

· 神经退行性疾病的基础与临床研究专题 ·

APP5 肽美金刚对 SY5Y 细胞神经保护作用的机制探究

吕彩珍 王晓珍 何静 孔玲 王雨欣 张旭 张伟 王蓉

100053 北京,首都医科大学宣武医院中心实验室(吕彩珍、王晓珍、何静、孔玲、王雨欣、张旭、张伟、王蓉); 101400 北京怀柔医院检验科(吕彩珍); 100053 北京,国家老年疾病临床医学研究中心(王蓉)

通信作者: 王蓉, Email: rong_wang72@aliyun.com

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2025.07.005

【摘要】 **目的** 探讨新设计合成的化合物 APP5 肽美金刚(RERMS-MEM)对 L-谷氨酸(L-glu)诱导的 SY5Y 细胞损伤的神经保护作用。**方法** SY5Y 细胞无菌培养,以高浓度的 L-glu(10 mM)建立损伤模型,自行设计并合成 RERMS-MEM, MTT 法初步筛选药物作用的有效浓度之后,分为阴性对照组、L-glu 组、L+RM 组(L-glu+RERMS-MEM)、L+M 组(L-glu+MEM)。采用 MTT 法检测各组细胞存活率,乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒检测细胞上清中 LDH 漏出率,蛋白免疫印迹法检测各组神经生长因子(NGF)、脑源性神经营养因子(BDNF)蛋白的表达情况,实时荧光定量 PCR 技术检测 NGF、BDNF mRNA 的表达情况,DCFH-DA 试剂盒检测各组活性氧(ROS)的表达情况。**结果** MTT 法检测 RERMS-MEM 对 L-glu 损伤的 SY5Y 细胞存活率的影响结果显示, L-glu 组细胞存活率为(74.89 ± 4.94)%, 低于阴性对照组细胞存活率(100.00 ± 5.01)%, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与 L-glu 组比较, L+RM 组 1、5、10、20 μ M 的细胞存活率分别为(86.40 ± 14.81)%、(90.24 ± 5.87)%、(90.47 ± 8.10)%、(91.84 ± 11.6.0)%, 呈现出细胞存活率随 RERMS-MEM 剂量依赖性增长的趋势, 其中在 5、10、20 μ M 干预时, 与 L-glu 组比较, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。与 L-glu 组比较, L+M 组低浓度(1、5、10 μ M)时, 细胞存活率有一定的提高, 但差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$); 20 μ M 干预时, 细胞存活率降低为(61.37 ± 10.32)%, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 最终选定 5 μ M 作为 RERMS-MEM 和 MEM 的干预剂量。Muse 细胞仪检测结果显示, 与对照组比较, L-glu 组活细胞数目明显减少, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 与 L-glu 组比较, L+RM 组 RERMS-MEM 干预后活细胞数目明显增多, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 而 L+M 组 MEM 干预后, 活细胞数目较 L+RM 组干预后增加较少且差异无统计学意义($P > 0.05$)。LDH 检测结果表明, 与对照组比较, L-glu 组 LDH 漏出率明显提升, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 与 L-glu 组比较, L+RM 组的 LDH 漏出率显著降低, 差异有统计学意义($P < 0.01$), L+M 组 LDH 漏出率也降低, 但差异无统计学意义($P > 0.05$); Western Blot 和 RT-qPCR 检测结果表明, 与对照组比较, L-glu 组 NGF 蛋白和 mRNA 相对表达量均显著下降, 差异有统计学意义(均 $P < 0.05$); 与 L-glu 组比较, L+RM 组、L+M 组表达量均显著升高, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$), 且 L+RM 组较 L+M 组, NGF 蛋白和 mRNA 表达量更高。BDNF 检测结果显示, L+M 组与 L-glu 组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$); mRNA 相对表达量升高不明显, L+M 组与 L-glu 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$); 与对照组比较, 2 种方法检测的 L-glu 组 ROS 表达量均显著提升, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与 L-glu 组比较, L+RM 组、L+M 组 ROS 表达均显著下降, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$), 其中 L+RM 组下降更明显; 与对照组比较, L-glu 组细胞总凋亡率明显上升, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 与 L-glu 组比较, L+RM 组、L+M 组细胞总凋亡率均明显下降, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。**结论** 自行设计并合成的 RERMS-MEM 与 MEM 比较, 在体外具有良好的神经保护作用, 同时具有较低的细胞毒性作用; RERMS-MEM 发挥神经保护作用可能是通过抑制细胞凋亡、氧化应激损伤, 以及提高神经营养因子的表达来实现。

【关键词】 阿尔茨海默病; L-谷氨酸; APP5 肽美金刚; 活性氧; 神经生长因子; 细胞存活率; SY5Y

基金项目: 国家重点研发计划(2022YFC2403500)

Study on the mechanism of neuroprotective effect of APP5-mer Peptide Memantine on SY5Y

Lyu Caizhen, Wang Xiaozhen, He Jing, Kong Ling, Wang Yuxin, Zhang Xu, Zhang Wei, Wang Rong
Central Laboratory, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China (Lyu CZ, Wang XZ,
He J, Kong L, Wang YX, Zhang X, Zhang W, Wang R); Department of Clinical Laboratory, Beijing Huairou
Hospital, Beijing 101400, China (Lyu CZ); National Clinical Research Center for Geriatrics, Beijing 100053,
China (Wang R)

Corresponding author: Wang Rong, Email: rong_wang72@aliyun.com

【Abstract】 Objective To explore the neuroprotective effect of APP5-mer Peptide Memantine (RERMS-MEM) on glutamate-induced injury of SY5Y cells. **Methods** SY5Y cells were cultured aseptically, and the injury model was established with high concentration of L-glutamic acid (10 mM). RERMS-MEM was self-designed and synthesized. After screening the effective concentration of drugs by MTT method, SY5Y cells were divided into control group, L-glu injury group, L+RM group (L-glu+RERMS-MEM) and L+M group (L-glu+MEM). MTT assay was used to detect the survival rate of cells, LDH kit was used to detect the leakage rate of LDH in supernatant, Western blot was used to detect the expression of nerve growth factor (NGF) and BDNF protein, real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect the expression of NGF and BDNF mRNA, DCFH-DA kit was used to detect the expression of reactive oxygen species (ROS) in each group. **Results** MTT assay was used to detect the effect of RERMS-MEM on the survival rate of SY5Y cells damaged by L-glu. Compared with control group [cell survival rate was $(100.00 \pm 5.01) \%$], the cell survival rate decreased to $(74.89 \pm 4.94) \%$ in L-glu group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with L-glu group, the survival rate of cells treated with RERMS-MEM at 1, 5, 10 and 20 μM was $(86.40 \pm 14.81) \%$, $(90.24 \pm 5.87) \%$, $(90.47 \pm 8.10) \%$ and $(91.84 \pm 11.60) \%$, respectively, showing a dose-dependent increase in cell survival rate with RERMS-MEM, and the difference was statistically significant at 5, 10, and 20 μM intervention (all $P < 0.05$). Compared with L-glu group, the cell survival rate of L+M group at low concentration (1, 5, 10 μM) was improved, but the difference was not statistically significant (all $P > 0.05$). After 20 μM intervention, the cell survival rate was significantly reduced to $(61.37 \pm 10.32) \%$, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Finally, 5 μM was selected as the intervention dose of RERMS-MEM and MEM. The results of Muse cell analyzer showed that the number of living cells in the L-glu group was significantly lower than that in the control group ($P < 0.01$). Compared with the L-glu group, the number of living cells in the L+RM group was significantly increased after RERMS-MEM intervention, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). After MEM intervention in L+M group, the number of living cells increased less than that in L+RM group, and the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). LDH test results showed that compared with the control group, the LDH leakage rate of the L-glu group was significantly increased, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). Compared with the L-glu group, the LDH leakage rate of the L+RM group was significantly reduced, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). The LDH leakage rate of the L+M group was also reduced, but the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). The results of Western Blot and RT-qPCR showed that compared with the control group, the relative expression of NGF protein and mRNA in the L-glu group was significantly decreased, and the difference was statistically significant (all $P < 0.05$). Compared with the L-glu group, the expression levels of L+RM group and L+M group were significantly increased, and the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). And the L+RM group showed higher NGF protein and mRNA expression levels compared to the L+M group. BDNF detection results indicated a statistically significant difference between the L+M group and the L-glu group ($P < 0.05$). The relative mRNA expression level was not significantly increased, but the difference between the L+M group and the L-glu group was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the control group, ROS expression levels in the L-glu group were significantly elevated by two detection methods, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the L-glu group, ROS expression in both the L+RM group and the L+M group was reduced, and the difference was statistically significant (both $P < 0.05$), and the reduction was more pronounced in the L+RM group. Compared with the control group, the total cell apoptosis rate in the L-glu group was increased, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). Compared with the L-glu group, the total cell apoptosis rates in both the L+RM group and the L+M group were reduced, and the difference was statistically significant (both $P < 0.01$). **Conclusions** APP5-mer Peptide memantine has better neuroprotective effect and lower cytotoxicity in vitro than memantine. The neuroprotective effect of RERMS-MEM may be realized by inhibiting apoptosis, oxidative stress injury and increasing the expression of neurotrophic factors.

【Key words】 Alzheimer disease; L-glu; APP5-mer Peptide Memantine; Reactive oxygen species; Nerve growth factor; Cell survival rate; SY5Y

Fund program: National Key Research and Development Plan (2022YFC2403500)

AD是全球范围内最常见的痴呆类型。据《2021年全球阿尔茨海默病报告》估计,全世界有超过5 500万人患有痴呆症,预计到2030年将达到7 800万。我国作为一个经济飞速发展的人口大国,形势同样十分严峻^[1]。截止到2019年,我国已有超过1 000万人患有AD,居世界首位^[1]。AD病程较长,有多种并发症,需长期被护理,给家庭和社会带来了沉重的负担^[2]。作为一种慢性、进行性的中枢神经系统退行性疾病,AD以细胞外 β 淀粉样蛋白(amyloid- β -peptide, A β)沉积形成的老年斑和细胞内过度磷酸化的Tau蛋白形成的神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFT)为主要病理特征,主要表现为学习、记忆及解决日常问题能力的下降,随着病程发展,AD患者会逐渐丧失自理能力^[3]。谷氨酸兴奋性毒性学说是AD重要的发病机制之一。谷氨酸作为中枢神经系统重要的兴奋性神经递质,细胞外浓度的急剧升高会产生兴奋性毒性损害^[4]。生理条件下,神经和胶质细胞能够控制突触间隙的谷氨酸浓度在一个正常水平;但是当疾病发生时,细胞外谷氨酸受体[尤其是N-甲基-D-天冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartate receptors, NMDAR)]会被过度激活,导致离子通道和信号发生改变,钙离子超载^[5],细胞内钙超载会导致线粒体膜通透性转换孔开放,产生大量的自由基并抑制磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)的磷酸化^[6],激活细胞凋亡通路^[7],引发兴奋性毒性^[8-9]以及大量的活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生。NMDAR是一种谷氨酸受体,介导兴奋性神经传递与突触可塑性,其拮抗剂盐酸美金刚(Memantine, MEM)是目前治疗AD的有效药物,但会出现幻觉、躁动、头晕、头痛和疲劳等不良反应^[10]。

人神经母细胞瘤SH-SY5Y分化细胞系来源于骨髓,是一种常用的研究氧化应激致神经元死亡的细胞模型。正常条件下,该细胞繁殖快,性状稳定。因其细胞的形态、生理、生化性质与神经元相似,被广泛应用于神经系统疾病的研究^[11]。现阶段AD药物研发大多趋于多靶点药物研究, MEM可能具有一定的局限性。经课题组前期实验证实, APP5肽(RERMS)具有神经营养作用^[12],因此将两者结合起来,试图改善MEM单一靶点治疗的不足,为AD及其他神经系统疾病患者带来新的希望。药物合成初期本课题组观察了RERMS-MEM的作用,发现其能够提高SY5Y细胞活性,抑制凋亡^[13]。本项研究拟在L-谷氨酸(L-glu)诱导的SY5Y细胞损伤模型中探究RERMS-MEM的神经保护作用,希望通过体外研

究证实RERMS-MEM能够保持MEM的药物活性作用兼具RERMS的神经保护功效,减弱MEM的不良反应,并初步探究其发挥作用的机制。

一、材料与方法

1.材料及仪器:(1)细胞。SH-SY5Y细胞系由瑞典卡罗琳斯卡研究所的Winblad教授和裴进京博士惠赠。(2)主要药物及试剂。包括DMEM高糖培养基和胎牛血清(康宁,美国)、L-glu(Sigma,美国)、MTT细胞增殖及毒性检测试剂盒(Elabscience公司)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)检测试剂(南京建成,中国)、ROS检测试剂(索莱宝,中国)、Oxidative Stress Kit、Annexin V & Dead Cell Kit、Muse Count & Viability Kit、Muse System Check Kit(Luminex,美国)、兔抗神经生长因子(nerve growth factor, NGF)抗体(abcam,美国)、兔抗脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)抗体(abcam,美国)、 β -actin抗体(Immunoway,美国)。(3)仪器。全波长酶标仪、Muse全能细胞质控仪(Thermo,美国)、倒置相差显微镜(Olympus,美国)、电泳仪、电泳槽(Bio-Rad,美国)、凝胶成像仪及成像系统(Alpha,美国)、荧光定量PCR仪(罗氏,瑞士)。

2.实验方法:(1)细胞培养。SY5Y细胞使用含FBS的DMEM高糖培养基,在37℃、5% CO₂培养箱培养,2~3 d换液1次,待细胞长满85%~90%时用0.25%的含乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)的胰酶消化传代,待细胞生长到对数生长期,接种于培养孔板。(2)化合物RERMS-MEM的制备。参照专利《一种美金刚衍生物、其制备方法及应用》^[13]。(3)RERMS-MEM干预浓度的确定。按照前期摸索出的L-glu损伤SY5Y细胞的条件^[14],采用10 mM的L-glu处理SY5Y细胞24 h后,分别将RERMS-MEM和MEM按照1、5、10、20 μ M分组干预24 h, MTT法检测各组细胞存活率,选定合适的RERMS-MEM干预浓度。(4)细胞分组及处理。实验分为4组。NC组(阴性对照组):加入含相应溶媒的无血清培养基; L-glu组(L-glu损伤组):待细胞贴壁后,采用终浓度为10 mM的L-glu的无血清培养基等量替代原培养基作用24 h; L+RM组(L-glu+RERMS-MEM):先用终浓度为10 mM的L-glu处理24 h后,将培养基替换为终浓度为5 μ M的RERMS-MEM无血清培养基继续干预24 h; L+M组(L-glu+MEM):干预药物由RERMS-MEM改为MEM,其余处理同L+RM组。(5)MTT法检测细胞存活率。将SY5Y细胞以 3×10^4 /ml的密度接种于96孔板,每组设置5个复孔,待细胞处理完毕后,每孔加入50 μ l MTT工作

液, 37℃, 5% CO₂培养箱中避光孵育4 h, 待MTT被还原为甲臜, 吸弃上清, 每孔加入150 μl的二甲基亚砜(DMSO), 振荡摇匀, 使甲臜全部溶解, 在570 nm波长处检测各孔OD值。实验分组同(4), 按照以下公式计算细胞存活率: 细胞存活率(%)=(处理孔OD-空白孔OD)/(对照孔OD-空白孔OD)×100%。(6)检测细胞上清中LDH漏出率。每板需设置空白孔和标准孔各2个, 每个样品均需设置测定孔和对照孔各3个, 在450 nm波长下检测各孔OD值, 按以下公式计算LDH漏出率: 细胞上清LDH活性(U/L)=(测定OD-对照OD)/(标准OD-空白OD)×标准品浓度(0.2 μmol/ml)×1 000。(7)Western Blot法测定细胞内NGF、BDNF的表达。将SY5Y细胞以5×10⁵/ml的密度接种于6孔板, 分组同(4), 待达到药物作用时间, 吸弃培养基, PBS轻轻洗2遍, 冰上裂解15 min, 收集于1.5 ml离心管, 12 000 r/min, 4℃条件下离心10 min, 收集上清。BCA法检测各组细胞蛋白浓度, 加入相应体积的Loading Buffer, 混匀后用金属浴95℃ 5 min煮蛋白, 使其充分变性, 分装后置于-20℃保存。采用聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜, 5%的脱脂奶粉封闭90 min, 一抗孵育过夜(NGF、BDNF、β-actin的稀释比例依次为1:1 000、1:500、1:500), TBST洗膜, 孵育相应种属的二抗, 洗膜, 配制并滴加适量的ECL发光液, 曝光。(8)RT-qPCR检测细胞内NGF、BDNF mRNA的表达。种板及分组同(4), 达到药物作用时间后, PBS洗2遍, 加入Trizol溶液, 充分吹打, 收集细胞, 加入相应的氯仿, 提取细胞总RNA, 用逆转录试剂盒将RNA逆转录为cDNA。以合成的cDNA第一链为模板进行实时荧光定量PCR, 不同的引物依据解链温度选择相应的退火温度, 实时测定基因扩增过程中产生的荧光, 以达到指数扩增时特定荧光值的循环周数(Ct值)表示目的基因mRNA的表达量。以β-actin为内参基因, 以2^{-ΔΔCt}法计算目的基因的相对表达量。(9)DCFH-DA法检测细胞内ROS表达量。种板及分组同(4), 达到药物作用时间后, 吸弃原培养基, 用无血清培养基反复吹打混匀, 收集细胞悬液。500 r/min离心5 min, 吸净上清, 用无菌PBS洗2次, 重悬细胞, 每管加入探针, 使其终浓度为10 μM(阴性对照组不加), 37℃避光孵育1 h, 每隔3~5 min颠倒混匀。收集细胞, 1 000 r/min离心, 吸弃上清, PBS洗2次, 收集沉淀。PBS重悬细胞, 立即用荧光酶标仪检测。(10)Muse细胞仪检测细胞活力、细胞总凋亡率、细胞ROS阳性百分比。检测前先使用Muse System Check Kit检测, 通过后方可使用。实验分组及处理同(4), 依照3种

实验说明书要求, 采用合适的试剂制备相应浓度的细胞悬液, 待处理完毕上机进行检测。

3.统计学方法: 所有数据均采用SPSS 20.0统计分析软件进行数据处理。采用Shapiro-Wilk法进行正态分布检验, 符合正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组间比较用独立样本 t 检验, 多组间比较用单因素方差分析, 事后两两比较采用LSD- t 法检验。双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

1. RERMS-MEM对L-glu损伤的SY5Y细胞活性的影响: 与NC组比较, L-glu组细胞存活率降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与L-glu组比较, L+RM组1、5、10、20 μM的RERMS-MEM作用24 h, 细胞存活率总体呈现出随给药浓度增大而增高的趋势, 其中5、10、20 μM作用时差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$), 且细胞存活率变化不明显, 结合细胞的生长情况以及给药剂量能少则少的原则选择5 μM作为后续RERMS-MEM的给药浓度; 与L-glu组比较, L+M组低浓度(1、5、10 μM)时, 细胞存活率有一定的提高, 但差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$); 20 μM干预时, 细胞存活率出现明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 这进一步验证了大剂量MEM使用时具有一定的细胞毒作用。见表1、图1。综合以上结果以及给药剂量的考虑, 选择5 μM的RERMS-MEM和MEM处理24 h定为药物的干预条件。接下来, 采用Muse活细胞数目检测和细胞上清液中LDH漏出率来进一步验证RERMS-MEM和MEM对谷氨酸损伤细胞活性的影响。Muse细胞仪检测结果显示, 与NC组比较, L-glu组活细胞数目明显减少, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 与L-glu组比较, L+RM组RERMS-MEM干预后活细胞数目明显增多, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 而L+M组MEM干预后, 活细胞数目较L+RM组干预后增加较少且差异无统计学意义($P > 0.05$), 提示RERMS-MEM在体外实验中的神经营养作用可能优于MEM(表2, 图1A、B)。LDH检测结果显示, 与NC组比较, L-glu组LDH漏出率明显提升, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 与L-glu组比较, L+RM组的LDH漏出率显著降低, 差异有统计学意义($P < 0.01$), L+M组LDH漏出率也降低, 但差异无统计学意义($P > 0.05$), 说明2种药物均能减弱L-glu的细胞毒性作用, RERMS-MEM作用更加明显(表3, 图1C)。

2. RERMS-MEM通过促进神经营养因子的表达来发挥神经保护作用: Western Blot和RT-qPCR检测

表1 4组SY5Y细胞存活率比较(% , $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 样本量 | 细胞存活率 | F值 | P值 |
|------------|-----|----------------------------|-------|-------|
| NC组 | 3 | 100.00 ± 5.01 | | |
| L-glu组 | 3 | 74.89 ± 4.94 ^a | | |
| L+RM组(μ M) | | | 6.962 | 0.001 |
| 1 | 3 | 86.40 ± 14.81 | | |
| 5 | 3 | 90.24 ± 5.87 ^b | | |
| 10 | 3 | 90.47 ± 8.10 ^b | | |
| 20 | 3 | 91.84 ± 11.60 ^b | | |
| L+M组(μ M) | | | | |
| 1 | 3 | 86.84 ± 11.03 | | |
| 5 | 3 | 78.66 ± 10.45 | | |
| 10 | 3 | 77.83 ± 3.29 | | |
| 20 | 3 | 61.37 ± 10.32 ^b | | |

注: NC 阴性对照; L+RM L-glu+RERMS-MEM; L+M L-glu+MEM; MEM 美金刚; RERMS-MEM APP5 肽美金刚; 与NC组比较, ^a*P* < 0.05; 与L-glu组比较, ^b*P* < 0.05

表2 RERMS-MEM对谷氨酸损伤的SY5Y细胞活细胞数目的影响(% , $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 样本量 | 活细胞百分比 |
|--------|-----|---------------------------|
| NC组 | 3 | 76.50 ± 0.89 |
| L-glu组 | 3 | 65.07 ± 1.65 ^a |
| L+RM组 | 3 | 73.77 ± 1.36 ^b |
| L+M组 | 3 | 68.57 ± 3.19 |
| F值 | | 20.316 |
| P值 | | < 0.001 |

注: NC 阴性对照; L+RM L-glu+RERMS-MEM; L+M L-glu+MEM; MEM 美金刚; RERMS-MEM APP5 肽美金刚; 与NC组比较, ^a*P* < 0.05; 与L-glu组比较, ^b*P* < 0.05

表3 RERMS-MEM对谷氨酸损伤的SY5Y细胞LDH漏出率的影响(U/L, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 样本量 | LDH漏出率 |
|--------|-----|-----------------------------|
| NC组 | 3 | 386.87 ± 46.02 |
| L-glu组 | 3 | 768.03 ± 66.16 ^a |
| L+RM组 | 3 | 539.76 ± 38.86 ^b |
| L+M组 | 3 | 670.33 ± 71.69 |
| F值 | | 24.931 |
| P值 | | < 0.001 |

注: LDH 乳酸脱氢酶; NC 阴性对照; L+RM L-glu+RERMS-MEM; L+M L-glu+MEM; MEM 美金刚; RERMS-MEM APP5 肽美金刚; 与NC组比较, ^a*P* < 0.05; 与L-glu组比较, ^b*P* < 0.05

结果显示, 与NC组比较, L-glu组NGF蛋白和mRNA相对表达量均显著下降, 差异均有统计学意义(均*P* < 0.05); 与L-glu组比较, L+RM组、L+M组表达量均显著升高, 差异均有统计学意义(均*P* < 0.05), 且L+RM组较L+M组, NGF蛋白和mRNA表达量更高(表4、图2、表5)。BDNF检测结果显示, L+M组与L-glu

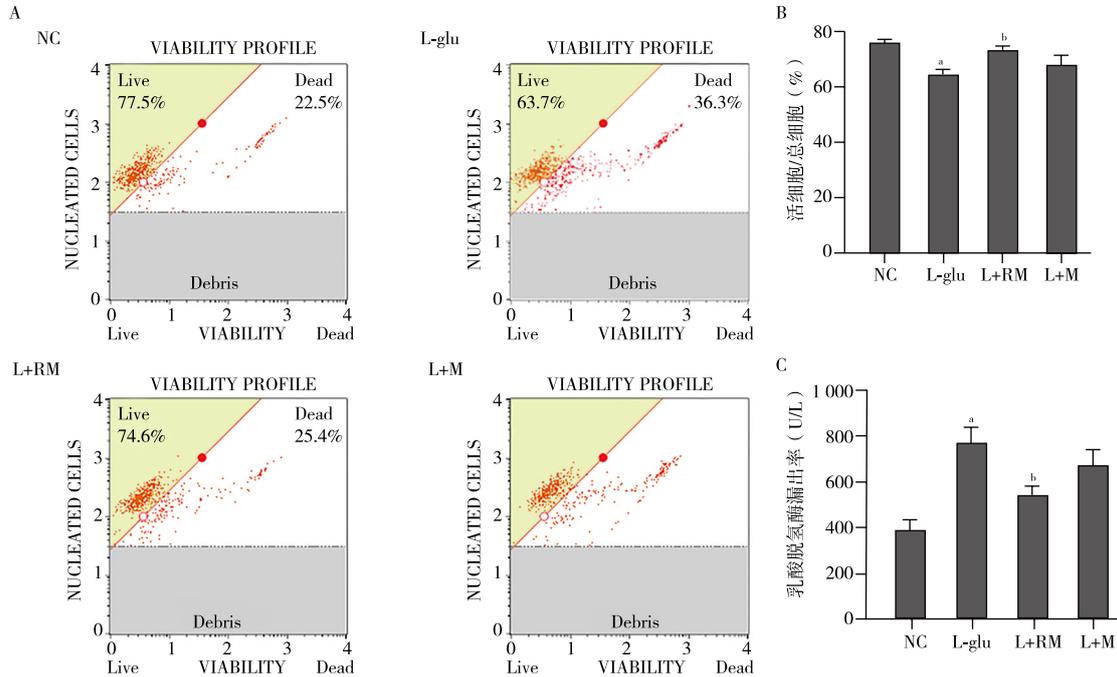
组比较, 差异有统计学意义(*P* < 0.05); mRNA相对表达量升高不明显, L+M组与L-glu组比较差异有统计学意义(*P* < 0.05)(表6)。

3. RERMS-MEM通过抑制细胞ROS表达来发挥神经保护作用: 与NC组比较, 2种方法检测的L-glu组ROS表达量均提升, 差异均有统计学意义(均*P* < 0.05); 与L-glu组比较, L+RM组、L+M组ROS表达均显著下降, 差异均有统计学意义(均*P* < 0.05), 其中L+RM组下降更明显(表7、表8、图3)。

4. RERMS-MEM通过抑制细胞凋亡来发挥神经保护作用: 与NC组比较, L-glu组细胞总凋亡率上升, 差异有统计学意义(*P* < 0.01), 与L-glu组比较, L+RM组、L+M组细胞总凋亡率均下降, 差异有统计学意义(均*P* < 0.01)(表9、图4)。

讨论 AD是一种不可逆的神经系统退行性疾病, 是痴呆中发病率最高的一种疾病^[15]。发病后, 患者记忆和认知能力会呈现出进行性下降, 这与大脑皮层和海马神经元的变性死亡有关^[16]。作为痴呆症中最常见的一种类型, AD的平均存活年限仅5.9年, 加之患者晚期大多失去生活自理能力, 易出现并发症导致死亡, 给家庭和社会带来极大的经济和精神压力^[17], 其已经成为一个重要的公共健康问题, 急需引起全球医务和科研工作者的重视。其发病机制复杂, 目前仍不十分清楚, 谷氨酸兴奋性毒性是其中重要的一项。本研究采用高浓度的谷氨酸处理细胞, 试图在体外模拟细胞凋亡、氧化应激、兴奋性毒性过程, 以探究RERMS-MEM干预后的效果和作用机制。研究结果显示, 经L-glu作用后, SY5Y细胞活力降低, 细胞LDH活性升高, 总凋亡率上升, ROS表达上升, 与Hu等^[18]和Terzioğlu等^[19]的研究结果一致, 因此可认为本研究的细胞模型能大致模拟AD在体外的病理状态。

AD的治疗目前主要是缓解症状, 改善认知功能和潜在的神经退变。药物研发主要集中于以下几个方向: 增强认知功能、改善神经精神症状、减轻Aβ、Tau蛋白的形成以及神经炎症反应^[20]。MEM是一种具有中等亲和力的非竞争性NMDAR拮抗剂, 是这类药物中唯一被批准用于治疗中重度AD的成员, 在一定程度上能够延缓认知功能下降, 控制行为表现^[21]。寻找能够减轻NMDAR过度激活的配体可能成为治疗兴奋性毒性的有用工具。这提示以MEM为代表的NMDAR拮抗剂在对抗AD的过程中有着巨大潜力, 但是在实验和使用过程中会出现一些不良反应。本课题组以前期研究具有神经营养作用的RERMS为依托, 联合MEM, 通过逐步脱水



注: A为Muse细胞仪检测各组活细胞数目的示例图; B为Muse细胞仪检测各组活细胞数日统计图; C为各组细胞上清液中LDH漏出率; NC 阴性对照; L+RM L-glu+RERMS-MEM; L+M L-glu+MEM; MEM 美金刚; RERMS-MEM APP5 肽美金刚; 与NC组比较, ^a*P* < 0.05; 与L-glu组比较, ^b*P* < 0.05; NUCLEATED CELLS 有核细胞数; VIABILITY PROFILE 细胞活力占比; Live 活细胞占比; Dead 死细胞占比; Debris 细胞碎片

图1 RERMS-MEM对谷氨酸损伤的SY5Y细胞活力的影响

表4 4组细胞NGF蛋白相对表达比较(NGF/β-actin, $\bar{x} \pm s$)

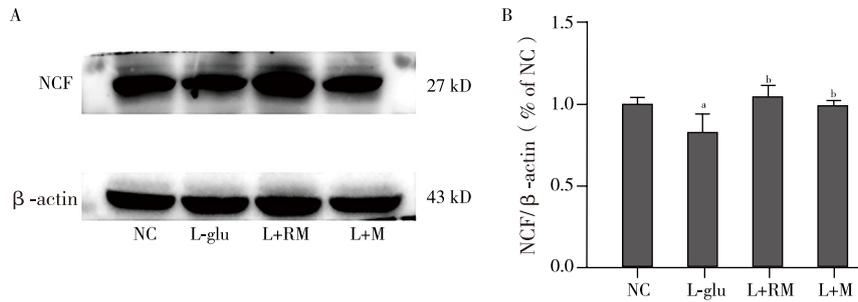
| 组别 | 样本量 | NGF相对表达量 |
|------------|-----|--------------------------|
| NC组 | 3 | 1.00 ± 0.04 |
| L-glu组 | 3 | 0.83 ± 0.11 ^a |
| L+RM组 | 3 | 1.05 ± 0.07 ^b |
| L+M组 | 3 | 1.00 ± 0.03 ^b |
| <i>F</i> 值 | | 5.580 |
| <i>P</i> 值 | | 0.023 |

注: NGF 神经生长因子; NC 阴性对照; L+RM L-glu+RERMS-MEM; L+M L-glu+MEM; MEM 美金刚; RERMS-MEM APP5 肽美金刚; 与NC组比较, ^a*P* < 0.05; 与L-glu组比较, ^b*P* < 0.05

缩合反应,自行设计并合成了RERMS-MEM,试图改善这一缺陷。结果显示,在L-glu损伤的SY5Y细胞研究上发现其能够提高细胞存活率,而且即使在大剂量使用时,依然具有不错的效果,而MEM在大剂量给药时,细胞存活率是降低的,因此我们推测RERMS-MEM治疗AD或许更有优势。

本课题组前期研究表明,RERMS具有良好的神经营养作用^[12]。它通过调节NGF和神经元信号转导通路的表达,抑制凋亡,促进神经元生长。P165作为RERMS活性最强且能抗胃蛋白酶消化的最优秀代表,能刺激胰岛素通路相关蛋白IRS-1和PI3K表达,从而减少LDH释放并提高细胞活力;在体内试验中,P165通过增加突触前突触素和PSD-95并

减少突触核蛋白聚集来保护突触丢失,提高大鼠的学习记忆能力^[22]。NGF对于神经系统的稳定发挥重要作用,哺乳动物体内有4种内源性神经营养素:NGF、BDNF、神经营养因子3(neurotrophin-3, NT-3),神经营养因子4(neurotrophin-4, NT-4),它们激活酪氨酸激酶受体家族中的1个或多个成员:酪氨酸激酶A(Tropomyosin receptor kinase A, TrkA)、酪氨酸激酶B(Tropomyosin receptor kinase B, TrkB)和酪氨酸激酶C(Tropomyosin receptor kinase C, TrkC)受体从而发挥相应的作用。NGF是最先被报道的神经营养因子,能够促进神经元的生长、分化和存活。Xu等^[23]研究显示,缺乏NGF会引起小鼠脑内Aβ聚集,Tau蛋白磷酸化和突触功能障碍。本研究发现,SY5Y细胞经L-glu损伤后,NGF mRNA和蛋白表达均下降。在给予RERMS-MEM干预后,NGF表达增加,MEM干预之后效果不明显,这说明RERMS-MEM保留了RERMS的神经营养作用,在动物和人体内或可重塑神经突触间的联系,恢复学习和记忆功能。与此类似,在原代培养的海马神经元中,敲除NGF或BDNF后,Aβ的产生增加^[24]。姚教授团队对美金刚的研究结果表明,MEM可使TrkA的磷酸化增加,并进一步激活其下游的c-Raf和ERK1/2等蛋白的磷酸化,从而活化了促进细胞分化和生存的ERK信号



注: A为蛋白免疫印迹法检测各组NGF蛋白表达情况; B为各组细胞NGF蛋白相对表达量统计图; NC 阴性对照; L+RM L-glu+RERMS-MEM; L+M L-glu+MEM; MEM 美金刚; RERMS-MEM APP5 肽美金刚; NGF 神经生长因子; 与 NC 组比较, ^a*P* < 0.05; 与 L-glu 组比较, ^b*P* < 0.05

图2 RERMS-MEM 和 MEM 干预对 NGF 相对表达量的影响(*n*=3)

表5 4组细胞NGF mRNA相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 样本量 | NGF mRNA 相对表达量 |
|--------|-----|--------------------------|
| NC组 | 3 | 1.00 ± 0.00 |
| L-glu组 | 3 | 0.74 ± 0.03 ^a |
| L+RM组 | 3 | 1.47 ± 0.04 ^b |
| L+M组 | 3 | 1.14 ± 0.06 ^b |
| F值 | | 170.836 |
| P值 | | < 0.001 |

注: NGF 神经生长因子; NC 阴性对照; L+RM L-glu+RERMS-MEM; L+M L-glu+MEM; MEM 美金刚; RERMS-MEM APP5 肽美金刚; 与 NC 组比较, ^a*P* < 0.05; 与 L-glu 组比较, ^b*P* < 0.05

表6 4组细胞BDNF mRNA相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 样本量 | BDNF mRNA 相对表达量 |
|--------|-----|--------------------------|
| NC组 | 3 | 1.00 ± 0.00 |
| L-glu组 | 3 | 0.79 ± 0.15 ^a |
| L+RM组 | 3 | 1.40 ± 0.21 ^b |
| L+M组 | 3 | 1.13 ± 0.06 ^b |
| F值 | | 11.441 |
| P值 | | 0.003 |

注: BDNF 脑源性神经生长因子; NC 阴性对照; L+RM L-glu+RERMS-MEM; L+M L-glu+MEM; MEM 美金刚; RERMS-MEM APP5 肽美金刚; 与 NC 组比较, ^a*P* < 0.05; 与 L-glu 组比较, ^b*P* < 0.05

表7 4组细胞ROS相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 样本量 | ROS% |
|--------|-----|--------------------------|
| NC组 | 3 | 1.00 ± 0.07 |
| L-glu组 | 3 | 2.17 ± 0.04 ^a |
| L+RM组 | 3 | 1.29 ± 0.02 ^b |
| L+M组 | 3 | 1.18 ± 0.08 ^b |
| F值 | | 243.549 |
| P值 | | < 0.001 |

注: ROS 活性氧; NC 阴性对照; L+RM L-glu+RERMS-MEM; L+M L-glu+MEM; MEM 美金刚; RERMS-MEM APP5 肽美金刚; 与 NC 组比较, ^a*P* < 0.05; 与 L-glu 组比较, ^b*P* < 0.05

表8 4组细胞ROS阳性表达量比较(% , $\bar{x} \pm s$)

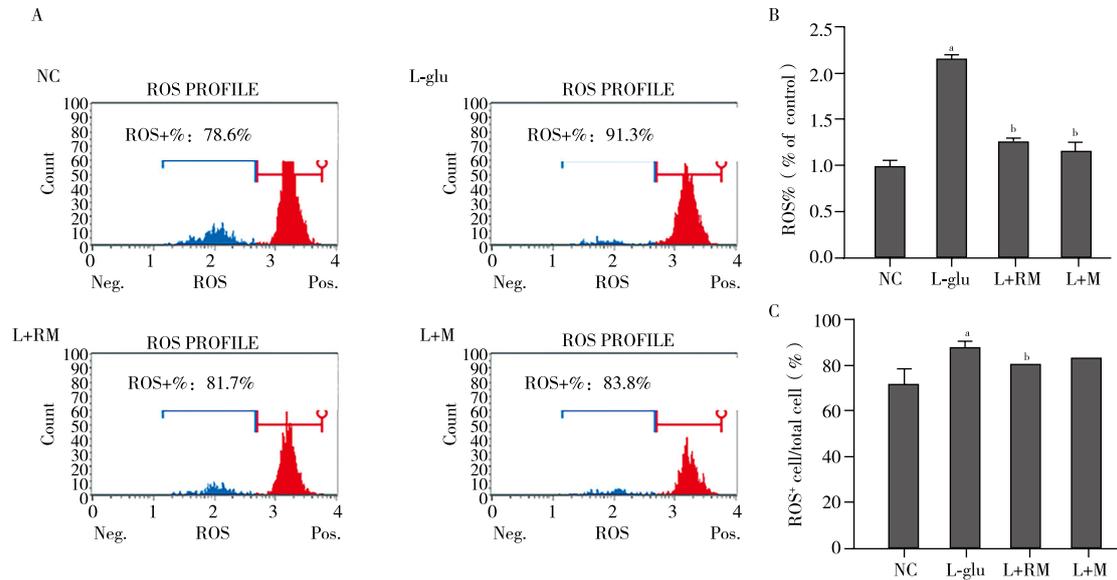
| 组别 | 样本量 | ROS 阳性率 |
|--------|-----|---------------------------|
| NC组 | 3 | 72.32 ± 6.57 |
| L-glu组 | 3 | 88.86 ± 2.19 ^a |
| L+RM组 | 3 | 81.71 ± 0.02 ^b |
| L+M组 | 3 | 83.82 ± 0.01 |
| F值 | | 11.988 |
| P值 | | 0.002 |

注: ROS 活性氧; NC 阴性对照; L+RM L-glu+RERMS-MEM; L+M L-glu+MEM; MEM 美金刚; RERMS-MEM APP5 肽美金刚; 与 NC 组比较, ^a*P* < 0.05; 与 L-glu 组比较, ^b*P* < 0.05

转导通路^[25]。BDNF的研究也显示出相似的结果, 临床研究表明, 随着疾病的进展, AD患者大脑^[26]、

血液^[27]和脑脊液^[28]中的BDNF水平均下降。在AD患者死后海马样本中, BDNF mRNA减少, 这表明BDNF可能参与了AD神经元的进行性萎缩^[29]。较多用于AD治疗的药物均会影响BDNF水平^[30], 该类物质对于治疗神经退行性疾病有着突出的优势。同时, 本实验结果表明, L-glu损伤的SY5Y细胞模型, 经RERMS-MEM干预之后, BDNF在mRNA水平上的表达提高, 说明其可能保留了RERMS的神经营养作用, 或可减轻MEM在临床使用中的不良反应。MEM可以直接刺激毒蕈碱样受体, 并促进BDNF和TrkB的表达^[31]。BDNF/TrkB/PI3K/Akt通过参与促进细胞增殖分化和抗细胞凋亡等发挥作用^[32], 也可通过接头蛋白Shc促进Ras/Raf信号通路, 进一步调节蛋白激酶丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)/细胞外调节蛋白激酶(ERK)级联, 进而调控细胞存活和神经元分化^[33]。多项研究表明, MEM通过恢复谷氨酸能系统的稳态来保护神经元免受谷氨酸毒性的影响^[34-37]。有研究表明, 在SY5Y细胞和转基因小鼠中, Tau蛋白的过表达也会导致BDNF表达下调^[38]。反过来, BDNF也会调节Tau蛋白的表达、磷酸化和分布^[38-39]。

高浓度的谷氨酸可能会引起细胞凋亡、氧化应激等损伤。生理状态下, 氧化剂和抗氧化剂保持一种稳态, 当细胞内氧化剂超出正常水平时, 就会发生



注: A为Muse细胞仪检测各组细胞ROS表达情况示例图; B为Muse细胞仪检测各组细胞ROS阳性率统计图; C为DCFH-DA试剂盒检测各组细胞ROS相对表达量统计图。NC空白对照; L+RM L-glu+RERMS-MEM; L+M L-glu+MEM; MEM美金刚; RERMS-MEM APP5肽美金刚; 与NC组比较, ^a*P* < 0.05; 与L-glu组比较, ^b*P* < 0.05; ROS活性氧; Count计数; ROS PROFILE ROS阳性细胞占比

图3 RERMS-MEM和MEM干预对ROS表达的影响(*n*=3)

表9 4组细胞总凋亡率比较(% , $\bar{x} \pm s$)

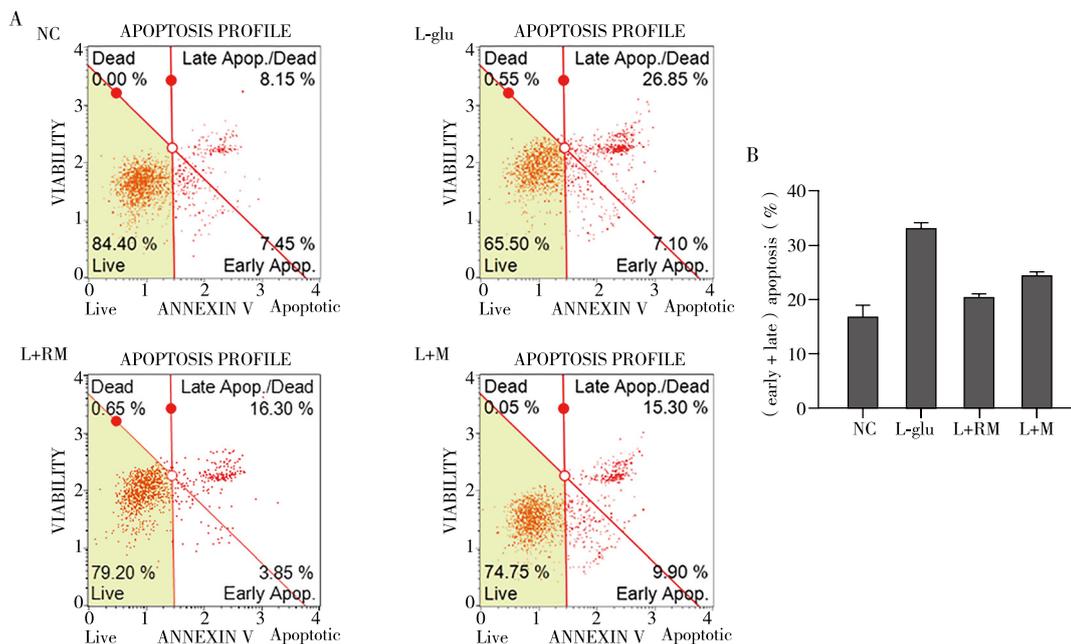
| 组别 | 样本量 | 细胞总凋亡率 |
|------------|-----|---------------------------|
| NC组 | 3 | 16.95 ± 2.08 |
| L-glu组 | 3 | 33.20 ± 0.87 ^a |
| L+RM组 | 3 | 20.53 ± 0.38 ^b |
| L+M组 | 3 | 24.53 ± 0.61 ^b |
| <i>F</i> 值 | | 104.466 |
| <i>P</i> 值 | | < 0.001 |

注: NC阴性对照; L+RM L-glu+RERMS-MEM; L+M L-glu+MEM; MEM美金刚; RERMS-MEM APP5肽美金刚; 与NC组比较, ^a*P* < 0.05; 与L-glu组比较, ^b*P* < 0.05

氧化应激反应^[40]。本研究发现, L-glu损伤SY5Y细胞后, 细胞中ROS被激活, 表达量明显升高; 当给予RERMS-MEM和MEM干预后, ROS水平均降低, 这提示L-glu可能激活了细胞的氧化应激, RERMS-MEM和MEM通过抑制细胞ROS的表达来发挥神经保护作用。此外, ROS水平的升高会损害细胞内大分子物质, 如脂质、蛋白质和核酸, 终将导致疾病的发生^[41], 也会引发线粒体功能障碍, 而线粒体的损伤会进一步加速氧自由基的产生, 最终导致神经元凋亡^[42-43]。淫羊藿次苷II是淫羊藿在体内的药理代谢产物, 研究表明, 淫羊藿次苷II可拮抗ROS介导的细胞毒性、抑制JNK和p38 MAPK磷酸化、调控线粒体凋亡通路, 降低Bax/Bcl-2比率和下调caspase-3表达, 抑制神经元凋亡, 也可通过抑制iNOS表达和ROS生成、增强SOD活性, 减轻氧化

应激损伤, 这也为我们下一步探索指明了方向^[44]。细胞凋亡有2条途径: 一是线粒体或内源性凋亡途径; 二是死亡受体或外源性凋亡途径。本研究结果显示, 与NC组比较, L-glu损伤后细胞总凋亡率上升; 与L-glu组比较, L+RM组、L+M组细胞总凋亡率均下降, 这提示RERMS-MEM可能通过抑制细胞凋亡来发挥神经保护作用。凋亡的最终阶段是由几个共同的效应半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶实现的^[45], caspase-3在caspase信号通路中有着至关重要的作用, 激活caspase-3会导致其从32kDa形式解离为P17和P12片段^[46]。一旦被触发, 它就会导致细胞体和细胞核固缩、染色质凝聚、DNA断裂以及凋亡小体的形成^[47]。因此, 抑制cleaved caspase-3激活或许可以阻止神经元死亡^[48-49], 具体的调控机制将纳入下一步研究计划。

综上所述, 本研究自行设计并合成的RERMS-MEM, 经体外实验发现, 相较于MEM, RERMS-MEM具有良好的神经保护作用以及较低的细胞毒性, 这与MEM在临床使用过程中, 尤其是大剂量使用时, 存在较大不良反应是一致的。这可能是通过促进神经营养因子表达, 抑制氧化应激和凋亡来发挥作用的。但由于条件的限制, 本研究对于这些机制的探究不够深入, 未对动物体内药物作用及作用机制进行探究。未来将体内实验纳入日后的研究中, 期待新合成的化合物在体内的表现。



注: NC 阴性对照; L+RM L-glu+RERMS-MEM; L+M L-glu+MEM; MEM 美金刚; RERMS-MEM APP5 肽美金刚; 与 NC 组比较, ^a*P* < 0.05; 与 L-glu 组比较, ^b*P* < 0.05; APOPTOSIS PROFILE 凋亡细胞占比; Live 活细胞; Dead 死亡细胞; Late apop./Dead 晚期凋亡/死细胞; Early Apop. 早期凋亡细胞; (early + late)apoptosis (早期+晚期)凋亡

图4 RERMS-MEM和MEM干预对细胞凋亡的影响(n=3)

利益冲突 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突

作者贡献声明 实验设计、论文撰写、资助获取为吕彩珍、王蓉, 研究实施为吕彩珍、张旭, 资料收集为王晓珍、何静, 数据收集为吕彩珍、王雨欣, 数据整理为吕彩珍、张伟, 数据分析为吕彩珍、孔玲, 数据解释为吕彩珍

参 考 文 献

- Jia J, Wei C, Chen S, et al. The cost of Alzheimer's disease in China and re-estimation of costs worldwide[J]. *Alzheimer's Dement*, 2018, 14(4): 483-491. DOI: 10.1016/j.jalz.2017.12.006.
- Kuo TC, Zhao Y, Weir S, et al. Implications of comorbidity on costs for patients with Alzheimer disease[J]. *Med Care*, 2008, 46(8): 839-846. DOI: 10.3233/JAD-170424.
- Cull-Candy SG, Leszkiewicz DN. Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses[J]. *Sci STKE*, 2004, 2004(255): re16. DOI: 10.1126/stke.2552004re16.
- Shimmyo Y, Kihara T, Akaike A, et al. Three distinct neuroprotective functions of myricetin against glutamate-induced neuronal cell death: involvement of direct inhibition of caspase-3[J]. *J Neurosci Res*, 2008, 86(8): 1836-1845. DOI: 10.1002/jnr.21629.
- Cheriyian J, Balsara RD, Hansen KB, et al. Pharmacology of triheteromeric N-Methyl-D-Aspartate receptors[J]. *Neurosci Lett*, 2016, 617: 240-246. DOI: 10.1016/j.neulet.2016.02.032.
- Chen H, Cao J, Zhu Z, et al. A novel tetramethylpyrazine derivative protects against glutamate-induced cytotoxicity through PGC1 α /Nrf2 and PI3K/Akt signaling pathways[J]. *Front Neurosci*, 2018, 12: 567. DOI: 10.3389/fnins.2018.00567.
- Bernardi P, Rasola A. Calcium and cell death: the mitochondrial connection[J]. *Subcell Biochem*, 2007, 45: 481-506. DOI: 10.1007/978-1-4020-6191-2_18.
- Mehta A, Prabhakar M, Kumar P, et al. Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders[J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 698(1/3): 6-18. DOI: 10.1016/j.ejphar.2012.10.032.
- Luo J, Li W, Zhao Y, et al. Pathologically activated neuroprotection via uncompetitive blockade of N-methyl-D-aspartate receptors with fast off-rate by novel multifunctional dimer bis (propyl)-cognitin[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(26): 19947-19958. DOI: 10.1074/jbc.M110.111286.
- Liu J, Chang L, Song Y, et al. The role of NMDA receptors in Alzheimer's disease[J]. *Front Neurosci*, 2019, 13: 43. DOI: 10.3389/fnins.2019.00043.
- Shi YH, Shi GC, Wan HY, et al. Coexistence of Th1/Th2 and Th17/Treg imbalances in patients with allergic asthma[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2011, 124(13): 1951-1956.
- Yao J, Ma L, Wang R, et al. Neurotrophic effects of amyloid precursor protein peptide 165 in vitro[J]. *Brain Res Bull*, 2016, 120: 58-62. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2015.11.005.
- 王晓珍, 王蓉. 一种美金刚衍生物、其制备方法及应用[P]. 2020-01-31.
- 吕彩珍, 吴燕川, 孔玲, 等. HT22、SY5Y细胞在L-谷氨酸损伤模型中的应用[J]. *神经疾病与精神卫生*, 2022, 22(4): 269-274. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2022.04.008.
- Lyu CZ, Wu YC, Kong L, et al. Application of HT22 and SY5Y cells in L-glutamate acid induced-injury model[J]. *Journal of Neuroscience and Mental Health*, 2022, 22(4): 269-274.
- Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease[J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(4): 329-344. DOI: 10.1056/NEJMra0909142.
- Goedert M, Spillantini MG. A century of Alzheimer's disease[J]. *Science*, 2006, 314(5800): 777-781. DOI: 10.1126/science.1132814.

- [17] Reitz C, Brayne C, Mayeux R. Epidemiology of Alzheimer disease[J]. *Nat Rev Neurol*, 2011, 7(3): 137-152.
- [18] Hu S, Wang D, Zhang J, et al. Mitochondria related pathway is essential for polysaccharides purified from *sparassis crispa* mediated neuro-protection against glutamate-induced toxicity in differentiated PC12 cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(2): 133. DOI: 10.3390/ijms17020133.
- [19] Terzioğlu B, Oğuz E, Gökçe A. Effect of valproic acid on oxidative stress parameters of glutamate induced excitotoxicity in SH-SY5Y cells[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(2): 1321-1328. DOI: 10.3892/etm.2020.8802.
- [20] Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, et al. Alzheimer's disease[J]. *Lancet*, 2021, 397(10284): 1577-1590. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)32205-4.
- [21] Wilkinson D. A review of the effects of memantine on clinical progression in Alzheimer's disease[J]. *Int J Geriatr Psychiatry*, 2012, 27(8): 769-776. DOI: 10.1002/gps.2788.
- [22] Wang P, Jiang S, Cui Y, et al. The n-terminal 5-MER peptide analogue P165 of amyloid precursor protein exerts protective effects on SH-SY5Y cells and rat hippocampus neuronal synapses[J]. *Neuroscience*, 2011, 173: 169-178. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2010.10.069.
- [23] Xu CJ, Wang JL, Jin WL. The Emerging therapeutic role of NGF in Alzheimer's disease[J]. *Neurochem Res*, 2016, 41(6): 1211-1218. DOI: 10.1007/s11064-016-1829-9.
- [24] Matrone C, Ciotti MT, Mercanti D, et al. NGF and BDNF signaling control amyloidogenic route and Abeta production in hippocampal neurons[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(35): 13139-13144. DOI: 10.1073/pnas.0806133105.
- [25] Liu MY, Wang S, Yao WF, et al. Memantine improves spatial learning and memory impairments by regulating NGF signaling in APP/PS1 transgenic mice[J]. *Neuroscience*, 2014, 273: 141-151. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2014.05.011.
- [26] Peng S, Wu J, Mufson EJ, et al. Precursor form of brain-derived neurotrophic factor and mature brain-derived neurotrophic factor are decreased in the pre-clinical stages of Alzheimer's disease[J]. *J Neurochem*, 2005, 93(6): 1412-1421. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2005.03135.x.
- [27] Ng T, Ho C, Tam W, et al. Decreased serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in patients with Alzheimer's disease (AD): a systematic review and Meta-analysis[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(2): 257. DOI: 10.3390/ijms20020257.
- [28] Forlenza OV, Diniz BS, Teixeira AL, et al. Lower cerebrospinal fluid concentration of brain-derived neurotrophic factor predicts progression from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease[J]. *Neuromolecular Med*, 2015, 17(3): 326-332. DOI: 10.1007/s12017-015-8361-y.
- [29] Phillips HS, Hains JM, Armanini M, et al. BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease[J]. *Neuron*, 1991, 7(5): 695-702. DOI: 10.1016/0896-6273(91)90273-3.
- [30] Gao L, Zhang Y, Sterling K, et al. Brain-derived neurotrophic factor in Alzheimer's disease and its pharmaceutical potential[J]. *Transl Neurodegener*, 2022, 11(1): 4. DOI: 10.1186/s40035-022-00279-0.
- [31] Jantas D, Szymanska M, Budziszewska B, et al. An involvement of BDNF and PI3-K/Akt in the anti-apoptotic effect of memantine on staurosporine-evoked cell death in primary cortical neurons[J]. *Apoptosis*, 2009, 14(7): 900-912. DOI: 10.1007/s10495-009-0370-6.
- [32] 王暖, 耿德勤, 黄红莉, 等. 老年大鼠海马细胞凋亡和神经元信号转导通路的变化与学习记忆的关系[J]. *中国老年学杂志*, 2013, 33(7): 1573-1576. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2013.07.040.
- Wang N, Geng DQ, Huang HL, et al. Relationship between learning and memory ability and the changes of signal transduction pathway and apoptosis of hippocampal neurons of old rats[J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2013, 33(7): 1573-1576.
- [33] Liu SB, Zhang N, Guo YY, et al. G-protein-coupled receptor 30 mediates rapid neuroprotective effects of estrogen via depression of NR2B-containing NMDA receptors[J]. *J Neurosci*, 2012, 32(14): 4887-4900. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5828-11.2012.
- [34] Erdö SL, Schäfer M. Memantine is highly potent in protecting cortical cultures against excitotoxic cell death evoked by glutamate and N-methyl-D-aspartate[J]. *Eur J Pharmacol*, 1991, 198(2-3): 215-217. DOI: 10.1016/0014-2999(91)90625-z.
- [35] Weller M, Finiels-Marlier F, Paul SM. NMDA receptor-mediated glutamate toxicity of cultured cerebellar, cortical and mesencephalic neurons: neuroprotective properties of amantadine and memantine[J]. *Brain Res*, 1993, 613(1): 143-148. DOI: 10.1016/0006-8993(93)90464-x.
- [36] Miguel-Hidalgo JJ, Alvarez XA, Cacabelos R, et al. Neuroprotection by memantine against neurodegeneration induced by beta-amyloid (1-40)[J]. *Brain Res*, 2002, 958(1): 210-221. DOI: 10.1016/S0006-8993(02)03731-9.
- [37] Van Dam D, Coen K, De Deyn PP. Cognitive evaluation of disease-modifying efficacy of donepezil in the APP23 mouse model for Alzheimer's disease[J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2008, 197(1): 37-43. DOI: 10.1007/s00213-007-1010-x.
- [38] Rosa E, Mahendram S, Ke YD, et al. Tau downregulates BDNF expression in animal and cellular models of Alzheimer's disease[J]. *Neurobiol Aging*, 2016, 48: 135-142. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2016.08.020.
- [39] Chen Q, Zhou Z, Zhang L, et al. The cellular distribution and Ser262 phosphorylation of tau protein are regulated by BDNF in vitro[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e91793. DOI: 10.1371/journal.pone.0091793.
- [40] Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, et al. Biomarkers of oxidative damage in human disease[J]. *Clin Chem*, 2006, 52(4): 601-623. DOI: 10.1373/clinchem.2005.061408.
- [41] Andres RH, Ducray AD, Schlattner U, et al. Functions and effects of creatine in the central nervous system[J]. *Brain Res Bull*, 2008, 76(4): 329-343. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2008.02.035.
- [42] Mancuso M, Coppede F, Migliore L, et al. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neurodegeneration[J]. *J Alzheimers Dis*, 2006, 10(1): 59-73. DOI: 10.3233/jad-2006-10110.
- [43] Chen S, Chen ST, Sun Y, et al. Fibroblast growth factor 21 ameliorates neurodegeneration in rat and cellular models of Alzheimer's disease[J]. *Redox Biol*, 2019, 22: 101133. DOI: 10.1016/j.redox.2019.101133.

- [44] 马正安, 顾万红, 王雪梅, 等. 淫羊藿次苷 II 神经保护作用机制研究进展[J/OL]. 中药药理与临床. <https://doi.org/10.13412/j.cnki.zyyl.20240924.004>.
- [45] Alvarez S, Blanco A, Fresno M, et al. TNF- α contributes to caspase-3 independent apoptosis in neuroblastoma cells: role of NFAT[J]. PLoS One, 2011, 6(1): e16100. DOI: 10.1371/journal.pone.0016100.
- [46] Sun X, Wu Y, Chen B, et al. Regulator of calcineurin 1 (RCAN1) facilitates neuronal apoptosis through caspase-3 activation[J]. J Biol Chem, 2011, 286(11): 9049-9062. DOI: 10.1074/jbc.M110.177519.
- [47] Zhu Y, Ahlemeyer B, Bauerbach E, et al. TGF-beta1 inhibits caspase-3 activation and neuronal apoptosis in rat hippocampal cultures[J]. Neurochem Int, 2001, 38(3): 227-235. DOI: 10.1016/s0197-0186(00)00084-x.
- [48] Robertson GS, Crocker SJ, Nicholson DW, et al. Neuroprotection by the inhibition of apoptosis[J]. Brain Pathol, 2000, 10(2): 283-292. DOI: 10.1111/j.1750-36392000.tb00262.x.
- [49] Wen XR, Tang M, Qi DS, et al. Butylphthalide suppresses neuronal cells apoptosis and inhibits JNK-Caspase3 signaling pathway after brain ischemia /reperfusion in rats[J]. Cell Mol Neurobiol, 2016, 36(7): 1087-1095. DOI: 10.1007/s10571-015-0302-7.

(收稿日期: 2024-08-07)

(本文编辑: 王影)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊文稿中缩略语的书写要求

在本刊发表的学术论文中, 已被公知公认的缩略语在正文中可以不加注释直接使用(表1); 不常用的和尚未被公知公认的缩略语以及原词过长、在文中多次出现者, 若为中文可于文中第1次出现时写明全称, 在圆括号内写出缩略语, 如: 流行性脑脊髓膜炎(流脑); 若为外文可于文中第1次出现时写出中文全称, 在圆括号内写出外文全称及其缩略语, 如: 阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)。若该缩略语已经公知, 也可不注出其英文全称。不超过4个汉字的名词不宜使用缩略语, 以免影响论文的可读性。西文缩略语不得拆开转行。

表1 《神经疾病与精神卫生》杂志常用缩略语

| 缩略语 | 中文全称 | 缩略语 | 中文全称 | 缩略语 | 中文全称 |
|------|----------|--------|----------------|------|----------------|
| CNS | 中枢神经系统 | AD | 老年痴呆症(阿尔茨海默病) | GABA | γ -氨基丁酸 |
| IL | 白细胞介素 | CT | 电子计算机体层扫描 | PD | 帕金森病 |
| MRI | 磁共振成像 | BDNF | 脑源性神经营养因子 | DSA | 数字减影血管造影 |
| PCR | 聚合酶链式反应 | ELISA | 酶联免疫吸附剂测定 | PET | 正电子发射计算机断层显像 |
| SOD | 超氧化物歧化酶 | NIHSS | 美国国立卫生研究院卒中评分 | CRP | C反应蛋白 |
| MMSE | 简易精神状态检查 | WHO | 世界卫生组织 | TIA | 短暂性脑缺血发作 |
| TNF | 肿瘤坏死因子 | PANSS | 阳性与阴性症状量表 | HAMD | 汉密尔顿抑郁量表 |
| HAMA | 汉密尔顿焦虑量表 | SSRIs | 选择性5-羟色胺再摄取抑制剂 | rTMS | 重复经颅磁刺激 |
| 5-HT | 5-羟色胺 | ICD-10 | 国际疾病分类第十版 | MoCA | 蒙特利尔认知评估量表 |
| PTSD | 创伤后应激障碍 | CCMD | 中国精神障碍分类与诊断标准 | DSM | 美国精神障碍诊断与统计手册 |