

SNP-9对 $A\beta_{25-35}$ 导致bEnd.3细胞损伤的作用及其机制

孟悦, 姚思远, 高向东, 陈松*

(中国药科大学生命科学与技术学院 江苏省生物药物成药性研究重点实验室, 南京 211198)

摘要 为了研究来源于丝素蛋白水解物的神经保护活性多肽SNP-9对于阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)中血脑屏障损伤的作用, 使用 $A\beta_{25-35}$ 损伤脑微血管内皮细胞bEnd.3建立AD损伤模型, 并给药干预。通过MTT实验检测SNP-9和 $A\beta_{25-35}$ 对细胞活力的影响; RT-qPCR法检测SNP-9和 $A\beta_{25-35}$ 对细胞紧密连接(tight junctions, TJs)相关的ZO-1、occludin和claudin-5 mRNA水平的影响; Western blot检测SNP-9和 $A\beta_{25-35}$ 对细胞TNF- α 、磷酸化NF- κ B、NF- κ B、I κ B α 和RAGE蛋白水平的影响。实验结果显示, SNP-9给药减少了 $A\beta_{25-35}$ 诱导的bEnd.3细胞损伤, 改善了模型细胞中ZO-1、occludin和claudin-5 mRNA水平的异常情况, 缓解了 $A\beta_{25-35}$ 导致的TNF- α 、磷酸化NF- κ B、I κ B α 和RAGE蛋白水平异常。研究结果表明, SNP-9可能通过影响RAGE/NF- κ B通路, 调控模型细胞炎症因子TNF- α 水平, 改善TJs相关指标异常, 缓解 $A\beta_{25-35}$ 诱导的bEnd.3细胞损伤。

关键词 SNP-9; 阿尔茨海默病; 血脑屏障; bEnd.3; $A\beta_{25-35}$; NF- κ B

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2022)03-0333-07

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20220311

引用本文 孟悦, 姚思远, 高向东, 等. SNP-9对 $A\beta_{25-35}$ 导致bEnd.3细胞损伤的作用及其机制[J]. 中国药科大学学报, 2022, 53(3): 333-339.

Cite this article as: MENG Yue, YAO Siyuan, GAO Xiangdong, et al. Effects and mechanisms of SNP-9 on $A\beta_{25-35}$ -induced damage in bEnd.3 cells[J]. J China Pharm Univ, 2022, 53(3): 333-339.

Effects and mechanisms of SNP-9 on $A\beta_{25-35}$ -induced damage in bEnd.3 cells

MENG Yue, YAO Siyuan, GAO Xiangdong, CHEN Song*

Jiangsu Key Laboratory of Druggability of Biopharmaceuticals, School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Abstract In order to investigate the effects of neuroprotective peptide SNP-9 which is derived from silk fibroin hydrolysate on the injury of the blood-brain barrier in Alzheimer's disease (AD), $A\beta_{25-35}$ was used to damage brain microvascular endothelial cells bEnd.3 to establish AD injury model and drug intervention was performed. MTT assay was used to detect the effects of SNP-9 and $A\beta_{25-35}$ on cell viability. RT-qPCR was used to determine the effects of SNP-9 and $A\beta_{25-35}$ on the mRNA levels of tight junctions (TJs)-related ZO-1, occludin and claudin-5. Western blot was used to detect the effects of SNP-9 and $A\beta_{25-35}$ on the protein levels of TNF- α , phosphorylated NF- κ B, NF- κ B, I κ B α and RAGE. The results showed that SNP-9 reduced bEnd.3 cell damage induced by $A\beta_{25-35}$, and improved the abnormal mRNA levels of ZO-1, occludin and claudin-5 in model cells. It alleviated the abnormal protein levels of TNF- α , phosphorylated NF- κ B, I κ B α and RAGE induced by $A\beta_{25-35}$. These results suggest that SNP-9 may regulate the levels of TNF- α in model cells by influencing RAGE/NF- κ B pathway, and then ameliorate TJs-related abnormalities and alleviate bEnd.3 cell injury induced by $A\beta_{25-35}$.

Key words SNP-9; Alzheimer's disease; blood-brain barrier; bEnd.3; $A\beta_{25-35}$; NF- κ B

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 82073755, No. 82173728, No. 81872850)

收稿日期 2022-01-19 *通信作者 Tel: 025-86185396 E-mail: ChenS@cpu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 82073755; No. 82173728; No. 81872850)

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种常见的神经系统变性疾病,重症AD可能伴随吞咽障碍、肺炎、器官衰竭等并发症,带来巨大的社会和经济负担^[1]。AD是一种多因素、异质性的疾病,其主要病理特征是 β 淀粉样蛋白(β -amyloid protein, A β)沉积和tau磷酸化造成的神经元纤维缠结^[2],近年来,对AD中脑血管功能的研究受到越来越多关注,AD早期可能已出现脑血管功能障碍和血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)损伤^[3-5]。

作为一种选择通透性的屏障, BBB可以防止体循环中的微生物、毒素等有害物质进入脑组织,同时帮助脑组织和血液交换营养物质和气体,对维持脑内环境稳态至关重要^[6-7]。脑内皮细胞之间的紧密连接(tight junctions, TJs)和黏附连接诱导了高跨内皮电阻、低细胞旁路和跨细胞渗透, TJs包括occludin、claudins和ZO_s,黏附连接包括钙黏蛋白、血小板内皮细胞黏附分子和连接黏附分子^[8]。AD患者的神经血管单元具有BBB渗透性增加、脑血管形态和功能异常、脑血流量减少等特点^[9]。A β 可以通过受体介导的主动转运进出BBB,LRP1受体介导A β 从大脑流出到外周,而RAGE受体促进A β 流入大脑,AD病理诱导的高RAGE可以促进A β 在BBB的转运,增加脑内积累^[10]。并且RAGE与A β 相互作用刺激促炎性细胞因子的活化,释放ROS,进一步造成神经元损伤和BBB功能障碍^[11]。炎症因子、RAGE、TJs等成分成为评估AD中BBB损伤的重要指标^[12]。

目前治疗AD的药物主要靶向N-甲基-D-天冬氨酸受体或乙酰胆碱酯酶,例如美金刚、多奈哌齐和加兰他敏等^[13],但它们大多难以治愈AD^[14],防治AD亟需研发新型药物。本课题组前期报道了丝素蛋白水解物(silk fibroin hydrolysate, SFH)具有神经细胞保护活性^[15-16],并从SFH中分离、鉴定及合成了一系列具有神经保护活性的多肽SNPs(silk-derived neuroprotective peptides),其中SNP-9在多种AD模型中均显示了良好的药物疗效,但是其对AD模型中BBB损伤的作用及分子机制仍不明确。

本研究使用A β_{25-35} 损伤bEnd. 3细胞建立AD损伤模型,研究SNP-9对该模型TJs和炎症因子表达的影响,进一步检测bEnd. 3细胞RAGE的表达以及相关的NF- κ B通路的激活情况,从而分析

SNP-9对AD中内皮细胞的影响,为SNP-9对AD中BBB的影响及作用机制提供理论依据。

1 材料

1.1 试剂

胎牛血清、DMEM高糖培养基(美国Gibco公司);MTT、氨苄青霉素、链霉素(中国Biosharp公司);A β_{25-35} (中国吉尔生化有限公司);SNP-9(序列为GSGAGAGSGAGAGSGAGSGGA,南京金斯瑞生物科技有限公司);RIPA细胞裂解液、BCA蛋白浓度检测试剂盒、一抗稀释液、5 \times 蛋白上样缓冲液(中国碧云天生物技术有限公司);RNA纯化试剂盒(北京全式金生物技术有限公司);蛋白预染Marker、蛋白酶和磷酸酶抑制剂(美国Thermo公司);脱脂奶粉(美国Bio-Rad公司);5 \times HiScript II qRT SuperMix II、2 \times ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix、ECL试剂盒(南京诺唯赞生物技术有限公司);PVDF膜(美国Millipore公司);胰蛋白酶、 β -巯基乙醇(美国Sigma公司); β -actin抗体、TNF- α 抗体、RAGE抗体、磷酸化NF- κ B抗体、NF- κ B抗体、I κ B α 抗体(中国Abclonal公司);HRP标记的山羊抗兔IgG(美国Cell Signaling Technology公司);其他试剂均为市售分析纯。

1.2 仪器

二氧化碳细胞培养箱、高速冷冻离心机、全波长酶标仪、PCR仪、QuantStudioTM3 Real-Time PCR仪、NanoDrop 2000C超微量分光光度计(美国Thermo公司);电泳仪、转膜仪(美国Bio-Rad公司);多功能凝胶成像系统(中国Tanon公司);倒置相差显微镜(日本Olympus公司);旋涡混合仪(中国大龙仪器公司)。

1.3 细胞

小鼠脑微血管内皮细胞bEnd. 3细胞来源于美国菌种保存中心(ATCC)。

2 方法

2.1 细胞培养

bEnd. 3细胞使用含10% Gibco血清的DMEM培养,于5% CO₂、37 $^{\circ}$ C的培养箱中培养至汇合度达到70%~80%时进行实验。

2.2 A β_{25-35} 寡聚体的制备

使用分析天平称取A β_{25-35} 6 mg,加入双蒸水

6 mL 涡旋溶解,在超净台中用 0.22 μm 微孔滤膜过滤后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温寡聚 5 d,BCA 法检测 A β_{25-35} 的浓度,于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 存放。

2.3 A β_{25-35} 损伤 bEnd. 3 细胞模型的建立

取 70% ~ 80% 汇合度的 bEnd. 3 细胞,用胰酶消化成细胞悬液,以每毫升 5×10^4 个细胞的密度铺于 96 孔板中。待细胞贴壁后,将不同浓度的 A β_{25-35} (0.003 1, 0.006 3, 0.013, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 $\mu\text{mol/L}$) 与 bEnd. 3 细胞孵育 24 h。MTT 法检测细胞活力:24 h 后每 100 μL 培养基加入 5 mg/mL MTT 溶液 10 μL ,在 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 3 ~ 4 h 后,吸出培养基,每孔加入二甲亚砜 150 μL ,500 r/min 摇板 10 min,用酶标仪检测吸收度,检测波长为 570 nm,参比波长为 630 nm。

2.4 SNP-9 对 A β_{25-35} 损伤 bEnd. 3 细胞的影响

分别在 A β_{25-35} 存在和不存在的条件下,bEnd. 3 细胞与不同浓度 SNP-9 (50, 100, 200, 400 $\mu\text{mol/L}$) 孵育 24 h 后,通过 MTT 法检测细胞活力。

2.5 RT-qPCR 法检测细胞 ZO-1、occludin 和 claudin-5 mRNA 水平

取 70% ~ 80% 汇合度的 bEnd. 3 细胞,以每毫

升 4×10^5 个细胞的密度铺于 6 孔板中,分为空白组、A β_{25-35} 组、A β_{25-35} + SNP-9 组。给药 24 h 后用 RNA 纯化试剂盒提取细胞总 RNA:弃去培养基,加入含有 β -巯基乙醇的裂解液裂解细胞并灭活 RNase,均质化后收集于无 RNase 的离心管中,11 200 r/min 离心 5 min,取上清液加等体积 70% 乙醇沉淀核酸,涡旋混匀并加入离心柱中,使 RNA 与硅胶膜结合;先后加入 DNase 和洗液去除 DNA、蛋白和盐离子污染;将离心柱置于新的无 RNase 的离心管中,加入无 RNase 水 30 ~ 100 μL ,静置 1 min;11 200 r/min 离心 2 min,收集 RNA,NanoDrop 检测 RNA 浓度。

逆转录反应体系:取 $5 \times \text{HiScript II qRT SuperMix II}$ 8 μL ,取 RNA 4 ng,用无 RNase 水补至 40 μL 。逆转录反应条件:55 $^{\circ}\text{C}$ 逆转录 15 min;85 $^{\circ}\text{C}$ 灭活逆转录酶 5 s。RT-qPCR 反应体系:每孔加上游和下游引物各 1.5 μL ,荧光染料 $2 \times \text{ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix}$ 5 μL ,cDNA 2 μL 。RT-qPCR 反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,进行 40 个循环;溶解曲线条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 、15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 、15 s。结果用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法进行定量分析。引物序列见表 1。

Table 1 Primer sequences of RT-qPCR

Gene	Forward primer(5'→3')	Reverse primer(5'→3')
ZO-1	GTGGTACGGTGCCCTGAAAGA	GCTGACAGGTAGGACAGACGAT
Occludin	TGGCAAGCGATCATACCCAGAG	CTGCCTGAAGTCATCCACT
Claudin-5	TGACTGCCTTCCTGGACCACAA	CATACACCTTGCCTGCATGTCC
β -actin	AGCCATGTACCTAGCCATCC	TTTGATGTCACGCACGATTT

2.6 Western blot 法检测细胞中 TNF- α 、磷酸化 NF- κB 、NF- κB 、I $\kappa\text{B}\alpha$ 、RAGE 蛋白的表达水平

在 6 孔板中造模给药 24 h 后,弃去培养基,用 PBS 洗 3 次,每孔加含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液 100 μL 裂解细胞。将裂解液收集到离心管中,置于冰上裂解,每 5 min 涡旋 1 次,共 5 次。4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 20 min,收集上清液,BCA 法检测蛋白浓度。将样品浓度调至相同后制样,加入 $5 \times$ 蛋白上样缓冲液后 95 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴 10 min。在 SDS-PAGE 胶中上样,80 V 恒压电泳。电泳结束后取下 SDS-PAGE 胶,按海绵、滤纸、SDS-PAGE 胶、活化的 PVDF 膜、滤纸、海绵的顺序排列并夹紧,湿法 300 mA 恒流转移模,使用脱脂奶粉封

闭 2 h,TBST 缓冲液洗 3 次,分别孵育 β -actin、TNF- α 、磷酸化 NF- κB 、NF- κB 、I $\kappa\text{B}\alpha$ 、RAGE 兔源一抗过夜。次日用 TBST 缓冲液洗 5 次,孵育 HRP 标记的山羊抗兔二抗 2 h,TBST 缓冲液洗 5 次后加 ECL 发光液曝光。

2.7 统计分析

实验结果采用 GraphPad Prism 8.0 软件分析处理,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 One-way ANOVA 检验各组间的显著差异, $P < 0.05$ 代表具有统计学差异。

3 结果

3.1 A β_{25-35} 损伤 bEnd. 3 细胞模型的建立

用含 1% Gibco 血清的 DMEM 将 A β_{25-35} 稀释成

一定浓度梯度(0.003 1, 0.006 3, 0.013, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 $\mu\text{mol/L}$)的溶液, 孵育细胞 24 h 后 MTT 实验检测细胞活力。结果如图 1 所示, $\text{A}\beta_{25-35}$ 处理导致 bEnd. 3 细胞的活力降低, 且具有浓度依赖性, 后续选择 0.05 $\mu\text{mol/L}$ 做为实验的损伤浓度。

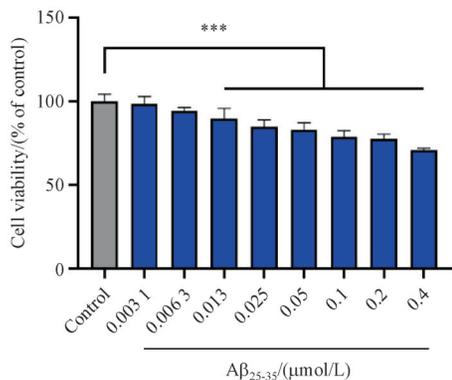


Figure 1 Effects of different concentrations of $\text{A}\beta_{25-35}$ on bEnd. 3 cell viability ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

*** $P < 0.001$

3.2 SNP-9对bEnd. 3细胞活力的影响

用含1%胎牛血清的DMEM将SNP-9稀释成一定浓度梯度(50, 100, 200, 400 $\mu\text{mol/L}$)的溶液, 孵育细胞 24 h 后 MTT 实验检测细胞活力。结果如图 2 所示, 单独加入不同浓度 SNP-9 对 bEnd. 3 细胞的活力没有显著影响。

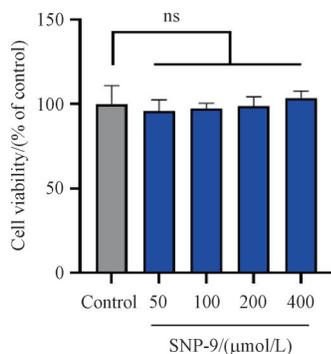


Figure 2 Effects of different concentrations of SNP-9 on bEnd. 3 cell viability ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

ns: No significance

3.3 SNP-9对 $\text{A}\beta_{25-35}$ 损伤bEnd. 3细胞模型的影响

SNP-9 (50, 100, 200, 400 $\mu\text{mol/L}$) 与 0.05 $\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{25-35}$ 溶液共孵育 bEnd. 3 细胞, 24 h 后 MTT 法检测细胞活力。结果如图 3 所示, 100, 200,

400 $\mu\text{mol/L}$ SNP-9 溶液均在一定程度上缓解了 0.05 $\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{25-35}$ 溶液造成的细胞活力下降, 证明了 SNP-9 具有抵抗 $\text{A}\beta_{25-35}$ 对 bEnd. 3 细胞损伤的作用, 其中 200 $\mu\text{mol/L}$ SNP-9 溶液可显著缓解 $\text{A}\beta_{25-35}$ 造成的细胞损伤, 且单独孵育 200 $\mu\text{mol/L}$ SNP-9 对细胞活力无显著影响, 因此本研究选择 200 $\mu\text{mol/L}$ 作为后续实验的浓度。

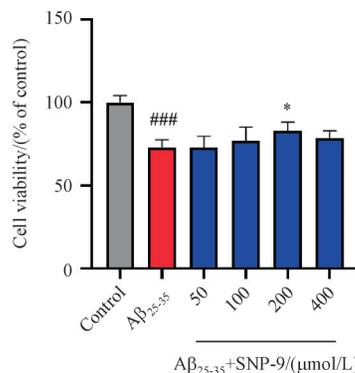


Figure 3 Effects of $\text{A}\beta_{25-35}$ and different concentrations of SNP-9 on bEnd. 3 cell viability ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

$P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ vs $\text{A}\beta_{25-35}$ group

3.4 SNP-9及 $\text{A}\beta_{25-35}$ 对bEnd. 3细胞ZO-1、occludin和claudin-5 mRNA水平的影响

实验分为3组:空白组, 0.05 $\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{25-35}$ 组以及 0.05 $\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{25-35}$ + 200 $\mu\text{mol/L}$ SNP-9 组。孵育 bEnd. 3 细胞 24 h 后提取细胞总 RNA, 逆转录成 cDNA 并通过 RT-qPCR 法检测 3 种 TJs: ZO-1、occludin 和 claudin-5 mRNA 水平。结果如图 4 所示, $\text{A}\beta_{25-35}$ 降低了 3 种 TJs 的 mRNA 水平, 而 SNP-9 缓解了 $\text{A}\beta_{25-35}$ 造成的 mRNA 水平异常, 证明了 SNP-9 可以缓解 $\text{A}\beta_{25-35}$ 损伤 bEnd. 3 细胞 TJs 水平的减少。

3.5 SNP-9及 $\text{A}\beta_{25-35}$ 对bEnd. 3细胞TNF- α 蛋白水平的影响

实验分为3组:空白组, 0.05 $\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{25-35}$ 组以及 0.05 $\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{25-35}$ + 200 $\mu\text{mol/L}$ SNP-9 组。孵育 bEnd. 3 细胞 24 h 后提取细胞总蛋白, Western blot 法检测细胞 TNF- α 蛋白的水平。结果如图 5 所示, SNP-9 可以减少由 $\text{A}\beta_{25-35}$ 造成的 TNF- α 水平异常升高, 证明了 SNP-9 可在一定程度上缓解 $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导的炎症, 其可能通过缓解炎症进而发挥保护内皮细胞及 BBB 的作用。

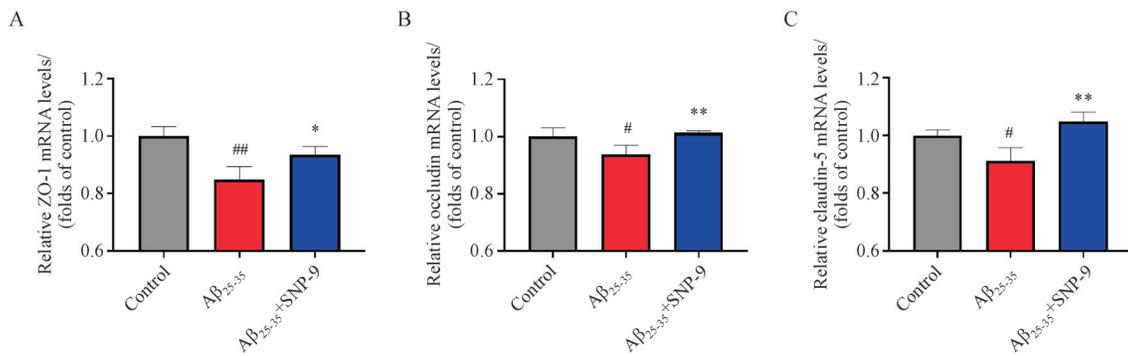


Figure 4 Effects of SNP-9 and Aβ₂₅₋₃₅ on the mRNA levels of ZO-1, occludin and claudin-5 in bEnd.3 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

A: Detection of relative mRNA levels of ZO-1 by RT-qPCR; B: Detection of relative mRNA levels of occludin by RT-qPCR; C: Detection of relative mRNA levels of claudin-5 by RT-qPCR

P* < 0.05, ##*P* < 0.01 vs control group; **P* < 0.05, *P* < 0.01 vs Aβ₂₅₋₃₅ group

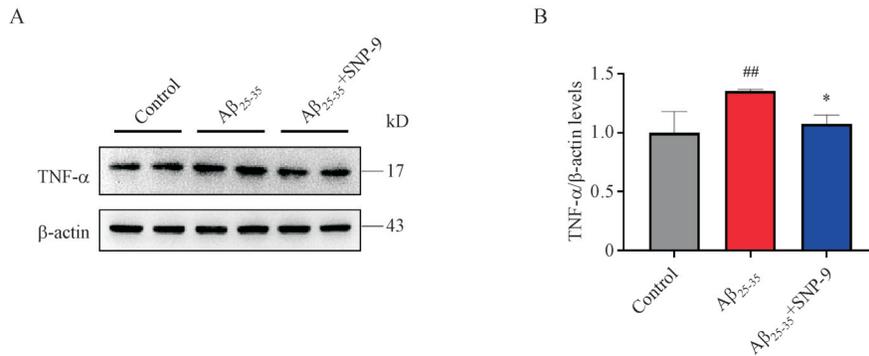


Figure 5 Effects of SNP-9 and Aβ₂₅₋₃₅ on the protein levels of TNF-α in bEnd.3 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

A: Detection of protein levels of TNF-α by Western blot; B: Quantitative analysis of protein levels of TNF-α

##*P* < 0.01 vs control group; **P* < 0.05 vs Aβ₂₅₋₃₅ group

3.6 SNP-9及Aβ₂₅₋₃₅对bEnd.3细胞磷酸化NF-κB、NF-κB、IκBα蛋白水平的影响

实验分为3组:空白组、0.05 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅组以及0.05 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅+200 μmol/L SNP-9组。孵育bEnd.3细胞24 h后提取细胞总蛋白,Western

blot法检测细胞磷酸化NF-κB、NF-κB、IκBα蛋白的水平。结果如图6所示,SNP-9可以缓解Aβ₂₅₋₃₅造成的NF-κB磷酸化升高和IκBα蛋白水平的异常降低,证明了SNP-9具有缓解Aβ₂₅₋₃₅诱导的IκBα降解以及NF-κB异常激活的作用。

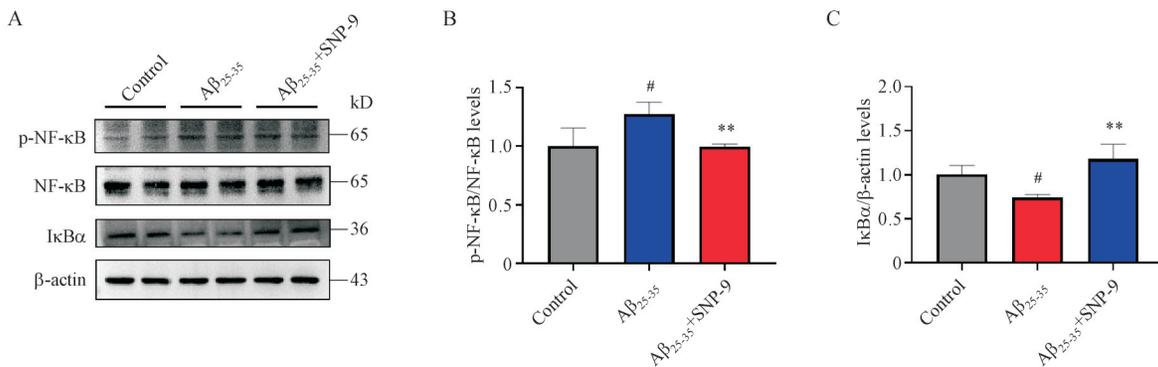


Figure 6 Effects of SNP-9 and Aβ₂₅₋₃₅ on the protein levels of p-NF-κB, NF-κB and IκBα in bEnd.3 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

A: Detection of protein levels of p-NF-κB, NF-κB and IκBα by Western blot; B: Quantitative analysis of protein levels of p-NF-κB/NF-κB; C: Quantitative analysis of protein levels of IκBα

P* < 0.05 vs control group; *P* < 0.01 vs Aβ₂₅₋₃₅ group

3.7 SNP-9及A β_{25-35} 对bEnd. 3细胞RAGE蛋白水平的影响

实验分为3组:空白组、0.05 $\mu\text{mol/L}$ A β_{25-35} 组以及0.05 $\mu\text{mol/L}$ A β_{25-35} + 200 $\mu\text{mol/L}$ SNP-9组。孵育bEnd. 3细胞24 h后提取细胞总蛋白, Western

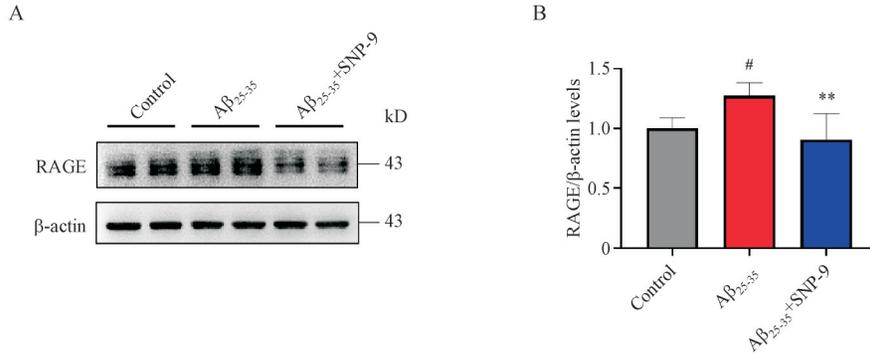


Figure 7 Effects of SNP-9 and A β_{25-35} on the protein levels of RAGE in bEnd. 3 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

A: Detection of protein levels of RAGE by Western blot; B: Quantitative analysis of protein levels of RAGE

* $P < 0.05$ vs control group; ** $P < 0.01$ vs A β_{25-35} group

4 讨论

TJs是BBB的重要组成部分,其中claudins和occludin是含有4个跨膜结构域的跨膜蛋白,ZOs结合claudins和occludin细胞内结构域的PDZ基序,并与肌动蛋白细胞骨架相连,保证TJs的结构完整性^[17]。在AD患者脑内,存在claudins和occludin的减少,并与不溶性A β 沉积有显著相关性^[18],这证明了TJs损伤在AD诱导的BBB损伤中发挥重要作用。本研究中SNP-9缓解了A β_{25-35} 导致的内皮细胞TJs损伤,说明其具有在AD中保护BBB的作用。IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等多种炎症因子可以诱导BBB的破坏和TJs下调或变性^[19]。其中,TNF- α 是最重要的促炎因子之一,可以由内皮细胞释放,并通过结合内皮细胞上的TNF- α 受体损伤BBB^[20]。炎症损伤可以诱导TJs mRNA水平下调^[21-22],TNF- α 还可以下调claudin-5的启动子活性^[23]。本研究中SNP-9可能通过缓解A β 诱导的TNF- α 水平异常,从而阻止TNF- α 导致的TJs下调。TNF家族的细胞因子可以通过NIK和TAK1激活NF- κ B^[24],NF- κ B也可以诱导TNF- α 的转录^[25]。NF- κ B作为一种快速诱导的转录因子,在调节炎症、凋亡、氧化应激等多种生理反应中发挥重要作用^[26]。经典NF- κ B复合物由p65和p50组成,未激活时与抑制蛋白I κ B α 结合。NF- κ B的激活受IKK

blot法检测细胞RAGE蛋白的水平。结果如图7所示,SNP-9可以缓解A β_{25-35} 造成的RAGE蛋白水平异常升高,说明SNP-9可能通过降低A β_{25-35} 损伤bEnd. 3细胞中RAGE水平进而发挥保护作用。

复合物调节,IKK可以磷酸化I κ B α ,诱导其泛素化降解,从而释放NF- κ B,诱导下游基因的转录^[27-28]。RAGE可以通过与A β 结合,激活NF- κ B通路,诱导炎症^[29],最终造成TJs破坏。本研究中SNP-9可能通过调控RAGE,缓解NF- κ B异常激活,减少炎症因子TNF- α 表达。

本研究分析了SNP-9对A β_{25-35} 损伤bEnd. 3细胞的作用及其机制,SNP-9可能通过影响RAGE/NF- κ B信号通路,降低炎症因子TNF- α 的表达水平,缓解A β 导致的TJs异常,进而在一定程度上改善A β 诱导的BBB损伤。本研究为SNP-9治疗AD及AD中BBB损伤的研究提供了实验依据,为SNP-9的应用提供了理论依据。

References

- [1] 2021 Alzheimer's disease facts and figures [J]. *Alzheimers Dement*, 2021, **17**(3):327-406.
- [2] Jeong S. Molecular and cellular basis of neurodegeneration in Alzheimer's disease[J]. *Mol Cells*, 2017, **40**(9):613-620.
- [3] Sweeney MD, Montagne A, Sagare AP, et al. Vascular dysfunction — The disregarded partner of Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Dement*, 2019, **15**(1):158-167.
- [4] Elahi FM, Casaletto KB, la Joie R, et al. Plasma biomarkers of astrocytic and neuronal dysfunction in early- and late-onset Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Dement*, 2020, **16**(4):681-695.

- [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**(2):270-276.
- [6] Serlin Y, Shelef I, Knyazer B, et al. Anatomy and physiology of the blood-brain barrier[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, **38**:2-6.
- [7] Cai ZY, Qiao PF, Wan CQ, et al. Role of blood-brain barrier in Alzheimer's disease[J]. *J Alzheimers Dis*, 2018, **63**(4):1223-1234.
- [8] Sweeney MD, Sagare AP, Zlokovic BV. Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders[J]. *Nat Rev Neurol*, 2018, **14**(3):133-150.
- [9] Iadecola C. The neurovascular unit coming of age: a journey through neurovascular coupling in health and disease [J]. *Neuron*, 2017, **96**(1):17-42.
- [10] Zenaro E, Piacentino G, Constantin G. The blood-brain barrier in Alzheimer's disease[J]. *Neurobiol Dis*, 2017, **107**:41-56.
- [11] Erdő F, Denes L, de Lange E. Age-associated physiological and pathological changes at the blood-brain barrier: a review [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2017, **37**(1):4-24.
- [12] Song J, Choi SM, Whitcomb DJ, et al. Adiponectin controls the apoptosis and the expression of tight junction proteins in brain endothelial cells through AdipoR1 under beta amyloid toxicity [J]. *Cell Death Dis*, 2017, **8**(10):e3102.
- [13] Mangialasche F, Solomon A, Winblad B, et al. Alzheimer's disease: clinical trials and drug development [J]. *Lancet Neurol*, 2010, **9**(7):702-716.
- [14] Breijyeh Z, Karaman R. Comprehensive review on Alzheimer's disease: causes and treatment [J]. *Molecules*, 2020, **25**(24):5789.
- [15] Xu Z, Chen S, Wang Y, et al. Neuroprotective effects of silk fibroin hydrolysate against A β_{25-35} induced cytotoxicity in SH-SY₅Y cells and primary hippocampal neurons by regulating ROS inactivation of PP2A [J]. *J Funct Foods*, 2018, **45**:100-109.
- [16] Yao SY, Xu Z, Chen S, et al. Silk fibroin hydrolysate improves memory impairment via multi-target function [J]. *J Funct Foods*, 2022, **89**:104942.
- [17] Greene C, Hanley N, Campbell M. Claudin-5: gatekeeper of neurological function[J]. *Fluids Barriers CNS*, 2019, **16**(1):3.
- [18] Yamazaki Y, Shinohara M, Shinohara M, et al. Selective loss of cortical endothelial tight junction proteins during Alzheimer's disease progression[J]. *Brain*, 2019, **142**(4):1077-1092.
- [19] Huang XW, Hussain B, Chang JL. Peripheral inflammation and blood-brain barrier disruption: effects and mechanisms [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2021, **27**(1):36-47.
- [20] Voirin AC, Perek N, Roche F. Inflammatory stress induced by a combination of cytokines (IL-6, IL-17, TNF- α) leads to a loss of integrity on bEnd.3 endothelial cells *in vitro* BBB model [J]. *Brain Res*, 2020, **1730**:146647.
- [21] Feng S, Zou L, Wang HJ, et al. RhoA/ROCK-2 pathway inhibition and tight junction protein upregulation by catalpol suppresses lipopolysaccharide-induced disruption of blood-brain barrier permeability [J]. *Molecules*, 2018, **23**(9):2371.
- [22] Wang L, Zhang R, Chen J, et al. Baicalin protects against TNF- α -induced injury by down-regulating miR-191a that targets the tight junction protein ZO-1 in IEC-6 cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2017, **40**(4):435-443.
- [23] Burek M, Förster CY. Cloning and characterization of the murine claudin-5 promoter [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2009, **298**(1/2):19-24.
- [24] Hayden MS, Ghosh S. Regulation of NF- κ B by TNF family cytokines [J]. *Semin Immunol*, 2014, **26**(3):253-266.
- [25] Caldwell AB, Cheng Z, Vargas JD, et al. Network dynamics determine the autocrine and paracrine signaling functions of TNF [J]. *Genes Dev*, 2014, **28**(19):2120-2133.
- [26] Zhang Q, Lenardo MJ, Baltimore D. 30 years of NF- κ B: a blossoming of relevance to human pathobiology [J]. *Cell*, 2017, **168**(1/2):37-57.
- [27] McNamara AJ, Danthi P. Loss of IKK subunits limits NF- κ B signaling in reovirus-infected cells [J]. *J Virol*, 2020, **94**(10):e00382-e00320.
- [28] Chen YJ, Chan DC, Chiang CK, et al. Advanced glycation end-products induced VEGF production and inflammatory responses in human synoviocytes via RAGE-NF- κ B pathway activation [J]. *J Orthop Res*, 2016, **34**(5):791-800.
- [29] Ding B, Lin CH, Liu Q, et al. Tanshinone IIA attenuates neuroinflammation via inhibiting RAGE/NF- κ B signaling pathway *in vivo* and *in vitro* [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, **17**(1):302.