

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.11.001

淫羊藿素对 β 淀粉样蛋白生成相关途径的影响*冯 飞¹, 李 莹², 黄南渠³, 李园园³, 罗 勇^{1△}

(1. 遵义医科大学第三附属医院/遵义市第一人民医院神经内科 563000; 2. 贵州省贵阳市第一人民医院神经内科 550000; 3. 遵义医科大学第三附属医院/遵义市第一人民医院 GCP 办公室 563000)

[摘要] **目的** 探讨淫羊藿素(ICT)对 β 淀粉样蛋白(A β)生成相关途径的作用机制。**方法** 将具有过表达 β 位淀粉样前体蛋白裂解酶 1(BACE1)质粒的脂质体转染至 APP-PS1-HEK293 细胞,分为对照组(不添加药物的等体积溶媒)、ICT 低剂量组(0.5 μ mol/L)、ICT 中剂量组(5.0 μ mol/L)、ICT 高剂量组(10.0 μ mol/L)。应用 Western blot、ELISA、定量 PCR 等方法检测 ICT 对 A β 生成相关途径中 A β_{1-40} 、BACE1、早老素 1(PS1)、解整合素金属蛋白酶 10(ADAM10)的影响。**结果** ICT 低、中、高剂量组 A β_{1-40} 的表达水平分别为(122.110 \pm 10.900)、(95.860 \pm 5.309)、(79.610 \pm 4.739)pg/mL,较对照组的(134.330 \pm 5.221)pg/mL 明显降低($P < 0.05$);BACE1 mRNA 表达水平分别为 2.140 \pm 0.042、1.510 \pm 0.081 和 1.170 \pm 0.061,较对照组(3.300 \pm 0.036)明显降低($P < 0.05$);PS1 mRNA 表达水平分别为 1.570 \pm 0.080、1.370 \pm 0.078 和 1.070 \pm 0.065,较对照组(2.140 \pm 0.044)明显降低($P < 0.05$);ADAM10 mRNA 表达水平分别为 0.840 \pm 0.079、1.150 \pm 0.026 和 1.520 \pm 0.080,较对照组(0.580 \pm 0.033)明显升高($P < 0.05$)。ICT 中、高剂量组 BACE1、PS1 和 ADAM10 蛋白表达水平和对照组相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** ICT 可通过下调 BACE1 和 PS1 表达水平,上调 ADAM10 的表达水平,从而参与抑制 A β 的生成。

[关键词] 淫羊藿素;淀粉样 β 蛋白前体;淀粉样 β 肽类;阿尔茨海默病**[中图分类号]** R96 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2020)11-1721-05Effect of icaritin on β -amyloid production-related pathways*FENG Fei¹, LI Ying², HUANG Nanqu³, LI Yuanyuan³, LUO Yong^{1△}

(1. Department of Neurology, the Third Affiliated Hospital of Zunyi Medical University/Zunyi First People's Hospital, Zunyi, Guizhou 563000, China; 2. Department of Neurology, Guiyang First People's Hospital, Guiyang, Guizhou 550000, China; 3. GCP Office, the Third Affiliated Hospital of Zunyi Medical University/Zunyi First People's Hospital, Zunyi, Guizhou 563000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the action mechanism of icaritin (ICT) on β -amyloid (A β) production-related pathways. **Methods** Liposomes with overexpressed amyloid precursor protein lyase 1 (BACE1) plasmid were transfected into APP-PS1-HEK293 cells, which were divided into the control group (iso-volume solvent without added drugs), the ICT low-dose group (0.5 μ mol/L), the ICT medium-dose group (5.0 μ mol/L), and the ICT high-dose group (10.0 μ mol/L). Western blot, ELISA and quantitative PCR were used to detect the effect of ICT on A β_{1-40} , BACE1, presenilin 1 (PS1) and integrin metalloproteinase 10 (ADAM10). **Results** The content of A β_{1-40} was (122.110 \pm 10.900), (95.860 \pm 5.309) and (79.610 \pm 4.739) pg/mL in the ICT low-dose, mediam-dose, and the high-dose group, respectively, which were significantly lower than that of the control group [(134.33 \pm 5.221)pg/mL, $P < 0.05$], respectively. The mRNA expression of BACE1 was 2.140 \pm 0.042, 1.510 \pm 0.081 and 1.170 \pm 0.061 in the ICT low-dose, mediam-dose, and the high-dose group, which were significantly decreased when compared with the control group (3.300 \pm 0.036, $P < 0.05$), while the mRNA expression leve of PS1 was 1.570 \pm 0.080, 1.370 \pm 0.078 and 1.070 \pm 0.065, respectively, which were also reduced when compared with the control group (2.140 \pm 0.044, $P < 0.05$). The ADAM10 mRNA

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81860710,81650030);贵州省科技厅项目(黔科合基础[2016]1165);遵义市科技基金项目(科合社字[2018]160号);贵州省中医药管理局项目(QZYY-2016-018,QZYY-2018-098)。作者简介:冯飞(1984-),主治医师,硕士,主要从事神经系统退行性疾病研究。△ 通信作者,E-mail:luoyongtt@163.com。

expression was 0.840 ± 0.079 , 1.150 ± 0.026 and 1.520 ± 0.080 in the ICT low-dose, medium-dose, and the high-dose group, respectively, which were increased when compared with the control group 0.580 ± 0.033 , $P < 0.05$. Compared with the control group, the protein expression levels of BACE1, PS1 and ADAM in the medium-dose and the high-dose group were significantly different ($P < 0.05$). **Conclusion** ICT can down-regulate the expression of BACE1, PS1 and up-regulate the expression of ADAM10, and takes part in regulating the pathway of A β production.

[Key words] icaritin; amyloid beta-Protein Precursor; amyloid beta-Peptides; Alzheimer's disease

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是老年人中最主要的痴呆类型^[1], 随着人口老龄化程度加剧, AD 在老年人疾病谱中的地位也将日益突显。其主要病理特征是 β 淀粉样蛋白 (amyloid β , A β) 沉积导致的老年斑和 tau 蛋白聚集导致的神经原纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFTs)^[2]。A β 被认为是 AD 病理改变的扳机点, 诸多降低 A β 的临床药物试验未能达到明显改善患者认知功能这一主要临床终点^[3-5], 这可能与 AD 发病机制复杂, 相关试验药物调控靶点单一等因素有关。因此, 调控 A β 的多靶点药物研究成为一个具有潜力的方向。

淫羊藿素 (icaritin, ICT) 是从传统补益类中药淫羊藿中提取的一种异戊二烯类黄酮衍生物^[6]。研究表明, ICT 具有缓解 A β 诱导的氧化应激和神经毒性的作用^[7-8], 可通过减少 AD 模型大鼠脑中 A β 的沉积来改善其记忆功能障碍^[9]。为进一步明确其对 A β 的调控机制, 本实验采用 BACE1-APP-PS1-HEK293 细胞, 通过检测 ICT 干预后与 A β 生成主要代谢酶的变化情况, 探索 ICT 对 A β 生成相关途径的调节作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

APP-PS1-HEK293 细胞株购自上海酶联科技有限公司; ICT 纯度大于或等于 98% (高效液相色谱法) 购自南京泽朗医药科技有限公司, 使用甲醇配制成 $10 \mu\text{mol/L}$ 备用; ELISA 测定试剂盒 (DAB140B) 购自美国 R&D Systems 公司; PrimeScript RT 试剂盒 (RR047A) 和 SYBR Premix Ex Taq (RR820A) 购自日本 TaKaRa 生物技术有限公司; β 位淀粉样前体蛋白裂解酶 1 (BACE1) 抗体 (ab2077)、早老素 1 (PS1) 抗体 (ab76083)、解整合素金属蛋白酶 10 (ADAM10) 抗体 (ab1997)、A β_{1-40} 抗体 (ab20068) 和 GAPDH 抗体 (ab8245) 购自英国 Abcam 公司。辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠或兔 IgG 抗体 (M21003L) 购自上海艾比玛特生物医药有限公司。

CO₂ 恒温培养箱 (MCO-18AC) 购自日本 Panasonic 公司; 连续波长酶标仪 (Synergy HTX) 购自美国 Bio Tek 公司; 超纯水制备系统购自德国 Merck Millipore 公司; 微孔板快速振荡器 (QB-9002) 购自江

苏其林贝尔仪器制造有限公司; SDS 垂直电泳槽 (DYCZ-25D) 和全自动化学发光凝胶成像系统 (731BR03736) 购自美国 Bio-Rad 公司; 低速离心机 (SC-3610) 购自安徽中科中佳科学仪器有限公司; 低温离心机 (centrifuge5424R) 购自德国 Eppendorf 公司; 电子天平 (AS220. R2) 购自波兰 Radwag 公司; Countess II FL 全自动细胞计数仪购自美国 Thermo 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和转染

将 APP-PS1-HEK293 细胞于含 10% 胎牛血清和青霉素-链霉素的 DMEM/F12 培养基中培养, 维持温度 $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO₂ 的潮湿空气。在药物干预前, 将细胞以 1:3 传代培养至六孔板 (每孔 1×10^6), 将过表达 BACE1 的质粒通过脂质体转染至 APP-PS1-HEK293 细胞, 前期研究证实该细胞模型中 BACE1 和 A β_{1-40} 表达更明显。48 h 后添加不同浓度 ICT 共培养 16 h。

1.2.2 药物分组

分别设置对照组 (不添加药物的等体积溶媒)、ICT 低剂量组 ($0.5 \mu\text{mol/L}$)、ICT 中剂量组 ($5.0 \mu\text{mol/L}$)、ICT 高剂量组 ($10.0 \mu\text{mol/L}$)。共培养 16 h 后收集各组培养基和 BACE1-APP-PS1-HEK293 细胞进行相关检测。

1.2.3 ELISA

用培养瓶培养各组细胞, 按实验分组处理后弃掉培养基, 每瓶细胞需加入 RIPA 裂解液 $200 \mu\text{L}$ 及 PMSF $2 \mu\text{L}$ 冰上裂解 30 min, 用细胞刮刮下, 于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 离心机 $10\,000 \text{ r/min}$ 离心 15 min, 收集的上清液用于检测 A β_{1-40} 。具体的 ELISA 操作步骤按说明书进行。

1.2.4 定量 PCR

应用 Trizol 试剂提取培养细胞样品的总 RNA。使用 PrimeScript RT 试剂盒逆转录 RNA 样品。按照试剂说明书应用 SYBR Premix Ex Taq 检测 BACE1、PS1 和 ADAM10 mRNA 表达。所有引物序列见表 1。使用 StepOnePlus 序列检测器 (美国 PEABI 公司) 扩增和检测荧光信号, Nano drop 2000 进行分析。每个样品的循环阈值 (Ct) 一式 3 份取平均值。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法分析, 其中将荧光信号标准化为相应的内参基因 (GAPDH)。

表 1 实验中应用的引物序列

基因名称		序列 (5'-3')	产物长度 (bp)
BACE1	forward	GCGGGAGTGGTATTATGAAGTG	101
	reverse	CCACGATGCTCTTGTTCATAGTT	101
PS1	forward	GAGCCCTGCACTCAATTCT	113
	reverse	CCAGGCATGGATGACCTTATAG	113
ADAM10	forward	CAGGAAGCTCTGGAGGAATATG	121
	reverse	GAGACTTTGGGAGGTACATGAG	121
GAPDH	forward	GATGCTGGTGTGAGTATGT	104
	reverse	GCGGAGATGATGACCCTTT	104

1.2.5 Western blot

BACE1-APP-PS1-HEK293 细胞在 4 °C 下用 RI-PA 裂解液处理 30 min,12 000 r/min 离心 30 min 除去不溶物质,并使用 BCA 法测定裂解液中蛋白质浓度。等量(30 μg)样品通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离及转移到硝酸纤维素膜上。将膜在含 5%(w/v)脱脂牛奶的 TBST[含有 0.5%(v/v)Tween-20 的 Tris 缓冲液]溶液中封闭 1 h,然后转移到含 BACE1 抗体(1 : 1 000 稀释)、PS1 抗体(1 : 1 000 稀释)、ADAM10 抗体(1 : 1 000 稀释)、Aβ₁₋₄₀ 抗体(1 : 1 000 稀释)和 GAPDH 抗体(1 : 1 000 稀释)的 5%(w/v)牛血清蛋白溶液中,4 °C 温育过夜。用 TBST 在 10 min 内洗涤膜 3 次后与辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠或兔抗 IgG 抗体(1 : 5 000 稀释)一起孵育。然后用 TBST 洗涤 3 次并使用 ECL 试剂盒显影。使用 Image J 软件定量每个条带的密度。

1.3 统计学处理

采用 SPSS22.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用独立样本 *t* 检验或 one-way ANOVA 方差分析,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ICT 对 BACE1-APP-PS1-HEK293 细胞中 Aβ₁₋₄₀ 表达水平的影响

ICT 低、中、高剂量组 Aβ₁₋₄₀ 表达水平分别为 (122.110 ± 10.900)、(95.860 ± 5.309) 和 (79.610 ± 4.739)pg/mL,较对照组(134.330 ± 5.221)pg/mL 明显降低(*P* < 0.05)。

2.2 ICT 对 Aβ 生成和清除中主要酶 mRNA 表达水平的影响

与对照组比较,ICT 各剂量组 BACE1-APP-PS1-HEK293 细胞的 BACE1、PS1 mRNA 表达水平明显降低(*P* < 0.05),ADAM10 mRNA 表达水平明显升高(*P* < 0.05),见表 2。PCR 扩增曲线和溶解曲线见图 1。

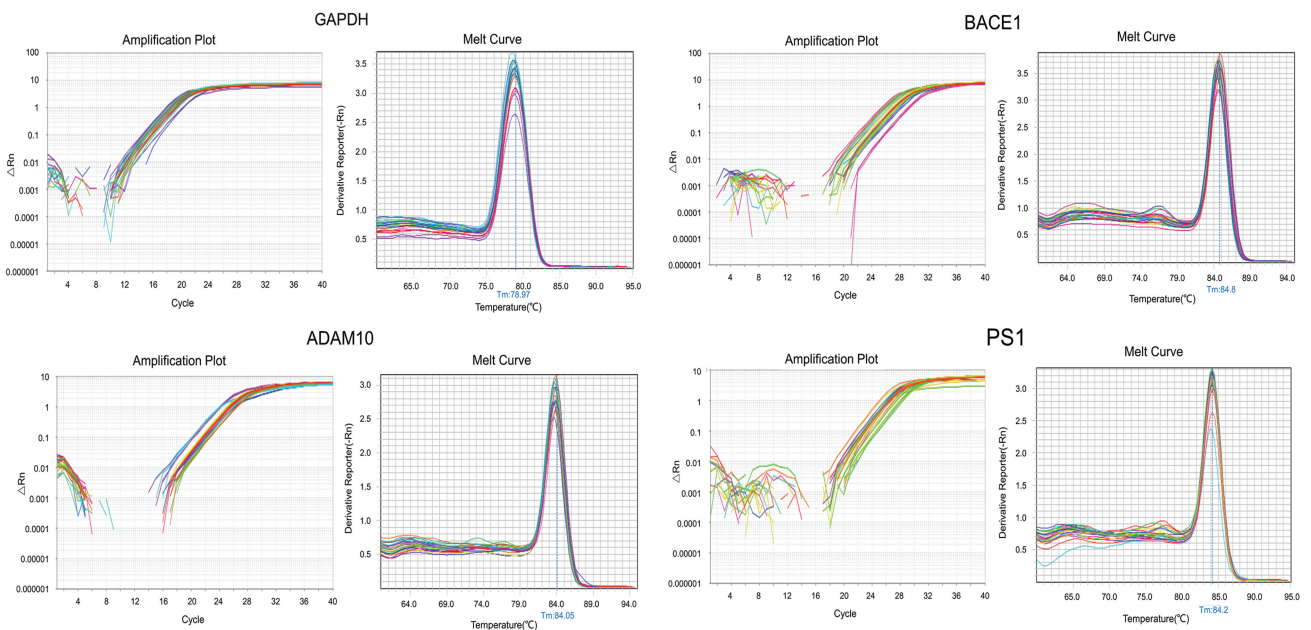
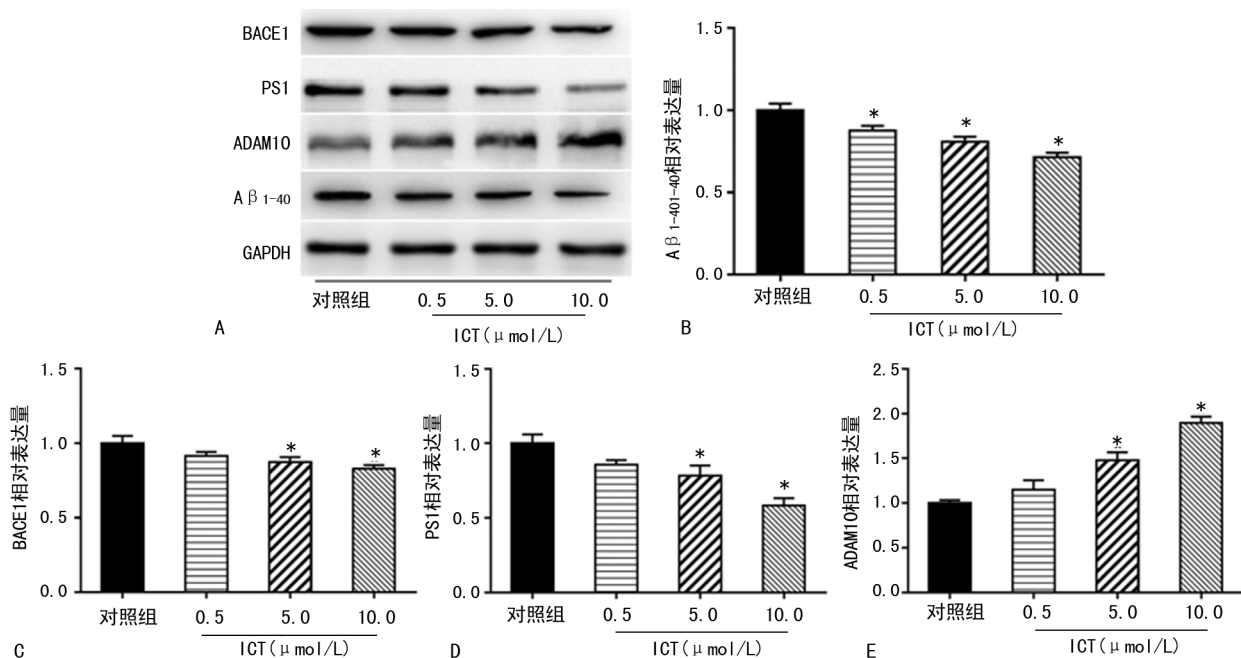


图 1 PCR 扩增曲线和溶解曲线

表 2 ICT 对 A β 生成中主要酶 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

项目	对照组	ICT 低剂量组	ICT 中剂量组	ICT 高剂量组
BACE1	3.300 \pm 0.036	2.140 \pm 0.042*	1.510 \pm 0.081*	1.170 \pm 0.061*
PS1	2.140 \pm 0.044	1.570 \pm 0.080*	1.370 \pm 0.078*	1.070 \pm 0.065*
ADAM10	0.580 \pm 0.033	0.840 \pm 0.079*	1.150 \pm 0.026*	1.520 \pm 0.080*

* : $P < 0.05$, 与对照组比较。A: Western blot 图; B: A β_{1-40} 相对表达量; C: BACE1 相对表达量; D: PS1 相对表达量; E: ADAM10 相对表达量; * : $P < 0.05$, 与对照组比较。图 2 ICT 对 A β 生成过程中主要酶蛋白表达水平的影响

2.3 ICT 对 A β 生成和清除中主要酶蛋白表达水平的影响

与对照组比较, ICT 中、高剂量组 BACE1、PS1 蛋白表达水平下降和 ADAM10 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$), 见图 2。

3 讨论

淀粉样前体蛋白 (APP) 代谢异常所致的 A β 沉积是导致 AD 的重要病理基础^[10]。正常情况下, APP 有非淀粉样代谢途径和淀粉样代谢途径 2 条代谢途径, 以非淀粉样代谢途径为主。APP 被 α -分泌酶切割, 产生具有可溶性片段 sAPP α 和 C 末端片段 C83, C83 进一步被 γ -分泌酶裂解产生非致病性的 P3 多肽和 APP 胞内区 (AICD)。 α -分泌酶的切割点位于 A β 结构域内部, 能阻止完整 A β 的生成。 β -分泌酶为 BACE1, 在 A β 的 N-末端裂解 APP, 产生可溶性片段 sAPP β 和含膜成分的 C 末端片段 C99。C99 进一步由 γ -分泌酶裂解为 A β 和 AICD。 γ -分泌酶裂解 A β 的 C 端的不同部位, 可产生 A β_{1-40} 、A β_{1-42} 。在某些病理条件下 (如 APP 基因突变) APP 代谢主要经 β -分泌酶和 γ -分泌酶裂解途径, 产生过多的不溶性 A β , 进而

堆积形成老年斑^[11-12]。

BACE1 和 PS1 被认为是阻断 A β 产生的潜在靶点, 是 APP 的淀粉样代谢途径中的重要调节酶, 与 A β 生成相关^[13-15]。而 ADAM10 是 APP 的非淀粉样代谢途径中的重要调节酶, 与减少 A β 的生成相关。基于此, 本实验采用 BACE1-APP-PS1-HEK293 细胞, 模拟 A β 过度生成的细胞模型, 研究结果显示, ICT 处理 16 h 后, ICT 可成剂量依赖性地降低 BACE1-APP-PS1-HEK293 细胞中 A β_{1-40} 的水平, 与其下调 A β 蛋白生成相关途径中的 BACE1 和 PS1 表达, 上调 ADAM10 表达有关。显示出一种系统性的调控作用, 从而抑制 AD 病理机制中 A β 代谢途径的病理性变化, 减少 A β 的生成及聚集。这与之前聚焦于 A β 代谢途径中某一关键酶位点的研究不同, 且较单一地对某一位点的处理, 理论上讲可能存在更小的药物不良反应。

因此, 该实验再次在细胞水平验证了 ICT 可减少 AD 病理模型中 A β 的生成, 且初步探明了其机制可能与 A β 生成中 2 条代谢途径的系统性调节相关。

参考文献

- [1] Alzheimer's Association. 2018 Alzheimer's disease facts and figures[J]. *Alzheimers Dement*, 2018, 14(3):367-429.
- [2] PASCOAL T A, MATHOTAARACHCHI S, MOHADES S, et al. Amyloid-beta and hyperphosphorylated tau synergy drives metabolic decline in preclinical Alzheimer's disease[J]. *Mol Psychiatry*, 2017, 22(2):306-311.
- [3] DOODY R S, THOMAS R G, FARLOW M, et al. Phase 3 trials of solanezumab for mild-to-moderate Alzheimer's disease [J]. *N Engl J Med*, 2014, 370(4):311-321.
- [4] DE LA TORRE J C. Phase 3 trials of solanezumab and bapineuzumab for Alzheimer's disease[J]. *N Engl J Med*, 2014, 370(15):1459-1460.
- [5] HUNG S Y, FU W M. Drug candidates in clinical trials for Alzheimer's disease[J]. *J Biomed Sci*, 2017, 24(1):47.
- [6] 何丹丹, 夏海建, 蒋俊, 等. 淫羊藿素与 RANKL 蛋白靶点结合抑制破骨细胞分化抗骨质疏松作用研究[J]. *中草药*, 2017, 48(22):4707-4712.
- [7] WU J, XU H, WONG P F, et al. Icaritin attenuates cigarette smoke-mediated oxidative stress in human lung epithelial cells via activation of PI3K-AKT and Nrf2 signaling[J]. *Food Chem Toxicol*, 2014, 64:307-313.
- [8] WANG Z, ZHANG X, WANG H, et al. Neuroprotective effects of icaritin against beta amyloid-induced neurotoxicity in primary cultured rat neuronal cells via estrogen-dependent pathway[J]. *Neuroscience*, 2007, 145(3):911-922.
- [9] FENG F, LI Y, TONG H, et al. Icaritin prevents neurotoxicity induced by amyloid-beta through increasing AMPK phosphorylation[J]. *Lat Am J Pharm*, 2017, 36(5):855-859.
- [10] SCHEUNER D, ECKMAN C, JENSEN M, et al. Secreted amyloid β -protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease[J]. *Nat Med*, 1996, 2(8):864-870.
- [11] NISHITOMI K, SAKAGUCHI G, HORIKOSHI Y, et al. BACE1 inhibition reduces endogenous A β and alters APP processing in wild-type mice 2[J]. *J Neuro Chem*, 2006, 99(6):1555-1563.
- [12] YAN R, VASSAR R. Targeting the β secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy [J]. *Lancet Neurol*, 2014, 13(3):319-329.
- [13] COIMBRA J R, MARQUES D F, BAPTISTA S J, et al. Highlights in BACE1 Inhibitors for Alzheimer's disease treatment[J]. *Front Chem*, 2018, 26:178.
- [14] KUMAR D, GANESH PURKAR A, KUMAR D, et al. Secretase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: Long road ahead[J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 148:436-452.
- [15] VOYTYUK I, DE STROOPER B, CHAVEZ-GUTIERREZ L. Modulation of γ - and β -secretases as early prevention against Alzheimer's disease[J]. *Biol Psychiatry*, 2018, 83(4):320-327.

(收稿日期:2019-12-26 修回日期:2020-03-12)