

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.23.005

人脐带间充质干细胞对 $A\beta_{1-42}$ 诱导 SH-SY5Y 细胞损伤的改善作用及机制研究*

唐吉祥^{1,2} 邵一鸣³ 靳冉冉³ 孔宁^{1,2} 马保东³ 张辉^{2,3Δ}

(1 新乡医学院 河南 新乡 453000; 2 郑州大学附属郑州中心医院神经外科 河南 郑州 450001;

3 郑州大学附属郑州中心医院干细胞再生医学转化中心 河南 郑州 450001)

摘要 目的:基于体外细胞实验探索人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)对 $A\beta_{1-42}$ 诱导 SH-SY5Y 细胞损伤的改善作用及相关机制。**方法:**提取 hUC-MSCs 并使用流式细胞术检测细胞表面标志物;油红 O 染色,茜素红 S 染色和阿利新蓝染色检测多向分化潜能。以 SH-SY5Y 细胞为对照组;使用 10 μ M/mL 的 $A\beta_{1-42}$ 处理 SH-SY5Y 细胞 24 h 设置为 A β 组;A β 组 SH-SY5Y 细胞与 hUC-MSCs 等比例共培养 24 h 设置为 MSC 组。使用 Annexin V-PI 双染色法检测三组细胞凋亡, CCK8 法检测三组细胞增殖。提取 A β 组和 MSC 组的总 RNA 行转录组测序,对结果数据进行差异表达分析和富集分析。实时定量 PCR 检测 A β 组和 MSC 组细胞中 APLN 和 APLNR 的 mRNA 水平表达。**结果:**提取的 hUC-MSCs 细胞表面阳性表达 CD73、CD90 和 CD105, 阴性表达 CD11b、CD19、CD34、CD45 和 HLA-DR, 且具有良好的成骨分化, 成脂分化和成软骨分化潜能。与对照组相比, A β 组 SH-SY5Y 细胞数量减少、形态皱缩, 早期凋亡和晚期凋亡增加, 存活率下降。与 A β 组相比, MSC 组细胞形态得到恢复, 早期凋亡和晚期凋亡减少, 存活率增加。差异表达分析到 287 个上调的差异表达基因和 142 个下调的差异表达基因, 上调差异表达基因可能参与神经活性配体-受体相互作用、Apelin 信号通路和 PI3K-Akt 信号通路等信号通路。实时定量 PCR 结果显示 MSC 组细胞中 APLN 和 APLNR 的相对表达水平较 A β 组显著升高 ($P < 0.05$)。**结论:**本研究发现 hUC-MSCs 显著改善了 $A\beta_{1-42}$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤, 其作用机制可能是通过调控 Apelin 信号通路发挥的。

关键词:间充质干细胞;阿尔茨海默病;细胞凋亡;细胞增殖;Apelin 信号通路

中图分类号:R329.2;R742 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2024)23-4421-07

Ameliorative Effect and Mechanism of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells on $A\beta_{1-42}$ -induced SH-SY5Y Cell Injury*

TANG Ji-xiang^{1,2}, SHAO Yi-ming³, JIN Ran-ran³, KONG Ning^{1,2}, MA Bao-dong³, ZHANG Hu^{2,3Δ}

(1 Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan, 453000, China; 2 Department of Neurosurgery, Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan, 450001, China; 3 Center of Stem Cell and Regenerative Medicine, Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan, 450001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the protective effects and mechanisms of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUC-MSCs) on $A\beta_{1-42}$ -induced damage in SH-SY5Y cells by in vitro experiments. **Methods:** hUC-MSCs were isolated and cell surface markers were detected by using flow cytometry. Multidirectional differentiation potential of hUC-MSCs was detected by using Oil Red O staining, Alizarin Red S staining and Alizarin Blue staining. SH-SY5Y cells were chosen as the control group, SH-SY5Y cells were treated with 10 μ M/mL of $A\beta_{1-42}$ for 24 h set to the A β group. SH-SY5Y cells of A β group were co-cultured with hUC-MSCs in equal proportions for 24 h set as MSC group. Apoptosis was detected in three groups of cells by using Annexin V-PI double staining, and cell proliferation was detected in three groups of cells using the CCK8 assay. Total RNA from the A β and MSC groups was extracted for transcriptome sequencing, and the resulting data were analyzed for differential expression and enrichment. Expression of APLN and APLNR at mRNA level in cells of A β and MSC groups were detected by real-time quantitative PCR. **Results:** The extracted hUC-MSCs were positive for CD73, CD90 and CD105 but negative for CD14, CD19, CD34, CD45 and HLA-DR. The hUC-MSCs have good potential for osteogenic differentiation, lipogenic differentiation and chondrogenic differentiation. Compared with that in the control group, SH-SY5Y cells in the A β group reduced, wrinkled in morphology, increased in early apoptosis and late apoptosis, and decreased in survival rate. Compared with the A β group, cell morphology was restored, early apoptosis and late apoptosis were reduced, and survival was increased in the MSC group. Differential expression was analyzed to 287 up-regulated and 142 down-regulated differentially expressed genes. Up-regulated differentially expressed genes may be involved in signaling pathways such as neuroactive ligand-receptor

* 基金项目:河南省医学科技攻关项目(242102310112, 242102310144);河南省医学科技攻关计划联合共建项目(LHGJ20220858)

作者简介:唐吉祥(1998-),男,硕士研究生,住院医师,研究方向:意识障碍和脑血管疾病的诊断和治疗, E-mail: t321314091@163.com

Δ 通讯作者:张辉(1972-),男,硕士,主任医师,研究方向:意识障碍和脑血管疾病的诊断和治疗, E-mail: 528zhanghui@sina.com

(收稿日期:2024-07-01 接受日期:2024-07-29)

interactions, Apelin signaling pathway and PI3K-Akt signaling pathway. The results of real-time quantitative PCR showed that the relative expression levels of APLN and APLNR in the cells of the MSC group were significantly higher than those of the A β group. **Conclusions:** The hUC-MSCs significantly ameliorated A β_{1-42} -induced SH-SY5Y cell injury, and the mechanism may be exerted via the Apelin signaling pathway.

Key words: Mesenchymal stem cells; Alzheimer's disease; Apoptosis; Cell proliferation; Apelin signaling pathway

Chinese Library Classification(CLC): R329.2; R742 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2024)23-4421-07

前言

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是指与年龄相关的认知和功能下降的进行性神经退行性疾病^[1]。随着人口老龄化的加快,AD患病率也呈上升趋势^[2]。流行病学数据,我国在未来30年AD患病人数将持续增长^[3]。AD的发病机制较为复杂并涉及多种途径,包括淀粉样 β 蛋白(amyloid β -protein, A β)蓄积、tau蛋白过度磷酸化和神经元丢失等。尽管进行了广泛的研究,但目前还没有能够逆转或阻止疾病进展的治疗方法。

由于神经功能损害通常是不可逆的,因此与其他疾病相比,神经系统疾病的治疗受到限制。近年来,细胞再生疗法在神经退行性疾病中表现出巨大潜力。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是来源于中胚层的一类多能干细胞,其具有自我更新、旁分泌、多向分化潜能、免疫调控和促进组织修复等优点^[4]。MSCs在AD等神经退行性疾病的临床前模型中显示出改善神经炎症、促进神经元存活和增强认知功能的潜力^[5]。在AD大鼠大脑中输注MSCs增加了乙酰胆碱的水平以及胆碱乙酰转移酶和乙酰胆碱酯酶的表达,从而改善海马神经元功能^[6-8]。同时MSCs可以将大鼠大脑皮层中的小胶质细胞从促炎的M1表型转换为抑炎的M2表型,显著降低促炎因子表达并改善神经元存活^[9,10]。MSCs具有强大的治疗神经退行性疾病的潜力,但具体机制尚不完全明确。

本研究使用A β_{1-42} 预处理人神经母细胞瘤SH-SY5Y细胞系构建体外AD模型,并将其与人脐带来源的MSCs(human umbilical cord-derived MSCs, hUC-MSCs)共培养,以探索MSCs对A β_{1-42} 诱导SH-SY5Y细胞损伤的改善作用及相关机制,为AD的疾病治疗提供理论依据和参考。

1 材料和方法

1.1 主要实验试剂及耗材

人神经母细胞瘤SH-SY5Y细胞系,DMEM培养基,胎牛血清,青霉素和链霉素均购自武汉普诺赛生命科技有限公司,MSC无血清培养基购自北京友康生物科技股份有限公司,Ficoll分离液,油红O染液,茜素红S染液和阿利新蓝染液均购自北京索莱宝科技有限公司,流式细胞术抗体购自美国Biolegend公司,A β_{1-42} 购自上海吉尔生化有限公司,Annexin V-PI双染细胞凋亡试剂盒购自中国武汉亚科因生物技术有限公司,CCK8细胞增殖检测试剂盒购自上海雅酶生物医药科技有限公司,反转录试剂盒购自美国赛默飞世尔科技有限公司,PCR引物购自北京擎科生物科技股份有限公司。

1.2 主要实验器材

细胞恒温培养箱购自中国Heal Force公司,超净工作台和

细胞计数仪购自美国赛默飞世尔科技有限公司,流式细胞仪倒置显微镜购自德国Carl Zeiss公司,酶标仪购自美国Molecular Devices公司,梯度PCR仪购自美国Bio-Rad公司,快速实时荧光定量PCR仪购自美国Applied Biosystems公司。

1.3 实验方法

1.3.1 人脐带间充质干细胞的提取和培养 无菌条件下采集郑州大学附属郑州中心医院行剖宫产的足月胎儿脐带,该研究获得郑州大学附属郑州中心医院伦理委员会批准(批号:202389),所有胎儿家属同意并签署知情同意书。取脐带4-5 cm, PBS缓冲液充分洗涤,分离取出脐带外膜组织和血管组织,获得脐带wharton胶组织并剪碎,用0.1% I型胶原酶37℃消化4 h后200目筛网过滤,收集滤液,1700 rpm离心8 min。使用MSC无血清培养基重悬细胞并置于5% CO₂和37℃的条件下培养。

1.3.2 流式细胞术鉴定人脐带间充质干细胞表面标志物 hUC-MSCs细胞悬液以1500 rpm离心5 min沉淀细胞,PBS缓冲液洗涤两次后使用100 μ L PBS缓冲液重悬细胞,加入4 μ L相应抗体后常温避光孵育15 min。PBS缓冲液清洗后加入250 μ L PBS缓冲液,然后使用流式细胞仪上机检测。

1.3.3 人脐带间充质干细胞的成骨分化诱导 在24孔板中接种hUC-MSCs(2 \times 10⁴/孔),当细胞达到80-90%的汇合度进行成骨分化诱导,每3天更换一次成骨诱导培养基。诱导14 d后进行茜素红S染色:使用PBS缓冲液清洗后加入4%多聚甲醛固定15 min,加入适量茜素红S染色液染色30 min,充分清洗后加入蒸馏水覆盖细胞在显微镜下观察并拍照。

1.3.4 人脐带间充质干细胞的成脂分化诱导 在24孔板中接种hUC-MSCs(2 \times 10⁴/孔),当细胞达到80-90%的汇合度时进行成脂分化诱导。诱导10 d后进行油红O染色:使用PBS缓冲液清洗后加入ORO Fixative固定液固定30 min,60%异丙醇浸洗5 min,然后加入配制好的ORO Stain浸染20 min, Mayer苏木素染色液复染2 min,水洗后加入ORO Buffer 1 min,最后加入蒸馏水覆盖细胞在显微镜下观察并拍照。

1.3.5 人脐带间充质干细胞的成软骨分化诱导 将hUC-MSCs(5 \times 10⁵个细胞)以1500 rpm离心5 min沉淀细胞,然后更换为软骨培养基中培养21 d。弃去培养基清洗后使用4%甲醛固定30 min,使用乙醇脱水,石蜡包埋后切片。石蜡片置于二甲苯中脱蜡,然后在乙醇中浸泡去除二甲苯,蒸馏水清洗后阿利新蓝染液染色30 min,根据着色效果复染5 min,再次经过梯度乙醇与二甲苯脱水透明,树胶封片后观察拍照。

1.3.6 SH-SY5Y细胞的培养,模型构建和分组 人神经母细胞瘤SH-SY5Y细胞使用DMEM高糖培养基,置于5% CO₂和37℃的条件下培养。未经任何处理的SH-SY5Y细胞设置为对

对照组;使用 $10 \mu\text{M}/\text{mL}$ 的 $\text{A}\beta_{1-42}$ 处理 SH-SY5Y 细胞 24 h 构建 AD 体外细胞模型, 设置为 $\text{A}\beta$ 组; $\text{A}\beta$ 组 SH-SY5Y 细胞与 hUC-MSCs 等比例在 Trans-well 小室系统中共培养 24 小时, 设置为 MSC 组。

1.3.7 细胞凋亡检测 使用 Annexin V-PI 双染色法检测细胞凋亡。将制备好的 SH-SY5Y 细胞悬液以 1500 rpm 离心 5 min 沉淀细胞, 使用 PBS 缓冲液洗涤两次。用 $100 \mu\text{L}$ $1\times$ Annexin V Binding Buffer 重悬细胞, 加入 $5 \mu\text{L}$ AnnexinV-AbFlour 647 和 $2 \mu\text{L}$ 碘化丙啶轻轻混匀。室温避光孵育 15 min 后使用流式细胞仪上机检测。

1.3.8 CCK8 法检测细胞增殖 在 96 孔板中接种 SH-SY5Y 细胞 (2×10^3 /孔), 培养 24 h 后每孔加入 $10 \mu\text{L}$ CCK8 溶液, 置于 37°C 和 $5\% \text{CO}_2$ 条件下孵育 2 h, 然后用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。通过细胞存活率反应细胞的增殖能力, 细胞存活率 $=[(\text{As}-\text{Ab})/(\text{Ac}-\text{Ab})]\times 100\%$ (As 为实验组, Ac 为对照组, Ab 为空白孔)。

1.3.9 转录组测序 提取 $\text{A}\beta$ 组和 MSC 组 SH-SY5Y 细胞中的总 RNA, 使用 NanoDrop 2000 分光光度计和 Agilent Bioanalyzer 2100 分析仪验证 RNA 溶液的质量和完整性。通过检测后建立文库, 利用 Illumina 平台进行测序, 对原始读段进行质量修整, 并使用 TopHat2 与 hg19 人类基因组比对。

1.3.10 差异表达分析和富集分析 使用 R 软件的 "limma" 包对转录组测序数据进行两组之间的差异性分析, 设置 $|\log_2(\text{FC})| > 1$ 和 $P < 0.05$ 筛选出差异表达的基因, 差异分析结果以火山图进行可视化展示。将差异表达基因提交至 DAVID 在

线数据库, 进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能富集分析、京都基因和基因组百科全书 (kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析, 得到可能参与的生物学功能和信号通路。

1.3.11 实时定量 PCR Trizol 法提取细胞内的总 RNA, 使用反转录试剂盒从 $1 \mu\text{g}$ 总 RNA 中合成 cDNA。然后使用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂构建 PCR 体系, 在 7500 Fast Dx Real-Time PCR 系统中启动 PCR 程序: 95°C 预变性 5 分钟, 95°C 15 秒, 56°C 34 秒, 72°C 45 秒, PCR 循环 40 次。以 β -actin 为参照, 采用相对标准曲线法 ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$) 测定 RNA 的相对表达量。

1.4 统计学分析

使用 GraphPad Prism 8 软件进行统计学分析, 计量资料使用均值 \pm 标准差表示, 两组间比较采用独立样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人脐带间充质干细胞的特征性表面标志物及多向分化潜能

流式细胞术结果显示, 所提取的 hUC-MSCs 细胞表面阳性表达 CD73、CD90 和 CD105, 阴性表达 CD11b、CD19、CD34、CD45 和 HLA-DR (图 1 A)。所提取的 hUC-MSCs 经成骨分化诱导后通过茜素红 S 染色观察到矿化结节形成; 成脂分化诱导后通过油红 O 染色观察到脂滴形成; 成软骨分化诱导后通过阿利新蓝染色观察到酸性粘多糖形成 (图 1 B-D)。以上结果表明所提取的 hUC-MSCs 具有良好的多向分化潜能。

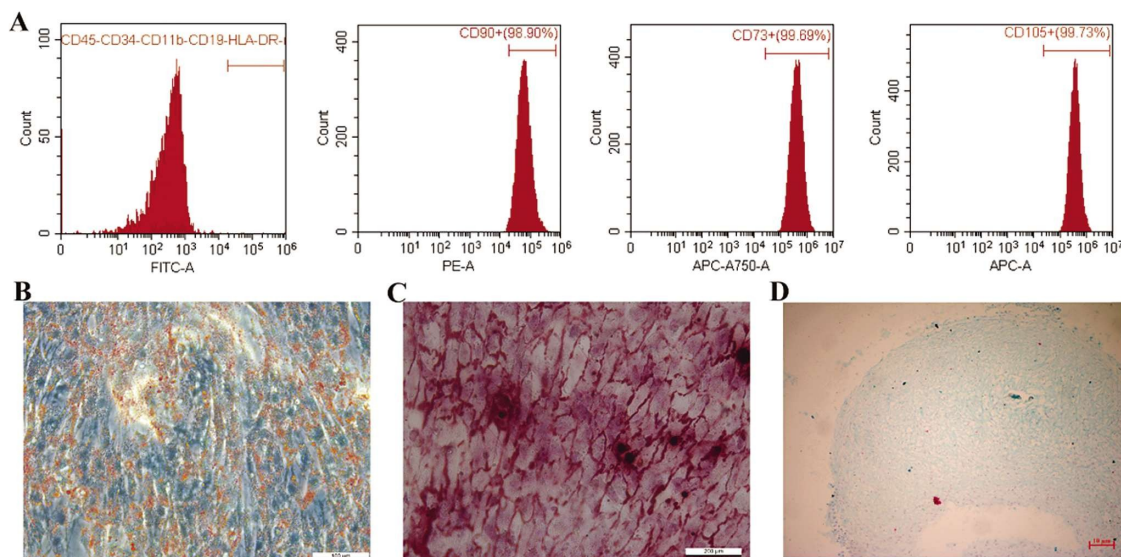


图 1 hUC-MSCs 的细胞表面标志物和多向分化潜能

Fig. 1 Cell surface markers and multidirectional differentiation potential of hUC-MSCs

注: A. 流式细胞术检测 hUC-MSCs 细胞表面标志物; B. 成脂分化后的油红 O 染色; C. 成骨分化后的茜素红 S 染色; D. 成软骨后的阿利新蓝染色。

Note: A. Detection of cell surface markers in hUC-MSCs by flow cytometry; B. Oil red O staining after lipogenic differentiation;

C. Alizarin red S staining after osteogenic differentiation; D. Alizarin blue staining after chondrogenic differentiation.

2.2 MSC 对 $\text{A}\beta$ 诱导 SH-SY5Y 细胞形态、凋亡和活力的影响

对照组 SH-SY5Y 细胞在镜下贴壁生长呈梭形; $\text{A}\beta$ 组 SH-SY5Y 细胞在加入 $\text{A}\beta_{1-42}$ 诱导 24 h 后镜下观察可见细胞数

量减少、形态皱缩; MSC 组 SH-SY5Y 细胞在共培养 24 h 后镜下观察见细胞数量较 $\text{A}\beta$ 组增多, 细胞形态得到恢复 (图 2)。

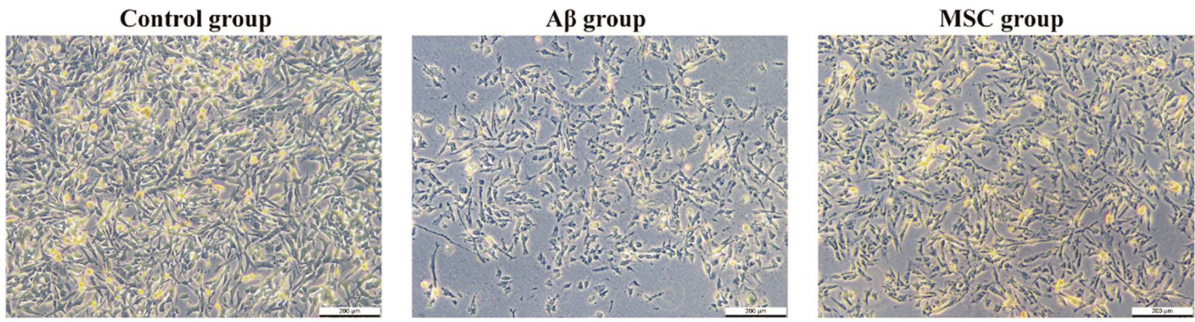


图 2 三组 SH-SY5Y 细胞的形态变化

Fig. 2 Morphological changes in three groups of SH-SY5Y cells

为了评估对照组、Aβ 组与 MSC 组中 SH-SY5Y 细胞凋亡的变化,使用 Annexin V -PI 双染色法检测细胞凋亡。结果表明与对照组相比,Aβ 组 SH-SY5Y 细胞早期凋亡和晚期凋亡明显

增加;与 Aβ 组相比,MSC 组 SH-SY5Y 细胞早期凋亡和晚期凋亡得到显著减少(图 3)。

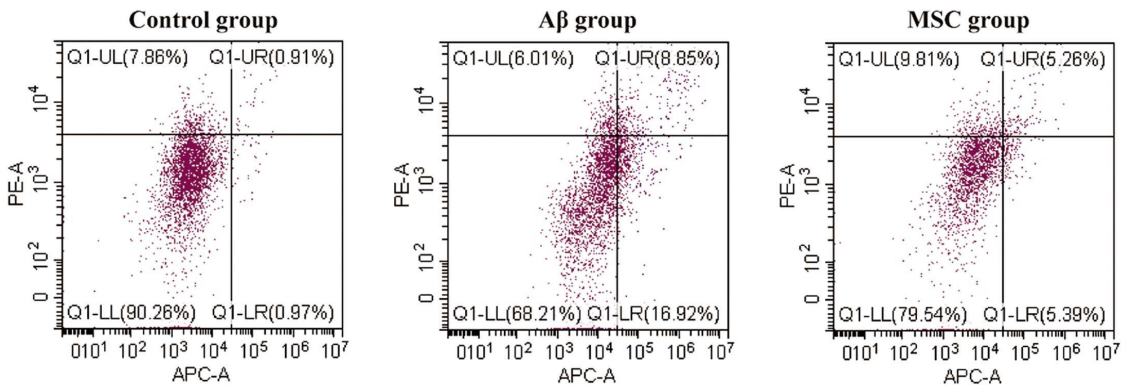


图 3 三组 SH-SY5Y 细胞的凋亡流式图

Fig. 3 Apoptosis flow diagram of three groups of SH-SY5Y cells

为了评估对照组、Aβ 组与 MSC 组中 SH-SY5Y 细胞活力的变化,采用 CCK8 法检测三组 SH-SY5Y 细胞的存活率。结果表明 Aβ₁₋₄₂ 诱导 SH-SY5Y 细胞 24 h 后细胞存活率显著下降,而与 hUC-MSCs 共培养后细胞存活率增加(图 4, P<0.05)。

为了进一步探索 hUC-MSCs 对 Aβ₁₋₄₂ 诱导 SH-SY5Y 细胞损伤的相关机制,对 Aβ 组与 MSC 组 SH-SY5Y 细胞行转录组测序并进行两组之间的差异基因表达分析。差异分析结果得到 287 个上调的差异表达基因和 142 个下调的差异表达基因(图 5)。

2.3 共培养后 SH-SY5Y 细胞中的差异表达基因变化

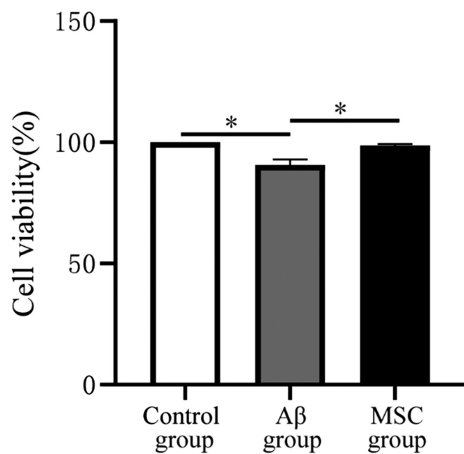


图 4 三组 SH-SY5Y 细胞存活率对比

Fig. 4 Comparison of survival rate of SH-SY5Y cells in three groups

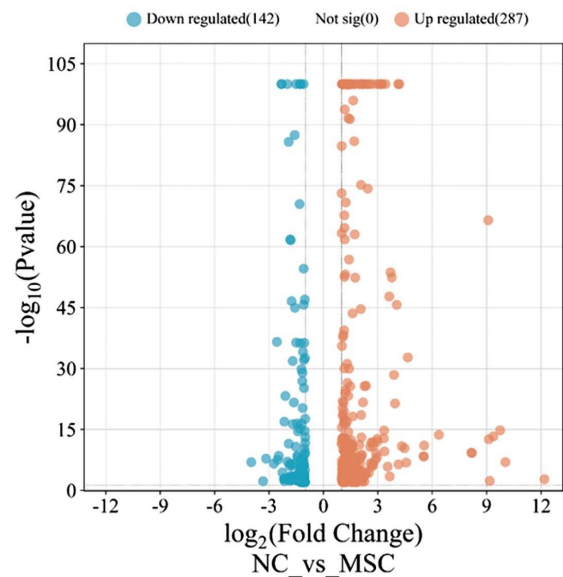


图 5 差异表达分析火山图

Fig. 5 Volcano map for differential expression analysis

2.4 差异表达基因的富集分析

GO 功能富集分析结果显示,上调差异表达基因可能与细胞粘附、嗜同性细胞通过质膜粘附分子、视觉感知、突触组织和细胞对缺氧的反应等生物进程有关。KEGG 通路富集分析结果显示,上调差异表达基因可能参与神经活性配体-受体相互作用、Apelin 信号通路、Serotonergic 突触通路、PI3K-Akt 信号通路和酒精中毒等信号通路(图 6)。

GO 功能富集分析结果显示,下调差异表达基因可能与半胱氨酸-型内多肽酶活性的负调控、信号转导、细胞粘附、胃肠上皮的维持和骨骼发育等生物进程有关。KEGG 通路富集分析结果显示,下调差异表达基因可能参与细胞因子-细胞因子受体相互作用、唾液分泌、IL-17 信号通路、肌动蛋白细胞骨架的调节和 NF-kappa B 信号通路有关(图 7)。

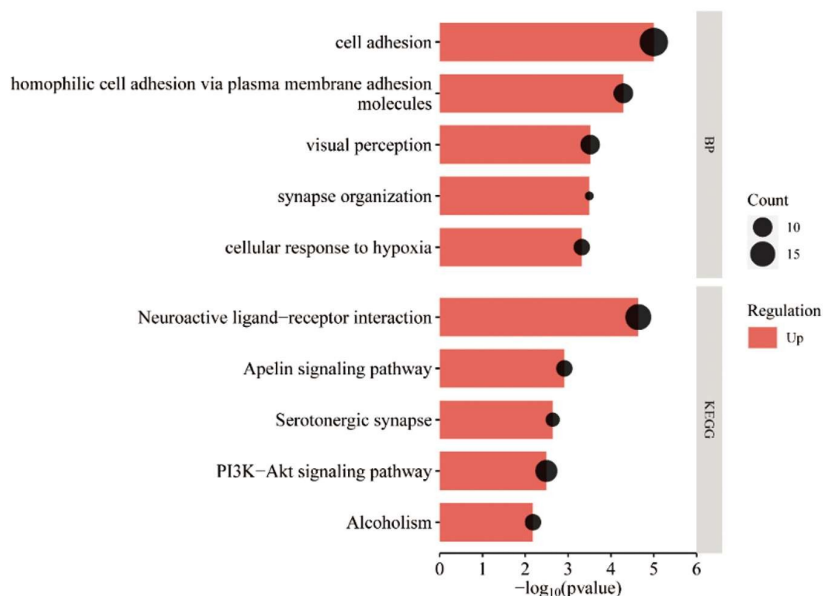


图 6 上调差异表达基因的富集分析

Fig. 6 Enrichment analysis of up-regulated differentially expressed genes

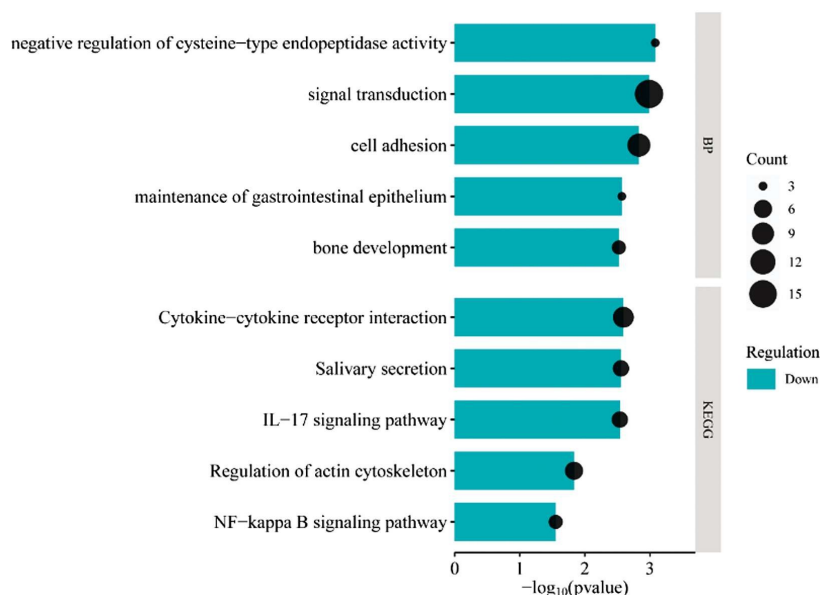


图 7 下调差异表达基因的富集分析

Fig. 7 Enrichment analysis of down-regulated differentially expressed genes

2.5 实时定量 PCR 验证 SH-SY5Y 细胞中 Apelin 信号通路关键基因表达

通过实时定量 PCR 检测并验证了 Aβ 组与 MSC 组 SH-SY5Y 细胞中 Apelin 信号通路关键基因 mRNA 水平的变化。结果显示, MSC 组细胞中 APLN 和 APLNR 的相对表达水

平较 Aβ 组显著升高 ($P < 0.05$)。这和转录组测序中的结果一致,提示 MSCs 可能通过激活 Apelin 信号通路改善 Aβ₁₋₄₂ 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤。

3 讨论

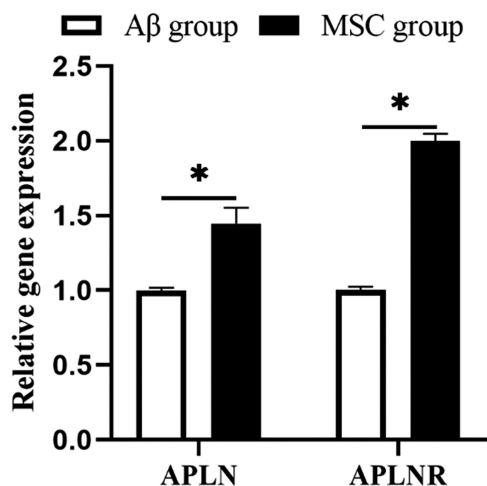


图 8 Aβ 组与 MSC 组 SH-SY5Y 细胞中 APLN 和 APLNR 的 mRNA 水平相对表达

Fig. 8 Relative expression of mRNA levels of APLN and APLNR in SH-SY5Y cells in Aβ group and MSC group

前期研究表明, MSCs 对 AD 临床前模型有改善作用,但是具体机制仍有待深入研究。在本研究中,使用 Aβ₁₋₄₂ 诱导 SH-SY5Y 细胞可以导致其形态发生改变,凋亡明显增加和细胞存活率明显减少。而使用 MSCs 共培养后, SH-SY5Y 细胞形态得到恢复,细胞凋亡和细胞存活率得到改善。

近年来,基于干细胞的再生医学疗法在疾病治疗中表现出巨大潜力。间充质干细胞的抗炎、抗凋亡、旁分泌和多向分化能力推动了它们在转化研究和临床试验中的应用,使其可以用于治疗多种疾病。其中包括涉及中枢神经系统结构的神经系统疾病,如中风^[11]、阿尔茨海默病^[12]、肌萎缩侧索硬化症^[13]、亨廷顿病^[14]、帕金森病^[15]、多发性硬化症^[16]和脊髓损伤^[17]等。而在 AD 的临床前研究中, MSCs 已被证明可以减少 Aβ 沉积和异常蛋白质降解^[18,19],上调乙酰胆碱水平并增加神经元存活率,从而改善 AD 动物模型的空间学习记忆能力。在最近的研究中, Zappa Villar 等人^[20]观察到 MSCs 治疗恢复了散发性 AD 大鼠模型海马体中突触结合素 -1、突触素和谷氨酸脱羧酶 65 突触标志物的表达水平,表明 MSCs 对突触蛋白丢失也具有一定的保护作用。

同时, MSCs 在神经系统疾病方面所发挥的治疗效果可归因于对神经元的保护作用。例如 MSCs 通过调节 SIRT-1/NF-κB 通路以减轻炎症小体信号传导和细胞凋亡,从而进一步增加神经元密度和神经元长度^[21]。MSCs 还可以通过调节 AD 大脑中小胶质细胞和星形胶质细胞的激活来调节神经炎症,起到抗炎作用并改善神经元存活。所制备的 MSCs 条件培养基能够通过改善线粒体功能障碍抑制冈田酸处理的 SH-SY5Y 细胞凋亡^[22]。在本研究中同样观察到, MSCs 对 Aβ₁₋₄₂ 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤起到保护作用,这和先前的研究相吻合,进一步证实了 MSCs 的神经保护作用。

此外,本研究进一步探讨了 hUC-MSC 对 Aβ 诱导 SH-SY5Y 细胞损伤的改善作用的潜在机制。生物信息学提示上调差异表达基因可能参与神经活性配体-受体相互作用、Apelin 信号通路和 PI3K-Akt 信号通路。而 Apelin/APJ 又进一步激活 PI3K/Akt 信号通路,所以提示 Apelin 信号通路在

MSCs 发挥的治疗效果中发挥关键作用。Apelin 是一种用于神经元之间脉冲传递的信号分子^[23],是一种在体内广泛表达的神经保护肽,而其中 apelin-13 是一种与 APJ 特异性结合的主要活性亚型,广泛分布在各种脑组织中,其参与多种生理和病理过程^[24,25]。Apelin-13 在抗衰老、抗炎、抗氧化和增殖以及修复促进中的作用被发现与 AD 密切相关。同时, apelin 与 APJ 联合可以调节多种信号通路从而诱导小胶质细胞和星形胶质细胞激活、减少神经元损伤和乙酰胆碱水平降低以改善认知功能^[26]。在本研究中发现 MSCs 改善 Aβ₁₋₄₂ 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤作用机制可能与激活 apelin 信号转导有关。

综上所述,本研究发现 MSCs 显著改善了 Aβ₁₋₄₂ 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤,转录组学测序分析预测并验证了 Apelin 信号通路在治疗过程中发挥重要作用。这为 AD 的疾病治疗提供了新的理论依据和参考。但本研究是基于体外细胞实验得到的结果,后续应在动物体内实验中进行验证。

参考文献(References)

- [1] Soria Lopez JA, González HM, Léger GC. Alzheimer's disease [J]. *Handb Clin Neurol*, 2019, 167: 231-255.
- [2] 付正兴. 老年痴呆症发病机制及其药物治疗[J]. *心血管病防治知识(学术版)*, 2014, (16): 122-123.
- [3] 王英全, 梁景宏, 贾瑞霞, 等. 2020-2050 年中国阿尔茨海默病患病情况预测研究[J]. *阿尔茨海默病及相关病*, 2019, 2(01): 289-298.
- [4] Andrzejewska A, Lukomska B, Janowski M. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: From Roots to Boost[J]. *Stem Cells*, 2019, 37(7): 855-864.
- [5] Mcgeer PL, Mcgeer EG. The amyloid cascade-inflammatory hypothesis of Alzheimer disease: implications for therapy [J]. *Acta Neuropathol*, 2013, 126(4): 479-497.
- [6] Li LY, Li JT, Wu QY, et al. Transplantation of NGF-gene-modified bone marrow stromal cells into a rat model of Alzheimer' disease[J]. *J Mol Neurosci*, 2008, 34(2): 157-163.
- [7] Park SE, Lee NK, Na DL, et al. Optimal mesenchymal stem cell delivery routes to enhance neurogenesis for the treatment of Alzheimer's disease: optimal MSCs delivery routes for the treatment of AD[J]. *Histol Histopathol*, 2018, 33(6): 533-541.
- [8] Hour FQ, Moghadam AJ, Shakeri-Zadeh A, et al. Magnetic targeted delivery of the SPIONs-labeled mesenchymal stem cells derived from human Wharton's jelly in Alzheimer's rat models [J]. *J Control Release*, 2020, 321: 430-441.
- [9] Varnum MM, Ikezu T. The classification of microglial activation phenotypes on neurodegeneration and regeneration in Alzheimer's disease brain [J]. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2012, 60(4): 251-266.
- [10] Abramoff B, Caldera FE. Osteoarthritis: Pathology, Diagnosis, and Treatment Options[J]. *Med Clin North Am*, 2020, 104(2): 293-311.
- [11] Namioka A, Namioka T, Sasaki M, et al. Intravenous infusion of mesenchymal stem cells for protection against brainstem infarction in a persistent basilar artery occlusion model in the adult rat [J]. *J Neurosurg*, 2018, 131(4): 1308-1316.
- [12] Shin JY, Park HJ, Kim HN, et al. Mesenchymal stem cells enhance autophagy and increase β-amyloid clearance in Alzheimer disease models[J]. *Autophagy*, 2014, 10(1): 32-44.

- [13] Nakanishi M, Watanabe Y, Honda N, et al. Dynamics of host and graft after cell sheet transplantation: Basic study for the application of amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Brain Res*, 2019, 1724: 146444.
- [14] Yu-Taeger L, Stricker-Shaver J, Arnold K, et al. Intranasal Administration of Mesenchymal Stem Cells Ameliorates the Abnormal Dopamine Transmission System and Inflammatory Reaction in the R6/2 Mouse Model of Huntington Disease [J]. *Cells*, 2019, 8(6).
- [15] Mei J, Niu C. Effects of engineered conserved dopamine neurotrophic factor-expressing bone marrow stromal cells on dopaminergic neurons following 6-OHDA administrations [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(2): 1207-1213.
- [16] Yan L, Jiang B, Niu Y, et al. Intrathecal delivery of human ESC-derived mesenchymal stem cell spheres promotes recovery of a primate multiple sclerosis model[J]. *Cell Death Discov*, 2018, 4: 28.
- [17] Seo JH, Jang IK, Kim H, et al. Early Immunomodulation by Intravenously Transplanted Mesenchymal Stem Cells Promotes Functional Recovery in Spinal Cord Injured Rats [J]. *Cell Med*, 2011, 2(2): 55-67.
- [18] Bae JS, Jin HK, Lee JK, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells contribute to the reduction of amyloid- β deposits and the improvement of synaptic transmission in a mouse model of pre-dementia Alzheimer's disease [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2013, 10(5): 524-531.
- [19] Harach T, Jammes F, Muller C, et al. Administrations of human adult ischemia-tolerant mesenchymal stem cells and factors reduce amyloid beta pathology in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Neurobiol Aging*, 2017, 51: 83-96.
- [20] Zappa Villar MF, López Hanotte J, Pardo J, et al. Mesenchymal Stem Cells Therapy Improved the Streptozotocin-Induced Behavioral and Hippocampal Impairment in Rats [J]. *Mol Neurobiol*, 2020, 57(2): 600-615.
- [21] Sarmah D, Datta A, Kaur H, et al. Sirtuin-1 - Mediated NF- κ B Pathway Modulation to Mitigate Inflammasome Signaling and Cellular Apoptosis is One of the Neuroprotective Effects of Intra-arterial Mesenchymal Stem Cell Therapy Following Ischemic Stroke[J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2022, 18(2): 821-838.
- [22] Zhang Z, Sheng H, Liao L, et al. Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Medium Improves Mitochondrial Dysfunction and Suppresses Apoptosis in Okadaic Acid-Treated SH-SY5Y Cells by Extracellular Vesicle Mitochondrial Transfer [J]. *J Alzheimers Dis*, 2020, 78(3): 1161-1176.
- [23] Wu L, Chen L, Li L. Apelin/APJ system: A novel promising therapy target for pathological angiogenesis [J]. *Clin Chim Acta*, 2017, 466: 78-84.
- [24] Hosoya M, Kawamata Y, Fukusumi S, et al. Molecular and functional characteristics of APJ. Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(28): 21061-21067.
- [25] Masri B, Morin N, Pedebernade L, et al. The apelin receptor is coupled to Gi1 or Gi2 protein and is differentially desensitized by apelin fragments[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(27): 18317-18326.
- [26] Bortolato B, Miskowiak KW, Köhler CA, et al. Cognitive remission: a novel objective for the treatment of major depression? [J]. *BMC Med*, 2016, 14: 9.

(上接第 4413 页)

- [5] Rendra E, Riabov V, Mossel DM, et al. Reactive oxygen species (ROS) in macrophage activation and function in diabetes [J]. *Immunobiology*, 2019, 224(2): 242-253.
- [6] Altoum AEA, Abbas MY, Osman AL, et al. The Influence of Oral Multivitamins Supplementation on Selected Oxidative Stress Parameters and Lipid Profiles among Sudanese Patients with Type-2 Diabetes[J]. *Open Access Maced J Med Sci*, 2019, 7(5): 775-778.
- [7] Barnstable CJ, Zhang M, Tombran-Tink J. Uncoupling Proteins as Therapeutic Targets for Neurodegenerative Diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(10): 5672.
- [8] Kanamori H, Naruse G, Yoshida A, et al. Morphological characteristics in diabetic cardiomyopathy associated with autophagy [J]. *J Cardiol*, 2021, 77(1): 30-40.
- [9] Li R, Du JH, Yao GM, et al. Autophagy: a new mechanism for regulating VEGF and PEDF expression in retinal pigment epithelium cells[J]. *Int J Ophthalmol*, 2019, 12(4): 557-562.
- [10] Kong FJ, Wu JH, Sun SY, et al. Liraglutide ameliorates cognitive decline by promoting autophagy via the AMP-activated protein kinase/mammalian target of rapamycin pathway in a streptozotocin-induced mouse model of diabetes[J]. *Neuropharmacology*, 2018, 131(3): 316-325.
- [11] Ramasubbu K, Devi Rajeswari V. Impairment of insulin signaling pathway PI3K/Akt/mTOR and insulin resistance induced AGEs on diabetes mellitus and neurodegenerative diseases: a perspective review[J]. *Mol Cell Biochem*, 2023, 478(6): 1307-1324.
- [12] Glaviano A, Foo ASC, Lam HY, et al. PI3K/AKT/mTOR signaling transduction pathway and targeted therapies in cancer[J]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1): 138.
- [13] Kma L, Baruah TJ. The interplay of ROS and the PI3K/Akt pathway in autophagy regulation [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2022, 69(1): 248-264.
- [14] Chen S, Peng J, Sherchan P, et al. TREM2 activation attenuates neuroinflammation and neuronal apoptosis via PI3K/Akt pathway after intracerebral hemorrhage in mice [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 168.