

## 橙皮素早期干预对APPswe/PS1dE9小鼠星形胶质细胞的作用

王楠<sup>1</sup>, 孙莹<sup>1</sup>, 闻豪<sup>1</sup>, 王瑞婷<sup>2\*</sup>

(1.承德医学院中药研究所, 河北承德 067000; 2.河北省中医药抗痴呆重点实验室/河北省神经损伤与修复重点实验室)

**摘要:** **目的** 研究橙皮素早期干预对野生型及转基因小鼠星形胶质细胞的作用。**方法** 选取3月龄野生型C57BL/6J小鼠为对照组、对照给药橙皮素10 mg/kg/d、20 mg/kg/d剂量组;设立3月龄转基因小鼠为模型组、橙皮素20 mg/kg/d、40 mg/kg/d、80 mg/kg/d剂量组,灌胃1次/d,灌胃6个月后处死。购买3月龄C57BL/6J小鼠为正常对照组,免疫组化(IHC)检测小鼠脑组织星形胶质细胞活化标志物GFAP表达;免疫荧光双重染色(IF)检测小鼠脑组织GFAP/C3、GFAP/S100A10共定位的细胞表达;蛋白免疫印迹法(WB)检测小鼠脑组织中GFAP、C3的蛋白表达;ELISA法测定小鼠脑组织中IL-1 $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 1含量。**结果** 与正常对照组相比,对照组GFAP阳性表达上调,GFAP/C3共定位阳性细胞数增加,GFAP/S100A10减少,C3表达上调,IL-1 $\alpha$ 含量升高。与对照组相比,对照给药橙皮素组GFAP表达下降,GFAP/C3共定位阳性细胞数减少,GFAP/S100A10增加,C3表达下调,IL-1 $\alpha$ 含量下降,TGF- $\beta$ 1含量升高。与对照组相比,模型组GFAP表达增强,C3蛋白表达上调,GFAP/S100A10阳性细胞数减少,TGF- $\beta$ 1含量下降。与模型组相比,橙皮素给药组GFAP表达下降,GFAP/C3共定位阳性细胞数减少,GFAP/S100A10增加,C3的表达下调,TGF- $\beta$ 1含量升高( $P<0.05$ )。**结论** 橙皮素早期干预能够明显减轻自然衰老小鼠及转基因小鼠炎症反应,其机制可能与抑制星形胶质细胞活化,促进抗炎A2型细胞活化,抑制促炎A1型活化,减轻炎症对神经元的损伤有关。

**关键词:** 阿尔茨海默病;橙皮素;星形胶质细胞;早期干预

**中图分类号:** R965.2

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1004-6879(2024)05-0361-07

## Effect of Hesperetin Early Intervention on Astroglial APPswe/PS1dE9 in Mice

WANG Nan<sup>1</sup>, SUN Ying<sup>1</sup>, WEN Hao<sup>1</sup>, WANG Rui-ting<sup>2\*</sup>

(1. Institute of Chinese Materia Medica, Chengde Medical University, Chengde, Hebei, 067000, China; 2. Hebei Key Laboratory of TCM anti-dementia / Hebei Key Laboratory of Nerve Injury and Repair)

**Abstract:** **Objective** To explore the effect of hesperetin early intervention to astrocyte in wild type and APPswe/PS1dE9 double transgenic mice. **Methods** The 3-month-old C57BL/6J wild type mice were set up as control group, hesperetin 10 mg/kg/d and 20 mg/kg/d group. The 3-month-old APPswe/PS1dE9 transgenic mice were set up as model group, hesperetin 20 mg/kg/d, 40 mg/kg/d, and 80 mg/kg/d groups, continuous intragastric administration for 6 months, once a day. The mice were killed after 6 months of intragastric administration, and 3-month-old C57BL/6J mice were purchased as normal control group. Immunohistochemical was used to test the expression of GFAP in mouse brain, double immunofluorescence staining was used to test the co-localized expressions of GFAP/C3 and GFAP/S100A10, Western Blot was used to observe the

资助项目: 河北省教育厅高等学校科学技术研究项目(ZD2017002); 河北省中医药重点学科建设项目(冀中医药函[2021]7号); 承德医学院神经生物学学科(071006)

\*通讯作者

expression of GFAP and C3 in brain tissues of mice, IL-1 $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1 in brain tissue of mice were tested by using ELISA.

**Results** Compared with the normal control group, the expression of GFAP and C3 in the control group increased, the number of GFAP/C3 colocalization positive cells increased, while the GFAP/S100A10 decreased. Compared with the control group, hesperetin could decrease the expression of GFAP, the number of GFAP/C3 colocalization-positive cells, C3 as well as IL-1 $\alpha$ , while the number of GFAP/S100A10 positive cells, TGF- $\beta$ 1 increased. Compared with the control group, the expression of GFAP, C3 in the model group increased, while the number of GFAP/S100A10 positive cells decreased. Compared with the model group, the expression of GFAP, C3 and the number of GFAP/C3 colocalization-positive cells in hesperetin group decreased, while the expression of TGF- $\beta$ 1 and the number of GFAP/S100A10 colocalization-positive cells increased ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Hesperetin early intervention can significantly alleviate the inflammation of naturally aged mice and transgenic mice, and its mechanism may be related to inhibiting the activation of astrocytes, promoting the activation of anti-inflammatory A2 cells, inhibiting the activation of pro-inflammatory A1 cells, and reducing the damage of neurons caused by inflammation.

**Key words:** Alzheimer's disease; Hesperetin; Astrocyte; Early intervention

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种进行性神经退行性疾病<sup>[1]</sup>。越来越多的证据表明胶质细胞在AD发病相关分子和细胞通路中发挥作用<sup>[2]</sup>。AD患者脑内会出现A $\beta$ 沉积,这些沉积物可与神经胶质细胞表面的受体结合,从而激活星形胶质细胞(Astrocyte, AS),导致大量炎性细胞因子释放<sup>[3]</sup>。

研究发现,从可检测出病理特征到神经元损伤、记忆力减退等症状出现,大约间隔20年时间<sup>[4]</sup>。橙皮素具有抗炎、抗氧化的作用。前期研究证明,橙皮素早期干预可以抑制 $\beta$ 、 $\gamma$ 分泌酶的活性,提高脑啡肽酶和胰岛素降解酶的表达水平,抑制TLR2和NF- $\kappa$ B的生成<sup>[5-6]</sup>。本实验采用野生型及转基因型小鼠早期干预6个月,探讨橙皮素对星形胶质细胞活化、不同表型及炎症因子的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

3月龄C57BL/6J野生型雄性小鼠48只,3月龄APPswe/PS1dE9双转基因雄性小鼠48只,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,合格证号SCXK(京)2014-0004。在承德医学院实验动物中心(SPF级)饲养,许可证编号SYXK(冀)2017-001,符合实验动物伦理要求,伦理审查编号为CDMULAC-20190308-004。

### 1.2 仪器

电泳仪(Bio-Rad公司);自动化学发光仪(Tanon-6100);

全自动轮转式切片机(Leica RM 2255);组织处理机(Shandon Excelsior);烘片机(Leica HI1220);光学显微镜(日本OLYMPUS公司)。

### 1.3 试剂

BCA蛋白浓度测定试剂盒、RIPA组织/细胞裂解液、SDS-PAGE凝胶制备试剂盒(北京索莱宝科技有限公司),GFAP、S100A10抗体(Abcam),C3、GAPDH抗体、羊抗兔二抗、驴抗兔荧光二抗(ABclonal),山羊抗鼠荧光二抗(Immunoway),特超敏ECL化学发光底物(Biosharp),兔二步法试剂盒、DAB显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),白介素-1 $\alpha$ (Interleukin 1 $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ )、转化生长因子 $\beta$ 1(Trasforming growth factor  $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1) ELISA试剂盒(杭州联科生物技术股份有限公司)。

### 1.4 方法

**1.4.1 动物分组与给药** 选取3月龄C57BL/6J野生型小鼠36只,随机分为对照组(Wild)、对照给药橙皮素10 mg/kg/d、20 mg/kg/d剂量组(Wild 10、Wild 20),每组12只;3月龄APPswe/PS1dE9双转基因小鼠48只,随机分为模型组(Model)和橙皮素20 mg/kg/d、40 mg/kg/d、80 mg/kg/d剂量组(LD、MD、HD),每组12只,每日一次灌胃给药,灌胃溶剂体积按小鼠体质量0.01 mL/g,对照组和模型组灌胃0.5% CMC-Na。待灌胃结束后,另购买3月龄C57BL/6J野生型雄性小鼠设为正常对照组(Normal)。

1.4.2 免疫组化检测小鼠海马和皮层组织GFAP蛋白表达 经二甲苯脱蜡,酒精水化,纯水冲洗2次,PBS清洗5 min;用柠檬酸钠进行抗原修复,PBS清洗3次;滴加3%  $H_2O_2$ 在37℃孵育20 min,PBS清洗3次;滴加GFAP一抗(1:50)4℃过夜;第二天37℃复温30 min,PBS清洗3次;二抗37℃孵育1 h,PBS清洗3次;DAB显色,自来水终止显色;苏木素复染,分化,返蓝;二甲苯脱水,透明,中性树脂封片,切片中见到胶质细胞突起呈棕黄色为GFAP阳性表达。使用Image J软件以平均光密度值进行半定量分析。

1.4.3 免疫荧光双重染色检测小鼠脑组织GFAP/C3、GFAP/S100A10共定位的细胞表达 经二甲苯脱蜡,酒精水化,纯水冲洗2次,PBS清洗5 min;用柠檬酸钠抗原修复,PBS清洗3次;1% Triton X-100破膜,室温孵育1 h,PBS清洗3次;用5% BSA进行封闭,37℃孵育1 h,不洗直接滴加一抗混合液(GFAP 1:100、C3 1:100、S100A10 1:200),4℃过夜。第二天37℃复温30 min,PBS清洗3次;避光滴加二抗,37℃孵育1 h,PBS清洗3次;滴加DAPI,PBS清洗3次,用含抗荧光淬灭封片剂封片。荧光显微镜下观察GFAP/C3和GFAP/S100A10共表达情况,用Image J软件对共表达阳性细胞数进行分析。

1.4.4 Western Blot检测小鼠脑组织GFAP和C3蛋白表达 取新鲜脑组织全脑匀浆,离心提取蛋白,BCA法定量检测蛋白浓度,以每孔40  $\mu$ g蛋白上样。电泳分离后,转至0.45  $\mu$ m PVDF膜。用5%脱脂奶粉封闭,加入一抗GFAP(1:10000)、C3(1:1000)、GAPDH(1:20000),摇床孵育,4℃过夜。第二天TBST洗膜,加入二抗(1:10000),摇床室温

孵育1 h,TBST洗膜,显影,使用 Image J软件分析蛋白表达水平。

1.4.5 ELISA法测定小鼠脑组织IL-1 $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 1含量 从液氮取出半脑,进行称重,按照比例加入5倍预冷的PBS缓冲液,匀浆机匀浆,得到的匀浆液于5000 $\times$ g离心5 min,取上清。按照试剂盒说明书所示的操作测定IL-1 $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 1含量。

## 1.5 统计学分析

使用IBM SPSS Statistics 21.0分析软件对数据进行统计分析,实验结果均以mean $\pm$ SD的形式表示,各组采用One Way ANOVA单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组小鼠海马和皮层GFAP蛋白表达

免疫组化(Immunohistochemistry,IHC)检测小鼠脑组织星形胶质细胞活化标志物神经胶质纤维酸性蛋白(Glial fibrillary acidic protein,GFAP)表达。GFAP为AS的特异性表面标记物,胶质细胞突起呈棕黄色为其阳性表达。与正常对照组相比,对照组海马CA1区和皮层阳性表达明显增加( $P<0.01$ );与对照组相比,对照给药橙皮素10剂量组小鼠海马CA1区阳性表达明显降低( $P<0.01$ ),对照给药橙皮素20剂量组小鼠海马CA1区和皮层阳性表达明显降低( $P<0.01$ ),模型组小鼠海马CA1区和皮层阳性表达明显增加( $P<0.01$ );与模型组相比,橙皮素低、中、高剂量组海马CA1区和皮层阳性表达明显减少( $P<0.01$ )。见图1、图2。

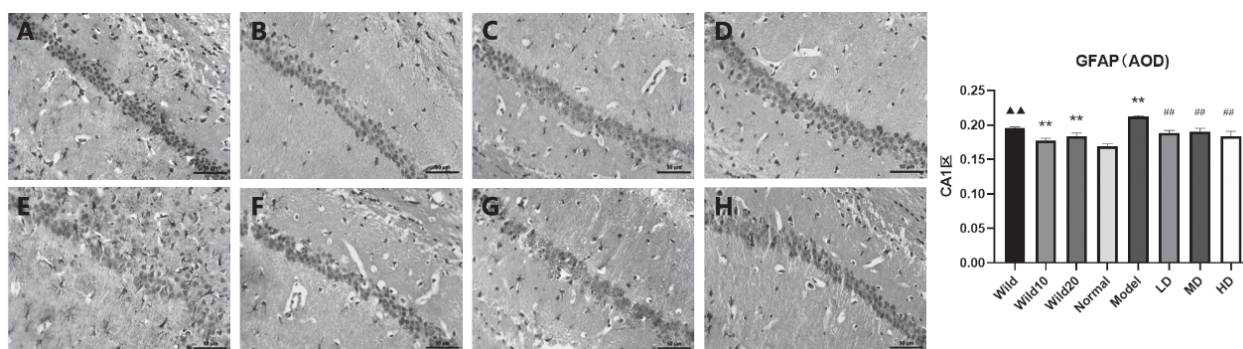


图1 各组小鼠海马CA1区GFAP免疫组化( $\times 400$ )

A: Wild; B: Wild10; C: Wild20; D: Normal; E: Model; F: LD; G: MD; H: HD; 与正常对照组比较 $\Delta\Delta P<0.01$ ; 与对照组比较 $^{**}P<0.01$ ; 与模型组比较 $^{***}P<0.01$

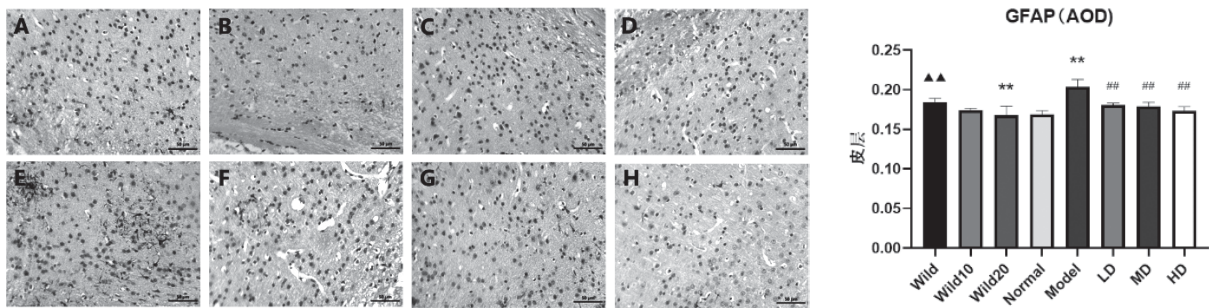


图2 各组小鼠海马皮层GFAP免疫组化(×400)

A: Wild; B: Wild10; C: Wild20; D: Normal; E: Model; F: LD; G: MD; H: HD; 与正常对照组比较 ▲▲ $P<0.01$ ; 与对照组比较 \*\* $P<0.01$ ; 与模型组比较 ### $P<0.01$

2.2 各组脑组织GFAP/C3、GFAP/S100A10共定位的细胞表达

免疫荧光双重染色(Immunofluorescence, IF)检测小鼠脑组织GFAP/C3、GFAP/S100A10共定位的细胞表达。与正常对照组相比,对照组小鼠脑组织GFAP/C3共表达明显增加( $P<0.01$ ),GFAP/S100A10明显减少( $P<0.05$ );与对照组相比,对照给药橙皮素10剂量组GFAP/C3共表达明

显降低( $P<0.05$ ),对照给药橙皮素20剂量组GFAP/C3明显降低( $P<0.01$ ),GFAP/S100A10明显增加( $P<0.05$ );与对照组相比,模型组GFAP/S100A10共表达明显下降( $P<0.05$ );与模型组相比,橙皮素低、中、高剂量组GFAP/C3共表达明显降低( $P<0.01$ ),GFAP/S100A10明显增加( $P<0.05$ )。见图3、图4。

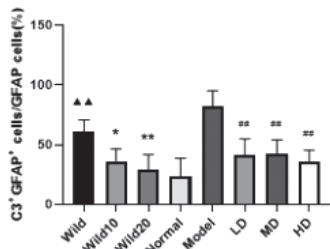
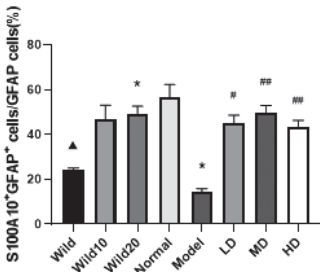
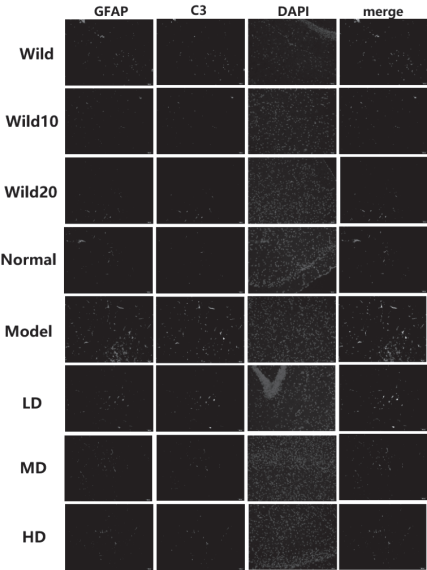


图3 各组小鼠脑组织GFAP与C3共表达情况(×200)

与正常对照组比较 ▲▲ $P<0.01$ ; 与对照组比较 \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ; 与模型组比较 ### $P<0.01$

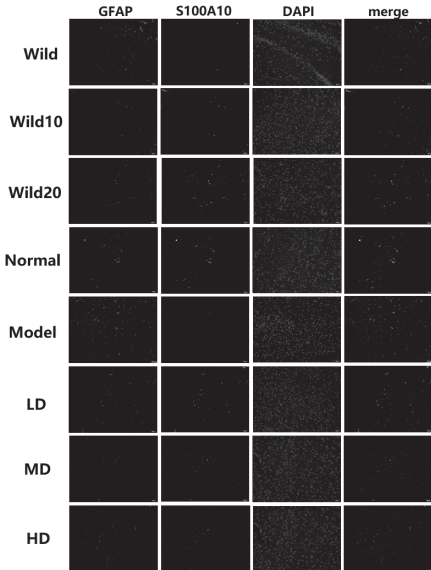


图4 各组小鼠脑组织GFAP与S100A10共表达情况(×200)

与正常对照组比较 ▲ $P<0.05$ ; 与对照组比较 \* $P<0.05$ ; 与模型组比较 # $P<0.05$ , ## $P<0.01$

2.3 各组小鼠脑组织GFAP、C3蛋白表达

蛋白免疫印迹法(Western Blot, WB)检测小鼠脑组织中GFAP、C3的蛋白表达。

2.3.1 GFAP蛋白表达 与对照组相比,对照给药橙皮素两剂量组GFAP表达显著下调( $P<0.01$ ),模型组表达显著上调( $P<0.01$ );与模型组相比,橙皮素低、中、高剂量组表达显著下调( $P<0.01$ ),见图5。

2.3.2 C3蛋白表达 与正常对照组相比,对照组C3表达显著上调( $P<0.01$ );与对照组相比,对照给药橙皮素两剂量组C3表达显著下调( $P<0.01$ ),模型组表达显著上调( $P<0.05$ );与模型组相比,橙皮素低、中、高剂量组表达显著下调( $P<0.05$ ),见图5。

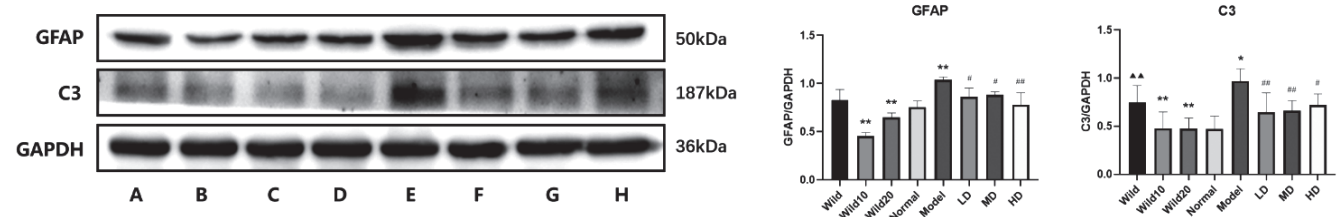


图5 GFAP和C3在小鼠脑组织中的表达

A: Wild; B: Wild10; C: Wild20; D: Normal; E: Model; F: LD; G: MD; H: HD; 与正常对照组比较<sup>△△</sup> $P<0.01$ ; 与对照组比较<sup>\*</sup> $P<0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P<0.01$ ; 与模型组比较<sup>#</sup> $P<0.05$ , <sup>###</sup> $P<0.01$

2.4 各组小鼠脑组织IL-1 $\alpha$ 和TGF- $\beta$ 1含量

ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)法测定小鼠脑组织中IL-1 $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 1含量。与正常对照组相比,对照组IL-1 $\alpha$ 含量升高( $P<0.05$ );对照组TGF- $\beta$ 1含量无显著性差异( $P>0.05$ );与对照组相比,对照给药橙皮素10剂量组IL-1 $\alpha$ 含量显著降低( $P<0.01$ ),对照给药橙皮素两剂量组TGF- $\beta$ 1含量显著升高( $P<0.01$ ),模型组TGF- $\beta$ 1含量显著降低( $P<0.01$ );与模型组相比,橙皮素低、中、高剂量组TGF- $\beta$ 1含量显著升高( $P<0.01$ ),见表1。

表1 各组小鼠脑组织中IL-1 $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 1含量

( $\bar{x}\pm s, n=6, \text{pg/mL}$ )

| 组别     | 剂量(mg/kg/d) | IL-1 $\alpha$                    | TGF- $\beta$ 1                    |
|--------|-------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| Wild   |             | 295.73 $\pm$ 55.38 <sup>△</sup>  | 312.50 $\pm$ 4.27                 |
| Wild10 | 10          | 191.36 $\pm$ 58.45 <sup>**</sup> | 407.50 $\pm$ 7.79 <sup>**</sup>   |
| Wild20 | 20          | 227.93 $\pm$ 43.28               | 602.50 $\pm$ 9.26 <sup>**</sup>   |
| Normal |             | 219.61 $\pm$ 56.78               | 491.67 $\pm$ 34.03                |
| Model  |             | 288.98 $\pm$ 21.72               | 212.50 $\pm$ 4.27 <sup>**</sup>   |
| LD     | 20          | 242.05 $\pm$ 46.72               | 612.50 $\pm$ 14.26 <sup>###</sup> |
| MD     | 40          | 245.85 $\pm$ 60.49               | 420.33 $\pm$ 78.27 <sup>###</sup> |
| HD     | 80          | 232.37 $\pm$ 36.13               | 269.17 $\pm$ 2.02 <sup>###</sup>  |

与正常对照组比较<sup>△</sup> $P<0.05$ ; 与对照组比较<sup>\*\*</sup> $P<0.01$ ; 与模型组比较<sup>###</sup> $P<0.01$

3 讨论

AS在调节脑内稳态和提供神经保护等方面发挥着重要作用<sup>[7]</sup>,它可通过多种途径清除A $\beta$ <sup>[8]</sup>。当中枢神经系统遭受损伤时,AS会发生一系列变化,表现为胞体和突起肥大,胞浆丰富,这一过程被称为反应性星形胶质细胞增生<sup>[7]</sup>。研究发现,神经炎症和缺血可以诱导两种不同类型的反应性星形胶质细胞,分别称为A1和A2<sup>[9]</sup>。A1型反应性星形胶质细胞是促炎细胞,起神经毒性作用,释放炎症因子如白介素1 $\alpha$ (Interleukin 1 $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )和补体成分1q; A2型反应性星形胶质细胞具有神经保护作用,上调神经营养因子如脑源性神经营养因子、神经生长因子、转化生长因子- $\beta$ (Transformation growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )等<sup>[10-11]</sup>。

GFAP是AS的一种中间丝蛋白,参与维持AS的形态和结构,可以了解AS的状态和神经退行性疾病的进展<sup>[12]</sup>。在中枢神经系统受损后GFAP表达上调,并被广泛用作反应性星形胶质细胞增生的标志<sup>[13]</sup>。Nagele等<sup>[14]</sup>使用AD脑样本和小鼠模型的病理学研究发现,A $\beta$ 周围有反应性星形胶质细胞,GFAP的表达增加。课题组前期研究发现,A $\beta$ 在脑内沉积可激活AS,进而释放炎症因子,导致神经元的损伤和死亡<sup>[15]</sup>。本研究结果显示,转基因小鼠和自

然衰老小鼠GFAP表达增加,说明小鼠A $\beta$ 沉积增多使AS活化增多。

补体成分C3作为补体级联的激活基因,是M1小胶质细胞和A1星形胶质细胞之间相互作用中高度上调的基因之一<sup>[16]</sup>。研究表明,在急性神经炎症过程中,小胶质细胞释放的促炎因子增加了AS C3的表达<sup>[17]</sup>。越来越多的证据表明,补体C3存在于神经退行性疾病的患者中,包括阿尔茨海默病、帕金森氏病等<sup>[17]</sup>。有研究发现,在AD小鼠模型中,A $\beta$ 可以激活AS中的NF- $\kappa$ B通路,使C3表达增加<sup>[18]</sup>。前期研究发现橙皮素早期干预可减少体内A $\beta$ ,减少NF- $\kappa$ B<sup>[5]</sup>,推测橙皮素通过降低NF- $\kappa$ B活性,抑制A1型AS活化。S100钙结合蛋白A10(S100 calcium binding protein A10, S100A10)属于钙结合S100蛋白家族的成员,是相对保守的结构蛋白<sup>[19]</sup>。S100A10能够促进中枢神经系统修复,并发挥神经保护作用,减少炎症反应<sup>[20]</sup>。Liddel等<sup>[21]</sup>发现,C3是A1型AS的特异性标记物,而S100A10则是A2型AS特有的标记物。近期有研究证明,适当的治疗干预可以促进AS由A1转化为A2,从而有利于损伤的修复<sup>[22]</sup>。本实验研究显示,橙皮素干预六个月后GFAP/C3共定位阳性细胞数减少,C3表达下调,促炎因子IL-1 $\alpha$ 含量下降;GFAP/S100A10阳性细胞数增加,TGF- $\beta$ 1含量升高,提示橙皮素可以抑制促炎A1型细胞活化,减少促炎因子释放,促进抗炎A2型细胞活化,增加抗炎因子生成,进一步减轻炎症反应。

黄酮类化合物是植物中常见的次生代谢物,其主要特征是抗氧化能力和抗炎作用<sup>[23]</sup>。本研究中的橙皮素是从芸香科柑橘属幼果中提取的一种天然黄酮类化合物,具有抗氧化、抗炎、抗凋亡作用。有研究表明<sup>[24]</sup>,橙皮素通过抑制活性氧介导的氧化应激缓解脂多糖诱导的骨关节炎软骨细胞炎症退变。也有研究发现<sup>[25]</sup>,橙皮素可能通过调控circ0039411/miR-296-5p抑制白介素1 $\beta$ (Interleukin 1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )诱导的白介素6(Interleukin-6, IL-6)、TNF- $\alpha$ 、干扰素 $\gamma$ 水平而改善炎症反应。橙皮素衍生物-14通过减少巨噬细胞产生的促炎细胞因子的表达,如TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-1 $\beta$ ,并上调PPAR- $\gamma$ 的表达,进而减轻炎症<sup>[26]</sup>。

综上所述,本研究结果表明,橙皮素早期干预可以抑制A1型AS活化,同时促进A2型AS细胞的活化。但橙皮素

如何促进A1型向A2型转化,延缓AD进展的治疗机制尚未完全明确,还需要进行更深入的研究来探究这些问题。

## 参考文献

- [1] Esquerda-Canals G, Montoliu-Gaya L, Güell-Bosch J, et al. Mouse Models of Alzheimer's Disease[J]. J Alzheimers Dis, 2017, 57(4): 1171-1183.
- [2] Guo T, Zhang D, Zeng Y, et al. Molecular and cellular mechanisms underlying the pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. Mol Neurodegener, 2020, 15(1): 40.
- [3] 贺晓文, 边竞. 鼠尾草酸通过抑制阿尔茨海默病小鼠脑内炎症反应减少 $\beta$ 淀粉样蛋白沉积的机制[J]. 中国医科大学学报, 2023, 52(7): 590-594, 600.
- [4] Burke AD, Goldfarb D. Diagnosing and Treating Alzheimer Disease During the Early Stage[J]. J Clin Psychiatry, 2023, 84(2): LI21019AH3C.
- [5] 张子龙, 王志成, 董一峰, 等. 橙皮素早期干预对 APPswe/PS1dE9 小鼠学习记忆能力及 TLR2、NF- $\kappa$ B 表达水平的影响[J]. 承德医学院学报, 2020, 37(3): 188-191.
- [6] 王志成. 橙皮素早期干预对APPswe/PS1dE9小鼠学习记忆能力和A $\beta$ 代谢的影响[D]. 承德医学院, 2022.
- [7] Li K, Li J, Zheng J, et al. Reactive Astrocytes in Neurodegenerative Diseases[J]. Aging Dis, 2019, 10(3): 664-675.
- [8] Al-Ghraiyyah NF, Wang J, Alkhalifa AE, et al. Glial Cell-Mediated Neuroinflammation in Alzheimer's Disease[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(18): 10572.
- [9] 李思宇. A1型星形胶质细胞在胆红素诱导的神经毒性作用中的机制研究[D]. 重庆医科大学, 2021.
- [10] Kogel V, Trinh S, Gasterich N, et al. Long-Term Glucose Starvation Induces Inflammatory Responses and Phenotype Switch in Primary Cortical Rat Astrocytes[J]. J Mol Neurosci, 2021, 71(11): 2368-2382.
- [11] Carter SF, Herholz K, Rosa-Neto P, et al. Astrocyte Biomarkers in Alzheimer's Disease[J]. Trends Mol Med, 2019, 25(2): 77-95.
- [12] Salvadó G, Milà-Alomà M, Shekari M, et al. Reactive astrogliosis is associated with higher cerebral glucose consumption in the early Alzheimer's continuum[J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2022, 49(13): 4567-4579.
- [13] Giovannoni F, Quintana FJ. The Role of Astrocytes in CNS Inflammation[J]. Trends Immunol, 2020, 41(9): 805-819.
- [14] Nagele RG, Wegiel J, Venkataraman V, et al. Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease[J]. Neurobiol Aging, 2004, 25(5): 663-674.

- [15] 狄婷婷,王秋杰,张美,等. 胶质细胞对A $\beta$ 诱导的阿尔茨海默病大鼠脑神经损伤的影响[J]. 重庆医学,2015,44(11):1466-1468.
- [16] Schmitz TW, Soreq H, Poirier J, et al. Longitudinal Basal Forebrain Degeneration Interacts with TREM2/C3 Biomarkers of Inflammation in Presymptomatic Alzheimer's Disease[J]. J Neurosci, 2020, 40(9): 1931-1942.
- [17] Zhou R, Chen SH, Zhao Z, et al. Complement C3 Enhances LPS-Elicited Neuroinflammation and Neurodegeneration Via the Mac1/NOX2 Pathway[J]. Mol Neurobiol, 2023, 60(9): 5167-5183.
- [18] Lian H, Yang L, Cole A, et al. NF $\kappa$ B-activated astroglial release of complement C3 compromises neuronal morphology and function associated with Alzheimer's disease[J]. Neuron, 2015, 85: 101-116.
- [19] 辛丹丹,邹晓华,佐满珍,等. S100A10蛋白的表达及其抗体的制备[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2014,30(11):1166-1169.
- [20] 史文哲,宋汉君,罗文哲,等. 大鼠海马区A1/A2型星形胶质细胞在弥漫性脑损伤后的表达变化[J]. 神经疾病与精神卫生,2022,22(12):888-893.
- [21] Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia[J]. Nature, 2017, 541(7638): 481-487.
- [22] 史文哲,罗文哲,宋汉君,等. 大鼠脑外伤后星形胶质细胞及血清中相关蛋白随时间表达变化研究[J]. 陕西医学杂志,2022,51(8):934-938.
- [23] Krysa M, Szymańska-Chargot M, Zdunek A. FT-IR and FT-Raman fingerprints of flavonoids - A review[J]. Food Chem, 2022, 393: 133430.
- [24] 罗善超,唐继仁. 橙皮素抑制氧化应激影响软骨细胞的炎性退变[J]. 中国组织工程研究,2024,28(26):4184-4188.
- [25] 郭玲,王兆领,黄振. 橙皮素通过circ-0039411/miR-296-5p影响IL-1 $\beta$ 诱导的软骨细胞凋亡[J]. 免疫学杂志,2022,38(2):151-156,163.
- [26] Chen X, Ding HW, Li HD, et al. Hesperetin derivative-14 alleviates inflammation by activating PPAR- $\gamma$  in mice with CCl $_4$ -induced acute liver injury and LPS-treated RAW264.7 cells[J]. Toxicol Lett, 2017, 274: 51-63.

(收稿日期:2024-01-17)

## 过表达Beclin1基因对横纹肌肉瘤RD细胞生物学行为的影响

吴恬菲,闫 涵,杨翼维,堵舒桐\*

(大理大学病原生物学实验室,云南大理 671000)

**摘要:** **目的** 本研究旨在探究Beclin1基因调控横纹肌肉瘤RD细胞的机制。**方法** 通过转染技术使Beclin1基因在RD细胞中过表达,将其分为实验组和阴性对照组。运用RT-qPCR及Western Blot分别从mRNA水平和蛋白水平检测Beclin1基因在RD细胞中的表达情况。采用CCK-8实验、细胞划痕愈合实验、Transwell实验以及TUNEL实验分别检测转染前后细胞的增殖、迁移、侵袭和凋亡情况。**结果** 实验组Beclin1基因的mRNA表达量为 $(4.06\pm 0.46)$ ,显著高于阴性对照组( $P=0.008, P<0.01$ ),蛋白表达量为 $(1.84\pm 0.30)$ ,显著高于阴性对照组( $P=0.032, P<0.05$ );根据吸光度值绘制出实验组和阴性对照组的生长曲线,实验组细胞生长水平显著低于阴性对照组( $P<0.05$ );实验组细胞迁移能力明显弱于阴性对照组( $P<0.01$ ),侵袭能力显著弱于阴性对照组( $P<0.01$ ),细胞凋亡率显著高于阴性对照组( $P<0.01$ )。**结论** 自噬调节基因Beclin1过表达可显著促进RD细胞凋亡,抑制RD细胞的增殖、迁移和侵袭能力。

**关键词:** 横纹肌肉瘤;Beclin1;基因过表达;自噬

**中图分类号:** R738.6

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1004-6879(2024)05-0367-06

资助项目:云南省教育厅科学研究基金项目(2024J0833)

\*通讯作者