

·基础研究·

二甲双胍通过增强 M146L 细胞 IDE 表达促进胞内 A β 降解

谢 婷, 徐采利, 唐皎玲, 郭开华

(中山大学中山医学院解剖生理学系, 人体解剖学教研室, 广东 广州 510080)

摘 要:【目的】探讨二甲双胍(Met)作用AD细胞模型M146L的淀粉样蛋白- β (A β)病理改善作用及其潜在机制。【方法】MTT比色法检测不同浓度Met对细胞活力的影响;Western Blotting检测Met处理后A β_{42} 、生成A β 相关的淀粉样蛋白前体(APP)、 β 分泌酶(BACE),以及A β 降解相关的胰岛素降解酶(IDE)、脑啡肽酶(NEP)、轻链蛋白3 II/I(LC3 II/I)的表达量变化;免疫荧光检测Met处理后A β_{42} 、IDE的表达;Western Blotting检测IDE的特异性抑制剂杆菌肽(Bac)和Met联合处理后IDE和A β_{42} 的表达情况。【结果】Met处理可显著下调M146L细胞A β_{42} 蛋白表达水平($P < 0.05$),但Met对M146L细胞内APP、BACE表达无显著影响($P > 0.05$)。另外,M146L细胞内IDE、NEP及LC3 II/I水平显著低于正常对照组(中国仓鼠卵巢巢细胞,CHO细胞)($P < 0.05$)。当Met处理24 h后,IDE蛋白表达和免疫荧光检测均明显升高($P < 0.05$)。一旦Met和IDE的特异性抑制剂Bac联合处理M146L细胞24 h,观察到IDE表达下降($P < 0.05$),而细胞内A β_{42} 水平则明显升高($P < 0.05$)。【结论】本研究明确了Met对M146L细胞A β_{42} 异常积累的改善作用,并且初步阐明其潜在机制是通过促进A β 降解途径中IDE表达增加介导的,为T2DM药物二甲双胍作为AD潜在治疗药物提供实验基础。

关键词:二甲双胍;胰岛素降解酶;淀粉样蛋白- β ;阿尔兹海默症;M146L细胞系

中图分类号:R34

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2022)04-0522-08

DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2022.0402

Metformin Facilitates Intracellular Amyloid β Degradation by Increasing Insulin-degrading Enzyme Expression in M146L Cell Line

XIE Ting, XU Cai-li, TANG Jiao-ling, GUO Kai-hua

(Department of Anatomy and Physiology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China)

Correspondence to: GUO Kai-hua; E-mail: guokh@mail.sysu.edu.cn

Abstract:【Objective】To explore the effects of metformin (Met) on amyloid- β (A β) in AD cell model M146L and the underlying mechanism.【Methods】MTT assay was performed to determine the optimal concentration of Met. Western blotting was performed to measure the protein levels of A β_{42} , amyloid precursor protein (APP), β -site APP-cleaving enzyme (BACE) and proteolytic enzymes including insulin-degrading enzyme (IDE), neprilysin (NEP), and light chain 3 II/I (LC3 II/I); Immunofluorescence was performed to visualize how A β_{42} peptides and IDE were affected by Met. Western blotting was performed to test levels of IDE and A β_{42} after treatment of Met and Bacitracin (Bac), a special inhibitor of IDE.【Results】In this study, we showed that the levels of A β_{42} were down-regulated by the Met treatment ($P < 0.05$). No effect was observed on the expression of APP and BACE, both of which are related to the production of A β , after Met treatment in M146L cells ($P > 0.05$). Furthermore, levels of proteolytic enzymes including IDE, NEP, and LC3 II/I levels were markedly decreased in the M146L cells compared to the CHO cells ($P < 0.05$), and only the level of IDE was reversed after the Met treatment for 24 h ($P < 0.05$). Importantly, Met-mediated A β_{42} degradation in M146L cells was com-

收稿日期:2022-04-26

基金项目:广州市科技计划项目(202002030441);广东省自然科学基金(2019A1515011184, 2020A1515010012)

作者简介:谢婷,硕士生,研究方向:中枢神经系统退行性疾病,E-mail: xie_ting098@163.com;郭开华,通信作者,副教授,
E-mail: guokh@mail.sysu.edu.cn

pletely blocked by the Bac ($P < 0.05$).【Conclusions】 This study clarifies the ameliorating effect of Met on the abnormal accumulation of A β_{42} in M146L cells, and that the underlying mechanism is mediated by the increased expression of IDE in the A β degradation pathway, providing an experimental basis for the T2DM drug metformin as a potential therapeutic target for AD.

Key words: metformin; insulin-degrading enzyme; amyloid β ; Alzheimer's disease; M146L cell line

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2022, 43 (4): 522-529]

阿尔兹海默症 (Alzheimer's disease, AD) 是最常见的衰老相关神经退行性疾病,淀粉样蛋白- β (amyloid beta, A β) 是 AD 最重要的病理标志物之一。除了淀粉样斑块,AD 还呈现相关代谢紊乱的特征^[1],代谢性疾病 II 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 和 AD 之间有着多重联系^[2-3]。二甲双胍 (metformin, Met) 是治疗 T2DM 的一线药物^[4],主要通过增加外周组织的胰岛素敏感性达到降血糖效果。而目前 Met 是否能用于 AD 治疗值得关注也尚存争议。临床研究报道长期 Met 治疗可导致老年人认知及脑小血管病 (cerebral small vessel disease, CSVD) 改善^[5-6]。然而,也有研究显示 Met 治疗不会改善 T2DM 高危人群的认知功能^[7]。有研究报道,在 db/db 小鼠^[8]及 SAMP8 小鼠^[9]中, Met 治疗可降低 A β 水平及改善认知能力,然而具体机制尚不清楚。A β 的表达水平取决于 A β 产生和清除的动态平衡^[10],A β 来源于淀粉样蛋白前体 (amyloid precursor protein, APP) 的非淀粉样蛋白切割途径, β 分泌酶是此途径的关键酶,BACE1 (beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1) 被认为是主要的 β 分泌酶^[11]。细胞中异常聚集蛋白的清除主要与蛋白酶体降解途径和自噬-溶酶体降解途径有关,蛋白酶体降解途径中的各种 A β 降解酶 (A β -degrading proteases, A β DPs) 以单独或协同作用的方式,对调节脑内 A β 水平具有重要影响^[12-14]。此外,有研究报道称低剂量的 Met 通过激活葡萄糖敏感途径 (lysosomal glucose-sensing pathway) 调节葡萄糖水平^[15]。而胰岛素降解酶 (Insulin-degrading enzyme, IDE) 是葡萄糖代谢的关键分子^[16],也是最重要的 A β DPs 之一,在细胞外和细胞内 A β 降解中都发挥重要作用^[17]。值得注意的是,最近有研究显示,在 APP/PS1 小鼠模型中, Met 能减弱 A β 病理及认知障碍,提高 IDE 水平^[18],但尚未明确 IDE 在此通路中的作用。因此,我们假设 IDE 是 Met 调节 A β 蛋白水平改变的潜在机制。本

研究采用 AD 细胞模型 M146L 细胞系^[19-20],通过药理学干预等策略探索 Met 对胞内 A β 异常积累的影响及其潜在机制。

1 材料与方法

1.1 细胞系和细胞培养

中国仓鼠卵巢细胞 (Chinese hamster ovary cell, CHO) 细胞购于中国科学院昆明细胞库, M146L 细胞购于上海谷研实业有限公司,该细胞系是将突变型 PS1 基因转入过表达 APP 的 CHO 细胞,能稳定分泌 A β ^[21]。实验伦理批号:SYSU-IACUC-2019-B989。细胞培养液:F12-DMEM (C11330500 BT, Gibco) 添加 10 g/L 的胎牛血清 (Thermo Fisher Scientific, USA) 以及青链霉素 (青霉素 100 U/mL, 链霉素 0.1 mg/mL) (15140-122, Gibco), 细胞培养于 37 °C, 体积分数 5% CO₂ 的恒温培养箱。培养液添加 200 μ g/mL 的 G418 (A1720-1G Sigma-Aldrich) 用于 M146L 的筛选及培养。

1.2 MTT 实验

细胞种板于 96 孔板,放入 37 °C, 5% CO₂ 的恒温培养箱。细胞贴壁后,弃旧培养液,每孔加入 10 μ L MTT 溶液 (5 mg/mL) 及 100 μ L 新鲜培养液, 37 °C, 5% CO₂ 继续培养 4 h。弃旧培养液,每孔加入 110 μ L DMSO, 慢摇 10 min 以溶解 MTT 结晶甲臜,随后采用酶标仪检测 490 nm 的吸光度。

1.3 蛋白免疫印迹

用蛋白提取试剂盒 (贝博, 中国) 提取蛋白, BCA 定量试剂盒 (碧云天, 中国) 检测以及配平蛋白浓度后,加入 SDS 蛋白上样缓冲液煮沸 5 min 使蛋白变性。SDS-PAGE 凝胶电泳,保证每条泳道上样量均为 10 μ L, PVDF 膜湿法转膜。5% BSA 室温封闭 2 h, 一抗 4 °C 孵育过夜。抗体浓度分别为 β -actin (1: 1 000, 4970S, CST, USA), APP (1: 1 000, 2452, CST, USA); A β_{1-42} (1: 500, bs-0107R,

Bioss Antibodies, China); IDE (1: 1 000, ab32216, Abcam, USA); NEP (1: 100, sc-46656, SANTA, USA); 轻链蛋白3 (light chain 3, LC3) (1: 1 000, ET1701-65, HUABIO, China); BACE (1: 1 000, CST, USA)。漂洗后相应二抗室温孵育2 h。洗膜后加入ECL发光液显色曝光,用GE AI600成像系统(GE, USA)显色拍照,Image J软件进行灰度值分析。

1.4 细胞免疫荧光

用激光共聚焦皿培养细胞(801002, NEST, USA),汇合度为60%时培养液换成加入或不加入Met的F12-DMEM继续培养24 h。随后弃培养液,PBS洗3次,每次5 min。多聚甲醛固定15 min。PBS洗3次,每次5 min。随后加入1%BSA及0.25% Triton X-100(Sigma)室温孵育1 h后,加入一抗4 °C过夜,漂洗后加入相应二抗iFluor™ 594 Conjugated Goat anti-rabbit IgG Goat Polyclonal Antibody (1: 500, HA1122, HUABIO, China)及Hoechst 33258 (1: 1 000, H3570, Enzo Life Sciences)室温孵育2 h。一抗是A β_{1-42} (bs-0107R, Bioss Antibodies)和IDE (ab32216, Abcam)。滴加抗荧光淬灭封片剂后存放于4 °C或-20 °C。在激光共聚焦显微镜(LSM780; Carl Zeiss)下观察摄片。

1.5 统计学分析

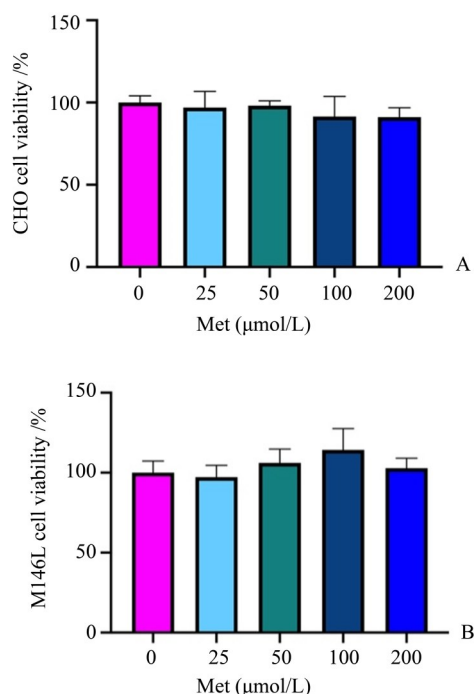
统计学分析用Graph pad Prism 9.0进行,数据来自至少3次独立实验,并用均数 \pm 标准差表示。所有定量数据经过正态性检验和方差齐性检验确认为服从正态分布且方差齐后,采用单因素方差分析(One Way ANOVA),方差分析差异有统计学意义时采用Bonferroni法进行两两比较,以双侧 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度Met对CHO和M146L细胞活力的影响

为了确定Met的最佳使用浓度,我们进行了MTT实验,通过测定吸光度间接反应活细胞数量及细胞活力。对CHO细胞和M146L细胞分别设置Met的浓度梯度为0 $\mu\text{mol/L}$ (对照组)、25 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$ 、200 $\mu\text{mol/L}$,培养24 h后,检测细胞活力。结果如图1所示,经单因素方差分析,CHO细胞($F=1.067$, $P=0.407$)及M146L细胞(F

$=2.166$, $P=0.123$)组间差异均无统计学意义。因此,在0~200 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内,Met处理24 h后,CHO细胞和M146L细胞的细胞活性都没有显著改变。同时,在Met浓度为50 $\mu\text{mol/L}$ 时两种细胞的细胞活力均较高,因此后续实验Met的处理浓度均设置为50 $\mu\text{mol/L}$ 。



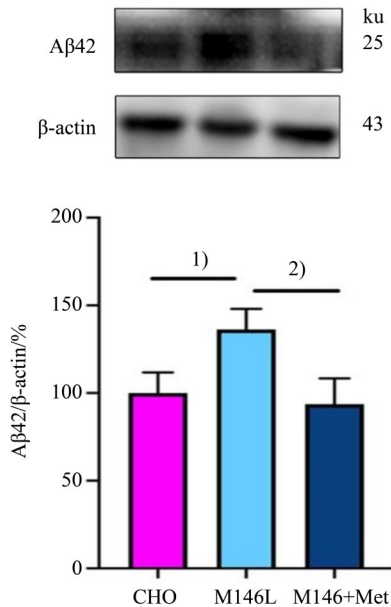
A: CHO cell viability was measured by an MTT assay after treatment with different concentrations (0~200 $\mu\text{mol/L}$) of Met for 24 h. B: M146L cell viability was analyzed after treatment with the indicated concentrations (0~200 $\mu\text{mol/L}$) of Met for 24 h. Met: Metformin. Data are represented as means \pm SD. $n = 6/\text{group}$.

图1 不同浓度Met对CHO和M146L细胞活力的影响
Fig. 1 The effects of Met on cell viability of CHO and M146L cells

2.2 Met诱导M146L细胞A β_{42} 水平降低

检测Met对细胞内A β_{42} 表达水平的影响。结果如图2 Western blotting所示,经单因素方差分析,3组间差异有统计学意义($F=11.880$, $P=0.006$);采用Bonferroni法作两两比较,发现M146L细胞组与CHO对照组比较差异有统计学意义($P=0.021$),同时,Met处理24 h的M146L细胞组与M146L细胞组比较差异有统计学意义($P=0.009$)。为了直观显示Met处理对A β_{42} 水平的影响,用A β_{42} 以及细胞核的特异性抗体进行免疫染色,并在共聚焦显微镜下进行观察(图3A),同时进行半定量统计(图3B)。经

单因素方差分析,3组间差异有统计学意义($F=10.620$, $P=0.011$);采用 Bonferroni 法作两两比较,发现 M146L 细胞组与 CHO 对照组比较差异无统计学意义($P=0.108$),Met 处理 24 h 的 M146L 细胞组与 M146L 细胞组比较差异有统计学意义($P=0.011$)。因此,免疫荧光结果表明,Met 处理 24 h 后,M146L 细胞内 A β_{42} 水平明显降低。



Representative Western blotting showing A β_{42} protein levels in M146L cells after incubation of Met (50 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h. Quantitative analysis of relative A β_{42} protein levels. Data were normalized to β -actin. Data are represented as means \pm SD. 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$. $n = 3/\text{group}$.

图2 Met 诱导 M146L 细胞内 A β_{42} 水平降低

Fig. 2 Met treatment induced A β_{42} degradation in M146L cells

2.3 Met 诱导 M146L 细胞 A β_{42} 水平降低与 A β_{42} 产生途径无关

APP 和 BACE 是与 A β 产生相关的蛋白,为了探究 Met 处理下调细胞内 A β_{42} 表达的机制,我们首先检测 50 $\mu\text{mol/L}$ Met 处理 24 h 后 CHO 细胞及 M146L 细胞中 APP 和 BACE 的蛋白表达水平。Western blotting 结果如图 4 所示:经单因素方差分析,BACE 蛋白 3 组间差异有统计学意义($F=6.957$, $P=0.027$);采用 Bonferroni 法作两两比较,发现 M146L 细胞组与 CHO 对照组比较差异有统计学意义($P=0.043$),Met 处理 24 h 的 M146L 细胞组与 M146L 细胞组比较差异无统计学意义($P>0.999$)。

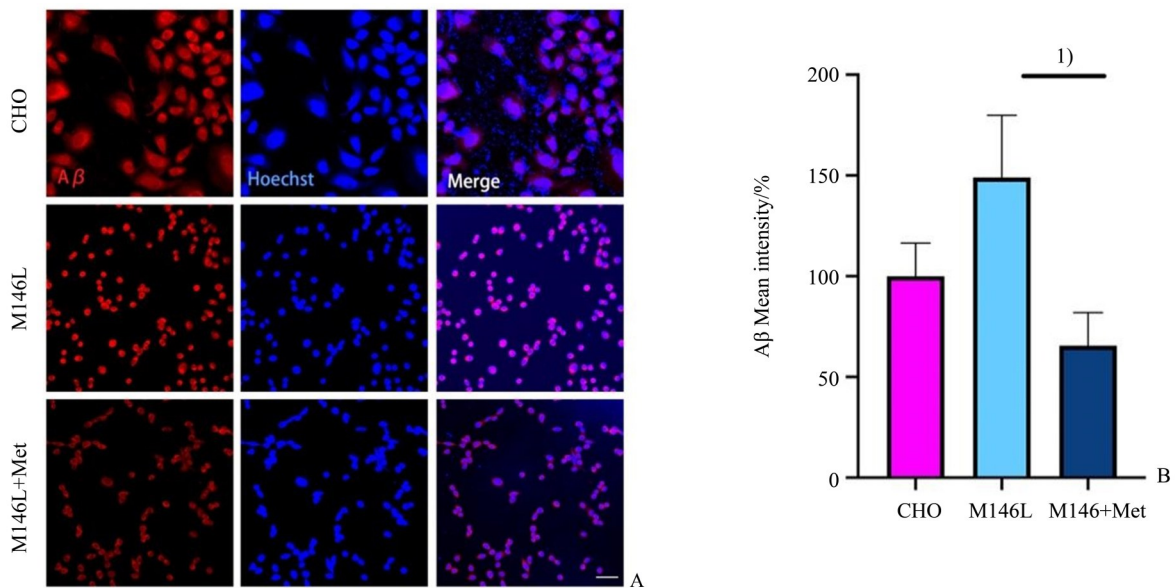
APP 蛋白 3 组间差异无统计学意义($F=4.030$, $P=0.056$)。因此,在加入 50 $\mu\text{mol/L}$ Met 处理 24 h 后,M146L 细胞的 APP、BACE 表达量无明显变化。

2.4 Met 诱导 M146L 细胞 A β_{42} 水平降低与 IDE 表达增强有关

我们接着检测了 A β 降解相关蛋白在细胞内表达量的变化,Western blotting 结果如图 5 所示:经单因素方差分析,IDE 蛋白 3 组间差异有统计学意义($F=8.071$, $P=0.020$);采用 Bonferroni 法作两两比较,发现 M146L 细胞组与 CHO 对照组比较差异有统计学意义($P=0.035$),同时,Met 处理 24 h 的 M146L 细胞组与 M146L 细胞组比较差异有统计学意义($P=0.045$)。脑啡肽酶(neprilysin, NEP)蛋白 3 组间差异有统计学意义($F=14.130$, $P=0.005$);采用 Bonferroni 法作两两比较,发现 M146L 细胞组与 CHO 对照组比较差异有统计学意义($P=0.008$),Met 处理 24 h 的 M146L 细胞组与 M146L 细胞组比较差异无统计学意义($P>0.999$)。LC3 II / I 蛋白 3 组间差异有统计学意义($F=8.753$, $P=0.017$);采用 Bonferroni 法作两两比较,发现 M146L 细胞组与 CHO 对照组比较差异有统计学意义($P=0.049$),Met 处理 24 h 的 M146L 细胞组与 M146L 细胞组比较差异无统计学意义($P>0.999$)。因此,M146L 细胞内的 IDE、NEP 及 LC3 II / I 水平明显低于 CHO 细胞,且只有 IDE 蛋白水平在 Met 处理 24 h 后有显著提高(图 5)。为了直观地观察 Met 处理对 IDE 水平的变化,进行了免疫荧光实验。用 IDE 以及细胞核的特异性抗体进行免疫染色,并在共聚焦显微镜下进行观察。免疫荧光结果如图 6 所示,对半定量统计结果行单因素方差分析,3 组间 IDE 蛋白水平差异有统计学意义($F=10.430$, $P=0.011$);Bonferroni 法作两两比较,发现 M146L 细胞组与 CHO 对照组比较差异有统计学意义($P=0.014$),同时,Met 处理 24 h 的 M146L 细胞组与 M146L 细胞组比较差异有统计学意义($P=0.045$)。因此,免疫荧光显示 IDE 蛋白表达量的变化与 Western blotting 结果一致,提示 IDE 可能参与 Met 对细胞内 A β_{42} 蛋白水平的调节。

2.5 抑制 IDE 表达将逆转 Met 对 A β_{42} 的降解作用

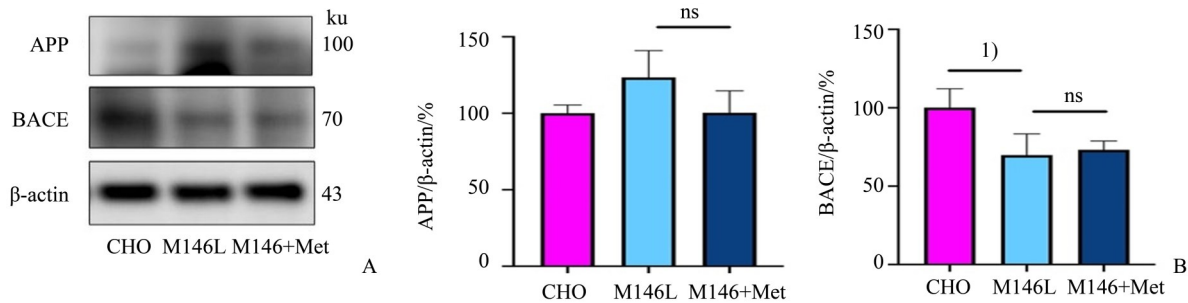
为了进一步验证 Met 对 M146L 细胞的保护作用是通过 IDE 介导的,我们采用 IDE 的特异性抑制剂杆菌肽(Bacitracin, Bac),探究在 IDE 的表达受到抑制后,Met 对 A β_{42} 的降解作用是否会被逆转。Western Blotting 结果显示(图 7),对半定量结果进



A: Representative confocal microscopy images of staining with anti- $A\beta_{42}$ (red) antibodies and Hoechst 33258 (blue) in CHO and M146L cells. Scale bar=50 μ m. B: Quantitative analysis of $A\beta_{42}$ deposition in CHO and M146L cells. Data are represented as means \pm SD. 1) $P < 0.05$. $n = 3$ /group.

图3 免疫荧光结果显示Met诱导M146L细胞内 $A\beta_{42}$ 水平降低

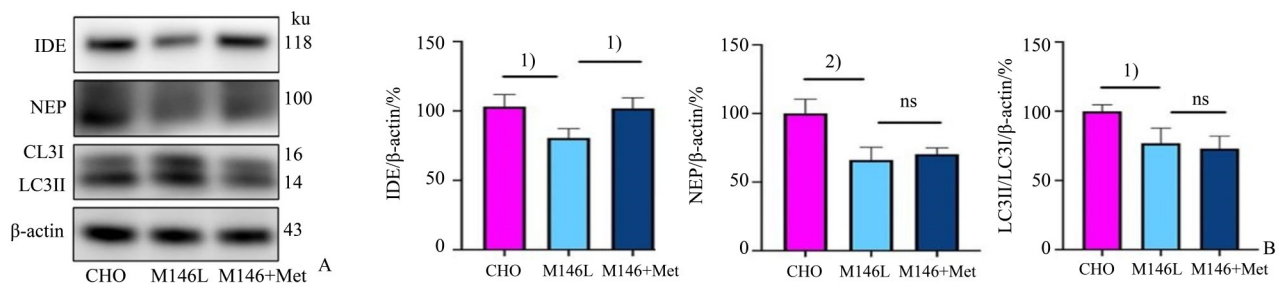
Fig. 3 Immunofluorescence staining showing Met treatment degraded $A\beta_{42}$ deposition in M146L cells



A: Representative Western blotting showing APP and BACE protein levels in M146L cells after incubation of Met (50 μ mol/L) for 24 h. B: Quantitative analysis of relative APP and BACE protein levels, respectively. Data were normalized to β -actin. Data are represented as means \pm SD. 1) $P < 0.05$. ns: not significant. $n = 3$ /group.

图4 Met处理对APP、BACE蛋白表达的影响

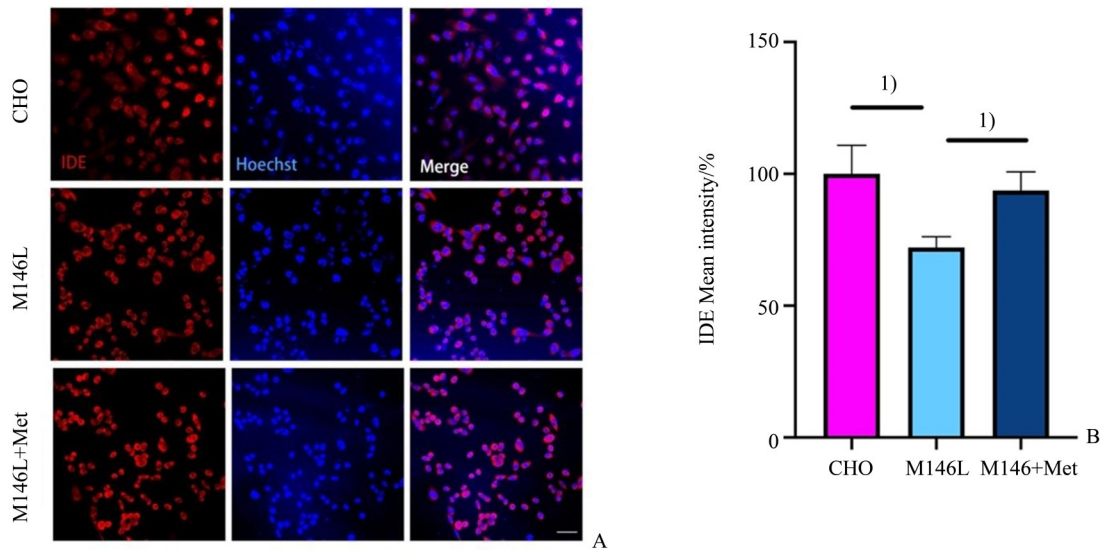
Fig. 4 Effect of Met treatment on the expression of APP and BACE



A: Representative Western blotting of IDE, NEP and LC3 protein levels in CHO and M146L cells. B: Quantitative analysis of Fig 5A. Data were normalized to β -actin. Data are represented as means \pm SD. 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$. ns: not significant. $n = 3$ /group.

图5 Met处理对 $A\beta_{42}$ 降解相关蛋白的影响

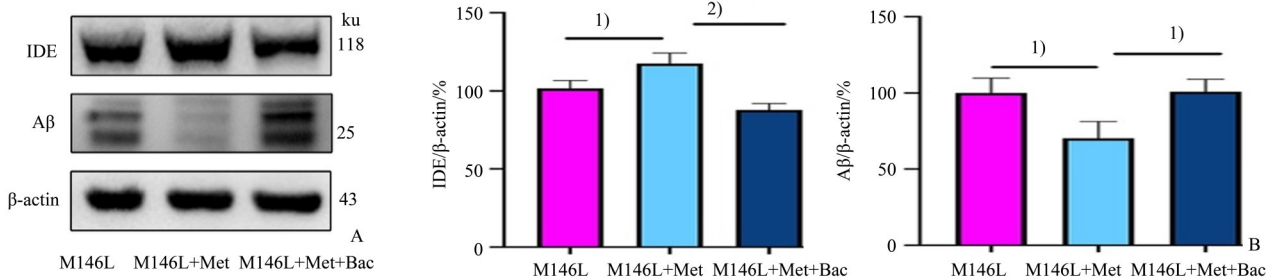
Fig. 5 Effect of Met treatment on the expression of proteins degrading $A\beta_{42}$



Representative confocal microscopy images of CHO and M146L cells with IDE (red). Hoechst33258 (blue) was used for nuclear staining. A: Representative confocal microscopy images of staining with anti-IDE (red) antibodies and Hoechst 33258 (blue) in CHO and M146L cells. Scale bar=50 μ m. B: Quantitative analysis of the level of IDE in CHO and M146L cells. Data are represented as means \pm SD. 1) $P < 0.05$. $n = 3$ /group.

图6 免疫荧光显示 Met 增强 M146L 细胞 IDE 表达

Fig. 6 Immunofluorescence staining shows Met treatment promoted IDE protein level in M146L cells



A: Representative Western blotting of IDE and A β_{42} in the M146L cells under Met treatment (50 μ mol/L) with or without Bac (20 μ mol/L) for 24 h. B: Quantitative analysis of Fig. 6A. Data were normalized to β -actin. Data are represented as means \pm SD. 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$. $n = 3$ /group.

图7 抑制 IDE 表达将逆转 Met 对 A β_{42} 的降解作用

Fig. 7 Inhibition of IDE reverses Met-induced A β_{42} degradation

行单因素方差分析,IDE 蛋白 3 组间差异有统计学意义($F = 22.750$, $P = 0.002$);采用 Bonferroni 法作两两比较,发现 M146L 细胞组与 M146L 细胞经 Met 处理 24 h 组比较差异有统计学意义($P = 0.034$),同时, M146L 细胞经 Met 处理 24 h 组与 M146L 细胞经 Met、Bac 联合处理 24 h 组比较差异有统计学意义($P = 0.002$)。A β_{42} 蛋白 3 组间差异有统计学意义($F = 9.677$, $P = 0.013$);采用 Bonferroni 法作两两比较,发现 M146L 细胞组与 M146L 细胞经 Met 处理 24 h 组比较差异有统计学意义($P = 0.029$),同时, M146L 细胞经 Met 处理 24 h 组与 M146L 细胞经 Met、Bac 联合处理 24 h 组比较差异有统计学意义($P = 0.025$)。

因此,与 Met 处理组相比,50 μ mol/L Met 及 20 μ mol/L Bac 联合处理 M146L 细胞 24 h 后, M146L 细胞中的 IDE 表达水平下调,即 20 μ mol/L Bac 可以有效降低 IDE 蛋白表达。Met 和 Bac 联合处理 24 h 后, M146L 细胞中的 A β_{42} 水平明显升高,因此,抑制 IDE 表达将逆转 Met 对 A β_{42} 的降解作用。以上结果表明, Met 对 M146L 细胞 A β_{42} 的降解作用是通过 IDE 介导的。

3 讨论

目前临床使用的 AD 治疗药物只能起到减缓症

状的作用,无法阻止或延缓病情进展。因此,寻找和开发AD治疗药物具有重要临床价值。考虑到AD的发病与代谢紊乱具有一定联系。于是,将临床糖尿病治疗药物用于AD治疗或许是一个可以尝试的思路。为此我们选择T2DM的一线临床用药Met作为治疗药物^[22],同时将M146L细胞作为AD模型组。我们尝试探究Met是否促进M146L细胞A β 降解并初步探讨潜在机制。在本研究中,我们在AD细胞模型M146L细胞系中确认了Met能够降低胞内A β_{42} 水平,这种影响依赖于Met上调A β 降解酶IDE水平,而与A β 产生途径的APP,BACE及A β 降解途径的NEP及LC3 II/I无关。

在Farr^[9]等的研究中, Met能改善AD模型SAMP8小鼠的学习和记忆能力,这种改善与AP-Pc99和pTau404的降低有关。同时, Met能降低A β_{1-40} 水平,以及增加PKC, pGSK-3 β ser9水平。在Ou^[23]等的研究中, Met通过AMPK/mTOR/S6K/Bace1和AMPK/P65 NF- κ B信号通路促进神经发生和抗炎,从而减少APP/PS1小鼠的A β 斑块沉积以及改善学习记忆损害。然而,也有报道称单独使用Met治疗上调BACE水平,从而增加原代皮质神经元和N2a695神经元中A β 的合成,但联合使用胰岛素和Met可以使A β 水平降低^[24]。

众所周知,A β 是AD的主要病理标志物。有研究表明,相对于细胞外A β ,神经元内A β 的积累是AD进展中的早期事件^[25],随着细胞外斑块的积累,神经元内A β 水平降低^[26]。因此,本研究假设细胞内A β_{42} 是AD在病理进程中较早出现的标志物,检测的指标是细胞内的A β_{42} 表达量。APP分别经 β 分泌酶和 γ 分泌酶的剪切是A β 产生的主要来

源^[25], A β DPs介导的蛋白降解以及自噬溶酶体途径是A β 清除的重要途径,A β 来源与清除之间的动态平衡决定了体内A β 的水平^[10]。本研究结果显示在Met处理24 h后APP和BACE均没有显著变化。考虑到BACE与APP都是与A β 产生相关的关键蛋白,由此可以推断:Met处理后A β 的减少主要与A β 的清除增多相关,而非A β 的产生减少。

在A β 的清除机制中,A β DPs及自噬溶酶体途径发挥了重要作用。有研究报道在AD的小鼠模型中, Met通过激活分子伴侣介导的自噬(Chaperone-mediated autophagy, CMA),进而激活TAK1-IKK α / β 信号通路,减少APP/PS1小鼠大脑内A β 斑块积累,改善AD行为障碍^[27]。因此,我们检测了IDE、NEP这两种主要的A β DPs以及检测LC3 II/I以判断自噬流的活化情况。结果提示Met对A β_{42} 的清除作用可能依赖于IDE表达增强,而不依赖自噬途径。

在Lu等^[18]的研究中, Met能减轻氧化应激水平,降低APP/PS1小鼠大脑中的A β 水平,改善APP/PS1小鼠的学习和记忆损害,同时, Met使p-AMPK以及IDE的水平升高,但不影响BACE1、PS1等分泌酶的水平,提示Met作为AD治疗药物具有应用前景。我们的研究在此基础上,采用药理学阻断的策略进一步明确Met对A β 病理的改善是通过IDE介导的。

细胞模型具有干扰因素小、方便等特点,本次研究在AD转基因细胞模型中证实Met对胞内A β_{42} 的积极作用。我们的研究确认了Met对胞内A β_{42} 异常积累的改善作用,并且明确了其中的机制是通过IDE介导,提示T2DM药物Met作为AD药物的治疗前景。

参考文献

- [1] Kandimalla R, Thirumala V, Reddy PH. Is Alzheimer's disease a type 3 diabetes? a critical appraisal[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017, 1863(5): 1078-1089.
- [2] De La Monte SM. Type 3 diabetes is sporadic Alzheimer's disease: mini-review[J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2014, 24(12): 1954-1960.
- [3] De La Monte SM. Relationships between diabetes and cognitive impairment[J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2014, 43(1): 245-267.
- [4] American Diabetes Association Professional Practice Committee. Pharmacologic approaches to glycemic treatment: standards of medical care in diabetes-2019[J]. *Diabetes Care*, 2019, 42(Suppl 1): s90-s102.
- [5] Samaras K, Makkak S, Crawford JD, et al. Metformin use is associated with slowed cognitive decline and reduced incident dementia in older adults with type 2 diabetes: the sydney memory and ageing study[J]. *Diabetes Care*, 2020, 43(11): 2691-2701.
- [6] Teng Z, Feng J, Qi Q, et al. Long-term use of metfor-

- min is associated with reduced risk of cognitive impairment with alleviation of cerebral small vessel disease burden in patients with type 2 diabetes[J]. *Front Aging Neurosci*, 2021, 13: 773797.
- [7] Luchsinger JA, Ma Y, Christophi CA, et al. Metformin, lifestyle intervention, and cognition in the diabetes prevention program outcomes study [J]. *Diabetes Care*, 2017, 40(7): 958–965.
- [8] Chen F, Dong RR, Zhong KL, et al. Antidiabetic drugs restore abnormal transport of amyloid- β across the blood-brain barrier and memory impairment in db/db mice [J]. *Neuropharmacology*, 2016, 101: 123–136.
- [9] Farr SA, Roesler E, Niehoff ML, et al. Metformin improves learning and memory in the SAMP8 mouse model of Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2019, 68(4): 1699–1710.
- [10] Saido T, Leissring MA. Proteolytic degradation of amyloid β -protein [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012, 2(6): a006379.
- [11] 程洁鸿, 张桂梁, 郭宝剑, 等. T-006改善APP/PS1/Tau转基因小鼠学习记忆功能及调控突触相关蛋白表达 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2021, 42(5): 667–675.
- Cheng JH, Zhang GL, Guo BJ, et al. T-006 improves learning and memory function and regulates synaptic associated protein expression in APP/PS1/Tau triple transgenic mice [J]. *J Sun Yat-sen Univ*, 2021, 42(5): 667–675.
- [12] Eckman EA, Eckman CB. Abeta-degrading enzymes: modulators of Alzheimer's disease pathogenesis and targets for therapeutic intervention [J]. *Biochem Soc Trans*, 2005, 33(Pt 5): 1101–1105.
- [13] Leissring MA. The AbetaCs of abeta-cleaving proteases [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(44): 29645–29649.
- [14] 徐菁, 陈生弟. 阿尔茨海默病中Tau蛋白和A β 相互作用的研究进展 [J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2014, 40(4): 251–254.
- Xu J, Chen SD. Tau protein and a in Alzheimer's disease β Research progress of interaction [J]. *Chin J Nerv Ment Dis*, 2014, 40(4): 251–254.
- [15] Ma T, Tian X, Zhang B, et al. Low-dose metformin targets the lysosomal AMPK pathway through PEN2 [J]. *Nature*, 2022, 603(7899): 159–165.
- [16] Tundo GR, Sbardella D, Ciaccio C, et al. Multiple functions of insulin-degrading enzyme: a metabolic crosslight? [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2017, 52(5): 554–582.
- [17] Huang L, McClatchy DB, Maher P, et al. Intracellular amyloid toxicity induces oxytosis/ferroptosis regulated cell death [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(10): 828.
- [18] Lu XY, Huang S, Chen QB, et al. Metformin ameliorates A β pathology by insulin-degrading enzyme in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 2315106.
- [19] Fang Y, Ou S, Wu T, et al. Lycopene alleviates oxidative stress via the PI3K/Akt/Nrf2 pathway in a cell model of Alzheimer's disease [J]. *PeerJ*, 2020, 8: e9308.
- [20] Huang C, Wen C, Yang M, et al. Lycopene protects against t-BHP-induced neuronal oxidative damage and apoptosis via activation of the PI3K/Akt pathway [J]. *Molecular Biology Reports*, 2019, 46(3): 3387–3397.
- [21] Zhao R, Hu W, Tsai J, et al. Microglia limit the expansion of β -amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Mol Neurodegener*, 2017, 12(1): 47.
- [22] Flory J, Lipska K. Metformin in 2019 [J]. *Jama*, 2019, 321(19): 1926–1927.
- [23] Ou Z, Kong X, Sun X, et al. Metformin treatment prevents amyloid plaque deposition and memory impairment in APP/PS1 mice [J]. *Brain Behav Immun*, 2018, 69: 351–363.
- [24] Chen Y, Zhou K, Wang R, et al. Antidiabetic drug metformin (GlucophageR) increases biogenesis of Alzheimer's amyloid peptides via up-regulating BACE1 transcription [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(10): 3907–3912.
- [25] 于箐, 周东升. 补肾益智方联合多奈哌齐片治疗阿尔茨海默病的疗效及对A β 、GSH-Px、SOD及MDA的影响 [J]. *广东医学*, 2019, 40(12): 1798–1802.
- Yu Z, Zhou DS. Therapeutic effect of bushen yizhi recipe combined with donepezil tablets on Alzheimer's disease and effects on A β , EGSH-Px, SOD and MDA [J]. *J Guangdong Med*, 2019, 40(12): 1798–1802..
- [26] Mori C, Spooner ET, Wisniewsk KE, et al. Intranuclear abeta42 accumulation in Down syndrome brain [J]. *Amyloid*, 2002, 9(2): 88–102.
- [27] Xu X, Sun Y, Cen X, et al. Metformin activates chaperone-mediated autophagy and improves disease pathologies in an Alzheimer disease mouse model [J]. *Protein Cell*, 2021, 12(10): 769–787.