

# APOE-TREM2 介导的蛇床子素对阿尔兹海默病体外细胞模型的抗炎机制研究

姚丽伟, 刘梦, 陈淑云, 秦钰云, 王紫琪, 赵威(广州中医药大学科技创新中心, 广东 广州 510405)

**摘要:** **目的** 探究载脂蛋白 E(APOE)-髓细胞触发受体 2(TREM2)信号通路介导的蛇床子素(Osthole)对阿尔兹海默病体外细胞模型的抗炎作用机制。**方法** 将小鼠小胶质细胞(BV2 细胞)分为:空白组、溶剂组(0.1% DMSO)、模型组( $A\beta_{1-42}$ ,  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、阳性药组(地塞米松,  $2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )及蛇床子素高、中、低剂量组( $25$ 、 $5$ 、 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。给药组分别给予药物预保护 4 h 后,再给予  $A\beta_{1-42}$  诱导损伤 24 h,建立阿尔兹海默病 BV2 细胞模型。采用 CCK-8 法检测细胞存活率;ELISA 法检测细胞炎症因子白细胞介素(IL)1 $\beta$ 、肿瘤坏死因子(TNF) $\alpha$ 的表达;免疫荧光法检测细胞促炎表型 M1 型标志物 CD16/32 的表达;倒置显微镜观察 BV2 细胞培养上清对 SH-SY5Y 细胞形态的影响;流式细胞术检测 BV2 细胞培养上清对 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响;采用 Western Blot、qPCR 法检测细胞中 APOE、TREM2 蛋白及基因的表达情况。**结果** 与空白组比较,模型组 BV2 细胞存活率明显降低( $P<0.001$ ),TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  分泌量明显增加( $P<0.001$ ),CD16/32 荧光明显增强,SH-SY5Y 细胞损伤明显,SH-SY5Y 细胞凋亡率明显升高( $P<0.001$ ),APOE、TREM2 蛋白及 mRNA 表达显著上调( $P<0.01$ ,  $P<0.001$ )。与模型组相比,蛇床子素组的 BV2 细胞存活率明显升高( $P<0.01$ ,  $P<0.001$ ),TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  分泌量明显减少( $P<0.01$ ,  $P<0.001$ ),CD16/32 荧光明显减弱,SH-SY5Y 细胞形态有所改善且凋亡率明显降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ,  $P<0.001$ ),APOE、TREM2 蛋白及基因表达明显下调( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ,  $P<0.001$ )。**结论** 蛇床子素对  $A\beta_{1-42}$  诱导的 BV2 细胞的炎症反应有较好的治疗作用,其机制可能与下调 APOE、TREM2 蛋白及基因表达有关。

**关键词:** 阿尔兹海默病;神经炎症;BV2 细胞;蛇床子素;APOE-TREM2 信号通路

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)11-1607-08

**doi:** 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.11.003

## Study on Anti-inflammatory Mechanism of Osthole on *in vitro* Cell Model of Alzheimer's Disease through APOE-TREM2

YAO Liwei, LIU Meng, CHEN Shuyun, QIN Yuyun, WANG Ziqi, ZHAO Wei (Science and Technology Innovation Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the anti-inflammatory mechanism of osthole (OST) on *in vitro* cell model of Alzheimer's disease through APOE (apolipoprotein E, APOE)-TREM2 (recombinant triggering receptor expressed on myeloid cells 2, TREM2). **Methods** Mouse microglia (BV2 cells) were divided into blank group, solvent group (0.1% DMSO), model group ( $A\beta_{1-42}$ ,  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), positive drug group (dexamethasone group,  $2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), OST high, medium, and low dose groups ( $25$ ,  $5$ ,  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). OST high, medium and low dose groups and positive drug groups were given pre-protection for 4 hours and then given  $\beta$ -amyloid protein 1-42 ( $A\beta_{1-42}$ ) 24 hours to damage mouse microglia for establishing Alzheimer's disease (AD) cell model in BV2 cells. CCK-8 method was used to detect the cell survival rate of each group; the ELISA kit was used to detect the expression of inflammatory

收稿日期: 2021-01-27

作者简介: 姚丽伟, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药药效与安全性评价机制研究。Email: yaoliwei1996@163.com。通信作者: 赵威, 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 中药药效与安全性评价机制研究。Email: athena\_zw@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81973919); 广东省普通高校重点实验室项目(2019KSYS005); 广州市科技创新委员会重点实验室项目(201805010005)。

factors interleukin (IL)-1 $\beta$  and tumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$  in the supernatant of cell culture medium of each group; immunofluorescence method was applied to detect the expression of CD16/32, marker of the M1 type proinflammatory phenotype in cells. Inverted microscope was used to observe the influence of BV2 cell culture supernatant on the morphology of SH-SY5Y cells, and the influence of BV2 cell culture supernatant on apoptosis of SH-SY5Y was detected by flow cytometry. Western Blot and qPCR were used to detect the protein and gene expression of APOE and TREM2 in cells. **Results** Compared with the blank group and the solvent group, the survival rate of BV2 cells in the model group was significantly reduced ( $P<0.001$ ), the secretion of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  was significantly increased ( $P<0.001$ ), the fluorescence of CD16/32 was significantly enhanced, and the damage and apoptosis of SH-SY5Y cells was obvious ( $P<0.001$ ). The protein expression and gene mRNA levels of APOE and TREM2 were significantly increased ( $P<0.01$ ,  $P<0.001$ ). Compared with the model group, the cell survival rates of the OST groups were significantly increased ( $P<0.01$ ,  $P<0.001$ ), TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  secretion was significantly reduced ( $P<0.01$ ,  $P<0.001$ ), CD16/32 fluorescence was significantly weakened, SH-SY5Y cell status improved, and total apoptotic rates of cells decreased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ,  $P<0.001$ ), the expression of APOE, TREM2 protein and gene levels were significantly reduced ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ,  $P<0.001$ ). **Conclusion** Osthole has a good therapeutic effect on the inflammatory response of BV2 cells induced by A $\beta_{1-42}$ . The mechanism may be related to the reduction of APOE and TREM2 protein and gene levels.

**Keywords:** Alzheimer's disease; neuroinflammation; BV2 cells; osthole; APOE-TREM2 signaling pathway

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种常见的中枢神经系统退行性疾病,其主要病理表现为中枢胆碱能神经元大量死亡及丢失,神经炎斑、 $\beta$ -淀粉样蛋白(Amyloid beta, A $\beta$ )沉积等,神经炎症在AD发病中起着重要作用。蛇床子为伞形科植物蛇床 *Cnidium monnieri*(L.)Cuss. 的干燥成熟果实。蛇床子素(Osthole, OST)是蛇床子的主要生物活性成分之一,具有解痉、降血压、抗心律失常、增强免疫功能及广谱抗菌等作用。近年来研究<sup>[1]</sup>发现,蛇床子素具有显著的抗炎作用,蛇床子素预处理后的小胶质细胞炎症因子释放量明显降低,并且能抑制下游炎症相关蛋白的表达。研究<sup>[2-6]</sup>表明,载脂蛋白E(Apolipoprotein E, APOE)-髓细胞触发受体2(Recombinant triggering receptor expressed on myeloid cells 2, TREM2)通路与神经炎症的发生密切相关。故本研究拟建立阿尔兹海默病体外细胞模型,探索蛇床子素对其APOE-TREM2通路及下游炎症因子的调控机制,以期为其治疗神经退行性疾病提供新的思路。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞** 小鼠小胶质细胞BV2、人神经母细胞瘤细胞SH-SY5Y,均购自武汉大学细胞典藏中心。

**1.2 药品及试剂** 蛇床子素(纯度 $\geq 98\%$ ),购自成

都德思特生物技术有限公司,批号:DST190218-055;用DMSO稀释至50 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup>,分装,-20℃避光保存。地塞米松,购自美国TargetMolecule公司,批号:50-02-2;用DMSO稀释至10  $\mu$ mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>,分装,-20℃保存。上述药品使用前分别用不含双抗的完全培养基稀释至所需浓度。

DMEM高糖培养基(批号:8118290)、胎牛血清(FBS,批号:42F3361K)、无EDTA胰酶(批号:15050065),均购自美国Gibco公司;DMSO,美国MpBiomedicals公司,批号:Q5291;A $\beta_{1-42}$ ,广州左克生物科技发展有限公司,批号:P160504-TL180231;六氟异丙醇(HFIP),山东西亚化学工业有限公司,货号:A13544;TRIzol试剂,美国Thermo Fisher科技公司,批号:15596-026;CCK-8试剂盒,北京全式金生物科技有限公司,批号:L31226;白细胞介素(IL)1 $\beta$  ELISA试剂盒(批号:1161543430)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) ELISA试剂盒(批号:2411547430)、抗荧光衰减封片剂(批号:AR1109),均购自武汉博士德生物工程有限公司;CD16+CD32荧光一抗(批号:GR3240168-3)、Anti-rat IgG(H+L)荧光二抗(批号:4417S)、DAPI(批号:8961S)、APOE一抗(批号:GR262627-16),均购自英国Abcam公司;TREM2一抗(批号:76765S)、 $\beta$ -tubulin一抗(批号:2146S),均购自美国CST公

司; BCA 蛋白定量试剂盒(批号: 80F001100)、山羊抗兔 IgG(批号: 130223)、山羊抗鼠 IgG(批号: 130129)、DEPC 水(批号: TER011), 均购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司; ECL 发光液, 美国 Affinity 公司, 货号: KF001; Go Script™ Reverse Transcription Mix, Oligo(dT) 逆转录试剂盒(批号: 0000280839), Go Taq® qPCR Master Mix 扩增试剂盒(批号: 0000273783), 均购自美国 Promega 公司。

**1.3 仪器** SW-CJ-2F 型超净工作台, 苏州净化设备有限公司; Thermo Forma4111 型水套式 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱、Multiskan FC 型酶标仪, 美国 Thermo Fisher 科技公司; DMI8 型倒置荧光显微镜, 德国 Leica 公司; HC-3618R 型高速冷冻离心机, 安徽中科中佳科技仪器有限公司; PowerPac HC 型电泳仪、Universal Hood II 型化学发光仪, 美国 Bio-Rad 公司; 7500 型荧光定量 PCR 仪, 美国 ABI 公司; SMA4000 型微量核酸定量仪, 美国 Merinton 公司。

**1.4 Aβ<sub>1-42</sub> 寡聚体的制备** 以 2.22 mL 六氟异丙醇充分溶解 10 mg Aβ<sub>1-42</sub> 冻干粉, 室温下静置 1 h, 通风橱内挥干, 得无色透明 Aβ 肽膜; 使用前取 1 支分装管, 加入 10 μL DMSO, 超声溶解后加 1 090 μL 的 DMEM, 于 4 °C 下放置 24 h, 即得终浓度为 100 μmol·L<sup>-1</sup> 的 Aβ<sub>1-42</sub> 寡聚体。

**1.5 细胞培养** BV2 细胞采用高糖 DMEM 培养基+10% FBS+1% 双抗, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 无需胰酶消化; SH-SY5Y 细胞用 0.25%-EDTA 胰蛋白酶消化 1 min 后, 加等量的完全培养基终止消化, 待细胞铺满至 80%~90% 时传代。

**1.6 细胞分组及处理** 将细胞分为空白组、溶剂组、模型组、阳性药组(地塞米松, 2.5 μmol·L<sup>-1</sup>)及蛇床子素高、中、低剂量组(25、5、1 μmol·L<sup>-1</sup>)。空白组和模型组给予不含双抗的完全培养基, 溶剂组给予含 0.1% DMSO 的无双抗完全培养基。除空白组和溶剂组外, 其余各组分别给药预保护 4 h 后, 再加入 10 μmol·L<sup>-1</sup> Aβ<sub>1-42</sub> 损伤细胞 24 h。

**1.7 CCK-8 法检测细胞存活率** 将对数生长期的 BV2 细胞按照每孔 8×10<sup>3</sup> 个接种于 96 孔板, 每组设 3 个复孔; 按照“1.6”项下干预处理后, 每孔加入 10 μL CCK-8, 于 450 nm 波长处测定吸光度, 计算细胞存活率。实验重复 3 次。

**1.8 ELISA 法检测细胞炎症因子水平** 将对数生长期的 BV2 细胞按照每孔 2.4×10<sup>5</sup> 个接种于 6 孔板; 按照“1.6”项下干预处理后, 收集细胞上清液, 按照

ELISA 试剂盒说明书步骤操作, 检测、计算每组细胞 IL-1β、TNF-α 含量。实验重复 3 次。

**1.9 免疫荧光法检测 CD16/32 表达** 将对数生长期的 BV2 细胞按照每孔 3×10<sup>4</sup> 个接种于预先放置盖玻片的 24 孔板; 按照“1.6”项下干预处理后, 以 4% 多聚甲醛固定, 0.25% TritonX-100 打孔; 4% BSA 37 °C 下封闭 1 h, 洗涤, 加一抗 4 °C 下孵育过夜, 洗涤; 加荧光二抗室温下避光孵育 1 h, 洗涤; DAPI 染核, 抗荧光淬灭剂封片后在荧光显微镜下(×400)观察。

**1.10 SH-SY5Y 细胞形态观察** 将 BV2 细胞接种于 6 孔板, 按照“1.6”项下干预处理后, 收集各组上清液。将 SH-SY5Y 细胞接种于 6 孔板, 贴壁后加入各组 BV2 细胞培养上清, 48 h 后于倒置显微镜下观察各组 SH-SY5Y 细胞形态。

**1.11 SH-SY5Y 细胞凋亡检测** BV2 细胞种于 6 孔板, 按“1.10”项下方法, 采用 BV2 细胞上清液对 SH-SY5Y 细胞进行干预; 48 h 后吸出细胞培养基, PBS 清洗, 再用不含 EDTA 的胰酶消化后收集细胞; PBS 洗 2 遍, 加入 500 μL Buffer 吹打混匀; 加 5 μL 的 Annexin-FITC 和 5 μL 的 PI, 避光, 转移至流式管, 采用流式细胞仪检测 SH-SY5Y 细胞凋亡。实验重复 3 次。

**1.12 Western Blot 法检测 BV2 细胞 APOE、TREM2 蛋白的表达** 将 BV2 细胞按照“1.6”项下干预处理后, 加入预冷的 RIPA 裂解液充分裂解, 4 °C 下以 13 523×g 离心 30 min, 取上清, 采用 BCA 法蛋白定量。取等量蛋白, 经 SDS-PAGE 凝胶电泳后, 电转至 PVDF 膜上, 使用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 洗涤; 加入一抗[APOE(1:1 000)、TREM2(1:1 000)], 4 °C 下摇床孵育过夜, 洗涤; 加入二抗(1:3 000), 室温下孵育 2 h, 洗涤; 采用 ECL 化学发光。以 ImageJ 软件分析目的蛋白和内参蛋白(β-tubulin)条带的灰度值, 用目的蛋白的灰度值除以内参蛋白的灰度值以校正误差, 分析结果代表样品目的蛋白相对含量。实验重复 3 次。

**1.13 qPCR 法检测 BV2 细胞 APOE、TREM2 mRNA 的表达** 根据 GeneBank 提供的基因序列设计特异性引物, 各基因引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计、合成, 引物序列见表 1。将 BV2 细胞按照“1.6”项下干预处理后, 加入 TRIzol 反复振摇, 室温下静置 5 min; 加入氯仿用力振摇后静置, 4 °C 下以 13 523×g 离心 15 min; 取上层水相加

入异丙醇, 室温下静置 10 min, 4 ℃ 下以  $13\,523\times g$  离心 10 min; 弃上清, 75% 乙醇洗涤 2 次, 所得 RNA 在通风橱挥干, 加入 DEPC 水后检测总 RNA 浓度。采用 GoScript Reverse Transcription Mix, Oligo 进行逆转录。qPCR 反应体系: cDNA 模板 2  $\mu\text{L}$ , 上游引物、下游引物各 0.4  $\mu\text{L}$ , GoTaq qPCR Master Mix 10  $\mu\text{L}$ , 无酶核酸水 7.2  $\mu\text{L}$ , 总体积 20  $\mu\text{L}$ 。于 7500 型荧光定量 PCR 仪上机进行扩增反应, 反应条件: 95 ℃ 2 min; 95 ℃ 15 s、60 ℃ 1 min 读板, 40 个循环。记录各组样品 Ct 值, 以 GAPDH 为内参, 采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算目的 mRNA 相对表达量。实验重复 3 次。

表 1 qPCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for qPCR

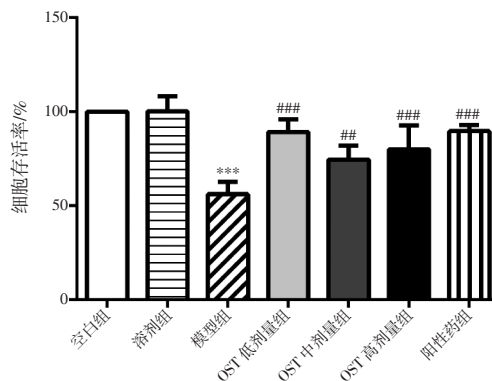
| 基因    | 引物序列                                           | 产物长度/bp |
|-------|------------------------------------------------|---------|
| APOE  | Forward primer: 5'-GACCCAGCAAATACGCCTG-3'      | 19      |
|       | Reverse primer: 5'-CATGTCTTCCACTATTGGCTCG-3'   | 22      |
| TREM2 | Forward primer: 5'-CTGGAACCGTCACCATCACTC-3'    | 21      |
|       | Reverse primer: 5'-CGAAACTCGATGACTCCTCGG-3'    | 21      |
| GAPDH | Forward primer: 5'-AGGTCGGGTGTGAACGGATTTC-3'   | 21      |
|       | Reverse primer: 5'-TGTAAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3' | 23      |

**1.14 统计学处理方法** 采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析; 计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示; 多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 两两比较采用 LSD 检验; 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 蛇床子素对  $A\beta_{1-42}$  损伤的 BV2 细胞存活率的影响** 结果见图 1, 与空白组比较, 模型组在  $A\beta_{1-42}$  损伤 24 h 后细胞存活率明显降低 ( $P < 0.001$ ), 溶剂组无明显差别 ( $P > 0.05$ )。与模型组比较, 各给药组的细胞存活率明显提高 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )。结果表明,  $A\beta_{1-42}$  对 BV2 细胞有明显损伤作用, 而蛇床子素可以明显提高  $A\beta_{1-42}$  损伤后 BV2 细胞的活力。

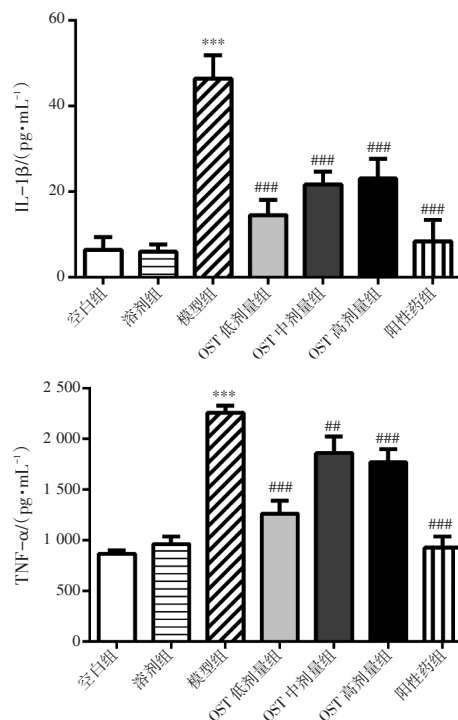
**2.2 蛇床子素对  $A\beta_{1-42}$  损伤的 BV2 细胞炎症因子分泌的影响** 结果见图 2。与空白组比较, 模型组细胞的炎症因子 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  分泌量显著增加 ( $P < 0.001$ ), 溶剂组无明显差别 ( $P > 0.05$ ); 与模型组比较, 各给药组细胞的 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  分泌量明显减少 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )。结果表明, 蛇床子素可显著降低  $A\beta_{1-42}$  诱导损伤后 BV2 细胞的 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  分泌水平。



注: 与空白组比较, \*\*\*  $P < 0.001$ ; 与模型组比较, \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$

图 1 蛇床子素 (OST) 对  $A\beta_{1-42}$  损伤的 BV2 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Figure 1 Effect of osthole on the cell viability of BV2 cells damaged by  $A\beta_{1-42}$  ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )



注: 与空白组比较, \*\*\*  $P < 0.001$ ; 与模型组比较, \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$

图 2 蛇床子素 (OST) 对  $A\beta_{1-42}$  损伤的 BV2 细胞 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  分泌水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Figure 2 Effect of osthole on IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  secretion of BV2 cells damaged by  $A\beta_{1-42}$  ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

**2.3 蛇床子素对  $A\beta_{1-42}$  损伤的 BV2 细胞 M1 型标志物 CD16/32 表达的影响** 为了评价 BV2 小胶质细胞的炎症反应, 采用 CD16/32 对 BV2 细胞进行免疫染色。结果见图 3。与空白组比较,  $A\beta_{1-42}$  诱导损伤后, 模型组 BV2 细胞表面的 CD16/32 表达明显增

强；与模型组比较，各给药组 BV2 细胞表面的 CD16/32 表达明显减弱。结果表明， $A\beta_{1-42}$  能促进 BV2 细胞炎症表型即 M1 型标志蛋白 CD16/32 表达的上调，而地塞米松及蛇床子素预处理能够抑制该变化。

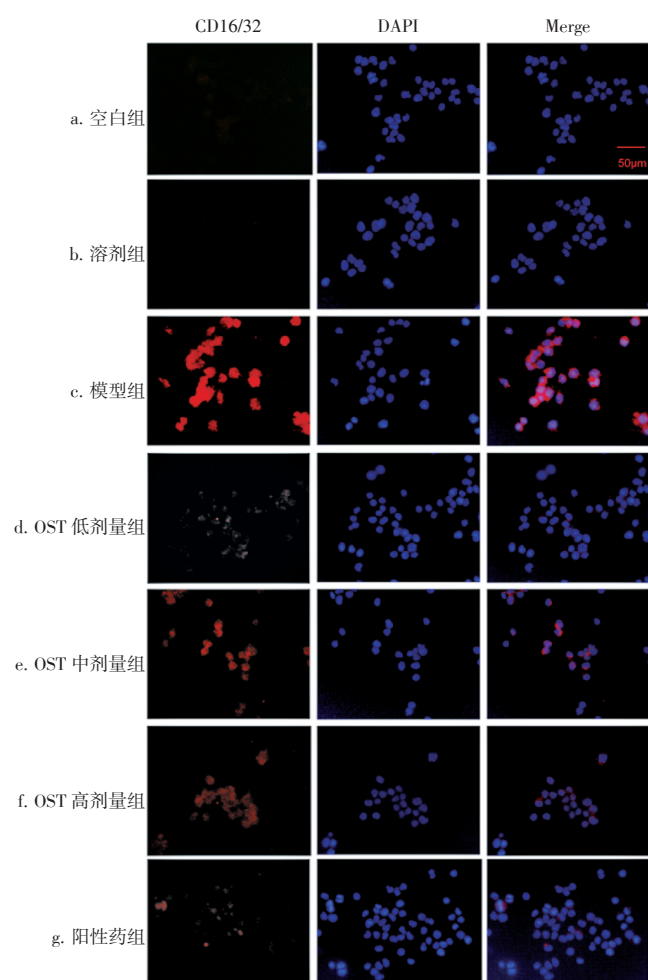


图 3 蛇床子素(OST)对  $A\beta_{1-42}$  损伤的 BV2 细胞 M1 型标志物 CD16/32 表达的影响(免疫荧光,  $\times 400$ )

Figure 3 Effect of osthole on the expression of M1 marker CD16/32 in BV2 cells damaged by  $A\beta_{1-42}$ (IF,  $\times 400$ )

**2.4 蛇床子素预保护后的 BV2 细胞培养上清对 SH-SY5Y 细胞形态的影响** 结果见图 4。空白组和溶剂组的 BV2 细胞培养上清对 SH-SY5Y 细胞的影响无明显区别。模型组 SH-SY5Y 细胞的胞体皱缩，由不规则多边形变为细长梭形，突起缩短或断裂，细胞周围的细胞碎片明显增多；与模型组比较，各给药组 SH-SY5Y 细胞的形态均有所改善。结果表明，可能是由于模型组 BV2 细胞培养上清中的炎症因子分泌增多导致了神经细胞 SH-SY5Y 的损伤，而蛇床子素降低了 BV2 细胞炎症因子的分泌水平。

**2.5 蛇床子素预保护后的 BV2 细胞培养上清对 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响** 结果见图 5。与空白组比较，模型组 SH-SY5Y 细胞凋亡率显著升高( $P < 0.001$ )，溶剂组无明显差别( $P > 0.05$ )；与模型组比较，各给药组的 SH-SY5Y 细胞凋亡率明显降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )。结果表明，可能由于模型组 BV2 细胞培养上清中的炎症因子分泌增多导致神经细胞 SH-SY5Y 凋亡，而蛇床子素预保护减少了 BV2 细胞炎症因子的分泌，故其细胞培养上清能降低 SH-SY5Y 神经细胞的凋亡率。

**2.6 蛇床子素对  $A\beta_{1-42}$  损伤的 BV2 细胞 APOE、TREM2 蛋白及 mRNA 表达水平的影响** 结果见图 6、图 7。与空白组比较，模型组细胞的 APOE、TREM2 蛋白及 mRNA 表达显著上调( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )，溶剂组无明显差别( $P > 0.05$ )；与模型组比较，各给药组细胞的 APOE、TREM2 蛋白及 mRNA 表达明显下调( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )。结果表明， $A\beta_{1-42}$  损伤能导致 BV2 细胞的 APOE、TREM2 蛋白及 mRNA 表达上调，而蛇床子素预保护能够逆转 APOE-TREM2 通路的变化。

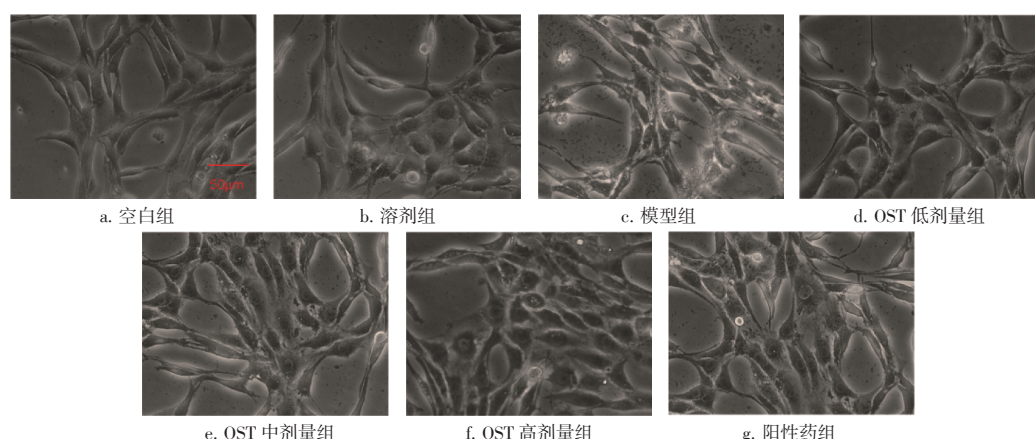
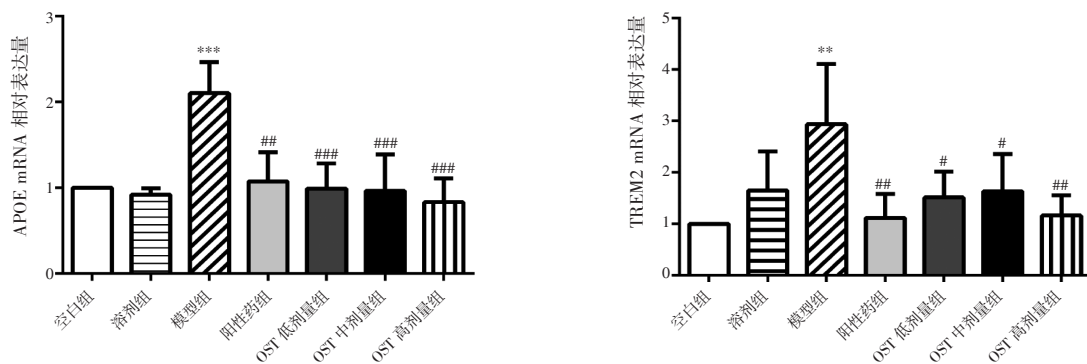
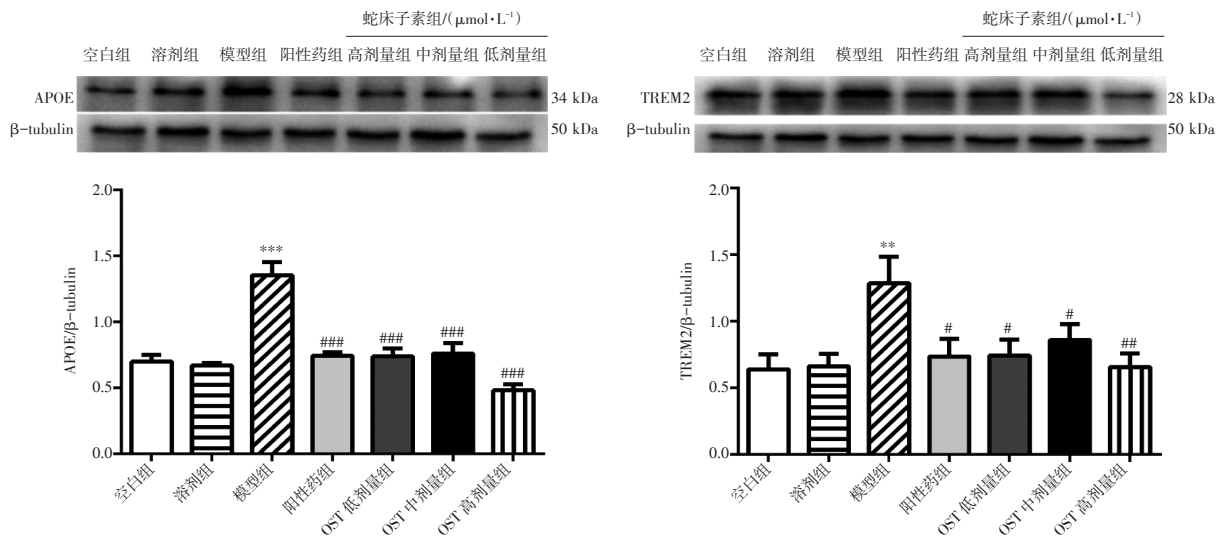
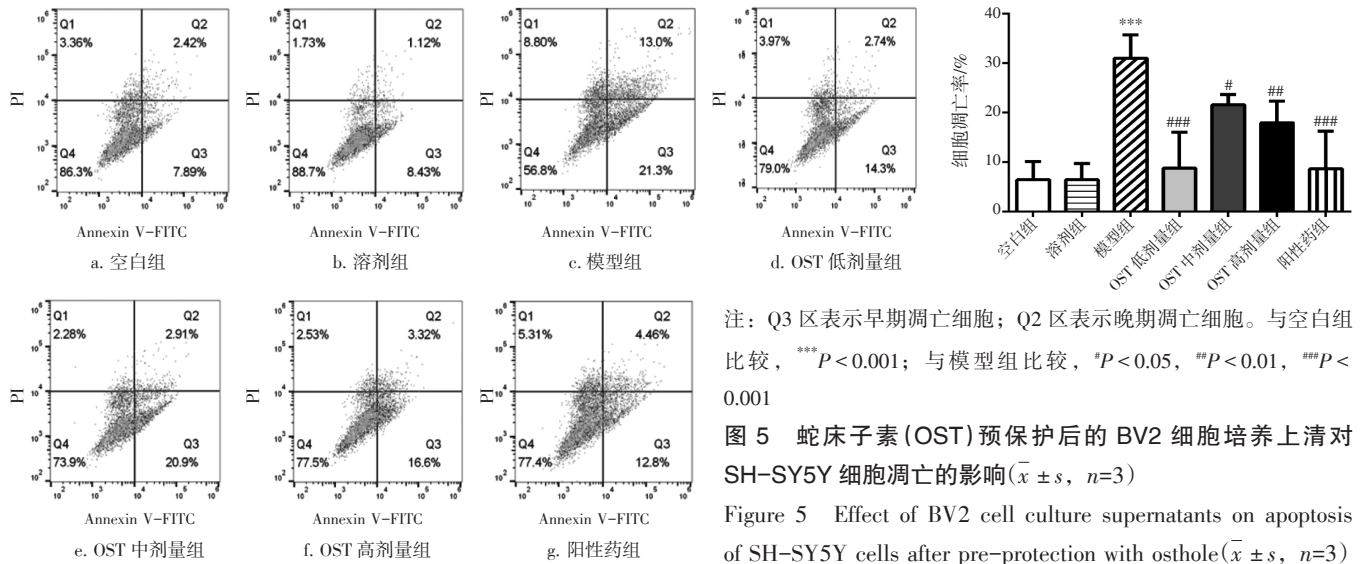


图 4 蛇床子素(OST)预保护后的 BV2 细胞培养上清对 SH-SY5Y 细胞形态的影响( $\times 400$ )

Figure 4 Effects of BV2 cell culture supernatants on SH-SY5Y cell morphology after pre-protection with osthole( $\times 400$ )



### 3 讨论

阿尔兹海默病主要的临床表现为记忆功能衰退和认知功能障碍,属中医学“痴呆”范畴,其特点为脑髓削减、神机失用<sup>[7-11]</sup>。阿尔兹海默病的病理表现为老年斑、神经纤维缠结(NFT)和神经元丢失,其中老年斑的主要成分是 $\beta$ -淀粉样蛋白(A $\beta$ )<sup>[12]</sup>。淀粉样前体蛋白(Amyloid- $\beta$  precursor protein, APP)可被内切酶切割成不同氨基酸数量的多肽,其中A $\beta_{1-42}$ 为脑内淀粉斑块及寡聚体的主要成分,被认为是最直接的神经毒性因子<sup>[13]</sup>。A $\beta_{1-42}$ 还可通过激活蛋白激酶,促进Tau蛋白异常磷酸化,导致神经元凋亡和学习记忆障碍<sup>[14-15]</sup>。A $\beta_{1-42}$ 肽簇具有较高的乙酰胆碱酯酶(AChE)活性,通过水解作用降低乙酰胆碱(ACh)水平,其合成障碍或丢失可能产生细胞损伤、神经炎症和认知功能障碍<sup>[16]</sup>。其他病理变化如炎症、持续激活的小胶质细胞和其他免疫细胞也是与AD有关的常见因素<sup>[17]</sup>。有研究<sup>[18]</sup>认为,除了清除A $\beta$ 蛋白和Tau蛋白,痴呆等神经退行性改变药物研发的第3个靶点是神经炎症。不论是血管性痴呆还是阿尔兹海默病出现的认知障碍,其病理因素都涉及Tau蛋白与A $\beta$ 的沉积<sup>[19]</sup>。A $\beta$ 的沉积是Tau蛋白病变的上游机制,使得Tau蛋白持续发生病变,而Tau蛋白的病变又以反馈机制促进A $\beta$ 的沉积,从而形成了恶性循环<sup>[20]</sup>。而A $\beta$ 沉积与Tau蛋白病变均可触发小胶质细胞持续激活,导致神经系统的慢性炎症,造成神经毒性物质的产生,最终引起神经退行性疾病。神经炎症既可能是阿尔兹海默病的发病原因,也可能是阿尔兹海默病病理或与其相关的风险因素的结果,并通过加剧A $\beta$ 的沉积和Tau蛋白病变而增加疾病的严重性。已经发现细胞炎性因子在A $\beta$ 斑块和NFT附近过度表达,可促进A $\beta$ 多肽的产生<sup>[21-25]</sup>。

APOE是大脑中主要的载脂蛋白,主要由星形胶质细胞合成和分泌,也可由小胶质细胞在单层HDL样颗粒中合成和分泌<sup>[26]</sup>。大量的遗传学研究<sup>[27]</sup>表明,APOE的异构体APOE4的遗传与多种神经退行性疾病的发病风险增加、发病时间早或临床预后较差有关。APOE参与调节中枢神经系统(CNS)的炎性反应,然而其依赖的免疫调节的分子机制尚不清楚。APOE的存在能够加重炎症程度。有研究<sup>[28]</sup>发现,人APOE在体内的神经元表达导致Tau蛋白过度磷酸化,在病理性Tau蛋白积聚的情况下,APOE的存在使神经元更易变性;APOE的缺失则保护神经元免于死亡,APOE影响Tau的发病机制,导致Tau蛋白磷

酸化,可能具有不同的诱导神经炎症的能力(APOE4>APOE3 $\approx$ APOE2>APOE1),最终导致不同程度的神经退行性病变。有研究<sup>[29]</sup>发现,APOE基因敲除小鼠可表现为LPS介导的炎性反应增强。然而,与LPS刺激小胶质细胞中APOE缺失增强免疫反应相反,在神经退行性变或神经炎性状态下,APOE缺乏可减轻炎症和疾病严重程度<sup>[30]</sup>。

TREM2在大脑中仅由小胶质细胞表达<sup>[31]</sup>,TREM2作为迟发型阿尔兹海默病的危险因素之一,其影响程度仅次于APOE。TREM2已经被证明是APOE受体<sup>[32]</sup>,但是关于APOE是否在上游影响TREM2仍然是争论的热点。Ulrich等<sup>[33]</sup>观察到,缺乏APOE的小鼠中与 $\beta$ 淀粉样斑块相关的小胶质细胞缺乏TREM2。在此之前,Jendresen等<sup>[34]</sup>通过实验证明了APOE的3种异构体均能作为TREM2的激动剂,并以剂量依赖的方式刺激TREM2受体的信号转导。因此,本研究检测了APOE、TREM2的蛋白和基因表达水平,以阐明APOE-TREM2通路对炎性反应的调节作用。

蛇床子素为中药蛇床子的主要活性成分。研究<sup>[35]</sup>发现,蛇床子素在神经退行性疾病的发生发展过程中可起到神经保护作用,但其具体机制尚不明确。本研究通过A $\beta_{1-42}$ 诱导BV2细胞炎症建立体外阿尔兹海默病模型,结果表明蛇床子素可减轻A $\beta_{1-42}$ 损伤的BV2细胞炎症,提高细胞活力,降低细胞炎性因子的分泌,可能与下调APOE、TREM2蛋白及基因表达有关。提示蛇床子素的抗炎机制可能与APOE-TREM2通路有关,可为后续探讨蛇床子素在神经退行性疾病中的作用机制提供参考。

### 参考文献:

- [1] BAO Y, MENG X, LIU F, et al. Protective effects of osthole against inflammation induced by lipopolysaccharide in BV2 cells[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2018, 17(3): 4561-4566.
- [2] GALLARDO G, SCHLÜTER O M, SÜDHOF T C. A molecular pathway of neurodegeneration linking alpha-synuclein to ApoE and Abeta peptides[J]. *Nat Neurosci*, 2008, 11(3): 301-308.
- [3] JIANG T, TAN L, ZHU X C, et al. Upregulation of TREM2 ameliorates neuropathology and rescues spatial cognitive impairment in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2014, 39: 2949-2962.
- [4] BOUCHON A, HERNÁNDEZ-MUNAIN C, CELLA M, et al. A DAPI 2-mediated pathway regulates expression of CC chemokine receptor 7 and maturation of human dendritic cells[J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2001, 194(8): 1111-1122.
- [5] FORABOSCO P, RAMASAMY A, TRABZUNI D, et al. Insights

- into TREM2 biology by network analysis of human brain gene expression data[J]. *Neurobiol Aging*, 2013, 34(12): 2699–2714.
- [6] LEYNS C E G, ULRICH J D, FINN M B, et al. TREM2 deficiency attenuates neuroinflammation and protects against neurodegeneration in a mouse model of tauopathy[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017, 114(43): 11524–11529.
- [7] GABRIELE C, CRISTINA D, LUCIA P, et al. Alzheimer and his disease: a brief history[J]. *Neurological Sciences*, 2011, 32(2): 275–279.
- [8] 刘强, 薛伟伟. 老年性痴呆病因病机浅析[J]. *光明中医*, 2015, 30(9): 1989–1990.
- [9] 郑然, 邹勇. 老年性痴呆的中西医研究进展[J]. *中国中医药现代远程教育*, 2016, 14(15): 150–152.
- [10] 张荣义, 张友堂. 中医对老年痴呆的认识与研究进展[J]. *中医药信息*, 2006, 23(1): 5–7.
- [11] 杨冰, 张晗, 杜天乐, 等. 从肾论治老年痴呆研究述评[J]. *河南中医*, 2015, 35(12): 3209–3211.
- [12] VASSAR R.  $\beta$ -Secretase, APP and A $\beta$  in Alzheimer's disease[J]. *Sub-cellular Biochemistry*, 2005, 38: 79–103.
- [13] LUBLIN A L, GANDY S. Amyloid- $\beta$  oligomers: possible roles as key neurotoxins in Alzheimer's disease[J]. *Mt Sinai J Med*, 2010, 77(1): 43–49.
- [14] QIN L Y, WU X F, BLOCK M L, et al. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration[J]. *Glia*, 2007, 55(5): 453–462.
- [15] ZHU B, WANG Z G, DING J, et al. Chronic lipopolysaccharide exposure induces cognitive dysfunction without affecting BDNF expression in the rat hippocampus[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2014, 7(3): 750–754.
- [16] KUMAR A, SEGHAL N, PADI S V, et al. Differential effects of cyclooxygenase inhibitors on intracerebroventricular colchicine-induced dysfunction and oxidative stress in rats[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2006, 551(1–3): 58–66.
- [17] LIN L, ZHENG L J, ZHANG L J. Neuroinflammation, gut microbiome, and Alzheimer's disease[J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(11): 8243–8250.
- [18] DOLGIN E. How to defeat dementia[J]. *Nature*, 2016, 539(7628): 156–158.
- [19] MURRAY M E, LOWE V J, GRAFF-RADFORD N R, et al. Clinicopathologic and 11C-Pittsburgh compound B implications of Thal amyloid phase across the Alzheimer's disease spectrum[J]. *Brain*, 138(5): 1370–1381.
- [20] ITTNER A, CHUA S W, BERTZ J, et al. Site-specific phosphorylation of tau inhibits amyloid- $\beta$  toxicity in Alzheimer's mice[J]. *Science*, 2016, 354(6314): 904–908.
- [21] TUPPO E E, ARIAS H R. The role of inflammation in Alzheimer's disease[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2005, 37(2): 289–305.
- [22] PARVATHENANI L K, TERTYSHNIKOVA S, GRECO C R, et al. P2X7 mediates superoxide production in primary microglia and is Up-regulated in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(15): 13309–13317.
- [23] ZHU S, WANG J, ZHANG Y, et al. The role of neuroinflammation and amyloid in cognitive impairment in an APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease[J]. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 2017, 23(4): 310–320.
- [24] CZECH M, GRESSENS P, KAINDL A M. The *Yin* and *Yang* of microglia[J]. *Developmental Neuroscience*, 2011, 33(3–4): 199–209.
- [25] ZHANG, F, RUJIA Z, SONG L, et al. Acute hypoxia induced an imbalanced M1/M2 activation of microglia through NF- $\kappa$ B signaling in Alzheimer's disease mice and wild-type littermates[J]. *Front Aging Neurosci*, 2017, 9: 282–297.
- [26] FAGAN A M, HOLTZMAN D M, MUNSON G, et al. Unique lipoproteins secreted by primary astrocytes from wild type, apoE (–/–), and human apoE transgenic mice[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(42): 30001–30007.
- [27] PIHLAJA R, KOISTINAHO J, MALM T, et al. Transplanted astrocytes internalize deposited  $\beta$  myloid peptides in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Glia*, 2008, 56(2): 154–163.
- [28] BRECHT W J. Neuron-Specific apolipoprotein E4 proteolysis is associated with increased Tau phosphorylation in brains of transgenic mice[J]. *Journal of Neuroscience*, 2004, 24(10): 2527–2534.
- [29] SHIN S, WALZ K A, ARCHAMBAULT A S, et al. Apolipoprotein E mediation of neuro-inflammation in a murine model of multiple sclerosis[J]. *Journal of Neuroimmunology*, 2014, 271(1–2): 8–17.
- [30] KIYOTA T, OKUYAMA S, SWAN R J, et al. CNS expression of anti-inflammatory cytokine interleukin-4 attenuates Alzheimer's disease-like pathogenesis in APP+PS1 bigenic mice[J]. *The FASEB Journal*, 2010, 24(8): 3093–3102.
- [31] SHI Y, HOLTZMAN D M. Interplay between innate immunity and Alzheimer disease: APOE and TREM2 in the spotlight[J]. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18(12): 759–772.
- [32] BAILEY C C, DEVAUX L B, FARZAN M. The Triggering receptor expressed on myeloid cells 2 binds apolipoprotein E[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(43): 26033–26042.
- [33] ULRICH J D, ULLAND T K, MAHAN T E, et al. ApoE facilitates the microglial response to amyloid plaque pathology[J]. *J Exp Med*, 2018, 215(4): 1047–1058.
- [34] JENDRESEN C, ÅRSKOG V, DAWS M R, et al. The Alzheimer's disease risk factors apolipoprotein E and TREM2 are linked in a receptor signaling pathway[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2017, 14(1): 59–72.
- [35] SHOKOOHINIA Y, HOSSEINZADEH L, MOIENI-ARYA M, et al. Osthole attenuates doxorubicin-induced apoptosis in PC12 cells through inhibition of mitochondrial dysfunction and ROS production [J]. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2014, 2014(2): e156848.

(编辑: 邹元平)