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Aβ的作用机制研究Δ

初　双[1*]，吴延娆[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（Aβ）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Aβ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$A\beta_{1-42}$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**　Aβ摄取实验结果显示，经中、高剂量EEAM干预后，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，经中、高剂量EEAM干预后，BV2细胞中Aβ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Aβ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 Aβ based on regulating PPAR-γ signaling pathway

CHU Shuang[1], WU Yanrao[2], WU Limin[1], CUI Zhenghao[1], WANG Pan[1], SUN Yiran[1], XIE Zhishen[1], ZHANG Zhenqiang[1]（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 (Aβ) 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 Aβ 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 $A\beta_{1-42}$, 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 Aβ uptake experiment showed that after the intervention of medium and high doses of EEAM, fluorescence intensity of Aβ in BV2 cells increased significantly ($P<0.05$). The degradation experiment of Aβ showed that after the intervention of medium and high doses of EEAM, fluorescence intensity of Aβ 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 Aβ 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，Aβ）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Aβ的功能，可以通过降解Aβ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Aβ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Aβ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Aβ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Aβ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Aβ摄取及降解的作用机制，以期为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；$Aβ_{1-42}$、FEEAM-Aβ（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；萤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% CO_2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 μL，继续培养4 h；弃去培养基，每孔加入二甲基亚砜150 μL，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×100%）。

2.4 EEAM对BV2细胞摄取及降解Aβ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 μmo/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-Aβ（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萤光素酶转录活性的影响

萤光素酶报告基因是转录活性测定的常用工具之一，萤光素酶催化底物产生化学发光，萤光素酶表达量越高，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萤光素酶活性。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，同上述方法检测萤光素酶活性。

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$A\beta_{1\text{-}42}$（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$2^{-\Delta\Delta Ct}$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
Lxra	上游：CCTTCCTCAAGGACTTCAGTTACAA	98
	下游：CATGGCTCTGGAGAACTCAAAGAT	
Lxrb	上游：AAGGACTTCACCTACAGCAAGGA	78
	下游：GAACTCGAAGATGGGATTGATGA	
Abca1	上游：ACCCACCCTATGAACAACATGA	123
	下游：GAGTCGGGTAACGGAAACAGG	
Abcg1	上游：AAGGCCTACTACCTGGCAAAGA	69
	下游：GCAGTAGGCCACAGGGAACA	
Apoe	上游：CTCCCAAGTCACACAAGAACTG	77
	下游：CCAGCTCCTTTTTGTAAGCCTTT	
Sra	上游：ACGACCCGCCACAATTCTC	166
	下游：CTGGAAGCCTTACTTGAAGGAG	
Cd36	上游：ATGGGCTGTGATCGGAACTG	233
	下游：TTTGCCACGTCATCTGGGTTT	
β-actin	上游：GGCTGTATTCCCCTCCATCG	241
	下游：CCAGTTGGTAACAATGCCATGT	

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

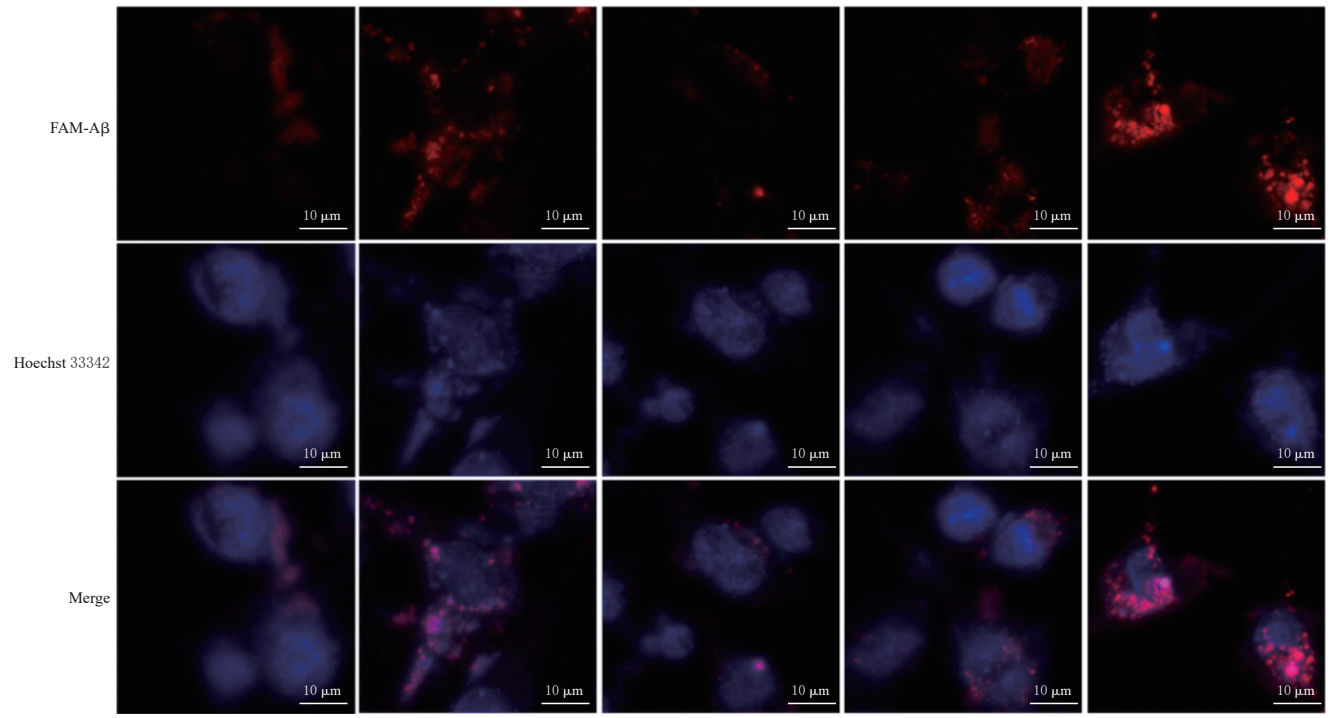
EEAM低、中、高剂量组细胞存活率[分别为（103.76±7.58）%、（111.27±6.05）%、（109.54±7.32）%]与空白对照组[（100.00±10.03）%]比较，差异均无统计学意义（$P>0.05$）。

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。

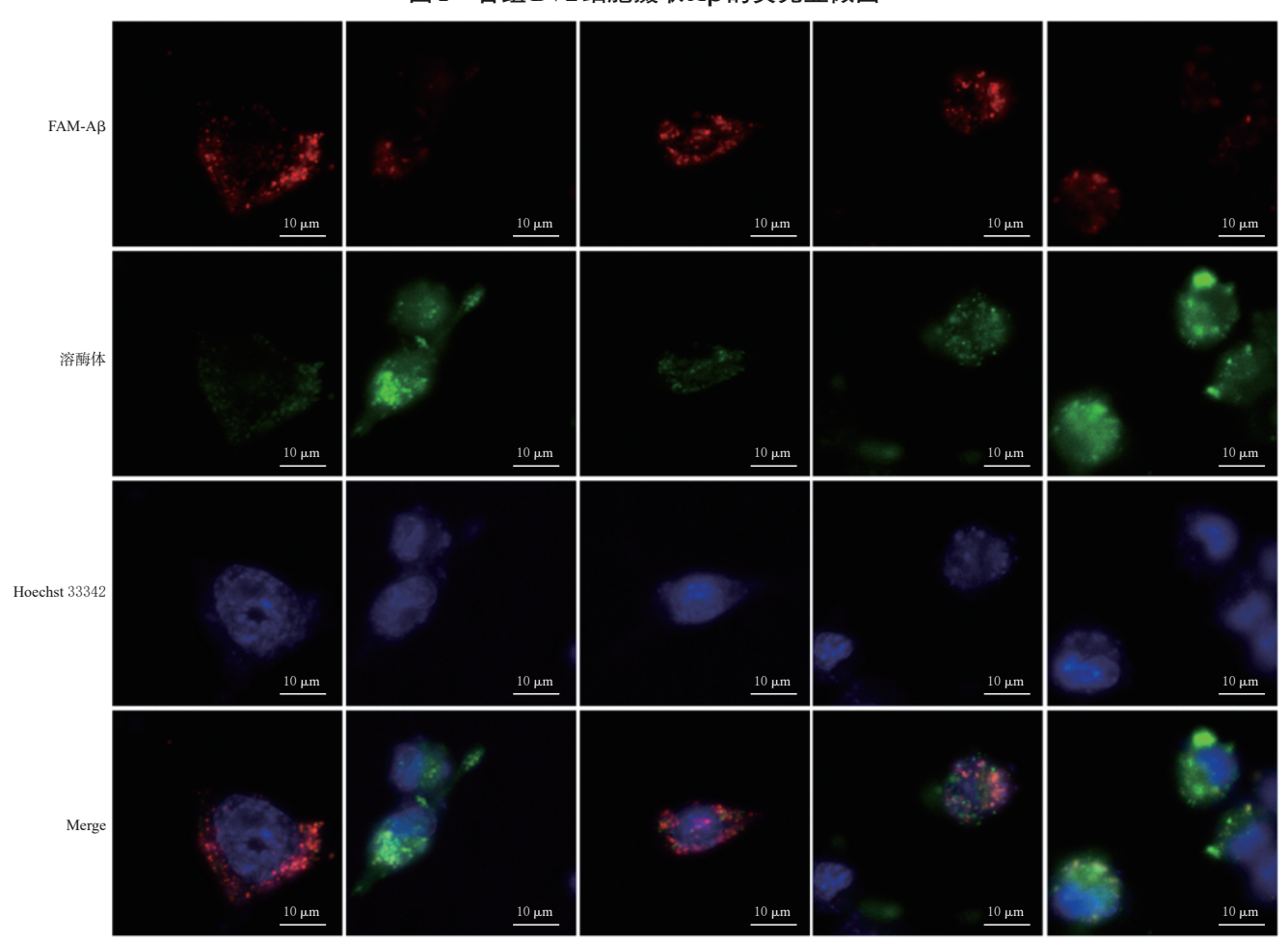
3.3 EEAM对HEK293细胞中PPAR-γ萤光素酶转录活性的影响

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萤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萤光素酶转录活性（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-Aβ；蓝色荧光表示细胞核

图1　各组BV2细胞摄取Aβ的荧光显微图



注：红色荧光表示FAM-Aβ；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Aβ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。

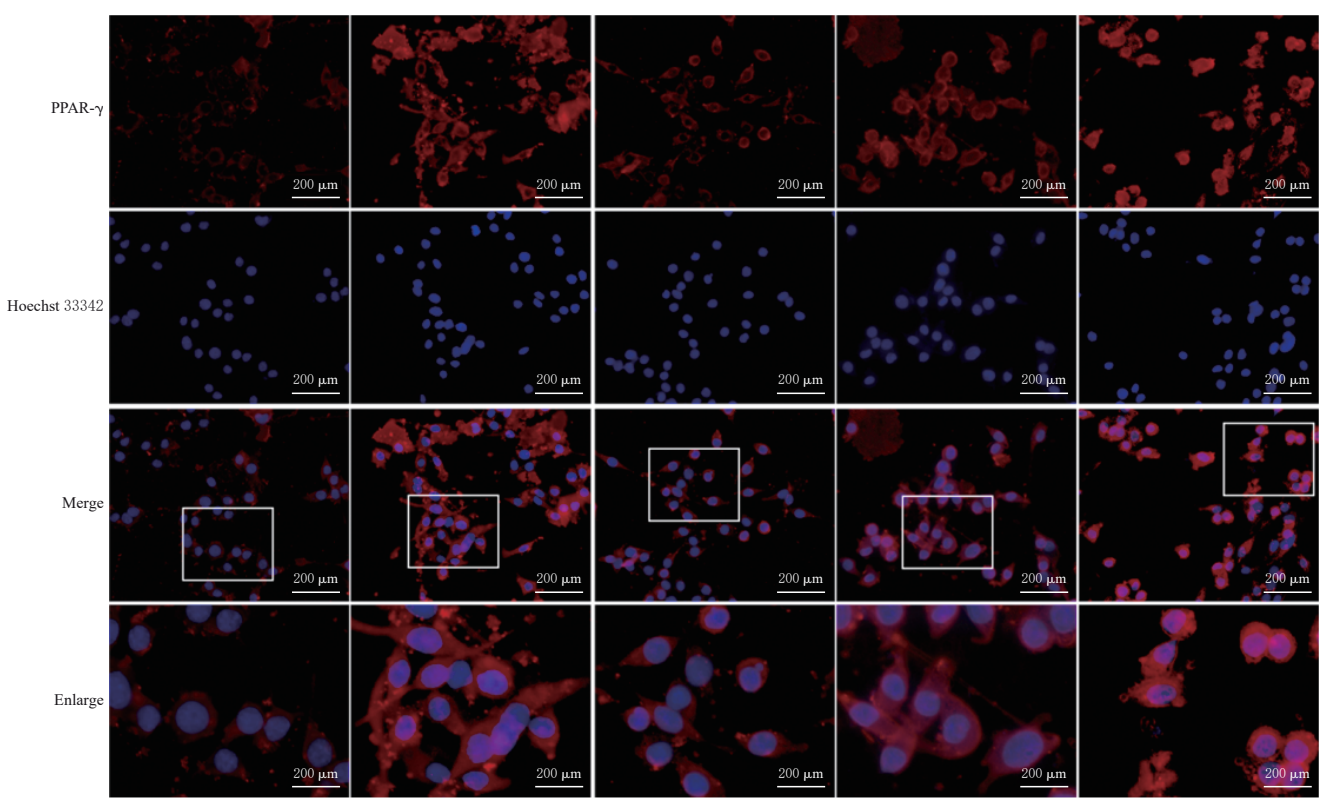
表4　各组BV2细胞中PPAR-γ下游靶基因mRNA的测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	*Lxra* mRNA	*Lxrb* mRNA	*Abca1* mRNA	*Abcg1* mRNA	*Cd36* mRNA	*Sra* mRNA	*Apoe* 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Aβ的吞噬和降解作用改善AD，且在促进Aβ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Aβ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Aβ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类清零受体，在脑中小胶质细胞进行表达，可介导小胶质细胞对Aβ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，Aβ含量与正常小鼠相比有明显升高[22]。这说明*Cd36*、*Sra*基因对Aβ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Aβ的清除作用[23—25]。这说明*Lxra*、*Lxrb*、*Apoe*、*Abca1*基因对Aβ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Aβ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/PS$_1$ 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Rb$_1$通过调节TGF-β$_1$/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-κB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）