

白术乙醇提取物调节PPAR- γ 信号通路促进小胶质细胞摄取及降解A β 的作用机制研究^Δ

初 双^{1*}, 吴延烧², 吴丽敏¹, 崔正浩¹, 王 潘¹, 孙意冉¹, 谢治深¹, 张振强^{1#}(1. 河南中医药大学中医药科学院, 郑州 450046; 2. 河南中医药大学第一附属医院药学部, 郑州 450052)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2023)01-0012-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2023.01.03



摘要 目的 基于过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR- γ)信号通路研究白术乙醇提取物(EEAM)促进小胶质细胞摄取及降解 β 淀粉样蛋白(A β)的作用机制。方法 以小鼠神经小胶质细胞BV2为研究对象,采用激光共聚焦荧光显微镜观察EEAM(低、中、高剂量分别为0.3、0.4、0.5 mg/mL,下同)对细胞摄取和降解A β 的影响;利用人胚胎肾细胞HEK293考察EEAM对PPAR- γ 萤光素酶转录活性的影响;采用免疫荧光法考察EEAM对PPAR- γ 核移位的影响;以A β_{1-42} 诱导阿尔茨海默病BV2细胞模型,并采用定量聚合酶链式反应法考察EEAM对PPAR- γ 下游靶基因(*Lxra*、*Lxrb*、*Abca1*、*Abcg1*、*Cd36*、*Sra*和*Apoe*)mRNA表达的影响。结果 A β 摄取实验结果显示,经中、高剂量EEAM干预后,BV2细胞中A β 荧光强度均显著升高($P<0.05$);A β 降解实验结果显示,经中、高剂量EEAM干预后,BV2细胞中A β 荧光强度均显著降低($P<0.05$)。经各剂量EEAM干预后,HEK293细胞中PPAR- γ 萤光素酶转录活性均显著升高($P<0.05$),BV2细胞中和细胞核中PPAR- γ 蛋白的荧光强度(低剂量组除外)均显著升高($P<0.05$),BV2细胞中*Lxra*、*Lxrb*、*Abca1*、*Abcg1*、*Cd36*、*Sra*、*Apoe* mRNA的表达水平均显著升高($P<0.05$)。结论 EEAM可通过激活PPAR- γ 信号通路,促进小胶质细胞对A β 的摄取与降解作用,进而改善阿尔茨海默病。

关键词 白术乙醇提取物;过氧化物酶体增殖物激活受体 γ ;小胶质细胞; β 淀粉样蛋白;阿尔茨海默病

Study on the promotion effect mechanism of ethanol extract from *Atractylodes macrocephala* on microglia phagocytosis and degradation of A β based on regulating PPAR- γ signaling pathway

CHU Shuang¹, WU Yanrao², WU Limin¹, CUI Zhenghao¹, WANG Pan¹, SUN Yiran¹, XIE Zhishen¹, ZHANG Zhenqiang¹ (1. Academy of Chinese Medicine Sciences, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450052, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To explore the effect mechanism of ethanol extract from *Atractylodes macrocephala* (EEAM) on microglial phagocytosis and degradation of amyloid β (A β) based on peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR- γ) signaling pathway. **METHODS** Taking neuromicroglial cell BV2 as subjects, confocal microscopy was used to observe the effects of EEAM (0.3, 0.4, 0.5 mg/mL, similarly hereinafter) on phagocytosis and degradation of A β in microglia. Human embryonic kidney cell HEK293 was used to investigate the effects of EEAM on luciferase transcriptional activity of PPAR- γ . The effect of EEAM on nuclear translocation of PPAR- γ was investigated by immunofluorescence. Alzheimer's disease BV2 cell model was induced by A β_{1-42} , and quantitative polymerase chain reaction was used to investigate the effects of EEAM on mRNA expressions of PPAR- γ downstream target genes (*Lxra*, *Lxrb*, *Abca1*, *Abcg1*, *Cd36*, *Sra* and *Apoe*). **RESULTS** The results of A β uptake experiment showed that after the intervention of medium and high doses of EEAM, fluorescence intensity of A β in BV2 cells increased significantly ($P<0.05$). The degradation experiment of A β showed that after the intervention of medium and high doses of EEAM, fluorescence intensity of A β in BV2 cells decreased significantly ($P<0.05$). After the intervention of different doses of EEAM, luciferase transcriptional activity of PPAR- γ in HEK293 cells increased significantly ($P<0.05$); fluorescence intensity of PPAR- γ in BV2 cells and nuclei (except for low-dose group) increased significantly ($P<0.05$). mRNA expressions of *Lxra*, *Lxrb*, *Abca1*, *Abcg1*, *Cd36*, *Sra* and *Apoe* in BV2 cells were increased significantly ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** EEAM can promote the uptake and degradation of A β in microglia by activating PPAR- γ signaling pathway, thus improving Alzheimer's disease.

KEYWORDS ethanol extract from *Atractylodes macrocephala*; PPAR- γ ; microglia; amyloid β ; Alzheimer's disease

^Δ 基金项目 国家自然科学基金资助项目(No.82274612);河南省高校科技创新人才支持计划项目(No.22HASTIT048);河南省高校科技创新团队支持计划(No.21IRTSTHN026);河南省高等学校青年骨干教师培养计划项目(No.2021GGJS081)

* 第一作者 硕士研究生。研究方向:中西医结合防治脑病。E-mail:634683991@qq.com

通信作者 教授,博士生导师,博士。研究方向:中西医结合防治脑病。电话:0371-65680206。E-mail:zhangzhenqiang@126.com

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是以进行性认知功能障碍为主要特征的神经退行性疾病,脑内 β 淀粉样蛋白(amyloid β -protein, A β)沉积是AD的主要病理学特征^[1-2]。有研究表明,小胶质细胞具有吞噬与降解A β 的功能,可以通过降解A β 沉积形成的斑块,发挥保护神经的作用,从而改善AD^[3]。然而,当小胶质细胞出现功能障碍时,则可增加A β 沉积,加重AD^[4]。因此,促进小胶质细胞摄取和降解异常累积的A β 是改善AD的有效策略之一^[5]。过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR- γ)属于核激素受体超家族,可与PPAR反应元件(PPAR response elements, PPREs)结合,形成一种有效的转录因子^[6]。PPAR- γ 激活后会促进下游基因*Abcg1*、*Sra*、*Cd36*、*Lxr*、*Apoe*及*Abca1*的表达,从而增强小胶质细胞对A β 的摄取及降解^[7]。

中医将AD归属于“痴呆”范畴,认为痴呆病位在脑,多为本虚标实之证,以脏腑精气亏虚、脑失所养为本,痰气交阻为标。脾主运化,脾失健运则气血亏虚,脑髓失养而生痴呆;脾喜燥恶湿,脾气亏虚则运化水液失常,水湿停聚内生痰湿,痰蒙清窍亦生痴呆。脾虚痰湿是早期AD发生发展的病机之一,故健脾化痰为治疗AD的有效方法之一^[8]。中药白术为菊科苍术属植物白术*Atractylodes macrocephala* Koidz.的干燥根茎,被誉为“脾脏补气健脾”第一要药。本课题组前期研究发现,白术乙醇提取物(ethanol extract from *Atractylodes macrocephala*, EEAM)可延缓AD模型秀丽隐杆线虫CL4176的瘫痪时间,调节溶酶体自噬,降解淀粉样蛋白前体蛋白,从而改善AD^[9-11]。但是白术乙醇提取物是否可通过PPAR- γ 信号通路促进小胶质细胞对A β 的摄取及降解,尚不明确。基于此,本研究以小鼠小胶质细胞BV2为研究对象,从PPAR- γ 信号通路出发,探讨EEAM促进小胶质细胞对A β 摄取及降解的作用机制,以期EEAM治疗AD的临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有Airtech型超净台(苏州安泰空气技术有限公司), Forma Series II Water Jacket型二氧化碳细胞培养箱、Multiskan GO型全波长酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司), Axiocam 506 Color型显微镜、LSM700型共聚焦荧光显微镜(德国Carl Zeiss公司), FLUOstar OPTIMA型多功能酶标仪(德国BMG Labtech公司), Roche LightCycler 96型实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)仪(美国ABI公司)。

1.2 主要药品与试剂

白术饮片购自安徽亳州药材市场,经河南中医药大学药学院付钰副教授鉴定为菊科植物白术*A. macrocephala* Koidz.的干燥根茎。pCMX-Gal-mPPAR- γ 及PPRE-J3-TK-Luc质粒由本实验室构建。兔源PPAR- γ

多克隆抗体(批号00105869)购自武汉三鹰生物技术有限公司;山羊抗兔免疫球蛋白G二抗(批号GR3401492-2)购自美国Abcam公司;A β ₁₋₄₂、FEEAM-A β (批号分别为CPC221027110、T2P1000485)均购自苏州强耀生物科技有限公司;Hoechst 33342、MEM基础培养基、DMEM基础培养基、TriQuick Reagent总RNA提取试剂(批号分别为20190412、20200716、10013031、229009)均购自北京索莱宝科技有限公司;胎牛血清(批号12A089)购自上海依科赛生物制品有限公司;PolyJet转染试剂(批号61758)购自深圳恩科生物科技有限公司;逆转录试剂盒(批号103118190503)购自上海碧云天生物技术有限公司;罗格列酮(批号C10534101,纯度98%)购自阿拉丁试剂(上海)有限公司;荧光素酶报告基因检测试剂盒(批号0000312919)购自美国Promega公司。

1.3 细胞

小鼠神经小胶质细胞BV2购自武汉普诺赛生命科技有限公司;人胚胎肾细胞HEK293购自中国科学院细胞库。

2 方法

2.1 EEAM的制备

参考本课题组前期制备方法^[12]操作:称取白术饮片2 kg,共加入95%乙醇4 L分别浸渍3次,每次1周;合并滤液,减压浓缩得到EEAM浸膏359 g,得率为17.95%(以生药量计),置于4℃下保存,备用。

2.2 细胞培养

将BV2细胞以含有10%胎牛血清、1%青-链霉素混合液的MEM完全培养基培养,置于37℃、5% CO₂培养箱中培养,待细胞密度达到80%左右时,进行后续实验。将HEK293细胞以含有10%胎牛血清、1%青-链霉素混合液的DMEM完全培养基培养,然后同上述条件培养后进行后续实验。

2.3 EEAM对BV2细胞活力的影响

采用MTT法对细胞活力进行测定。取对数生长期的BV2细胞接种于96孔板中,培养24 h后,将细胞分为空白对照组和EEAM低、中、高剂量组(0.3、0.4、0.5 mg/mL,剂量参考前期预实验设置),每组设置6个复孔。各孔加入相应含药培养基培养24 h后,避光加入5 mg/mL MTT溶液20 μ L,继续培养4 h;弃去培养基,每孔加入二甲亚砜150 μ L,摇床振摇10 min,采用酶标仪在490 nm处测定各孔光密度(optical density, OD)值,并计算细胞存活率(细胞存活率=给药组OD值/空白对照组OD值 $\times$ 100%)。

2.4 EEAM对BV2细胞摄取及降解A β 的影响

采用共聚焦皿平行铺BV2细胞,分为摄取组及降解组,2组细胞再分别设置空白对照组、阳性对照组(1 μ mol/L罗格列酮,剂量参考文献^[13]及预实验结果设置,下同)和EEAM低、中、高剂量组(0.3、0.4、0.5 mg/mL),每组设置3个复孔。培养过夜后,次日分别给予相应药物处理24 h,每皿加入500 nmol/L FAM-A β (带有红色荧光

标记的Aβ)避光染色4 h;染色结束后,摄取组细胞用Hoechst 33342对细胞核进行染色,经磷酸盐缓冲液(PBS)清洗后在激光共聚焦荧光显微镜下拍照,观察BV2细胞对Aβ的摄取作用。降解组细胞以500 nmol/L FAM-Aβ避光染色4 h后,更换为MEM完全培养基继续培养6 h,用Hoechst 33342和溶酶体绿色荧光探针分别对细胞核及溶酶体进行染色,经PBS清洗后在激光共聚焦荧光显微镜下观察BV2细胞对Aβ的降解作用。

2.5 EEAM对HEK293细胞中PPAR-γ荧光素酶转录活性的影响

荧光素酶报告基因是转录活性测定的常用工具之一,荧光素酶催化底物产生化学发光,荧光素酶表达量越高,化学发光度越强,从而表明目的基因转录活性越强^[14]。HEK293细胞是人胚胎肾细胞的细胞系,该细胞具有高度的可转染性,常用作报告基因检测的工具细胞^[15]。基于此,笔者参考相关文献^[16],采用HEK293细胞探讨EEAM对PPAR-γ转录活性的影响。取对数生长的HEK293细胞接种于96孔板中,待细胞密度达到80%左右时,用PolyJet转染试剂进行转染;每孔转染pCMX-Gal-mPPAR-γ、PPRE-J3-TK-Luc质粒各100 ng,并于转染6 h后更换为DMEM完全培养基。次日,将转染后的细胞分为空白对照组、阳性对照组(1 μmol/L 罗格列酮)和EEAM低、中、高剂量组(0.3、0.4、0.5 mg/mL),每组设置6个复孔。分别给予相应药物培养24 h后,采用多功能酶标仪检测各孔荧光素酶活性。此外,取对数生长的HEK293细胞按上述方法接种、转染后,给予高剂量(0.5 mg/mL)EEAM处理后,分别培养6、12、18、24 h时,同上述方法检测荧光素酶活性。

2.6 EEAM对BV2细胞中PPAR-γ核移位的影响

采用免疫荧光法进行实验。将BV2细胞接种于提前加入细胞爬片的24孔板中,按照“2.4”项下方法分组、培养,每组设3个复孔。24 h后加入4%多聚甲醛固定细胞1~2 h,经PBS清洗后,用0.3% Triton-X室温孵育30 min,以山羊血清封闭2 h,经PBS清洗后,于4℃条件下以PPAR-γ一抗(稀释度为1:200)孵育过夜,次日加入二抗(稀释比例为1:300)室温避光孵育2 h;加入Hoechst 33342染色30 min,经PBS清洗后,取出爬片,采用显微镜观察荧光情况,并用Image J软件分析各组细胞中PPAR-γ蛋白的荧光强度及核移位情况。细胞中PPAR-γ蛋白荧光强度增强,则表明PPAR-γ表达水平升高;另外,当在细胞核中检测到PPAR-γ,也表明其被激活^[17]。

2.7 EEAM对BV2细胞中PPAR-γ下游靶基因表达的影响

采用qPCR进行实验。取对数生长期的BV2细胞接种于6孔板中,培养24 h后,将细胞分为空白对照组、AD模型组和EEAM低、中、高剂量组(0.3、0.4、0.5 mg/mL),每组设置3个复孔。加入相应药物(空白对照组和模型组加入培养基),除空白对照组外,其余组也加入Aβ₁₋₄₂

(终浓度为5 μmol/L)。培养24 h后,用Trizol法提取细胞总RNA,测定其纯度及浓度后,按照逆转录试剂盒方法进行逆转录得到cDNA。以cDNA为模板进行PCR,以β-actin为内参,采用2^{-ΔΔCt}法计算目的基因的表达水平。PCR引物序列及扩增产物长度见表1。

表1 PCR引物序列及扩增产物长度

基因	引物序列(5'→3')	扩增产物长度/bp
<i>Lxra</i>	上游:CCTTCCTCAAGGACTTCAGTTACAA	98
	下游:CATGGCTCTGGAGAACTCAAAGAT	
<i>Lxrb</i>	上游:AAGGACTTCACCTACAGCAAGGA	78
	下游:GAAGCTCGAAGATGGGATTGATGA	
<i>Abca1</i>	上游:ACCCACCTATGAACAACATGA	123
	下游:GAGTCGGGTACGGAACAGG	
<i>Abcg1</i>	上游:AAGGCCTACTACTGGCAAAGA	69
	下游:GCAGTAGGCCACAGGGAACA	
<i>Apoe</i>	上游:CTCCCAAGTCACACAAGAAGTG	77
	下游:CCAGCTCCTTTTGTAAAGCCTTT	
<i>Sra</i>	上游:ACGACCCGCCACAATCTC	166
	下游:CTGGAAGCCTTACTTGAAGGAG	
<i>Cd36</i>	上游:ATGGGCTGTGATCGGAAGTG	233
	下游:TTTGCCACGTCTATCTGGGTTT	
<i>β-actin</i>	上游:GGCTGTATTCCCTCCATCG	241
	下游:CCAGTTGGTAAACAATGCCATGT	

2.8 统计学方法

所有数据采用GraphPad Prism 6.0软件进行统计分析,计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用Student's *t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 EEAM对BV2细胞活力的影响结果

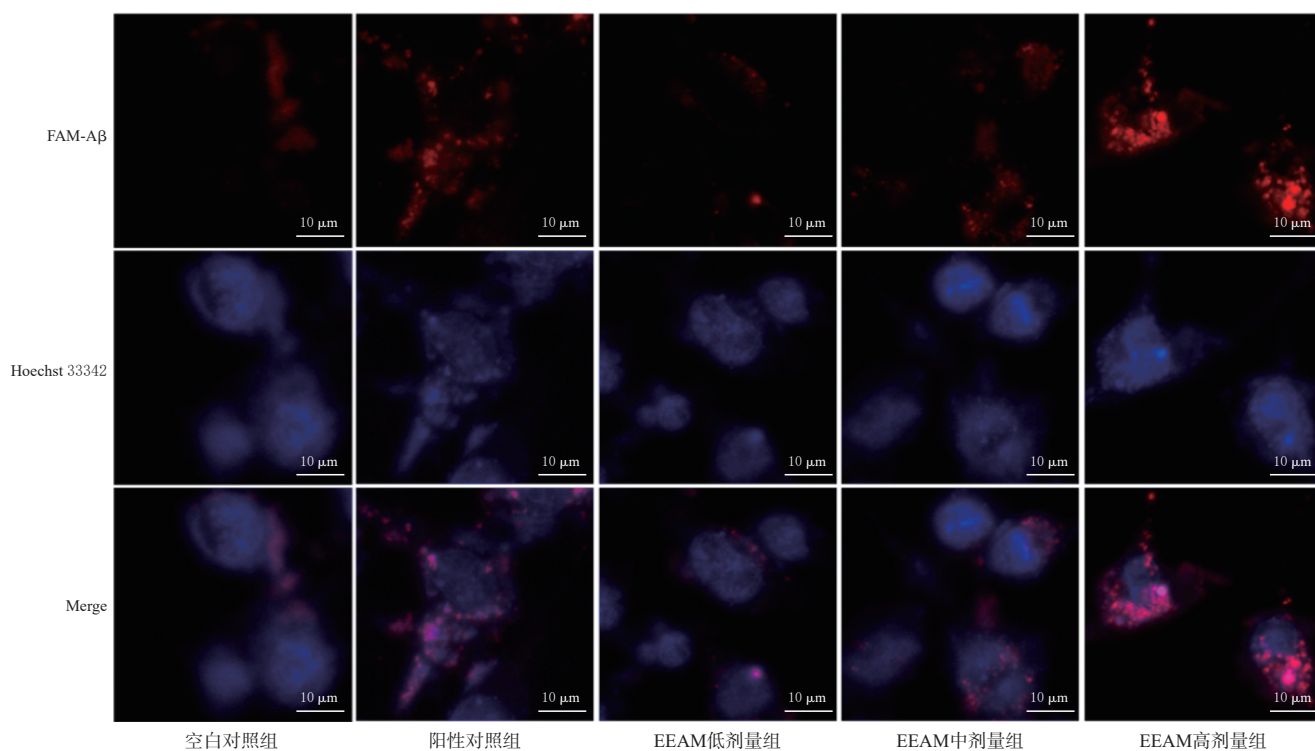
EEAM低、中、高剂量组细胞存活率[分别为(103.76±7.58)%、(111.27±6.05)%、(109.54±7.32)%]与空白对照组[(100.00±10.03)%]比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。

3.2 EEAM对BV2细胞摄取和降解Aβ的影响结果

Aβ摄取实验结果显示,与空白对照组比较,阳性对照组和EEAM中、高剂量组BV2细胞中Aβ荧光强度均显著升高($P<0.05$)。Aβ降解实验结果显示,与空白对照组比较,阳性对照组和EEAM中、高剂量组BV2细胞中Aβ荧光强度均显著降低($P<0.05$),阳性对照组及EEAM高剂量组BV2细胞中溶酶体荧光强度显著升高($P<0.05$)。结果见图1、图2、表2。

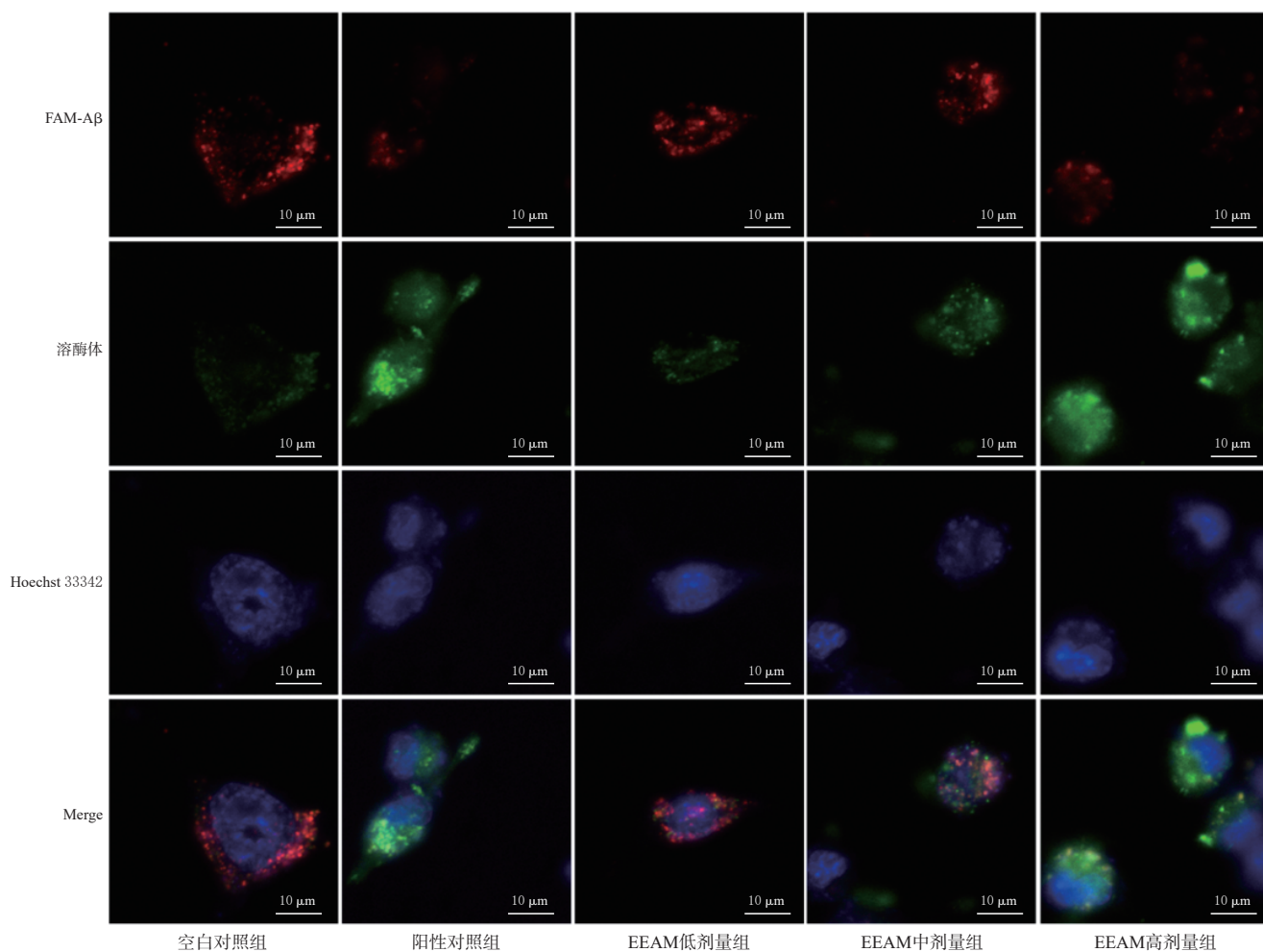
3.3 EEAM对HEK293细胞中PPAR-γ荧光素酶转录活性的影响

与空白对照组(1.00±0.11)比较,阳性对照组(1.73±0.15)和EEAM各剂量组(分别为1.65±0.21、1.65±0.14、1.77±0.19)HEK293细胞中PPAR-γ荧光素酶转录活性显著升高($P<0.05$)。另外,以高剂量EEAM培养6、12、18、24 h后,HEK293细胞中PPAR-γ荧光素酶转录活性(分别为1.31±0.22、1.44±0.86、1.51±0.16、1.95±0.28)均显著升高($P<0.05$),且处理24 h后的转录活性最强。



注:红色荧光表示FAM-A β ;蓝色荧光表示细胞核

图1 各组BV2细胞摄取A β 的荧光显微图



注:红色荧光表示FAM-A β ;绿色荧光表示溶酶体;蓝色荧光表示细胞核

图2 各组BV2细胞降解A β 的荧光显微图

表2 各组BV2细胞中Aβ摄取和降解荧光强度以及溶酶体荧光强度的检测结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Aβ摄取荧光强度	Aβ降解荧光强度	溶酶体荧光强度
空白对照组	1.00±0.03	1.00±0.06	1.00±0.17
阳性对照组	1.46±0.27 ^a	0.68±0.17 ^a	2.10±0.18 ^a
EEAM低剂量组	1.00±0.02	1.04±0.05	1.08±0.15
EEAM中剂量组	1.07±0.01 ^a	0.96±0.04 ^a	1.35±0.18
EEAM高剂量组	1.65±0.06 ^a	0.72±0.06 ^a	2.23±0.11 ^a

a:与空白对照组比较, $P<0.05$

3.4 EEAM对BV2细胞中PPAR-γ核移位的影响结果

与空白对照组比较,阳性对照组和EEAM各剂量组BV2细胞中和细胞核中PPAR-γ蛋白的荧光强度(低剂量组除外)均显著升高($P<0.05$),结果见表3、图3。

表3 各组BV2细胞中和细胞核中PPAR-γ蛋白荧光强度的测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	细胞中PPAR-γ	细胞核中PPAR-γ
空白对照组	1.00±0.04	1.00±0.05
阳性对照组	1.42±0.05 ^a	1.30±0.06 ^a
EEAM低剂量组	1.22±0.12 ^a	1.08±0.06
EEAM中剂量组	1.38±0.01 ^a	1.21±0.09 ^a
EEAM高剂量组	1.41±0.05 ^a	1.41±0.14 ^a

a:与空白对照组比较, $P<0.05$

3.5 EEAM对PPAR-γ下游靶基因mRNA表达的影响结果

与空白对照组比较,AD模型组BV2细胞中*Lxra* mRNA的表达水平显著降低($P<0.05$),其余基因mRNA的表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)。与

AD模型组比较,各给药组BV2细胞中*Lxra*、*Lxrb*、*Abca1*、*Abcg1*、*Cd36*、*Sra*、*Apoe* mRNA的表达水平均显著升高($P<0.05$)。结果见表4。

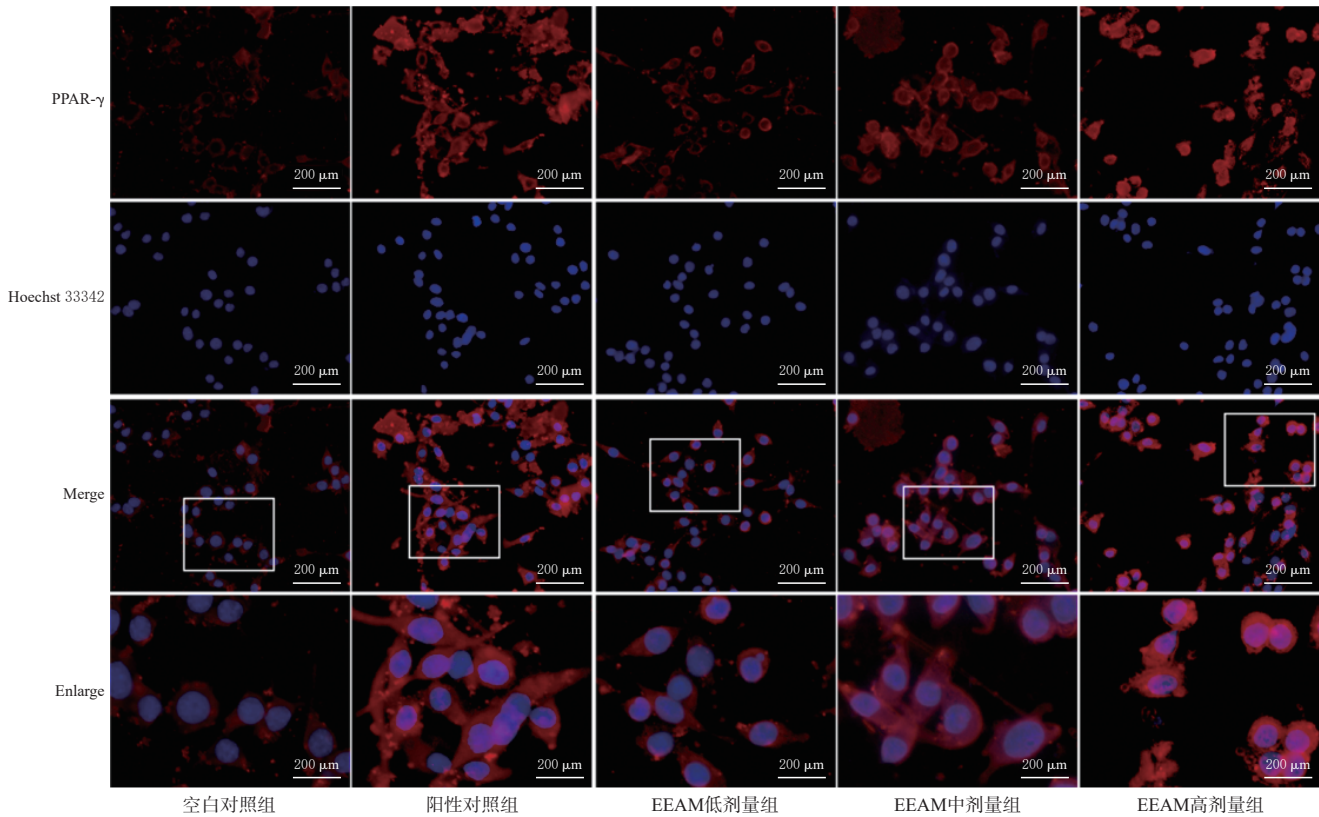
表4 各组BV2细胞中PPAR-γ下游靶基因mRNA的测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	<i>Lxra</i> mRNA	<i>Lxrb</i> mRNA	<i>Abca1</i> mRNA	<i>Abcg1</i> mRNA	<i>Cd36</i> mRNA	<i>Sra</i> mRNA	<i>Apoe</i> mRNA
空白对照组	1.00±0.06	1.00±0.13	1.00±0.66	1.00±0.22	1.00±0.06	1.00±0.09	1.00±0.10
AD模型组	0.59±0.04 ^a	1.14±0.07	1.25±0.76	0.99±0.10	0.77±0.01	0.98±0.04	0.75±0.03
阳性对照组	1.45±0.10 ^b	1.77±0.95 ^b	6.10±0.33 ^b	1.28±0.06 ^b	1.20±0.44 ^b	1.70±0.08 ^b	1.43±0.07 ^b
EEAM低剂量组	1.28±0.14 ^b	2.71±0.30 ^b	3.54±0.30 ^b	3.91±0.12 ^b	3.90±0.08 ^b	1.79±0.11 ^b	2.23±0.22 ^b
EEAM中剂量组	1.27±0.07 ^b	3.52±0.41 ^b	14.60±0.73 ^b	3.79±0.76 ^b	4.27±0.49 ^b	2.09±0.11 ^b	1.87±0.02 ^b
EEAM高剂量组	1.55±0.23 ^b	7.44±0.34 ^b	26.10±0.18 ^b	13.20±0.84 ^b	7.71±0.53 ^b	3.01±0.11 ^b	2.08±0.04 ^b

a:与空白对照组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$

4 讨论

随着全球社会老龄化的加剧,AD发病率也逐年升高。在AD病理中,Aβ的生成与清除失衡是造成脑内斑块沉积的主要原因之一。白术为补气健脾第一要药,具有神经保护等多种药理作用^[18],本课题组前期研究发现,其对AD具有改善作用^[11],但具体作用机制不明。Aβ沉积是AD的主要病理学特征^[1]。有研究表明,小胶质细胞具有摄取与降解Aβ的功能^[3]。基于此,本研究以BV2细胞为研究对象,探讨EEAM对Aβ摄取及降解的作用机制。Aβ摄取实验结果显示,经EEAM干预后,BV2细胞中Aβ荧光强度升高。Aβ降解实验结果显示,经EEAM干预后,BV2细胞中Aβ荧光强度降低,且溶酶体荧光强度升高。这提示EEAM可通过促进BV2细胞



注:红色荧光表示PPAR-γ;蓝色荧光表示细胞核

图3 各组BV2细胞中PPAR-γ核移位的荧光显微图

对A β 的吞噬和降解作用改善AD,且在促进A β 降解的同时也增强了溶酶体活性。

PPAR- γ 是依赖配体激活的转录因子,在A β 稳态、炎症和能量代谢的各种基因调节中发挥重要作用^[17]。PPAR- γ 激动剂可以减轻或逆转AD动物模型中A β 负荷、炎症及疾病相关行为障碍^[19]。报告基因是识别及表征功能的有力工具,在研究基因表达及转录因子等方面具有重要作用^[14],故本研究采用萤光素酶报告基因系统探究EEAM对PPAR- γ 通路的作用。本研究结果显示,经EEAM干预后,HEK293细胞中PPAR- γ 萤光素酶转录活性升高。这提示,EEAM可提高PPAR- γ 转录活性。PPAR- γ 作为转录因子,只有进入细胞核才能发挥作用,因此核移位也是PPAR- γ 激活的标志^[17]。进一步研究结果显示,经EEAM干预后,BV2细胞核中PPAR- γ 的荧光强度也有所升高。这提示EEAM可通过促进PPAR- γ 的核移位改善AD。

Abcg1、*Cd36*、*Sra*、*Lxr*、*Apoe*及*Abca1*均为PPAR- γ 的下游靶基因,*Abcg1*基因编码的蛋白质是atp结合盒(ABC)转运蛋白家族成员,可通过消除大脑中的有毒肽维持正常的脑内稳态^[20];Cd36是B类清脂受体,在脑中小胶质细胞进行表达,可介导小胶质细胞对A β 的吞噬作用^[21];Sra是一种多功能受体,具有吞噬作用,研究表明在Sra基因敲除小鼠中,A β 含量与正常小鼠相比有明显升高^[22]。这说明Cd36、Sra基因对A β 的摄取作用具有重要意义。Lxr基因属于核受体超家族,包括Lxra和Lxrb两种亚型,其可激活Apoe和Abca1,进而促进小胶质细胞对A β 的清除作用^[23-25]。这说明Lxra、Lxrb、Apoe、Abca1基因对A β 的降解作用具有重要意义。本研究结果表明,经EEAM处理后,BV2细胞中*Abcg1*、*Cd36*、*Sra*、*Lxr*、*Apoe*、*Abca1* mRNA的表达水平均升高。这表明EEAM可通过上调PPAR- γ 下游靶基因改善AD。

综上所述,EEAM可通过激活PPAR- γ 信号通路,促进小胶质细胞对A β 的摄取与降解作用,进而改善AD。由于体内与体外环境存在差异,后续本课题组将进一步开展动物体内实验对上述结论进行验证。

参考文献

[1] 胡文军,邓朝晖,李国锋.复方脑康胶囊对 β -淀粉样肽诱导SH-SY5Y细胞凋亡的保护作用研究[J].中国药房,2012,23(7):594-596.

[2] BAKOTA L, BRANDT R. Tau biology and tau-directed therapies for Alzheimer's disease[J]. Drugs, 2016, 76(3): 301-313.

[3] HANISCH U K, KETTENMANN H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain[J]. Nat Neurosci, 2007, 10(11): 1387-1394.

[4] KUMMER M P, ISING C, KUMMER C, et al. Microglial PD-1 stimulation by astrocytic PD-L1 suppresses neuroinflammation and Alzheimer's disease pathology[J]. Embo

J, 2021, 40(24): e108662.

[5] TANG Y, LE W. Differential roles of M1 and M2 microglia in neurodegenerative diseases[J]. Mol Neurobiol, 2016, 53(2): 1181-1194.

[6] KUMMER M P, SCHWARZENBERGER R, SAYAH-JEANNE S, et al. Pan-PPAR modulation effectively protects APP/PS₁ mice from amyloid deposition and cognitive deficits[J]. Mol Neurobiol, 2015, 51(2): 661-671.

[7] XIE Z, ZHAO J, WANG H, et al. Magnolol alleviates Alzheimer's disease-like pathology in transgenic *C. elegans* by promoting microglia phagocytosis and the degradation of beta-amyloid through activation of PPAR- γ [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 124: 109886.

[8] 易亚乔,方锐,葛金文,等.基于数据挖掘的历代医家痴呆相关病症用药规律分析[J].中国中药杂志,2018,43(16):3376-3381.

[9] 吴丽敏,王辉,王梦瑶,等.基于TrkB-CREB的白术神经保护作用机制研究[J].时珍国医国药,2021,32(10):2324-2330.

[10] WANG P, XIE Z S, SONG J Y, et al. Four new sesquiterpene lactones from *Atractylodes macrocephala* and their CREB agonistic activities[J]. Fitoterapia, 2020, 147: 104730.

[11] 吴丽敏,赵洁,张效威,等.基于LKB1-AMPK-TFEB的白术调节溶酶体自噬抗阿尔茨海默病作用机制[J].中国中药杂志,2022,47(17):4723-4732.

[12] 赵建平,吴丽敏,鲁晓娜,等.白术乙醇提取物对秀丽隐杆线虫寿命的影响及其机制研究[J].中国药房,2021,32(4):418-424.

[13] ABGRALL A, POIZAT G, PREVOST M, et al. Evidence for the neuronal expression and secretion of adiponectin[J]. Cells, 2022, 11(17): 2725.

[14] NAIR A K, BAIER L J. Using luciferase reporter assays to identify functional variants at disease-associated loci[J]. Methods Mol Biol, 2018, 1706: 303-319.

[15] ARENA T A, HARMS P D, WONG A W. High throughput transfection of HEK293 cells for transient protein production[J]. Methods Mol Biol, 2018, 1850: 179-187.

[16] 刘志文,徐江雁,张振强,等.人参皂苷Rb₁通过调节TGF- β /Smad3信号通路抑制肾小管上皮细胞-间质转化[J].中国药房,2022,33(5):535-541.

[17] 王宁,韩晶,徐艳炜,等.过氧化氢损伤原代皮质神经元中PPAR- γ 的改变[J].中华医学杂志,2015,95(21):1686-1690.

[18] 叶晓滨,孙越.益气类中药干预阿尔茨海默病作用机制的研究进展[J].中国民族民间医药,2022,31(1):78-83.

[19] 高博,张云,屈文英.黄芪甲苷IV通过激活PPAR- γ 抑制NF- κ B介导的炎症反应减少AD大鼠脑中淀粉样蛋白沉淀[J].脑与神经疾病杂志,2021,29(8):479-483.

(下转第22页)