigma 公司。DMEM (货号: 119650840)、OPTI-MEM (货号: 31985070) 及胎牛血清 (fetal bovine serum,

FBS, 货号: 10091130) 购自美国 Gibco 公司。荧光 (Cy3) 标记羊抗大鼠 IgG 购自北京博奥森生物技术有限公司 (货号: bs-0293G-Cy3) 及荧光 (FITC) 标记羊抗小鼠 IgG 购自武汉博士德生物工程有限公司 (货号: BA1101); DAPI (货号: C1002)、二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白测定试剂盒 (货号: P0010) 购自上海碧云天生物技术有限公司。 $A\beta_{40}$ (货号: E-EL-M0067c) 和 $A\beta_{42}$ (货号: E-EL-M0068c) 试剂盒购于武汉伊莱瑞特生物科技有限公司。4G8 抗体 (货号: 800701, 美国 Biolegend 公司), 微管相关蛋白轻链 3 (microtubule-associated protein light chain 3, LC3) 抗体 (货号: NB100-2220, 美国 Novus Biologicals 公司), P62 抗体 (货号: ab56416, 美国 Abcam 公司), 溶酶体关联膜蛋白 2 (Lysosomal-Associated Membrane Protein 2, LAMP2) 抗体 (货号: ab13524, 美国 Abcam 公司)。雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 通路中 p70 核糖体 S6 激酶 (p70 ribosomal protein S6 kinase, p70S6K, 货号: #9202) 及其苏氨酸 389 位点磷酸化 (p-p70S6K, 活性形式, 货号: #9234) 购自美国 Cell Signaling 公司。CCK-8 试剂盒 (日本 Dojindo Laboratories 公司)

3 仪器 AlphaClean 1300 型 Heal Force CO₂ 恒温培养箱 (上海力新仪器有限公司); spectra MAX M5 型多功能酶标仪 (上海美谷分子仪器有限公司); 电泳槽和凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司); 转膜仪 (美国 Hofer 公司); BX53 型荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); TG 16W 型台式高速离心机 (长沙湘智离心机仪器有限公司); CR21G II 型低温高速离心机 (日本日立公司)。

4 细胞实验

4.1 细胞培养和造模 N2a 细胞置于 5% CO₂, 37 °C 培养箱内进行培养, 培养基 (50% DMEM, 50% OPTI-MEM, 5% FBS) 用一次性针头滤器 (Millipore 公司, 货号: SLHV033RB, 过滤除菌), 每 2~3 d 更换 1 次。细胞生长至 70%~80% 丰度时, 传代或用于实验。

$A\beta_{25-35}$ 多肽溶于 DMSO, 充分震荡 5 min, 待其充分溶解, 加入蒸馏水, 配成浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 储备液, 置于 37 °C 避光孵育 1 周, 备用^[18]。再将 20 $\mu\text{mol/L}$ 老化的 $A\beta_{25-35}$ 诱导 N2a 细胞 24 h 建立 AD 细胞模型。

4.2 ICA 浓度的筛选 细胞悬液接种于 96 孔板, 每孔 100 μL , 每组均设定 6 个复孔, 孵育 24 h 后

更换为无血清培养基, 加入 0.01、0.05、0.1、0.2、0.5、1 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 ICA 孵育 6 h, 再将 $A\beta_{25-35}$ 处理 24 h 后, 应用 CCK-8 试剂盒检测细胞存活率。与 AD 细胞模型组比较, 0.05、0.1 和 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 的 ICA 可增加细胞存活率, 故选用进行药物干预。实验分为 5 组: 对照组 (DMSO)、AD 细胞模型组 ($A\beta_{25-35}$)、0.05 $\mu\text{mol/L}$ ICA 干预组 ($A\beta_{25-35}$ + ICA0.05)、0.1 $\mu\text{mol/L}$ ICA 干预组 ($A\beta_{25-35}$ + ICA0.1)、0.2 $\mu\text{mol/L}$ ICA 干预组 ($A\beta_{25-35}$ + ICA0.2)。

4.3 Western Blot 检测蛋白表达 ICA 干预 AD 细胞后进行蛋白提取, 简要步骤如下: 将 4× 上样缓冲液 (终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ Tris, PH 6.8, 4% SDS, 20% 甘油) 80 mL 加入 6 孔板后用细胞刮匙刮起细胞, 转移至 EP 管 (规格为 1.5 mL) 中, 沸水浴中煮 10 min, 60 Hz 超声 10~15 次, BCA 法测定蛋白浓度。向已测定浓度的蛋白样品中加入 β -巯基乙醇及溴酚蓝 (终浓度分别为 7.5% 及 0.2%), 充分振荡 20 s 后, 上样前煮 10 min。取等量蛋白进行 SDS-PAGE 电泳并转位到 PVDF 膜 (美国 Millipore 公司, 货号: IPVH00010/ISEQ15150) 上, 封闭 (5% 脱脂奶粉稀释于 TBS 溶液中) 1 h 后, 4 °C 一抗 LC3, P62, p70S6K 和 p-p70S6K (稀释均为 1:1 000) 封膜孵育过夜, 次日 TBST 漂洗 3×10 min, 加入二抗室温孵育 1 h, TBST 漂洗后采用 ECL 化学发光法显影, 用 Gel-pro 4.0 软件进行条带量化分析灰度值。

4.4 ELISA 检测细胞内外 $A\beta_{40}$ 和 $A\beta_{42}$ 0.05、0.1 和 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 的 ICA 预先 6 h 加入 AD 模型细胞, 24 h 后收集细胞和培养基。0.2 $\mu\text{mol/L}$ 的 ICA 预处理 N2a 细胞 2、4、6 h, 再加入 $A\beta_{25-35}$ 处理 24 h, 提取细胞匀浆液或吸取培养基, 3 000 r/min 离心 10 min 取上清, 按照 $A\beta_{40}$ 和 $A\beta_{42}$ ELISA 试剂盒说明书进行操作。分别设空白孔、标准孔和待测样品孔。空白孔加样品稀释液 100 μL , 余孔分别加标准品或待测样品 100 μL 。酶标板覆膜 37 °C 孵育 90 min。弃去液体, 甩干, 每个孔中加入 Detection Ab 工作液 100 μL , 酶标板加上覆膜 37 °C 温育 1 h。弃去孔内液体, 甩干, 洗板 3 次。每孔加 HRP Conjugate 工作液 100 μL , 加上覆膜 37 °C 温育 30 min。弃去孔内液体, 甩干, 洗板 5 次。每孔加底物溶液 90 μL , 酶标板加上覆膜 37 °C 避光孵育 15 min。每孔加终止液 50 μL , 此时蓝色立转黄色。用酶标仪在 450 nm 波长测量各孔的光密度 (OD 值)。

4.5 细胞免疫荧光检测 4G8 和 LC3 的表达和分布 处理结束后, 预先放有盖玻片的 24 孔板的细

胞,弃去培养液,PBS 冲洗,4%多聚甲醛固定 20 min 后,PBS 清洗 3 遍,0.1% Triton-100 破膜 15 min。加入封闭用山羊血清孵育 30 min。4G8 及 LC3 抗体(均为 1:200)4℃孵育 24 h,0.1% Triton-100-PBS 液清洗 3×10 min,加入荧光素标记的二抗,避光 37℃孵育 1 h 后,DAPI 染色 5 min,0.1% Triton-100-PBS 液清洗 3×5 min,最后抗荧光淬灭剂封片,4℃避光保存。在激光共聚焦显微镜下进行观察,每张切片随机观察 5 个视野并拍照取图,检测各组自噬诱导和 A β 的分布和表达情况,各组实验各重复 3 次。

4.6 细胞免疫荧光双标观察 LAMP2 和 4G8 共定位 玻片经山羊血清,室温封闭后,加 4G8 (1:200),4℃孵育 24 h;回收一抗,0.1% Triton-100-PBS 液漂洗 3×10 min。加入 LAMP2(1:100)4℃孵育 48 h。回收第二种一抗,0.1% Triton-100-PBS 液漂洗 3×10 min。荧光(FITC)标记羊抗小鼠 IgG (1:100),37℃避光孵育 1 h,0.1% Triton-100-PBS 液漂洗 5×10 min。再加入荧光(Cy3)标记羊抗大鼠 IgG (1:100),37℃避光孵育 1 h,0.1% Triton-X100-PBS 液漂洗 5×10 min。最后 DAPI 染核,封片。

5 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件统计分析数据,各组计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组细胞存活率和胞内外 A β 含量比较(图 1) 与对照组比较,AD 细胞模型组细胞存活率降低($P < 0.05$),细胞内外 A β_{42} 及 A β_{40} 的含量增加($P < 0.01$, $P < 0.05$)。与 AD 细胞模型组比较,0.05、0.1 和

0.2 $\mu\text{mol/L}$ ICA 干预组细胞活力下降($P < 0.05$),0.2 $\mu\text{mol/L}$ ICA 干预组细胞内外 A β_{42} 及 A β_{40} 含量降低($P < 0.05$)。

2 各组 LC3、P62 和 4G8 蛋白表达比较(图 2)

与对照组比较,AD 细胞模型组 LC3 II/LC3 I 和 P62 蛋白表达均增加($P < 0.05$)。与 AD 细胞模型组比较,0.1 和 0.2 $\mu\text{mol/L}$ ICA 干预组 LC3、P62 及 4G8 蛋白表达($P < 0.05$)。LC3 和 4G8 阳性染色主要分布在细胞浆内,AD 细胞模型组胞浆中 LC3 和 4G8 荧光染色强度较对照组增强,ICA 可降低 LC3 和 4G8 阳性显色。

3 各组 A β 含量、LC3 和 P62 蛋白表达比较(图 3) 0.2 $\mu\text{mol/L}$ ICA 预处理 4、6 h 可明显降低 AD 细胞模型组胞内外 A β_{42} 和 A β_{40} 的含量,降低 LC3 II/LC3 I 和 P62 蛋白表达($P < 0.01$, $P < 0.05$),而 ICA 预处理 2 h 无明显改善作用($P > 0.05$)。

4 各组细胞内 4G8 和 LAMP2 蛋白共定位比较(图 4) AD 细胞模型组胞浆内 4G8 与 LAMP2 共定位较对照组增强,与 AD 细胞模型组比较,ICA 组(0.2 $\mu\text{mol/L}$ 的 ICA 预处理 AD 模型细胞 6 h)4G8 和 LAMP2 表达较弱且两者共定位减少。

5 各组 p70S6K 和 p-p70S6K 蛋白表达比较(图 5) AD 细胞模型组 p-p70S6K 表达较对照组增加($P < 0.01$),ICA 预处理 4、6 h 能降低 p-p70S6K/p70S6K 比值($P < 0.05$),p70S6K 的表达在各组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

讨 论

中医学认为“肾虚髓空”是 AD 的根本病机,并把“从肾论治”作为主要治疗法则。中医药特别是补肾方药在抗衰老和改善学习记忆功能等方面有悠久的历史,积累了丰富的经验。淫羊藿始载于《神农本草经》,是小檗科淫羊藿属植物,为传统补肾中药,主要用于治疗阳痿遗精、筋骨痿软、风湿痹痛及麻木拘挛。ICA 是淫羊藿的主要活性成分,近年来其在促进学习记忆、改善 AD 的基本病变已被广泛报道^[11-13]。AD 重要特征为毒性蛋白异常聚集,自噬溶酶体途径是清除这些长寿命蛋白最重要的方式。针对单一靶点的基因或药物治疗改善 AD 脑内自噬溶酶体功能失调可清除 AD 脑内蛋白聚集,但存在较大副作用,寻找调控自噬的小分子天然产物具有广阔的前景。本实验以自噬溶酶体途径为靶点,探讨 ICA 改善 AD 病变的分子机制,为其临床治疗及抗痴呆新药的研发提供实验依据。

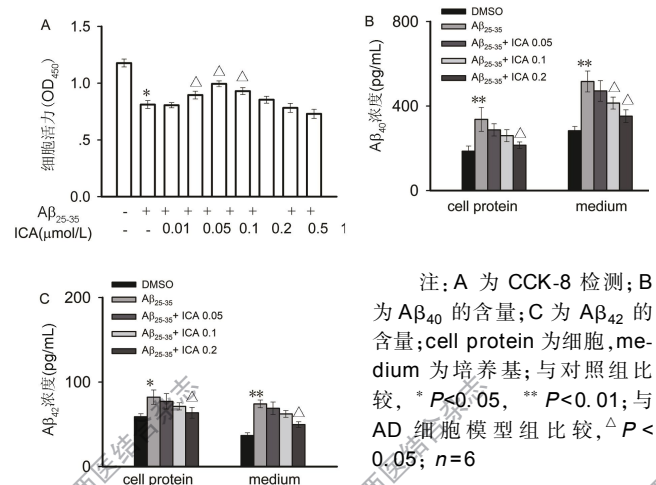
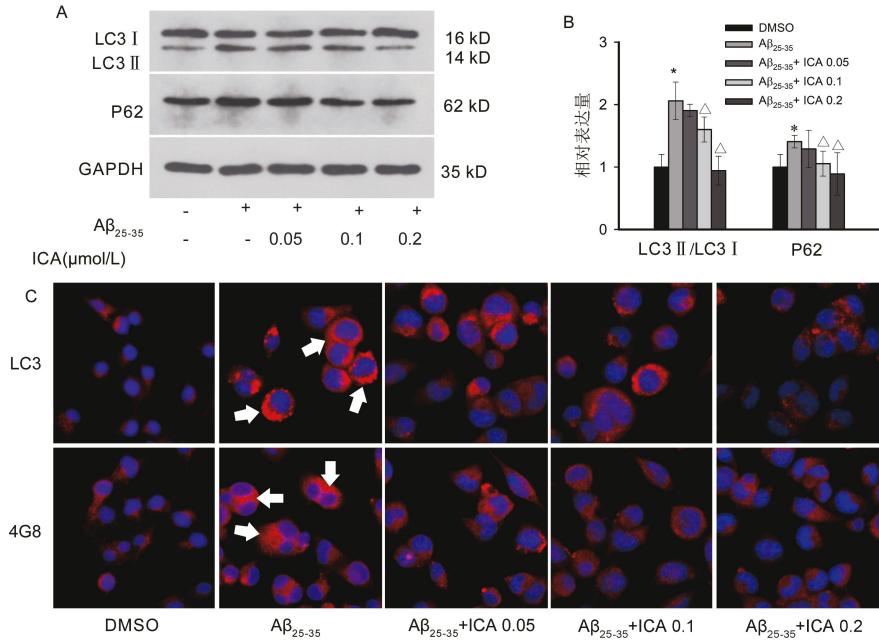


图 1 各组细胞存活率和胞内外 A β 含量比较

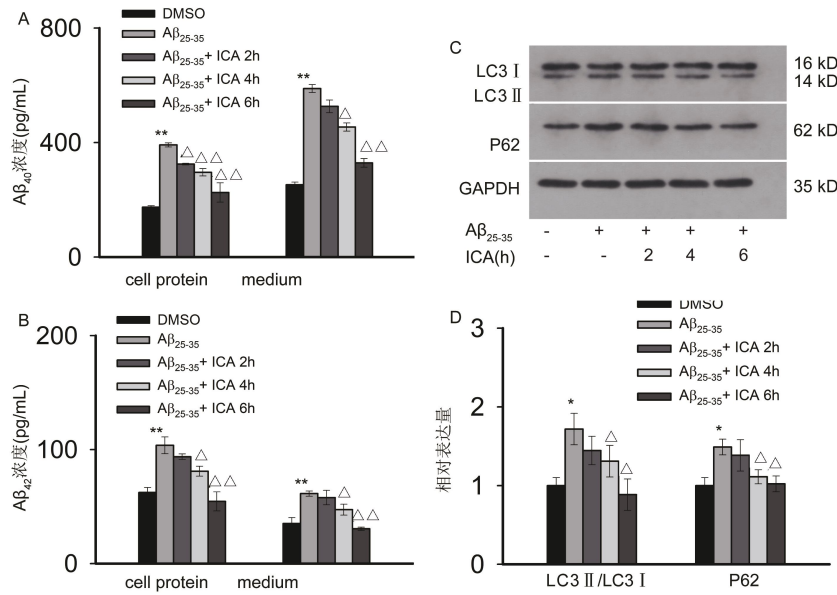
A β 是 AD 发病的核心致病因子,其定位于 APP 跨膜区外的 597~640 位点,经 β -分泌酶及 γ -分泌酶切割 APP 形成 37~42 kD 的多肽。正常生理条件下,A β 的产生和清除处于动态平衡。由于基因突变或外界环境

因素可破坏 A β 的动态平衡而使其聚集增加从而引起氧化应激、细胞凋亡、突触可塑性损伤及学习记忆障碍等病理及行为学改变。不同于罕见的家族型 AD (familial cases of AD, FAD),在更常见的晚发性散发型



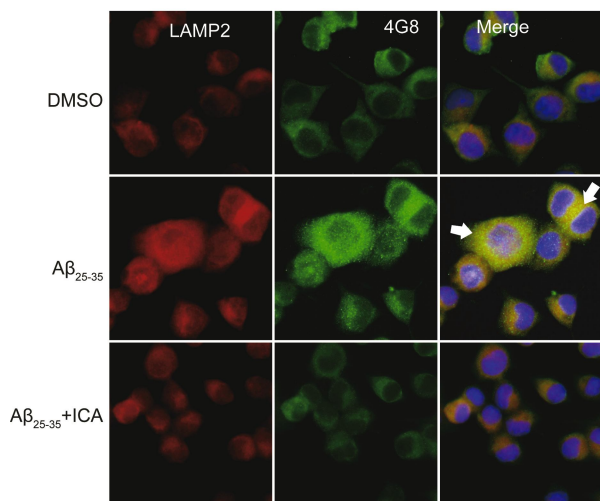
注:A为 Western Blot 检测 LC3 和 P62 的表达,GAPDH 为内参, $n=3$;B 为灰度值分析相对表达量;C 为细胞免疫荧光检测 LC3 和 4G8 的表达, $n=3$,放大倍数 $\times 200$;箭头所指为 AD 细胞模型组胞浆中 LC3 和 4G8 阳性荧光染色;与对照组比较, * $P<0.05$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$

图 2 各组 LC3、P62 和 4G8 蛋白表达比较



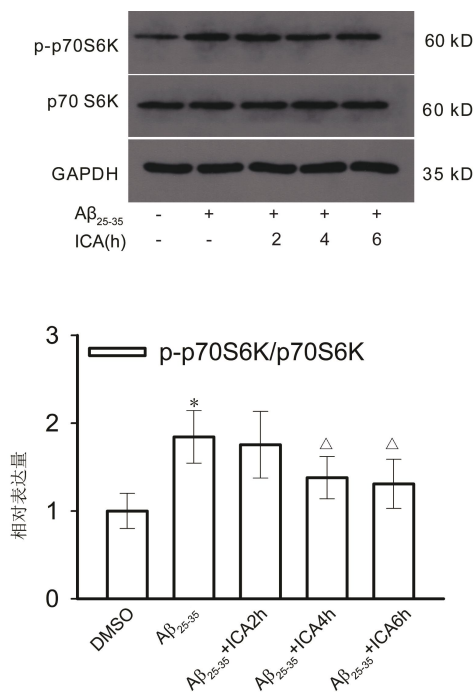
注:A为 A β_{40} 含量;B 为 A β_{42} 的含量;C 为 Western Blot 检测 LC3 和 P62 表达,GAPDH 为内参, $n=3$;D 为灰度值分析相对表达量;与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$

图 3 各组 A β 含量 LC3 和 P62 蛋白表达比较



注:箭头所指为 AD 细胞模型组胞浆中 4G8 与 LAMP2 共定位; $n=3$

图 4 LAMP2 和 4G8 细胞免疫荧光双标(400×)



注:与对照组比较, ** $P<0.05$; 与模型组比较, $^{\Delta} P<0.05$

图 5 各组 p70S6K 和 p-p70S6K 蛋白表达比较

AD(sporadic AD) 脑内 A β 产生速率并没有明显改变,然而其清除速率较对照下降近 30%^[15]。NEP、IDE 和内皮素转换酶(endothelin-converting enzyme, ECE)可降解细胞外的 A β 。近年研究发现,细胞内 A β 才是导致神经毒性的根本原因^[16]。自噬不仅与胞内 A β 清除障碍密切相关,并且自噬体是产生 A β 的场所。在 AD 典型病变尚未出现时,自噬已广泛存在。目前,是 A β 诱发自噬激活,还是自噬功能异常导致其清除障碍,尚未明确。较多的研究关注了 A β

对自噬溶酶体途径的影响:A β 上调炎症介质,导致星形胶质细胞功能障碍,激活自噬^[17]; A β 孵育 SH-SY5Y/pEGFP-LC3 细胞 4 h 后,自噬诱导增强,自噬体形成增加^[18]。细胞发生自噬时,LC3 的含量及 LC3 I 向 LC3 II 的转化均明显增加,一旦自噬体与溶酶体融合,自噬体内的 LC3 II 即被水解酶降解。我们的研究显示,A β_{25-35} 孵育 N2a 细胞 24 h 后,胞浆型 LC3(即 LC3 I)转变为自噬体膜型(即 LC3 II)增加,表现为 LC3 II/LC3 I 比值,提示自噬激活。并且采用 4G8 与 LAMP2 抗体进行免疫荧光双标,结果发现 AD 细胞模型组胞浆内 4G8 与 LAMP2 共定位较对照组增强,提示 A β 可导致自噬诱导及自噬体与溶酶体融合增强。目前认为,自噬是高度动态变化的过程,自噬体及 AVs 是其动态通路的中间结构,真正影响和决定自噬水平的是自噬流(autophagic flux),它反映了自噬体的诱导、产生、自噬底物到溶酶体的运输(次级自噬流)、自噬底物在溶酶体的降解(初级自噬流)等动态过程。P62 是一种 LC3 连接蛋白,是自噬途径通畅与否的标志物。P62 在自噬过程中绝大多数被清除,如果自噬流通畅,则 LC3 II 转换的增加会伴随着 P62 蛋白的减少。A β_{25-35} 孵育 N2a 细胞 24 h 后, P62 蛋白表达增加,提示该 AD 细胞模型自噬流被严重阻断。

有研究提示上调自噬有望成为 AD 早期的治疗靶点;转基因人突变体 P301S tau 小鼠脑内激活自噬减少了大脑皮质和脑中 tau 包涵体的数量^[19];应用自噬增强剂雷帕霉素可以减轻 AD 动物模型中的认知障碍和减少 A β 聚集^[9]。但是,如用于 AD 的后期阶段,自噬上调会导致毒性 A β 的释放。笔者认为,单独激活或抑制自噬可能对 AD 治疗适得其反,应考虑到 AD 病变进展的不同阶段,保持自噬流稳态才是防治 AD 的重要策略。本实验发现 ICA 可显著抑制 A β_{25-35} 诱导的 N2a 细胞自噬诱导过度激活,改善神经元自噬流受阻,实现 AD 自噬重平衡,进而减少细胞内、外 A β 的含量。ICA 预处理 4、6 h 可抑制自噬激活,延长时间是否仍有改善作用,需进一步实验研究。

自噬的调节是一个非常复杂的过程, mTOR、Class III 型磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)及 Ca²⁺ 等许多信号通路参与其中。自噬激活可通过三种途径:Ca²⁺、活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)以及 mTOR。mTOR 是自噬的一种负调控因子,通过调节下游 Atg 的活性,抑制自噬。另外, mTOR 通过磷酸化其下游靶蛋白 p70S6K 来调节蛋白质翻译。p70S6K 的磷酸化状态

可以用来指示 mTOR 的活性。磷酸化 p70S6K 的量越多,提示 mTOR 的活性越弱,自噬过程可被激活。本研究发现, A β_{25-35} 孵育 N2a 细胞 24 h 后, p-p70S6K 表达较对照组增加,提示 A β 可能通过抑制 mTOR 活性激活细胞自噬。有文献报道,活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 在 A β 上调自噬中有重要作用^[20]。本实验结果显示, A β 诱导自噬与 mTOR 相关,但不排除其他途径也参与其中。ICA 预处理 4 h 和 6 h 能降低 p-p70S6K/p70S6K 比值,可能激活了 mTOR 进而抑制自噬。但本研究存在一定不足, ICA 是否影响 N2a 细胞内源性 A β 含量和自噬途径,并且 ICA 作用于哪种细胞信号转导分子抑制自噬,将在今后的工作中进一步探索。

利益冲突: 无。

参 考 文 献

- [1] Arvanitakis Z, Shah RC, Bennett DA. Diagnosis and management of dementia: review [J]. JAMA, 2019, 322(16): 1589.
- [2] Goldberg AL. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins [J]. Nature, 2003, 426(6968): 895-899.
- [3] Hara T, Nakamura K, Matsui M, et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice [J]. Nature, 2006, 441(7095): 885-889.
- [4] Komatsu M, Waguri S, Chiba T, et al. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice [J]. Nature, 2006, 441(7095): 880-884.
- [5] Tung Y T, Wang B J, Hu M K, et al. Autophagy: a double-edged sword in Alzheimer's disease [J]. J Biosci, 2012, 37(1): 157-165.
- [6] Yu WH, Kumar A, Peterhoff C, et al. Autophagic vacuoles are enriched in amyloid precursor protein secretase activities: implications for beta-amyloid peptide over production and localization in Alzheimer's disease [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2004, 36(12): 2531-2540.
- [7] Yu WH, Cuervo AM, Kumar A, et al. Macroautophagy: a novel Beta amyloid peptide generating pathway activated in Alzheimer's disease [J]. J Cell Biol, 2005, 171(1): 87-98.
- [8] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease [J]. Cell, 2008, 132(1): 27-42.
- [9] Majumder S, Richardson A, Strong R, et al. Inducing autophagy by rapamycin before, but not after, the formation of plaques and tangles ameliorates cognitive deficits [J]. PLoS One, 2011, 6(9): e25416.
- [10] Wei LF, Yang H, Xie ZH, et al. A butyrolactone derivative 3BDO alleviates memory deficits and reduces amyloid-deposition in an APP/PS1 transgenic mouse model [J]. J Alzheimers Dis, 2012, 30(3): 531-543.
- [11] 张晓菲, 路畅, 贺晓丽, 等. 淫羊藿苷预防给药对快速老化小鼠 SAMP8 学习记忆能力及脑组织线粒体氧化应激的影响 [J]. 中国药理学通报, 2015, 31(7): 925-930.
- [12] 方丽媛, 王平, 谭爱华, 等. 淫羊藿苷和固本方对肾虚型老年痴呆大鼠行为及病理学的作用 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(12): 5322-5326.
- [13] Jiang X, Chen LL, Lan Z, et al. Icarin ameliorates amyloid pathologies by maintaining homeostasis of autophagic systems in A β_{1-42} -injected rats [J]. Neurochem Res, 2019, 44: 2708-2722.
- [14] Cuevas E, Rosas-Hernandez H, Burks SM, et al. Amyloid Beta 25-35 induces blood-brain barrier disruption in vitro [J]. Metab Brain Dis, 2019, 34(5): 1365-1374.
- [15] Mawuenyega KG, Sigurdson W, Ovod V, et al. Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease [J]. Science, 2010, 330(6012): 1774.
- [16] LaFerla FM, Green KN, Oddo S. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease [J]. Nat Rev Neurosci, 2007, 8: 499-509.
- [17] Hong Y, Liu Y, Zhang G, et al. Progesterone suppresses A β_{42} -induced neuroinflammation by enhancing autophagy in astrocytes [J]. Int Immunopharmacol, 2018, 54: 336-343.
- [18] Hung SY, Huang WP, Liou HC, et al. Autophagy protects neuron from Abeta-induced cytotoxicity [J]. Autophagy, 2009, 5(4): 502-510.
- [19] Schaeffer V, Lavenir I, Ozcelik S, et al. Stimulation of autophagy reduces neurodegeneration in a mouse model of human tauopathy [J]. Brain, 2012, 135(Pt 7): 2169-2177.
- [20] Lipinski MM, Zheng B, Lu T, et al. Genome-wide analysis reveals mechanisms modulating autophagy in normal brain aging and in Alzheimer's disease [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(32): 14164-14169.

(收稿: 2019-09-11 在线: 2021-03-19)

责任编辑: 赵芳芳