

# 抑制去整合素金属蛋白酶10对阿尔茨海默病 APPswe695 细胞凋亡的影响及其作用机制

王雨欣 何静 张伟 张旭 王蓉

100053 北京,首都医科大学宣武医院中心实验室

通信作者:王蓉, Email: rong\_wang72@aliyun.com

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2025.03.008

**【摘要】** 目的 探讨抑制去整合素金属蛋白酶10(ADAM10)对阿尔茨海默病 APPswe695 细胞凋亡的影响及其作用机制。方法 使用1、5、10、20  $\mu\text{mol/L}$ 浓度的ADAM10抑制剂GI254023X处理APPswe695细胞,并设置PBS空白对照组及二甲基亚砜(DMSO)阴性对照组。采用Cell Counting Kit(CCK-8)法检测细胞活性,蛋白免疫印迹检测丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(Akt)/叉头框蛋白O3a(FOXO3a)信号通路和凋亡相关蛋白水平。结果 GI254023X组的Akt和FOXO3a的总蛋白表达量分别为(0.973 0  $\pm$  0.157 7)及(1.149 8  $\pm$  0.196 7),与PBS组、DMSO组相比,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$ )。p-FOXO3a(S253)/FOXO3a经10  $\mu\text{mol/L}$  GI254023X作用24 h后的比值为(0.866 7  $\pm$  0.075 8),PBS组与DMSO组的比值分别为(1.000 0  $\pm$  0.000 0)及(1.016 2  $\pm$  0.050 6),高于GI254023X组( $P < 0.05$ ); p-Akt(S473)/Akt经10  $\mu\text{mol/L}$  GI254023X作用24 h后的比值为(1.180 6  $\pm$  0.150 2),PBS组与DMSO组的比值分别为(1.000 0  $\pm$  0.000 0)及(0.893 2  $\pm$  0.041 3),低于GI254023X组(均 $P < 0.05$ )。GI254023X能够使抗凋亡蛋白B细胞淋巴瘤因子-2(Bcl-2)表达显著降低( $P < 0.05$ ),促凋亡蛋白半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶9、促凋亡蛋白Bcl-2相关蛋白X表达均显著升高( $P < 0.05$ )。结论 使用10  $\mu\text{mol/L}$ 的ADAM10抑制剂GI254023X处理APPswe695细胞能抑制其细胞活性,并通过Akt/FOXO3a信号通路诱导APPswe695细胞凋亡。

**【关键词】** 阿尔茨海默病; 叉头框蛋白O3a; 去整合素金属蛋白酶10; 凋亡; SH-SY5Y

**基金项目:** 国家重点研发计划(2022YFC2403500)

## Effect of inhibiting disintegrin metalloproteinase 10 on apoptosis of Alzheimer disease APPswe695 cells and its mechanism

Wang Yuxin, He Jing, Zhang Wei, Zhang Xu, Wang Rong

Central Laboratory of Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China

Corresponding author: Wang Rong, Email: rong\_wang72@aliyun.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of inhibiting A Disintegrin and Metalloproteinase 10 (ADAM10) on apoptosis of Alzheimer's disease APPswe695 cells, a model of Alzheimer's disease, and to explore its underlying mechanism. **Methods** APPswe695 cells were treated with the ADAM10 inhibitor GI254023X at concentrations of 1, 5, 10, and 20  $\mu\text{mol/L}$ , with PBS and Dimethyl sulfoxide (DMSO) serving as blank and negative controls, respectively. Cell viability was assessed using the Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay, and protein expression levels of the serine/threonine kinase (Akt)/forkhead box protein O3a (FOXO3a) signaling pathway and apoptosis-related proteins were measured by Western blot. **Results** The total protein expression levels of serine/ threonine protein kinase (Akt) and Forkhead Box O3a (FOXO3a) in the GI254023X group were (0.973 0  $\pm$  0.157 7) and (1.149 8  $\pm$  0.196 7), respectively, showing no significant differences compared to the PBS and DMSO groups ( $P > 0.05$ ). However, the ratio of p-FOXO3a (S253)/FOXO3a after 24 h of treatment with 10  $\mu\text{mol/L}$  GI254023X was (0.866 7  $\pm$  0.075 8), significantly lower than those of the PBS (1.000 0  $\pm$  0.000 0) and DMSO (1.016 2  $\pm$  0.050 6) groups ( $P < 0.05$ ). Conversely, the ratio of p-Akt (S473)/Akt after 24 h of treatment with 10  $\mu\text{mol/L}$  GI254023X was (1.180 6  $\pm$  0.150 2), significantly higher than those of the PBS (1.000 0  $\pm$  0.000 0) and DMSO (0.893 2  $\pm$  0.041 3) groups ( $P < 0.05$ ). Additionally, GI254023X significantly reduced the expression of the anti-apoptotic protein B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) ( $P < 0.05$ ) and significantly increased the expression of the pro-apoptotic proteins caspase-3, caspase-9, and Bcl-2-associated X protein (Bax) ( $P < 0.05$ ).

**Conclusions** Treatment of APPswe695 cells with 10  $\mu$ mol / L ADAM10 inhibitor GI254023X significantly inhibited cell viability and induced apoptosis of APPswe695 cells through the Akt / FOXO3a signaling pathway.

**【 Key words 】** Alzheimer disease; Forkhead Box O3a; A Disintegrin and Metalloprotease; Apoptosis; SH-SY5Y

**Fund program:** National Key Research and Developmental Program of China (2022YFC2403500)

AD是最常见的神经退行性疾病,主要影响65岁以上人群<sup>[1]</sup>。AD患者表现为记忆力下降,通常伴有失语症、视觉空间能力受损等<sup>[2]</sup>。我国目前已正式进入深度人口老龄化阶段,2019年中国AD及其他痴呆的疾病患者占全球AD及其他痴呆患者总数的23.6%<sup>[3]</sup>。但是目前AD治疗药物研究进程缓慢,作用有限。因此,探索AD的发病机制仍具有重要意义。

AD的病理标志为细胞外淀粉样蛋白 $\beta$  (amyloid  $\beta$ -protein, A $\beta$ ) 斑块沉积、细胞内神经原纤维缠结和大脑神经元丢失。淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)是一种在神经元中含量丰富的跨膜蛋白,其蛋白水解会导致A $\beta$ 水平增加<sup>[4]</sup>。APP mRNA的剪接能够产生不同长度的异构体,大脑中主要包括APP695、APP751与APP770 3种亚型,分别包含695、751、770个氨基酸,其中APP695亚型占主导地位<sup>[5]</sup>。神经母细胞瘤细胞系SH-SY5Y比其他神经细胞系更具功能性,来源于神经嵴,能够转化为成熟的神经元表型,是神经退行性疾病研究中使用最广泛的细胞模型。SH-SY5Y细胞系在其未分化和分化状态下都被频繁使用<sup>[6]</sup>。SH-SY5Y细胞的增殖是一种未分化状态,与神经祖细胞或未成熟神经元的分化状态非常相似,有研究通过引入APP转录变异体标记系统来表征SH-SY5Y细胞的分化状态<sup>[7]</sup>。转染APPswe695基因后细胞内分泌A $\beta$ 水平增加,符合AD疾病特征。稳定转染过表达APP695瑞典型突变体的人神经母细胞瘤细胞SH-SY5Y细胞系被广泛应用于AD的体外研究<sup>[8]</sup>。

去整合素金属蛋白酶10(a disintegrin and metalloprotease10, ADAM10)作为AD治疗靶点,在APP非淀粉样代谢过程发挥关键作用<sup>[9]</sup>。ADAM10底物众多,除介导细胞表面受体外域脱落外,其蛋白活性还影响细胞黏附、迁移和增殖调节<sup>[10]</sup>。髓系细胞触发受体2(triggering receptor expressed on myeloid cells 2, TREM2)作为ADAM10的底物,被其裂解后可溶性TREM2的形式释放胞外域,阻断和逆转A $\beta$ 寡聚化和纤维化,能通过PI3K/Akt/叉头框蛋白O3a(forkhead box o3a, FOXO3a)信号通路改善AD小鼠

的神经炎症反应和认知障碍<sup>[11]</sup>。TREM2已被证明介导凋亡细胞碎片的吞噬清除和调节炎症反应<sup>[12]</sup>。TREM2的过表达能激活PI3K/Akt通路进而抑制小鼠海马神经元凋亡<sup>[13]</sup>。FOXO3a在人体各种器官和组织中广泛表达,在AD中已得到广泛关注,能抑制A $\beta$ 沉积<sup>[14]</sup>。其生物学效应主要通过磷酸化决定,当FOXO3a在细胞核中被磷酸化后会易位到胞质中,其转录活性受到抑制,通过发挥抗凋亡作用来保护神经元免受损伤<sup>[15]</sup>。然而,ADAM10能否通过FOXO3a信号通路调控APPswe695细胞的凋亡尚不明确。本研究旨在探究抑制ADAM10对APPswe695细胞凋亡的影响及其机制,为AD的治疗靶点提供参考依据。

## 一、材料与方法

1. 主要材料及主要仪器: (1)APPswe695细胞(稳定转染过表达APP695瑞典型突变体的人神经母细胞瘤细胞SH-SY5Y细胞系)由首都医科大学宣武医院检验科惠赠。(2)主要仪器: CO<sub>2</sub>细胞培养箱(美国Thermo公司); 蛋白免疫印迹电泳仪(美国Bio-Rad公司); 倒置相差显微镜(美国Olympus公司); 化学发光成像仪(杭州申花科技有限公司); 全波长酶标仪(美国Thermo公司)。

2. 实验试剂: ADAM10抑制剂GI254023X购自美国Selleck公司。二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)购自美国Sigma公司。DMEM培养基(dulbecco's modified eagle medium, 杜氏改良Eagle培养基)、0.25%胰蛋白酶-EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid, 乙二胺四乙酸)购自美国Gibco公司。一步法十二烷基硫酸钠-聚酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)凝胶快速制备试剂盒购自北京博泰斯生物技术有限公司。增强型化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)超敏发光液购自北京兰杰柯科技有限公司。细胞培养级磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS) (1 $\times$ )、细胞活力检测试剂盒(cell counting kit, CCK-8)购自上海翌圣生物技术有限公司。嘌呤霉素(puromycin dihydrochloride, puro)均购自上海碧云天生物技术有限公司。10 $\times$ 电转液、三乙醇

胺缓冲盐水溶液)缓冲液、放射免疫沉淀法缓冲液(radioimmunoprecipitation assay buffer, RIPA)、苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)均购自北京索莱宝科技有限公司。二喹啉甲酸法(bicinchoninic acid assay, BCA)蛋白定量试剂盒、10×电泳缓冲液、一抗稀释液均购自北京普利莱基因技术有限公司。聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜购自德国Merck公司。ADAM10抗体、FOXO3a(phospho S253)抗体、Bax抗体、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶9(Cysteiny Aspartate Specific Proteinase9, Caspase-9)抗体均购自英国Abcam公司。Caspase-3抗体、B细胞淋巴瘤因子-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)抗体、FoxO3a抗体均购自美国Cell Signaling Technology公司,  $\beta$ -actin抗体购自北京中杉金桥公司。Akt1/2/3抗体、p-Akt1/2/3抗体(Ser473)购自美国Santa Cruz Biotechnology公司。

3. 实验方法: (1) 细胞培养及分组。将APP<sub>swe695</sub>细胞接种于含10%胎牛血清和1  $\mu$ g/ml Puro的DMEM培养基, 置于37℃、5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱, 待细胞生长至80%以上进行传代。将对数生长期的APP<sub>swe695</sub>细胞分为3组, 即PBS组(空白对照)、DMSO组(阴性对照)、GI254023X组(GI254023X按照说明书用DMSO溶解制成50 mmol/L母液, 后用含10%胎牛血清的DMEM培养液稀释为终浓度为1、5、10、20  $\mu$ mol/L使用)。(2) CCK-8检测各组细胞活性。APP<sub>swe695</sub>细胞经0.125%胰蛋白酶-EDTA消化后用血细胞计数板计数, 以 $2 \times 10^4$ 的细胞密度在96孔板中接种细胞悬液100  $\mu$ L/孔, 置于37℃、5%CO<sub>2</sub>恒温培养箱培养12~24 h。待其贴壁后用1、5、10、20  $\mu$ mol/L GI254023X分别处理细胞, DMSO阴性对照组加入对应等量的DMSO溶剂, PBS空白对照组加入等量的PBS溶剂, 设置副孔。置于37℃、5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱培养48 h后每孔加入10  $\mu$ L CCK-8试剂孵育4 h后用酶标仪测定450 nm处的吸光度。(3) 蛋白免疫印迹。10  $\mu$ mol/L GI254023X处理APP<sub>swe695</sub>细胞24 h后收取细胞, 加入含有1% PMSF和1%磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液, 涡旋后在离心转速为12 000 r/min和4℃条件下离心10 min, 吸取上清液。使用BCA蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。在RIPA裂解液中加入5×SDS-PAGE蛋白上样缓冲液, 95℃金属浴5 min。SDS-PAGE聚丙烯凝胶电泳分离蛋白后, 使用湿转法转移到PVDF膜上。在含有5%脱脂奶粉的TBST缓冲液中封闭1 h后, 加入一抗4℃孵育过夜。次日置于摇床上用TBST缓冲液洗涤3次, 每次

5 min。室温孵育二抗1 h, 再用TBST缓冲液洗涤3次后进行显影。用ImageJ分析条带灰度值, 得到各组目的条带的相对表达值。

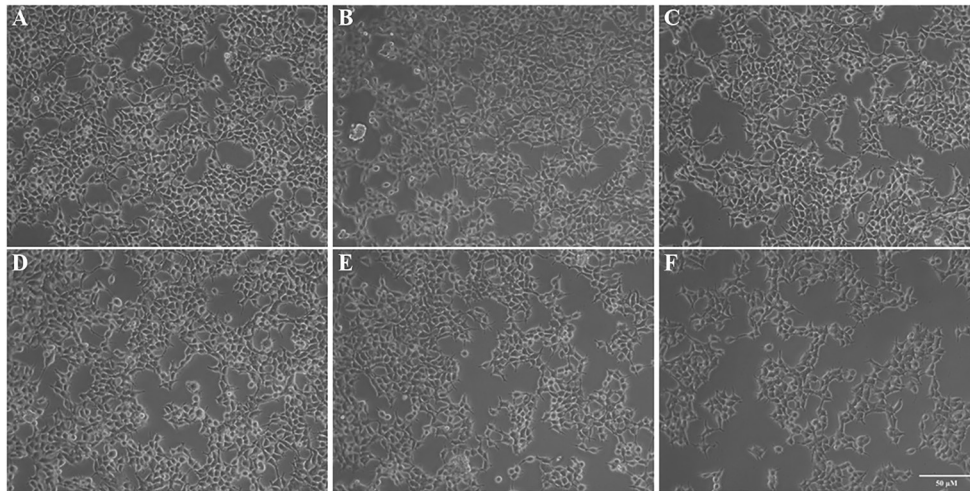
4. 统计学方法: 采用SPSS 21.0统计软件进行统计学分析。计数资料用频数表示; 采用Shapiro-Wilk检验正态分布, 符合正态分布且方差齐的计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 事后两两比较使用LSD-*t*检验。双侧检验,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 二、结果

1. 不同浓度GI254023X对APP<sub>swe695</sub>细胞形态及细胞数量的影响: 将APP<sub>swe695</sub>细胞以 $3 \times 10^5$ 密度接种于6孔板, 待其贴壁后加入不同浓度的GI254023X处理24 h, 在倒置相差显微镜下观察细胞形态并拍照, 观察结果见图1。PBS组与DMSO组APP<sub>swe695</sub>细胞密度接近, 随着GI254023X浓度提高, APP<sub>swe695</sub>细胞密度降低, 细胞边缘发亮, 贴壁能力减弱。

2. 不同浓度GI254023X对APP<sub>swe695</sub>细胞活性的影响: 用不同浓度的GI254023X处理APP<sub>swe695</sub>细胞48 h后检测各组细胞活性。PBS组与DMSO组细胞活性比较差异无统计学意义[(1.008 6 $\pm$ 0.007 9)比(1.000 0 $\pm$ 0.000 0),  $P > 0.05$ ]; 1、5、10、20  $\mu$ mol/L组细胞活性分别为(0.985 7 $\pm$ 0.016 2)、(0.946 9 $\pm$ 0.034 4)、(0.883 5 $\pm$ 0.058 3)、(0.816 8 $\pm$ 0.074 5)。随着GI254023X浓度的增加, 细胞活性逐渐降低。当GI254023X浓度为10  $\mu$ mol/L时的APP<sub>swe695</sub>细胞活性均低于PBS组与DMSO组, 差异有统计学意义( $t=3.683$ 、 $3.464$ ,  $P < 0.01$ ); 当GI254023X浓度为20  $\mu$ mol/L时的APP<sub>swe695</sub>细胞活性均低于PBS组, 差异有统计学意义( $t=4.435$ 、 $4.262$ ,  $P < 0.01$ )。与PBS组、DMSO组相比, GI254023X浓度为1、5、10  $\mu$ mol/L时的APP<sub>swe695</sub>存活率比较差异无统计学意义(均 $P > 0.05$ )。

3. GI254023X处理APP<sub>swe695</sub>细胞后对Akt/FOXO3a信号通路相关蛋白的影响: APP<sub>swe695</sub>细胞经10  $\mu$ mol/L的GI254023X处理24 h后, 使用蛋白免疫印迹法评估APP<sub>swe695</sub>细胞Akt蛋白的表达水平以及Akt蛋白在Ser473位点处磷酸化蛋白的表达水平、FOXO3a蛋白的表达水平以及FOXO3a蛋白在Ser253位点处磷酸化蛋白的表达水平, 计算p-FOXO3a(S253)/FOXO3a的比值, 结果见表1, 各组细胞中Akt和FOXO3a的总蛋白水平无明显变化。与PBS组、DMSO组相比, GI254023X组p-Akt(S473)/



注: A PBS 磷酸盐缓冲液; B DMSO 二甲基亚砜; C 1 μmol/L GI254023X 处理 APPswe695 细胞; D 5 μmol/L GI254023X 处理 APPswe695 细胞; E 10 μmol/L GI254023X 处理 APPswe695 细胞; F 20 μmol/L GI254023X 处理 APPswe695 细胞; 倒置相差显微镜拍摄(100 ×, Bar=50 μm)

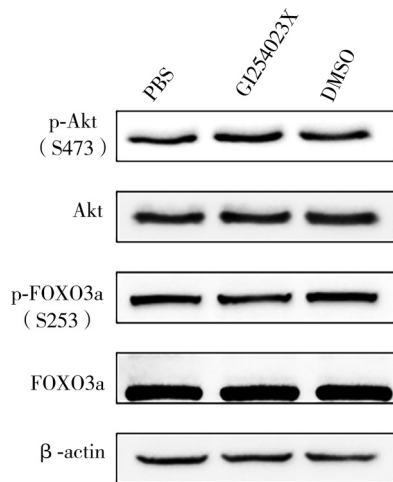
图1 不同浓度 GI254023X 处理 24 h 对 APPswe695 细胞形态及数量的影响

表1 三组 APPswe695 细胞的 Akt/FOXO3a 信号通路相关蛋白相对表达量比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	Akt	p-Akt(S473)/Akt	FOXO3a	p-FOXO3a(S253)/FOXO3a
PBS组	1.000 0 ± 0.000 0	1.000 0 ± 0.000 0	1.000 0 ± 0.000 0	1.000 0 ± 0.000 0
GI254023X 组	0.973 0 ± 0.157 7	1.180 6 ± 0.150 2 <sup>ab</sup>	1.149 8 ± 0.196 7	0.866 7 ± 0.075 8 <sup>ab</sup>
DMSO 组	0.930 0 ± 0.262 3	0.893 2 ± 0.041 3	1.088 2 ± 0.148 5	1.016 2 ± 0.050 6
F 值	0.119	7.824	0.717	7.292
P 值	0.890	0.021	0.526	0.025

注:与PBS组相比,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与DMSO组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ; PBS 磷酸盐缓冲液;DMSO 二甲基亚砜;Akt:丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶;p-Akt(S473):丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶丝氨酸473位点;FOXO3a 叉头框蛋白 O3a; p-FOXO3a(S253)叉头框蛋白 O3a 丝氨酸253位点

Akt 比值显著升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); p-FOXO3a(S253)/FOXO3a 比值显著降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图2。



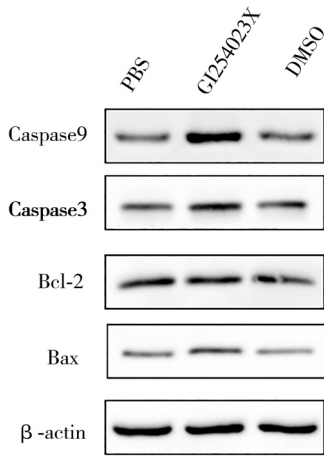
注: Akt 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶; p-Akt 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶丝氨酸473位点; FOXO3a 叉头框蛋白 O3a; p-FOXO3a(S253)叉头框蛋白 O3a 丝氨酸253位点; PBS 磷酸盐缓冲液; DMSO 二甲基亚砜

图2 GI254023X 处理 APPswe695 细胞后对 Akt/FOXO3a 信号通路相关蛋白表达水平的影响

4. GI254023X 抑制后 APPswe695 细胞的凋亡相关蛋白表达水平:检测 PBS 组、DMSO 组和 GI254023X 组凋亡相关蛋白的表达,结果见图3。与 PBS 组、DMSO 组相比,GI254023X 组 APPswe695 细胞中促凋亡蛋白 Bcl-2 相关蛋白 X (Bcl-2-associated X, Bax)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3(Caspase3)和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶9(Caspase9)蛋白表达水平均显著升高,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ ); Bcl-2 表达水平显著降低( $P < 0.05$ ),见表2。

讨论 随着人口老龄化加剧,AD 的患病率也在增加。APP 及其裂解片段在 CNS 中的功能已被广泛研究,特别是它们与 AD 的关系。研究证实,通过  $\alpha$ -分泌酶在非淀粉样蛋白生成途径产生的可溶性淀粉样前体蛋白  $\alpha$  (secreted amyloid precursor protein alpha, sAPP  $\alpha$ ) 在 CNS 中具有重要的抗凋亡和神经保护作用<sup>[16]</sup>。

GI254023X 是 ADAM10 的选择性强效抑制剂,能整合蛋白酶活性中心的  $Zn^{2+}$ <sup>[17]</sup>。用 GI254023X 处理细胞能抑制 sAPP  $\alpha$  生成并降低细胞存活率<sup>[18]</sup>。Milosch 等<sup>[19]</sup>研究发现 GI254023X 能加剧营养因子



注: Caspase9 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶9; Caspase3 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3; Bcl-2 B细胞淋巴瘤因子-2; Bax Bcl-2相关蛋白X

图3 GI254023X处理 APPswe695细胞后对凋亡相关蛋白表达水平的影响

和葡萄糖剥夺的野生型小鼠海马中的神经元死亡。重组 sAPP $\alpha$  保护原代海马神经元和 SH-SY5Y 细胞免受营养因子剥夺诱导的细胞死亡。并且 sAPP $\alpha$  能激活 PI3K/Akt 存活信号通路, 该激活作用由 G 蛋白依赖性信号转导介导, 并依赖于 holo-APP 及其细胞内 G 蛋白相互作用基序的存在, 从而防止细胞凋亡。

FOXO3a 来自哺乳动物叉头蛋白 O 家族, 是一种保守的转录因子<sup>[20]</sup>。FOXO3a 活性通过一系列激酶的翻译后修饰进行调节, 能够在细胞核和细胞质之间易位, 在炎症、自噬、细胞凋亡、氧化应激等过程中发挥关键作用, 通过调节特定靶基因的表达影响生物过程并减少疾病进展和发病机制<sup>[21]</sup>。FOXO3a 的生物学效应主要由其磷酸化水平决定, 其 Thr32、Ser253 和 Ser315 位点可被激活的 Akt 磷酸化, 导致 FOXO3a 与 14-3-3 蛋白结合而保留在细胞质中, 进而保持非活性状态<sup>[23]</sup>。作为重要的神经元介质, FOXO3a 对于维持神经元存活至关重要, FOXO3a 的敲低导致胚胎斑马鱼在发育过程中大量

的神经元凋亡<sup>[23]</sup>。TREM2 主要在 CNS 的小胶质细胞上表达, 被认为是 AD 中仅次于 APOE4 的第 2 位遗传危险因素<sup>[24]</sup>。TREM2 敲除会使 5 × FAD 小鼠海马体中的淀粉样斑块增加, 并显著降低 p-FOXO3a 水平, 能抑制 Akt/FOXO3a 信号通路的传导。而 TREM2 的过表达通过抑制 FOXO3a 转录活性增加了脂多糖处理的小胶质细胞中的 M2 表型小胶质细胞, PI3K 抑制剂 LY294002 能逆转 TREM2 介导的抗炎作用<sup>[11]</sup>。小鼠特异性敲除 FOXO3a 会导致皮层星形胶质细胞增殖异常。而 FOXO3a 的过表达抑制了星形胶质细胞的畸变, 增强了星形胶质细胞对 A $\beta$  的摄取并限制了 AD 的进展<sup>[25]</sup>。

本研究结果显示, GI254023X 处理后有效降低 APPswe695 活性, 并且能促进其细胞凋亡。GI254023X 处理 APPswe695 细胞后 Akt/FOXO3a 信号通路上的蛋白表达水平受影响, p-FOXO3a(S253)/FOXO3a 比值低于对照组, 刺激下游靶蛋白 Bax、Caspase 9、Caspase 3 表达增加并通过线粒体凋亡途径最终导致细胞凋亡, 进一步证实了 GI254023X 能显著抑制 Akt/FOXO3a 信号通路的活化。以上结果提示, GI254023X 能够促进 APPswe695 细胞凋亡, 此作用可能与 Akt/FOXO3a 信号通路受抑制相关。基于上述研究提示, 该结果可能是有由于 GI254023X 抑制 ADAM10 导致 sAPP $\alpha$  产生受抑制, 或通过抑制 ADAM10 导致其底物 TREM2 蛋白表达水平发生改变, 进而抑制下游 Akt 存活信号通路, 使得下游 FOXO3a 磷酸化水平发生改变, 促进细胞凋亡。

本研究存在一定的局限性: GI254023X 处理 APPswe695 细胞后 ADAM10 是否会对其自身底物以及 APP 代谢途径产生影响, 是否会生成相应产物从而促进细胞凋亡, 还有待未来进一步深入研究。本研究揭示了 GI254023X 促进 APPswe695 细胞凋亡的作用机理, 为 ADAM10 这一潜在治疗靶点的机制研究提供了研究基础。

表2 GI254023X 抑制后 APPswe695 细胞的凋亡相关蛋白表达水平及相对表达量比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	Caspase9	Caspase3	Bcl-2	Bax
PBS组	1.000 0 ± 0.000 0	1.000 0 ± 0.000 0	1.000 0 ± 0.000 0	1.000 0 ± 0.000 0
GI254023X 组	1.927 4 ± 0.192 0 <sup>a</sup>	1.322 4 ± 0.121 3 <sup>b</sup>	0.861 6 ± 0.0431 <sup>b</sup>	1.481 9 ± 0.203 4 <sup>b</sup>
DMSO 组	1.367 7 ± 0.146 9	1.147 0 ± 0.106 0	0.996 4 ± 0.075 6	1.100 5 ± 0.128 6
F 值	33.584	9.041	7.406	10.046
P 值	0.001	0.016	0.024	0.012

注: PBS 磷酸盐缓冲液; DMSO 二甲基亚砜; Caspase9 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶9; Caspase3 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3; Bcl-2 B细胞淋巴瘤因子-2; Bax Bcl-2相关蛋白X; 与PBS组相比, <sup>a</sup>P < 0.01; 与PBS组相比, <sup>b</sup>P < 0.05

**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** 研究构思与设计为王雨欣、王蓉, 研究实施、数据整理与分析为王雨欣, 论文修订、审校为王蓉、何静、张伟、张旭

### 参 考 文 献

- [ 1 ] 2023 Alzheimer's disease facts and figures[ J ]. *Alzheimers Dement*, 2023, 19(4): 1598-1695. DOI: 10.1002/alz.13016.
- [ 2 ] Liu E, Zhang Y, Wang JZ. Updates in Alzheimer's disease: from basic research to diagnosis and therapies[ J ]. *Transl Neurodegener*, 2024, 13(1): 45. DOI: 10.1186/s40035-024-00432-x.
- [ 3 ] 任汝静, 殷鹏, 王志会, 等. 中国阿尔茨海默病报告 2021 [ J ]. *诊断学理论与实践*, 2021, 20(4): 317-337. DOI: 10.16150/j.1671-2870.2021.04.001.
- [ 4 ] Yang KF, Zhang JY, Feng M, et al. Secretase promotes AD progression: simultaneously cleave Notch and APP[ J ]. *Front Aging Neurosci*, 2024, 16: 1445470. DOI: 10.3389/fnagi.2024.1445470.
- [ 5 ] Andrew RJ, Fisher K, Heesom KJ, et al. Quantitative interaction proteomics reveals differences in the interactomes of amyloid precursor protein isoforms[ J ]. *J Neurochem*, 2019, 149(3): 399-412. DOI: 10.1111/jnc.14666.
- [ 6 ] Xicoy H, Wieringa B, Martens GJ. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review[ J ]. *Mol Neurodegener*, 2017, 12(1): 10. DOI: 10.1186/s13024-017-0149-0.
- [ 7 ] Kulatunga D, Ranaraja U, Kim EY, et al. A novel APP splice variant-dependent marker system to precisely demarcate maturity in SH-SY5Y cell-derived neurons[ J ]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 12113. DOI: 10.1038/s41598-024-63005-y.
- [ 8 ] Ștefănescu R, Stanciu GD, Luca A, et al. Contributions of mass spectrometry to the identification of low molecular weight molecules able to reduce the toxicity of amyloid- $\beta$  peptide to cell cultures and transgenic mouse models of Alzheimer's disease[ J ]. *Molecules*, 2019, 24(6): 1167. DOI: 10.3390/molecules24061167.
- [ 9 ] Cervellati C, Trentini A, Zuin M, et al. BACE-1 and ADAM-10 as potential peripheral biomarkers for Alzheimer's disease[ J ]. *Curr Pharm Des*, 2025. DOI: 10.2174/0113816128339561241120135914.
- [ 10 ] Dorta S, Alexandre-Silva V, Popolin CP, et al. ADAM10 isoforms: optimizing usage of antibodies based on protein regulation, structural features, biological activity and clinical relevance to Alzheimer's disease[ J ]. *Ageing Res Rev*, 2024, 101: 102464. DOI: 10.1016/j.arr.2024.102464.
- [ 11 ] Wang Y, Lin Y, Wang L, et al. TREM2 ameliorates neuroinflammatory response and cognitive impairment via PI3K/AKT/FoxO3a signaling pathway in Alzheimer's disease mice[ J ]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(20): 20862-20879. DOI: 10.18632/aging.104104.
- [ 12 ] Zhao Y, Wu X, Li X, et al. TREM2 is a receptor for  $\beta$ -amyloid that mediates microglial function[ J ]. *Neuron*, 2018, 97(5): 1023-1031.e7. DOI: 10.1016/j.neuron.2018.01.031.
- [ 13 ] Liu AH, Chu M, Wang YP. Up-regulation of trem2 inhibits hippocampal neuronal apoptosis and alleviates oxidative stress in epilepsy via the PI3K/Akt pathway in mice[ J ]. *Neurosci Bull*, 2019, 35(3): 471-485. DOI: 10.1007/s12264-018-0324-5.
- [ 14 ] Omorou M, Huang Y, Gao M, et al. The forkhead box O3 (FOXO3): a key player in the regulation of ischemia and reperfusion injury[ J ]. *Cell Mol Life Sci*, 2023, 80(4): 102. DOI: 10.1007/s00018-023-04755-2.
- [ 15 ] Liu QQ, Wu GH, Wang XC, et al. The role of Foxo3a in neuron-mediated cognitive impairment[ J ]. *Front Mol Neurosci*, 2024, 17: 1424561. DOI: 10.3389/fnmol.2024.1424561.
- [ 16 ] Masi M, Biundo F, Fiou A, et al. The labyrinthine landscape of APP processing: state of the art and possible novel soluble APP-related molecular players in traumatic brain injury and neurodegeneration[ J ]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(7): 6639. DOI: 10.3390/ijms24076639.
- [ 17 ] Appel D, Hummel R, Weidemeier M, et al. Pharmacologic inhibition of ADAM10 attenuates brain tissue loss, axonal injury and pro-inflammatory gene expression following traumatic brain injury in mice[ J ]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 661462. DOI: 10.3389/fcell.2021.661462.
- [ 18 ] Woods NK, Padmanabhan J. Inhibition of amyloid precursor protein processing enhances gemcitabine-mediated cytotoxicity in pancreatic cancer cells[ J ]. *J Biol Chem*, 2013, 288(42): 30114-30124. DOI: 10.1074/jbc.M113.459255.
- [ 19 ] Milosch N, Tanriöver G, Kundu A, et al. Holo-APP and G-protein-mediated signaling are required for sAPP  $\alpha$ -induced activation of the Akt survival pathway[ J ]. *Cell Death Dis*, 2014, 5(8): e1391. DOI: 10.1038/cddis.2014.352.
- [ 20 ] Willcox BJ, Donlon TA, He Q, et al. FOXO3A genotype is strongly associated with human longevity[ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(37): 13987-13992. DOI: 10.1073/pnas.0801030105.
- [ 21 ] Hu W, Yang Z, Yang W, et al. Roles of forkhead box O (FoxO) transcription factors in neurodegenerative diseases: A panoramic view[ J ]. *Prog Neurobiol*, 2019, 181: 101645. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2019.101645.
- [ 22 ] Flachsbart F, Dose J, Gentschew L, et al. Identification and characterization of two functional variants in the human longevity gene FOXO3 [ J ]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 2063. DOI: 10.1038/s41467-017-02183-y.
- [ 23 ] Vincent B, Govitrapong P. Activation of the  $\alpha$ -secretase processing of A $\beta$  PP as a therapeutic approach in Alzheimer's disease[ J ]. *J Alzheimers Dis*, 2011, 24 Suppl 2: 75-94. DOI: 10.3233/JAD-2011-110218.
- [ 24 ] Guerreiro R, Wojtas A, Bras J, et al. TREM2 variants in Alzheimer's disease[ J ]. *N Engl J Med*, 2013, 368(2): 117-127. DOI: 10.1056/NEJMoa1211851.
- [ 25 ] Du S, Jin F, Maneix L, et al. FoxO3 deficiency in cortical astrocytes leads to impaired lipid metabolism and aggravated amyloid pathology[ J ]. *Aging Cell*, 2021, 20(8): e13432. DOI: 10.1111/accel.13432.

(收稿日期: 2024-08-07)

(本文编辑: 王影)