

# 莱菔硫烷通过抑制 A $\beta$ 42 寡聚体激活的 U87 细胞中 MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路降低反应性星形胶质细胞介导的 SH-SY5Y 凋亡

张淑芬<sup>1</sup>, 黄添容<sup>2</sup>, 杨灿洪<sup>2</sup>, 陈家镒<sup>2</sup>, 吕田明<sup>2</sup>, 张嘉发<sup>2</sup>

<sup>1</sup>广州市南沙区中医医院, 广东 广州 511455; <sup>2</sup>南方医科大学第三附属医院神经内科, 广东 广州 510630

**摘要:**目的 探讨莱菔硫烷(SFN)和 A $\beta$ 42 寡聚体对 U87 细胞的影响,及其通过下调 MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路逆转神经炎症介导的 SH-SY5Y 神经元凋亡。方法 以不同浓度 A $\beta$ 42 和 SFN 对 U87 细胞作用 48 h,使用 CCK-8 试剂盒检测各组细胞活性。实验分组:溶媒对照组、A $\beta$ 组、A $\beta$ +SFN 组、A $\beta$ +SB203580 组。使用 RT-qPCR 检测 U87 细胞中 IL-6 及 TNF- $\alpha$  mRNA 水平,采用 ELISA 检测细胞上清液中 IL-6 及 TNF- $\alpha$  水平,Western blotting 检测各组 U87 细胞蛋白中 p-p38、p-p65 和 GFAP 蛋白表达水平;U87 与 SH-SY5Y 共培养后提取 SH-SY5Y 蛋白,使用 Western blotting 检测 SH-SY5Y 细胞蛋白中 Bax 蛋白表达水平。星形胶质细胞和原代神经元培养及鉴定。以不同浓度 A $\beta$ 42 和 SFN 对星形胶质细胞作用 48 h 后使用 CCK-8 试剂盒检测各组细胞活性。星形胶质细胞和原代神经元共培养后,检测神经元细胞活性。结果 CCK-8 结果显示,与溶媒对照组相比,1.25  $\mu$ mol/L 浓度 A $\beta$ 42 导致 U87 细胞活力增加( $P<0.05$ ), $\geq 5$   $\mu$ mol/L 浓度活力降低( $P<0.05$ )。SFN 在 0~5  $\mu$ mol/L,对 U87 细胞作用 24 h 后,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。RT-qPCR、ELISA 以及 Western blotting 结果显示,在 U87 细胞中,A $\beta$ 组与其他 3 组相比,p-p38、p-p65 和 GFAP 表达升高( $P<0.05$ )、IL-6 和 TNF- $\alpha$  mRNA 表达升高( $P<0.05$ )及上清中 IL-6、TNF- $\alpha$  浓度升高( $P<0.001$ )。在 SH-SY5Y 细胞中,A $\beta$ 组与其他 3 组相比 Bax 表达升高( $P<0.05$ )。CCK-8 结果显示,与溶媒对照组相比,A $\beta$ 42  $\geq 10$   $\mu$ mol/L 浓度的活力降低( $P<0.05$ )。SFN 在 0~5  $\mu$ mol/L 对星形胶质细胞作用 24 h 后,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与溶媒对照组、A $\beta$ +SFN 组和 A $\beta$ +SB203580 组相比,A $\beta$ 组原代神经元细胞活性降低( $P<0.05$ )。结论 SFN 通过在 A $\beta$ 42 寡聚体激活的 U87 细胞中下调 MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路以降低星形胶质细胞介导的 SH-SY5Y 凋亡。

**关键词:** 莱菔硫烷;阿尔兹海默病;星形胶质细胞;淀粉样蛋白 $\beta$ ;MAPK;NF- $\kappa$ B;神经炎症;凋亡

## Sulforaphane reduces reactive astrocyte-mediated neuron apoptosis *in vitro* by inhibiting the MAPK/NF- $\kappa$ B signaling pathway in A $\beta$ 42 oligomer-activated astrocytes

ZHANG Shufen<sup>1</sup>, HUANG Tianrong<sup>2</sup>, YANG Canhong<sup>2</sup>, CHEN Jiayi<sup>2</sup>, LÜ Tianming<sup>2</sup>, ZHANG Jiafa<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Guangzhou Nansha District Traditional Chinese Medicine Hospital, Guangzhou 511455, China; <sup>2</sup>Department of Neurology, Third Affiliated Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510630, China

**Abstract: Objective** To explore the effects of sulforaphane (SFN) on A $\beta$ 42-activated U87 astrocyte-mediated apoptosis of SH-SY5Y neurons *in vitro*. **Methods** U87 cells treated with different concentrations of A $\beta$ 42, SFN or both were examined for changes in cell activity, IL-6 and TNF- $\alpha$  mRNA expression, release of IL-6 and TNF- $\alpha$  proteins, and expressions of p-p38, p-p65 and GFAP using CCK-8 assay, RT-qPCR, ELISA and Western blotting. SH-SY5Y neurons were co-cultured with U87 astrocytes treated with A $\beta$ 42 alone or in combination with SFN or SB203580 for 24 h, and the changes in Bax protein expression levels and viability of SH-SY5Y cells were examined. The effects of A $\beta$ 42, SFN, and their combination were also observed in astrocytes isolated from mouse brain tissues, and the indirect effects of astrocyte treatment on viability of the co-cultured primary neurons were assessed. **Results** The viability of U87 astrocytes increased significantly following treatment with 1.25  $\mu$ mol/L A $\beta$  42 but decreased after A $\beta$ 42 treatment above 5  $\mu$ mol/L. SFN treatments for 24 h below 5  $\mu$ mol/L did not significantly affect U87 cell viability. A $\beta$ 42 treatment significantly increased protein expressions of p-p38, p-p65 and GFAP, mRNA expression levels of IL-6 and TNF- $\alpha$ , and IL-6 and TNF- $\alpha$  levels in culture supernatant of U87 cells. SH-SY5Y cells co-cultured with A $\beta$ 42-treated U87 cells showed significantly increased protein expressions of Bax, and exhibited lowered viability following co-culture with 5  $\mu$ mol/L A $\beta$ 42-treated U87 cells. The isolated mouse astrocytes showed lowered viability following A $\beta$ 42 treatment above 10  $\mu$ mol/L, but SFN treatment below 5  $\mu$ mol/L for 24 did not obviously affect the cell viability. The primary neurons co-cultured with A $\beta$ 42-treated mouse astrocytes showed significantly lower cell viability than those co-cultured with the astrocytes treated with A $\beta$ +SFN or A $\beta$ +SB203580. **Conclusion** SFN attenuates astrocyte-mediated neuron apoptosis by inhibiting the MAPK/NF- $\kappa$ B signaling pathway in A $\beta$ 42 oligomer-activated astrocytes

**Keywords:** sulforaphane; Alzheimer's disease; astrocyte;  $\beta$ -amyloid; MAPK; nuclear factor- $\kappa$ B; neuroinflammation; apoptosis

收稿日期:2025-09-15

基金项目:广东省自然科学基金自由申请项目(2021A1515010006);南沙区民生科技项目(2021MS003);南方医科大学第三附属医院院长基金(YM2021002);2022年度院长基金护理专项(YH202203);2022年度院长基金护理专项(YH202203);南方医科大学护理科研专项基金重点项目(Z2021002);广州市科技计划项目(2024A04J4728)

作者简介:张淑芬,主治医师,E-mail: 252300534@qq.com;黄添容,副主任护师,E-mail: 120064577@qq.com;张淑芬、黄添容共同为第一作者

通信作者:张嘉发,硕士,主治医师,E-mail: 596471200@qq.com

随着人口结构转变和社会经济变革,阿尔兹海默病(AD)及相关认知障碍的负担急剧增加,对公共卫生和经济产生了重大影响。通过对 105 项国内外研究的整合分析发现,在 626 276 例老年受试者样本中,AD 的汇总患病率为 3.48%,发病密度为 7.9 例/(1000 人/年)<sup>[1]</sup>。AD 的防治是中国老龄化社会正在面对的巨大挑战之一。 $\beta$ -淀粉样蛋白(A $\beta$ )过度沉积和神经炎症反应是

AD的主要发病机制之一<sup>[2-6]</sup>。A $\beta$ 具有不同折叠状态,包括寡聚体、原纤维和纤维等,而过度折叠的A $\beta$ 纤维是最终聚集形成A $\beta$ 斑块,最终引起毒性<sup>[7]</sup>。神经炎症反应贯穿了AD整个病程,在AD的发病和发展中起重要作用。

莱菔硫烷(SFN)是众多异硫氰酸酯中的一种,是硫代葡萄糖苷的一种水解产物,具有抗氧化、抗癌、抗炎以及治疗退行性疾病的作用<sup>[8]</sup>。有研究表明,SFN是AD早期治疗的候选药物之一<sup>[8]</sup>。星形胶质细胞是大脑中占比最高的神经胶质细胞,但长期以来它们在中枢神经系统(CNS)中的角色却被认为是“静态旁观者”<sup>[10]</sup>。随着技术的进步,越来越多的研究发现,星形胶质细胞在大脑生长发育、动物行为以及退行性相关疾病中起着重要的作用<sup>[10]</sup>。星形胶质细胞是普遍存在的、形态多样的一种细胞,它与其他各种脑细胞广泛接触并且在其中发挥着不同的作用。星形胶质细胞在大脑中发挥着离子和神经递质稳态、突触形成和去除、突触调节、协助神经血管偶联和构成血脑屏障等作用<sup>[10]</sup>。

在A $\beta$ 斑块附近存在活化的星形胶质细胞,并与AD的神经原纤维缠结相关,这表明神经炎症与AD的病理学特征之间存在相关性<sup>[15]</sup>。既往研究发现SFN能有效抑制小胶质细胞MAPK/NF- $\kappa$ B信号通路介导的神经炎症进而降低小胶质细胞介导的神经元程序性坏死<sup>[16]</sup>。但是SFN通过其他胶质细胞,如星形胶质细胞保护神经元的作用的证据较少。有研究表明A $\beta$ 42寡聚体能诱导U87细胞释放IL-6、IL-1以及TNF- $\alpha$ 等炎症因子<sup>[13]</sup>。我们推测,SFN能通过抑制A $\beta$ 42寡聚体激活的U87细胞中MAPK/NF- $\kappa$ B信号通路以降低反应性星形胶质细胞介导的SH-SY5Y凋亡。U87细胞系,也称为U87MG细胞,是一种来源于神经胶质瘤的细胞系,具有上皮样形态,贴壁生长的特性,使其成为科研中常用的细胞模型之一。U87因其形态和功能上与星形胶质细胞相似,常在基础实验中用于替代星形胶质细胞<sup>[17-21]</sup>。已有文献用U87与SH-SY5Y共培养,研究星形胶质细胞与神经元之间的相互关系<sup>[21]</sup>。为了验证上述推测,本研究通过transwell共培养U87或SH-SY5Y细胞,并探讨其中可能的作用机制并通过原代细胞培养进一步验证假设,旨在探讨SFN用于治疗神经退行性疾病的可行性。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 出生24 h内的SPF级C57BL/6J新生小鼠,由南方医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂 A $\beta$ 42(上海吉尔生化公司);DMEM高糖培养基、DMEM/F12培养基、Neurobasal-A培养基、

细胞培养添加剂B27、谷氨酰胺、谷氨酸、胎牛血清(FBS)、青霉素-链霉素(10 000 U/mL)、胰蛋白酶/ETDA、p38抑制剂SB203580、SFN、Cell Counting Kit-8(MedChemExpress);多聚赖氨酸(PLL)、4%多聚甲醛固定液、免疫染色封闭液、免疫染色洗涤液、蛋白酶抑制剂混合物(通用型,100X)、RIPA裂解液(强)、BCA蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(5X)(碧云天);二甲亚砜(DMSO,MPBio);六氟异丙醇(上海阿拉丁生化科技股份有限公司);RNA isolater Total RNA Extraction Reagent、HiScript Q RT SuperMix for qPCR、ChamQ SYBR qPCR Master Mix(南京诺唯赞);小鼠白细胞介素6(IL-6)ELISA科研试剂盒、小鼠肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )ELISA科研试剂盒(酶免)。主要耗材和仪器:Transwell小室(Corning);共聚焦皿(赛宁);超净工作台(苏州净化设备公司);多功能酶标仪(Thermo);实时荧光定量PCR仪(罗氏LightCycler96, Roche)。

1.1.3 抗体 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(H+L)、AF488标记山羊抗兔IgG(H+L)(碧云天);MAP-2 Rabbit mAb、GFAP Rabbit mAb、Phospho-p38 MAPK XP<sup>®</sup> Rabbit mAb、Phospho-NF- $\kappa$ B p65 Rabbit mAb、Bax Rabbit mAb(Cell Signaling Technology);GAPDH Polyclonal 抗体(proteintech)。

### 1.2 A $\beta$ 42寡聚体制备

A $\beta$ 42寡聚体:参考既往研究步骤制备A $\beta$ 寡聚体<sup>[22]</sup>。用六氟异丙醇(HFIP)溶解A $\beta$ 42,充分震荡混匀,室温静置60 min,于冰上冷冻10 min,得1 mmol/L HFIP-A $\beta$ 42溶液。把HFIP-A $\beta$ 42溶液分装至无菌EP管,置于通风橱,干燥过夜。干燥完毕后EP管内形成A $\beta$ 42肽膜。用干燥的DMSO溶解肽膜,得5 mmol/L A $\beta$ 溶液。用预冷的无酚红的培养基稀释,得100  $\mu$ mol/L A $\beta$ 42溶液,使用0.22  $\mu$ m低蛋白吸附过滤器过滤。最后在4  $^{\circ}$ C条件下孵育24 h。获得A $\beta$ 42寡聚体。

### 1.3 细胞

1.3.1 U87和SH-SY5Y细胞系来源及培养 U87和SH-SY5Y细胞株由南方医科大学司法鉴定中心赠与。U87倍增时间为24~48 h,常规培养于含10% FBS,100 U/mL的青霉素-链霉素的DMEM高糖培养基中,在37  $^{\circ}$ C,5% CO<sub>2</sub>饱和湿度培养箱中培养,2~3 d传代,使用10<sup>6</sup>/mL的细胞密度进行实验。SH-SY5Y倍增时间为48~72 h,常规培养于含10% FBS,100 U/mL的青霉素-链霉素的DMEM高糖培养基中,在37  $^{\circ}$ C,5% CO<sub>2</sub>饱和湿度培养箱中培养,2~3 d传代,使用10<sup>6</sup>/mL的细胞密度进行实验。

1.3.2 小鼠星形胶质细胞的分离和培养<sup>[22]</sup> 将新生小鼠喷洒体积分数为0.75的乙醇消毒,断颈处死后,在无菌

条件下取脑,仔细去除脑膜和血管,剥离出大脑半球用PBS清洗,在体视显微镜下分离出皮层脑组织。剪碎后用0.1%含EDTA的胰酶消化5 min,使用含有10% FBS的DMEM/F12培养基中止消化。200目筛网过滤。将细胞悬液接种于培养瓶(T25),在37℃、5% CO<sub>2</sub>孵箱中25 min进行差速贴壁以去除杂细胞,吸出悬浮细胞,获得细胞悬液。以10% FBS DMEM/F12培养基为基础培养基。置于37℃、5% CO<sub>2</sub>细胞培养箱培养。培养3~5 d待星形胶质细胞生长铺满培养瓶底面的80%~90%,进行传代,传代前可将培养瓶放置在摇床上以200 r/min的速度摇2 h,然后移除上清,再用无菌的PBS漂洗2次,以达到纯化星形胶质细胞的目的,传代至第3代进行细胞纯度鉴定及后续实验。

1.3.3 小鼠原代神经元细胞的分离和培养<sup>[22]</sup> 获得细胞悬液步骤同星形胶质细胞。离心并以神经元的首次培养基(50 mL Neurobasal-A培养基+1 mL细胞培养添加剂B27+500 μL谷氨酰胺+25 μL谷氨酸+1%青/链霉素)重悬细胞。根据后续实验需要,接种于PLL包被的共聚焦皿或孔板上。置于37℃、5% CO<sub>2</sub>细胞培养箱培养。每隔2~3 d换液1次,换液使用的培养基应更换为专用的神经元换液培养基(50 mL Neurobasal-A培养基+1 mL细胞培养添加剂B27+500 μL谷氨酰胺+1%青/链霉素),并每天在导致显微镜下观察神经元的形态。原代神经元细胞培养5~6 d时即可用于后续实验。

#### 1.4 分组

以不同浓度Aβ<sub>42</sub>寡聚体和SFN对U87细胞作用后,检测细胞活性以确定药物浓度。再进行实验分组:溶媒对照组、Aβ组、Aβ+SFN组、Aβ+SB203580组。SB203580参考既往研究条件使用20 μmol/L浓度作用24 h<sup>[16]</sup>。对于Aβ+SFN组和Aβ+SB203580组,U87细胞先进行SFN或SB203580预处理24 h后,换液再加入Aβ<sub>42</sub>寡聚体作用48 h。在进行检测U87细胞相关实验时,把U87细胞种于孔板中。在进行检测SH-SY5Y相关实验时,U87细胞首先种于transwell上室,药物处理后,去除药物上清,再与种有SH-SY5Y的孔板组合。参考既往共培养研究,因人脑内星形胶质细胞占比72%~81%,神经元细胞占约10%,因此设置细胞比例为U87:SH-SY5Y=8:1<sup>[23]</sup>。共培养24 h后提取SH-SY5Y蛋白进行检测(图3A)。

以不同浓度Aβ<sub>42</sub>寡聚体和SFN对星形胶质细胞作用后,检测细胞活性以确定药物浓度。再进行实验分组:溶媒对照组、Aβ组、Aβ+SFN组、Aβ+SB203580组。对于Aβ+SFN组和Aβ+SB203580组,星形胶质细胞先进行SFN或SB203580预处理24 h后,换液再加入Aβ<sub>42</sub>寡聚体作用48 h。在进行检测星形胶质细胞相关实验时,把星形胶质细胞种于孔板中。在进行检测神经元

相关实验时,星形胶质细胞首先种于transwell上室,药物处理后,去除药物上清,再与种有神经元的孔板组合。参考既往共培养研究,因人脑内星形胶质细胞占比72%~81%,神经元细胞占约10%,因此设置细胞比例为星形胶质细胞:神经元细胞=8:1。

#### 1.5 实验方法

1.5.1 CCK-8细胞活性检测 药物作用U87细胞后,严格遵照CCK-8说明书,对各组U87细胞进行细胞活性检测。对于星形胶质细胞-神经元transwell共培养中神经元活性检测,先去除上层transwell和换液后进行CCK-8检测。

1.5.2 ELISA检测 遵照试剂盒说明书步骤,对U87上清进行ELISA检测以检测上清培养基中的TNF-α和IL-6的含量。

1.5.3 RT-qPCR 按RNA isolater Total RNA Extraction Reagent试剂盒说明书提取总RNA,检测U87细胞RNA浓度,按照HiScript Q RT SuperMix for qPCR和ChamQ SYBR qPCR Master Mix试剂盒说明书步骤进行RT-qPCR。引物由深圳华大基因科技有限公司合成。将目的基因扩增结果经内参校正后,以空白组的目的基因扩增结果作为溶媒对照,2<sup>-ΔΔCt</sup>法比较不同样品间mRNA的表达量差异。引物信息(表1)。

表1 qRT-PCR引物序列

Tab.1 Primers sequences for qRT-PCR

Primer	Sequence (5' to 3')
GAPDH-F	CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT
GAPDH-R	GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C
TNF-α-F	CTG TGA AGG GAA TGG GTG TT
TNF-α-R	CAG GGA AGA ATC TGG AAA GGT C
IL-6-F	GAG AGC ATT GGA AGT TGG GG
IL-6-R	CTT CCA GCC AGT TGC CTT CT

F: Forward primer; R: Reverse primer; RT: Reverse Transcription.

1.5.4 免疫荧光实验 星形胶质细胞或神经元接种于共聚焦皿中。室温下,加入4%多聚甲醛1 mL,15 min,进行细胞固定;去除4%多聚甲醛,用免疫荧光洗涤液浸泡8 min,共重复3次。室温下,用含10%山羊血清的免疫染色封闭液进行封闭1 h后,去除封闭液。加一抗MAP-2(1:200)或GFAP(1:200),4℃过夜。用免疫荧光洗涤液浸泡8 min,3次。加二抗AF488标记山羊抗兔IgG(1:100),在温箱内避光孵育45 min。用免疫荧光洗涤液浸泡8 min,3次。滴加DAPI染液,避光静置10 min后,用免疫荧光洗涤液浸泡8 min,3次。加入抗荧光淬灭PVP封片液。在倒置激光共聚焦荧光显微镜下进行观察、拍摄。对于纯度鉴定,选取3个随机视野,对于星

形胶质细胞,分别计数DAPI阳性细胞数和GFAP阳性细胞数,则星形胶质细胞纯度=[GFAP(+)DAPI(+)/DAPI(+)]×100%;对于神经元细胞,分别计数DAPI阳性细胞数和MAP-2阳性细胞数,则星形胶质细胞纯度=[MAP-2(+)DAPI(+)/DAPI(+)]×100%。

1.5.5 Western blotting 用4℃预冷的PBS缓冲液洗涤板中细胞3次,加入含有蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液(强)于冰上裂解10 min。超声5 s,共3次,使细胞充分裂解。4℃、12 000 r/min离心10 min,取上清,BCA蛋白浓度测定试剂盒定量后,混合蛋白样品和蛋白上样缓冲液,100℃或沸水浴加热3~5 min,以充分变性蛋白。取各组蛋白进行SDS-PAGE电泳分离转膜至PVDF膜上,分别加一抗p-p38、p-p65、GFAP、Bax、GAPDH(稀释比例均为1:10 000),用含5%脱脂奶粉封闭后4℃孵育缓慢摇动过夜,经TBST洗涤3次,5 min/次;室温用二抗(辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG,1:2000)孵育1~2 h,

TBST清洗后,使用ECL发光试剂盒曝光,拍照,并进行蛋白定量。

### 1.6 统计学分析

采用统计分析软件GraphPad Prism 9.0进行数据分析,各组数据以均数±标准差表示,多组间差异比较采用单因素方差分析,对于Western blotting条带半定量分析结果采取配对t检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CCK-8法检测Aβ42与SFN对U87细胞活性的影响

与溶媒对照组相比,Aβ42 1.25 μmol/L浓度组细胞活力增加( $P<0.05$ ,图1A),≥5 μmol/L浓度组细胞活力降低( $P<0.05$ ,图1A)。SFN在0~5 μmol/L内,对U87细胞作用24 h后,差异无统计学意义( $P>0.05$ ,图1B)。与溶媒对照组和Aβ+SFN组相比,Aβ组细胞活性下降( $P<0.05$ ,图1C);与溶媒对照组相比,Aβ+SFN组细胞活性无明显差异( $P>0.05$ ,图1C)。

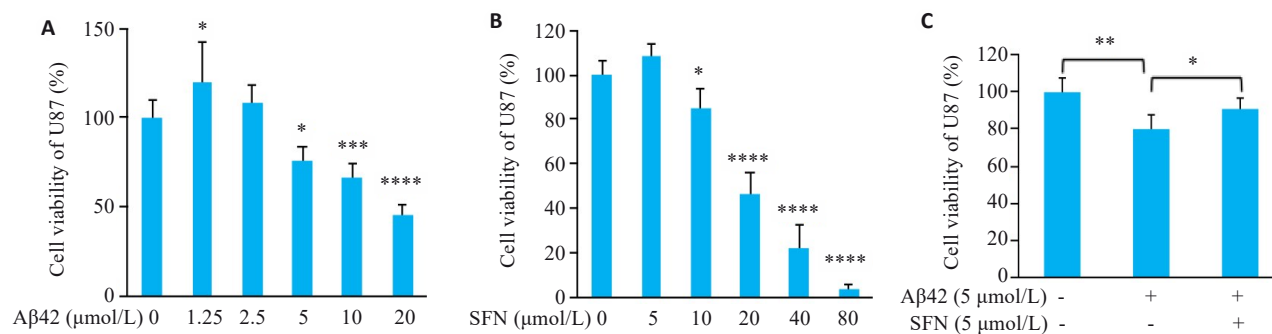


图1 CCK-8法检测Aβ42与SFN对U87细胞活性的影响

Fig.1 CCK-8 assay for assessing viability of U87 cells treated with different concentration of Aβ42, sulforaphane (SFN) and both. A: Viability of U87 cells treated with 0, 1.25, 2.5, 5, 10, and 20 μmol/L Aβ42 for 48 h (\* $P<0.05$ , \*\*\* $P<0.001$ , \*\*\*\* $P<0.0001$  vs 0 μmol/L group). B: Viability of U87 cells treated with 0, 5, 10, 20, 40, and 80 μmol/L SFN for 24 h (\* $P<0.05$ , \*\*\*\* $P<0.0001$  vs 0 μmol/L group). C: Viability of U87 cells treated with vehicle, Aβ42 (5 μmol/L), and Aβ42 (5 μmol/L)+SFN (5 μmol/L) (\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ).

### 2.2 Aβ42、SFN和p38抑制剂SB203580对U87细胞的影响

Western blotting结果显示,与溶媒对照组相比,Aβ组U87细胞p-p38、p-p65和GFAP表达升高( $P<0.05$ );与Aβ组相比,Aβ+SFN组和Aβ+SB203580组U87细胞p-p38、p-p65和GFAP表达降低( $P<0.05$ ,图2A~D)。

PCR结果显示,与溶媒对照组相比,Aβ组U87细胞IL-6和TNF-α mRNA表达升高( $P<0.05$ );与Aβ组相比,Aβ+SFN组和Aβ+SB203580组U87细胞IL-6和TNF-α mRNA表达降低( $P<0.05$ ,图2E、F)。

ELISA结果显示,与溶媒对照组相比,Aβ组U87细胞上清中IL-6和TNF-α浓度升高( $P<0.001$ );与Aβ组相比,Aβ+SFN组和Aβ+SB203580组U87细胞上清中IL-6和TNF-α浓度降低( $P<0.001$ ,图2G、H)。

### 2.3 Aβ42、SFN和SB203580通过U87细胞对SH-SY5Y的间接作用

与溶媒对照组相比,Aβ组SH-SY5Y的Bax表达升高( $P<0.05$ );与Aβ组相比,Aβ+SFN组和Aβ+SB203580组SH-SY5Y的Bax表达降低( $P<0.01$ ,图3)。

### 2.4 星形胶质细胞和原代神经元细胞纯度鉴定

本研究成功离体培养出较高纯度的星形胶质细胞和原代神经元细胞。用DAPI标记所有细胞核。选取3个随机视野,进行阳性细胞计数,结果显示星形胶质细胞纯度>98%(图4A~C),原代神经元细胞纯度>95%(图4D~F)符合后续实验要求。

### 2.5 CCK-8法检测Aβ42与SFN对星形胶质细胞活性的影响

与溶媒对照组相比,≥10 μmol/L浓度组与溶媒对

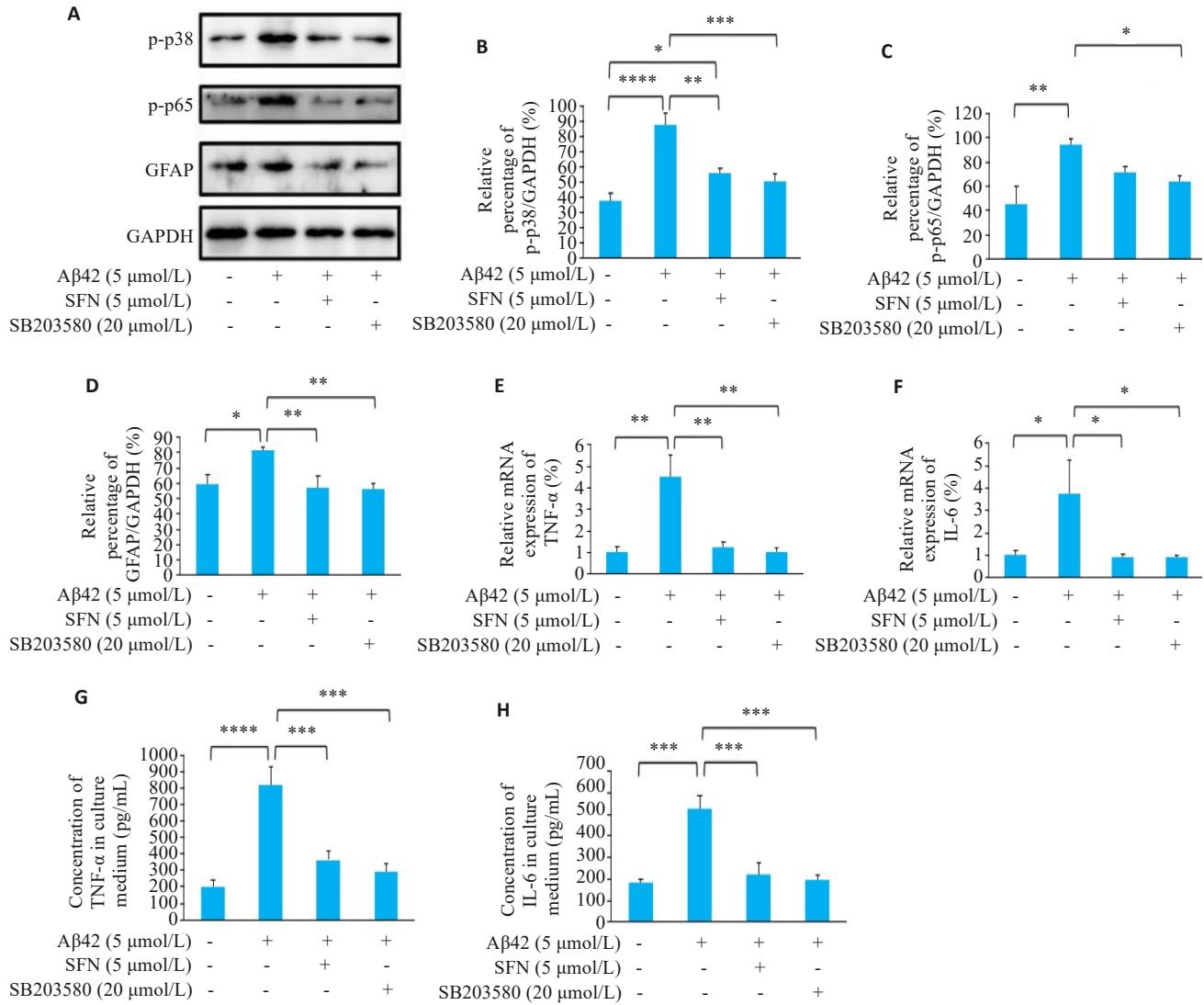


图2 Aβ42、SFN和p38抑制剂SB203580对U87细胞的影响

Fig.2 Effects of Aβ42 (5 μmol/L), SFN (5 μmol/L) and SB203580 (20 μmol/L) on protein expressions of p-p38, p-p65 and GFAP, mRNA expressions of TNF-α and IL-6, and TNF-α and IL-6 levels in culture supernatant of U87 cells. A-D: Protein expression levels of p-p38, p-p65 and GFAP in U87 cells treated with vehicle, Aβ42, Aβ42+SFN, and Aβ42+SB203580 detected by Western blotting (\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, \*\*\*\*P<0.0001). E, F: Expression levels of TNF-α and IL-6 mRNA in treated U87 cells detected by RT-qPCR (\*P<0.05, \*\*P<0.01). G-H: TNF-α and IL-6 levels in culture supernatant of the treated U87 cells (\*\*P<0.01, \*\*\*P<0.0001).

照组相比活力降低(P<0.05,图5A)。SFN在0~5 μmol/L范围内,对星形胶质细胞作用24 h后,差异无统计学意义(P>0.05,图5B)。与溶媒对照组和Aβ+SFN组相比,Aβ组细胞活性下降(P<0.01,图5C)。

### 2.6 Aβ42、SFN和SB203580通过星形胶质细胞对原代神经元的间接作用

CCK-8结果显示,与溶媒对照组、Aβ+SFN组和Aβ+SB203580组相比,Aβ组原代神经元细胞活性降低(P<0.05);溶媒对照组、Aβ+SFN组和Aβ+SB203580组间的神经元细胞活性差异无统计学意义(P>0.05,图6)。

### 3 讨论

本研究结果显示,Aβ42浓度大于5 μmol/L作用48 h时对U87具有毒性作用,但值得注意的是,在1.25 μmol/L

浓度作用48 h时存在一个正相峰,呈先高后低的变化趋势,提示Aβ42对U87细胞存在hormesis效应。hormesis效应是指细胞在受到轻度压力或弱毒性药物时,产生的有益作用的反应<sup>[22]</sup>。SFN在0~5 μmol/L内,对U87细胞作用24 h后,无显著性差异,提示在此作用时间SFN的安全浓度是0~5 μmol/L。基于以上实验结果,本研究选取研究选用5 μmol/L浓度Aβ42和5 μmol/L SFN作为实验药物浓度,分别设置溶媒对照组、Aβ组和Aβ+SFN组。Aβ组与溶媒对照组相比细胞活性下降,而Aβ+SFN组和溶媒对照组无显著性差异,提示SFN可逆转Aβ42对U87细胞造成的毒性作用。

IL-6和TNF-α是较为常见的炎症因子,有研究表明Aβ42寡聚体能诱导星形胶质细胞释放IL-6、IL-1以及TNF-α等炎症因子<sup>[22]</sup>。GFAP作为反应性星形胶质

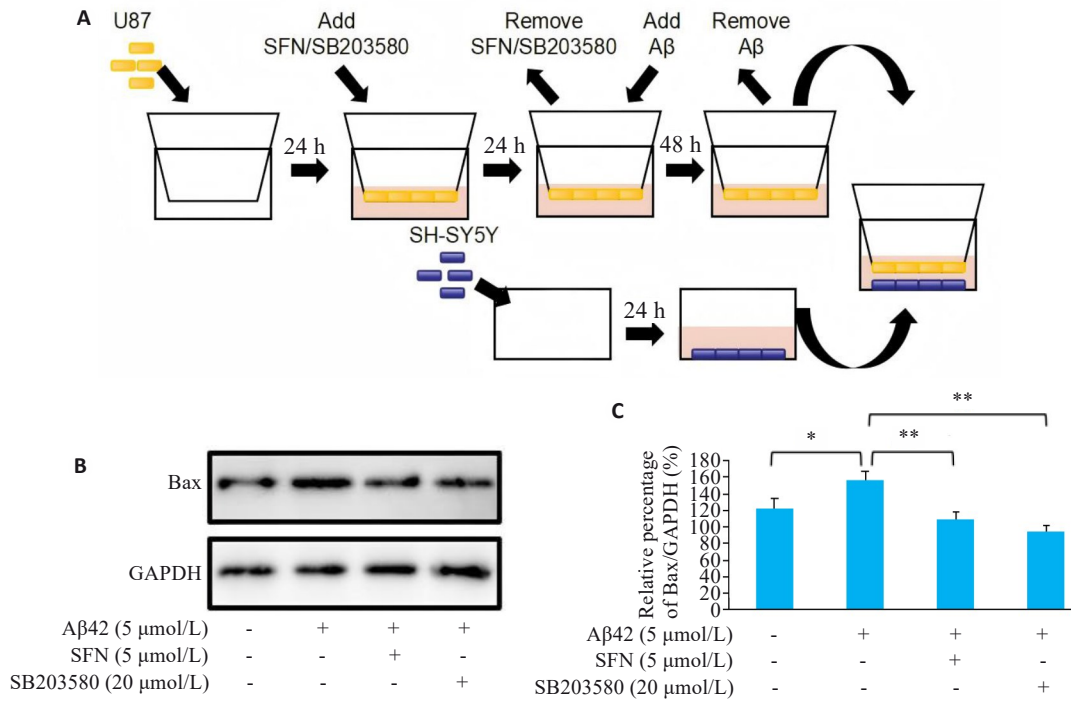


图3 A $\beta$ 42、SFN和p38抑制剂SB203580通过U87细胞对SH-SY5Y的间接作用

Fig. 3 Indirect effects of A $\beta$ 42, SFN and SB203580 treatment of U87 cells on co-cultured SH-SY5Y neurons. **A:** Transwell co-culture scheme of U87 and SH-SY5Y Cells. **B:** Protein expression of Bax in SH-SY5Y cells co-cultured with U87 cells treated with vehicle, A $\beta$ 42, A $\beta$ 42+SFN, and A $\beta$ 42+SB203580. **C:** Quantification of Bax expression levels. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01.

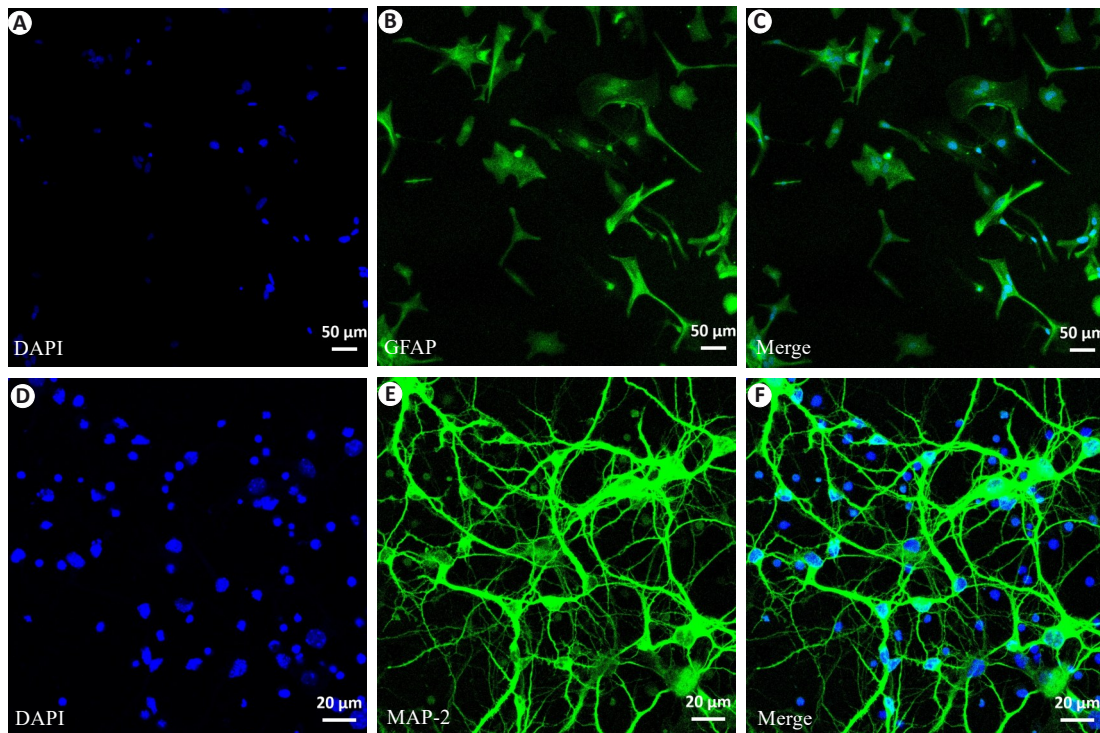


图4 星形胶质细胞和原代神经元细胞纯度鉴定

Fig. 4 Purity identification of astrocytes and primary neurons isolated from mouse brain tissues. **A-C:** Immunofluorescence staining for assessing purity of the astrocytes labeled with GFAP (green). DAPI (blue) was used to label the cell nuclei (Scale bar=50  $\mu$ m). **D-F:** Immunofluorescence staining for assessing purity of the primary neurons labeled with MAP-2 (green). DAPI (blue) was used to label the cell nuclei (Scale bar=20  $\mu$ m).

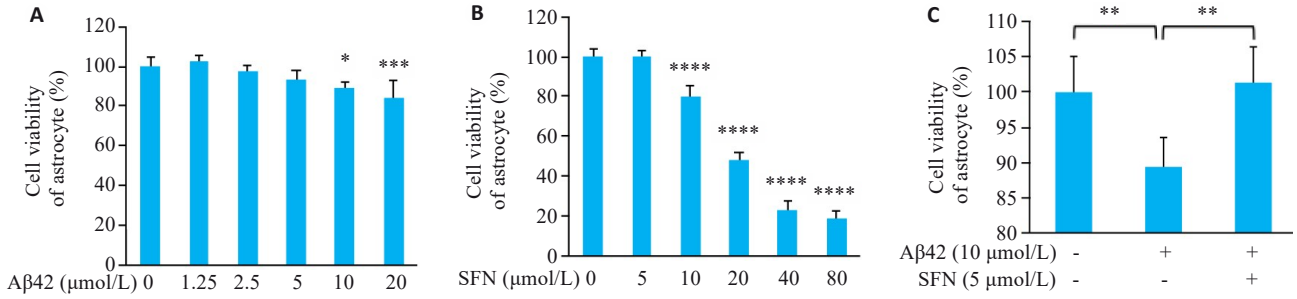


图5 CCK-8法检测Aβ42与SFN对星形胶质细胞活性的影响

Fig.5 CCK-8 assay for assessing the effect of different concentrations of Aβ42, SFN and their combination on viability of isolated mouse astrocytes. **A:** Viability of mouse astrocytes treated with 0, 1.25, 2.5, 5, 10, and 20 μmol/L Aβ42 for 48 h (\*P<0.05, \*\*\*P<0.001 vs control group). **B:** Viability of mouse astrocytes treated with 0, 5, 10, 20, 40, and 80 μmol/L SFN for 24 h (\*\*\*\*P<0.0001 vs control group). **C:** Viability of mouse astrocytes treated with vehicle, Aβ42 (10 μmol/L), and Aβ42 (10 μmol/L) + SFN (5 μmol/L) (\*P<0.05, \*\*P<0.01).

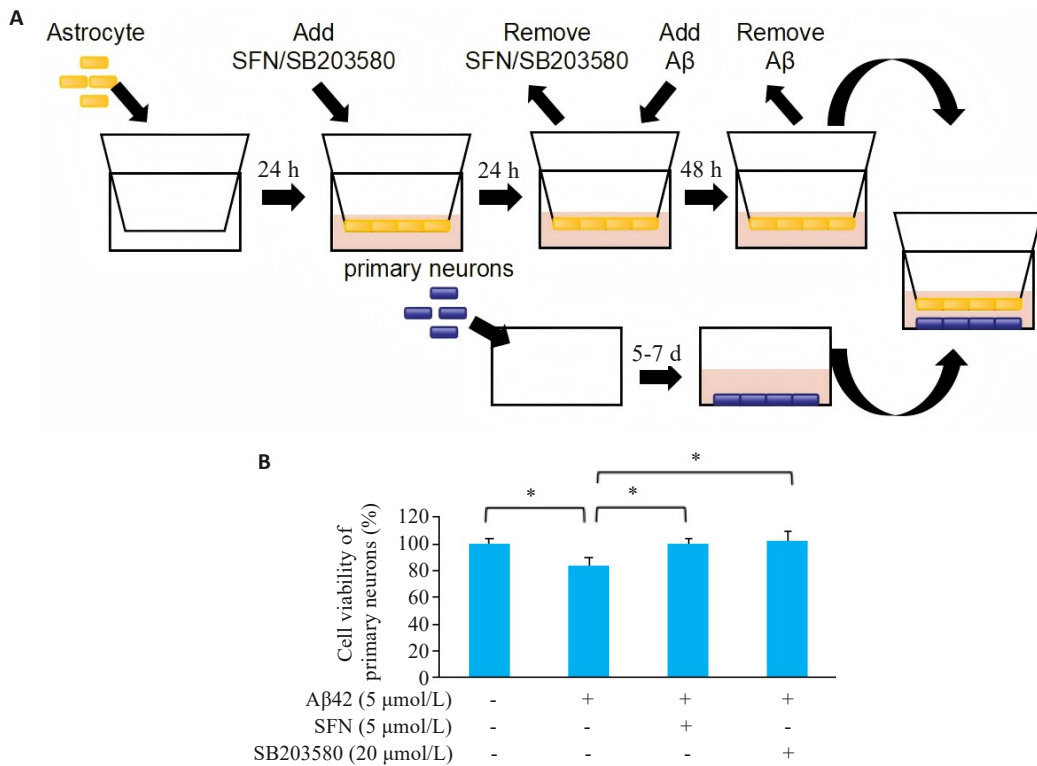


图6 Aβ42、SFN和p38抑制剂SB203580通过星形胶质细胞对原代神经元细胞的间接作用

Fig.6 Indirect effects of Aβ42, SFN and SB203580 treatment of isolated mouse astrocytes on the primary neurons. **A:** Transwell co-culture scheme for mouse astrocytes and primary neurons. **B:** Viability of primary neurons co-cultured with mouse astrocytes treated with vehicle, Aβ42 (10 μmol/L), Aβ42 (10 μmol/L)+SFN (5 μmol/L), and Aβ42 (10 μmol/L)+SB203580 (20 μmol/L). \*P<0.05.

细胞的标志物,用于评估星形胶质细活化水平<sup>[22]</sup>。SB203580是p38 MAPK的常用抑制剂<sup>[26-29]</sup>。结合既往研究阳性结果,SFN能有效抑制小胶质细胞MAPK/NF-κB信号通路介导的神经炎症<sup>[16]</sup>。我们假设SFN在星形胶质细胞中也有类似作用,因此设立溶媒对照组、Aβ组、Aβ+SFN组和Aβ+SB203580组,以探讨Aβ和SFN通过MAPK/NF-κB信号通路对星形胶质细胞的影响。RT-qPCR、ELISA、以及Western blotting结果显示,在U87细胞中,SFN能通过抑制Aβ诱导MAPK/NF-κB信

号通路活化,进而降低GFAP表达、IL-6和TNF-α释放水平。

目前认为导致AD神经退行性变的主要因素有神经毒素、tau蛋白的神经纤维缠结形成、神经元中Aβ的累积、线粒体功能障碍、活性氧的产生以及细胞因子释放引起的神经炎症,这些因子刺激各种信号分子,最终导致细胞凋亡<sup>[25, 30]</sup>。细胞凋亡是一种生物学机制,指的是细胞接受特定刺激后主动进入死亡的过程。许多研究表明神经元的凋亡在AD中起着关键作用<sup>[31-34]</sup>。因此

我们检测了不同分组 SH-SY5Y Bax 的表达,以评估神经元凋亡情况。为了排除 A $\beta$ 、SFN 和 SB203580 等药物直接作用 SH-SY5Y 干扰结果,本研究设计了 transwell 共培养实验。SFN 和 SB203580 药物预处理 transwell 上室的 U87 细胞 24 h,然后使用培养基洗去上室中的药物,再加入 A $\beta$ 42 作用 48 h,最后与种有 SH-SY5Y 的孔板结合。参考既往共培养研究,因人脑内星形胶质细胞占比 72%~81%,神经元细胞占约 10%,因此设置细胞比例为 U87:SH-SY5Y=8:1<sup>[23]</sup>。在 SH-SY5Y 细胞中,A $\beta$  组与其他 3 组相比 Bax 表达升高,提示 SFN 逆转了 A $\beta$  42 通过激活 U87 细胞 MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路,降低了 SH-SY5Y 细胞的凋亡。

尽管细胞系为体外研究的常用工具,但其与原代细胞存在一定差异。本研究开展了原代细胞培养工作,构建了星形胶质细胞-原代神经元共培养模型,以进一步验证相关假设。本研究制备的星形胶质细胞和原代神经元细胞纯度较高,可满足后续实验要求。A $\beta$ 42 浓度大于 10  $\mu$ mol/L 作用 48 h 时对 U87 具有毒性作用,SFN 在 0~5  $\mu$ mol/L 范围内,对星形胶质细胞作用 24 h 后,无显著性差异,提示在此作用时间 SFN 的安全浓度是 0~5  $\mu$ mol/L。基于以上实验结果,本研究选取研究选用 10  $\mu$ mol/L 浓度 A $\beta$ 42 和 5  $\mu$ mol/L SFN 作为实验药物浓度,分别设置溶媒对照组、A $\beta$  组和 A $\beta$ +SFN 组。A $\beta$  组与溶媒对照组相比细胞活性下降,而 A $\beta$ +SFN 组和溶媒对照组无显著性差异,提示 SFN 可逆转 A $\beta$ 42 对星形胶质细胞造成的毒性作用。本研究星形胶质细胞-原代神经元共培养模型进一步验证假设发现,与溶媒对照组、A $\beta$ +SFN 组和 A $\beta$ +SB203580 组相比,A $\beta$  组原代神经元细胞活性降低。这结果重复验证了,A $\beta$  可能通过诱导星形胶质细胞的 MAPK/NF- $\kappa$ B 通路活化,分泌相关炎症因子,导致神经元凋亡。而 SFN 能通过抑制 MAPK/NF- $\kappa$ B 通路活化进而抑制后续通路。

本研究的主要发现为:SFN 可通过星形胶质细胞介导的神经保护作用减轻神经元损伤,且排除了药物直接作用于神经元对实验结果的干扰。然而,细胞间信号通路具有高度复杂性,在体内微环境中,星形胶质细胞不仅通过分泌炎症因子调控神经元活性,还可通过直接接触等多种方式影响其他细胞。本研究聚焦于星形胶质细胞炎症因子相关信号通路对神经元的作用机制,后续研究可进一步探讨星形胶质细胞通过直接接触等途径对神经元及其他细胞的影响。

综上所述,本研究表明 A $\beta$  寡聚体能显著激活 U87 星形胶质细胞 MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路,促进其向反应性表型转化,并伴随 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的释放增加。这些炎症因子可进一步诱导 SH-SY5Y 神经元发生凋亡。SFN 通过抑制 A $\beta$  诱导的 MAPK/NF- $\kappa$ B 通路活化,逆转

星形胶质细胞反应性转化,降低 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的释放水平,从而减少神经元凋亡,延缓 AD 的病理进程。因此,SFN 干预治疗及靶向抑制星形胶质细胞 MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路的药物策略,可能成为 AD 的有效治疗手段。

**Declaration of interests:** The authors declare no competing interests.

#### 参考文献:

- [1] Ji QQ, Chen JQ, Li YF, et al. Incidence and prevalence of Alzheimer's disease in China: a systematic review and meta-analysis [J]. *Eur J Epidemiol*, 2024, 39(7): 701-14.
- [2] Jorfi M, Maaser-Hecker A, Tanzi RE. The neuroimmune axis of Alzheimer's disease [J]. *Genome Med*, 2023, 15(1): 6.
- [3] Kim J, Lee HJ, Park SK, et al. Donepezil regulates LPS and a $\beta$ -stimulated neuroinflammation through MAPK/NLRP3 inflammasome/STAT3 signaling [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(19): 10637.
- [4] Qiu S, Palavicini JP, Wang J, et al. Adult-onset CNS myelin sulfatide deficiency is sufficient to cause Alzheimer's disease-like neuroinflammation and cognitive impairment [J]. *Mol Neurodegener*, 2021, 16(1): 64.
- [5] Du Z, Li M, Ren J, et al. Current strategies for modulating a $\beta$  aggregation with multifunctional agents [J]. *Acc Chem Res*, 2021, 54(9): 2172-84.
- [6] Ding B, Lin C, Liu Q, et al. Tanshinone IIA attenuates neuroinflammation via inhibiting RAGE/NF- $\kappa$ B signaling pathway *in vivo* and *in vitro* [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 302.
- [7] Bernabeu-Zornoza A, Coronel R, Palmer C, et al. Oligomeric and fibrillar species of A $\beta$ 42 diversely affect human neural stem cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(17): 9537.
- [8] Calabrese EJ, Kozumbo WJ. The phytoprotective agent sulforaphane prevents inflammatory degenerative diseases and age-related pathologies via Nrf2-mediated hormesis [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 163: 105283.
- [9] Kim J. Pre-clinical neuroprotective evidences and plausible mechanisms of sulforaphane in Alzheimer's disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(6): 2929.
- [10] Allen NJ, Lyons DA. *Glia* as architects of central nervous system formation and function [J]. *Science*, 2018, 362(6411): 181-5.
- [11] Endo F, Kasai A, Soto JS, et al. Molecular basis of astrocyte diversity and morphology across the CNS in health and disease [J]. *Science*, 2022, 378(6619): eadc9020.
- [12] Yu X, Nagai J, Khakh BS. Improved tools to study astrocytes [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2020, 21(3): 121-38.
- [13] Nagai J, Yu X, Papouin T, et al. Behaviorally consequential astrocytic regulation of neural circuits [J]. *Neuron*, 2021, 109(4): 576-96.
- [14] Lee HG, Wheeler MA, Quintana FJ. Function and therapeutic value of astrocytes in neurological diseases [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2022, 21(5): 339-58.
- [15] Jung E, Koh SH, Yoo M, et al. Regenerative potential of carbon monoxide in adult neural circuits of the central nervous system [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(7): E2273.
- [16] Qin SS, Yang CH, Huang WH, et al. Sulforaphane attenuates microglia-mediated neuronal necroptosis through down-regulation

- of MAPK/NF- $\kappa$ B signaling pathways in LPS-activated BV-2 microglia[J]. *Pharmacol Res*, 2018, 133: 218-35.
- [17] Wang H, Ma J, Tan Y, et al. Amyloid-beta1-42 induces reactive oxygen species-mediated autophagic cell death in U87 and SH-SY5Y cells[J]. *J Alzheimers Dis*, 2010, 21(2): 597-610.
- [18] Lopez-Suarez L, Al Awabdh S, Coumoul X, et al. The SH-SY5Y human neuroblastoma cell line, a relevant *in vitro* cell model for investigating neurotoxicology in human: Focus on organic pollutants [J]. *NeuroToxicology*, 2022, 92: 131-55.
- [19] Ozbolat G, Alizade A. Investigation of the protective effect of thymoquinone of U87 cells induced by beta-amyloid[J]. *Bratisl Lek Listy*, 2021, 122(10): 748-52.
- [20] Pandey M, Karmakar V, Majie A, et al. The SH-SY5Y cell line: a valuable tool for Parkinson's disease drug discovery[J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2024, 19(3): 303-16.
- [21] Saeed Y, Xie B, Xu J, et al. Glial U87 cells protect neuronal SH-SY5Y cells from indirect effect of radiation by reducing oxidative stress and apoptosis[J]. *Acta Biochim Biophys Sin: Shanghai*, 2015, 47(4): 250-7.
- [22] Fu Y, Zhang J, Yang C, et al. Effects of solvent dimethyl sulfoxide invites a rethink of its application in amyloid beta cytotoxicity[J]. *Int J Toxicol*, 2025, 44(4): 297-313.
- [23] Liu T, Guo WH, Gong M, et al. Pericyte loss: a key factor inducing brain A $\beta$ 40 accumulation and neuronal degeneration in cerebral amyloid angiopathy[J]. *Exp Brain Res*, 2025, 243(8): 191.
- [24] White JA, Manelli AM, Holmberg KH, et al. Differential effects of oligomeric and fibrillar amyloid- $\beta$ 1-42 on astrocyte-mediated inflammation[J]. *Neurobiol Dis*, 2005, 18(3): 459-65.
- [25] Kim S, Chun H, Kim Y, et al. Astrocytic autophagy plasticity modulates A $\beta$  clearance and cognitive function in Alzheimer's disease[J]. *Mol Neurodegener*, 2024, 19(1): 55.
- [26] Huo SM, Li B, Du JY, et al. Dibutyl phthalate induces liver fibrosis via p38MAPK/NF- $\kappa$ B/NLRP3-mediated pyroptosis[J]. *Sci Total Environ*, 2023, 897: 165500.
- [27] Kim KM, Yoo GD, Heo W, et al. TAZ stimulates exercise-induced muscle satellite cell activation via Pard3-p38 MAPK-TAZ signalling axis[J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2023, 14(6): 2733-46.
- [28] Dey P, Biswas S, Das R, et al. p38 MAPK inhibitor SB203580 enhances anticancer activity of PARP inhibitor olaparib in a synergistic way on non-small cell lung carcinoma A549 cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2023, 670: 55-62.
- [29] Bahattab S, Assiri A, Alhaidan Y, et al. Pharmacological p38 MAPK inhibitor SB203580 enhances AML stem cell line KG1a chemosensitivity to daunorubicin by promoting late apoptosis, cell growth arrest in S-phase, and miR-328-3p upregulation[J]. *Saudi Pharm J*, 2024, 32(6): 102055.
- [30] Santoro A, Martucci M, Conte M, et al. Inflammaging, hormesis and the rationale for anti-aging strategies[J]. *Ageing Res Rev*, 2020, 64: 101142.
- [31] Balusu S, De Strooper B. The necroptosis cell death pathway drives neurodegeneration in Alzheimer's disease[J]. *Acta Neuropathol*, 2024, 147(1): 96.
- [32] Lou S, Gong D, Yang M, et al. Curcumin improves neurogenesis in Alzheimer's disease mice via the upregulation of Wnt/ $\beta$ -catenin and BDNF[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(10): 5123.
- [33] Huang JH, Xu ZW, Yu CS, et al. The volatile oil of *Acorus tatarinowii* Schott ameliorates Alzheimer's disease through improving insulin resistance via activating the PI3K/AKT pathway [J]. *Phytomedicine*, 2024, 135: 156168.
- [34] Li Q, Yuan Y, Huang S, et al. Excess ub-K48 induces neuronal apoptosis in Alzheimer's disease[J]. *J Integr Neurosci*, 2024, 23(12): 223.

(编辑:林萍)