

马泽微, 黄丽, 郑云勤, 等. 叶酸对 AD 炎症小鼠脑内 Flotillin-1 及 $A\beta$ 表达的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(8): 10-18.

Ma ZW, Huang L, Zheng YQ, et al. Effect of folic acid on the expression of Flotillin-1 and β -amyloid protein in the brain of mice with Alzheimer's disease inflammation [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(8): 10-18.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.08.002

叶酸对 AD 炎症小鼠脑内 Flotillin-1 及 $A\beta$ 表达的影响

马泽微¹, 黄丽¹, 郑云勤¹, 张美琳^{1,2,3}, 刘欢^{1,2,3*}

(1. 天津医科大学公共卫生学院营养与食品卫生学系, 天津 300070; 2. 人群重大疾病防控教育部重点实验室, 天津 300070; 3. 天津市环境营养与人群健康重点实验室, 天津 300070)

【摘要】 目的 观察叶酸 (folic acid, FA) 补充对炎症刺激 AD 小鼠脑内 Flotillin-1 及 β 淀粉样蛋白 (β -amyloid protein, $A\beta$) 代谢相关蛋白表达的影响。**方法** 27 只 6 月龄雄性 APP/PS1 小鼠, 随机分为 AD 组、AD+LPS 组和 AD+LPS+FA 组, 每组各 9 只。9 只同月龄 C57BL/6J 雄性小鼠作为野生对照 (Control) 组。给予 AD+LPS+FA 组叶酸补充饲料 (8 mg/kg) 干预 3 个月, 其他 2 组喂养普通饲料。实验结束前 1 周对 AD+LPS 组与 AD+LPS+FA 组小鼠腹腔注射脂多糖溶液 (LPS, 250 μ g/(kg·d)), 其余两组注射生理盐水。采用 ELISA 方法检测各组小鼠血清炎症因子 TNF- α 、IL-6 含量以及脑组织 $A\beta_{1-40}$ 、 $A\beta_{1-42}$ 水平, Western blot 检测脑组织 Flotillin-1 蛋白的表达, 免疫荧光双标法检测脑皮质区 Flotillin-1 和 $A\beta_{1-42}$ /APP/PS1/BACE1 的共表达。**结果** 经方差分析, 与 Control 组相比, AD 组小鼠血清 TNF- α 、IL-6 含量升高 ($P<0.05$)、脑内 $A\beta_{1-40}$ 和 $A\beta_{1-42}$ 水平升高 ($P<0.05$)、脑内 Flotillin-1 蛋白的表达增加 ($P<0.05$)、脑组织皮质区 Flotillin-1 与 $A\beta_{1-42}$ /APP/PS1/BACE1 的共表达蛋白增多 ($P<0.05$); 与 AD 组相比, AD+LPS 组小鼠血清炎症因子和脑内 $A\beta$ 水平均进一步升高 ($P<0.05$)、脑组织皮质区 Flotillin-1 与 $A\beta_{1-42}$ /APP/BACE1 双标阳性蛋白表达量增多 ($P<0.05$); 与 AD+LPS 组相比, AD+LPS+FA 组小鼠体内炎症水平和脑内 $A\beta$ 含量降低 ($P<0.05$)、脑组织 Flotillin-1 蛋白表达减少 ($P<0.05$)、脑组织皮质区 Flotillin-1 与 $A\beta_{1-42}$ /APP/PS1/BACE1 蛋白的共表达量减少 ($P<0.05$)。**结论** 补充叶酸能够降低 AD 炎症小鼠脑内 Flotillin-1 蛋白的表达, 减少 $A\beta$ 沉积。

【关键词】 叶酸; β 淀粉样蛋白; Flotillin-1; 阿尔茨海默病; 炎症

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 08-0010-09

Effect of folic acid on the expression of Flotillin-1 and β -amyloid protein in the brain of mice with Alzheimer's disease inflammation

MA Zewei¹, HUANG Li¹, ZHENG Yunqin¹, ZHANG Meilin^{1,2,3}, LIU Huan^{1,2,3*}

(1. Department of Nutrition and Food Science, School of Public Health, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China.

2. Key Laboratory of Prevention and Control of Major Diseases in the Population, Ministry of Education, Tianjin 300070.

3. Tianjin Key Laboratory of Environment, Nutrition and Public Health, Tianjin 300070)

【Abstract】 Objective To observe the effects of folic acid (FA) supplementation on the expression of Flotillin-1 and β -amyloid protein ($A\beta$)-metabolism-related proteins in the brains of inflammation-stimulated Alzheimer's disease (AD) mice. **Methods** Twenty-seven 6-month-old male APP/PS1 mice were randomly divided into AD, AD+LPS, and AD+LPS+FA groups, with nine mice in each group. Nine C57BL/6J male mice born within the same month were used as

【基金项目】 国家自然科学基金 (82173516)。

【作者简介】 马泽微 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 营养与神经科学。E-mail: ma_zewei@163.com

【通信作者】 刘欢 (1980—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 营养与神经科学。E-mail: liuhuan@tmu.edu.cn

the Control group. The AD + LPS + FA group was given folic-acid-supplemented feed (8 mg/kg) for 3 months of intervention, while the other three groups were fed normal feed. Lipopolysaccharide solution (LPS, 250 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$) was injected intraperitoneally into mice in the AD+LPS and AD+LPS+FA groups 1 week before the end of the experiment, and saline was injected into the remaining two groups. The serum inflammatory factors TNF- α and IL-6 levels and brain tissue A β_{1-40} and A β_{1-42} levels of mice in each group were detected by ELISA. Flotillin-1 protein expression in brain tissue was detected using Western blot, and the co-expression of Flotillin-1 and A β_{1-42} /APP/PS1/BACE1 in the cortical region of the brain was detected via immunofluorescence double-labeling. **Results** After ANOVA analysis, we found mice in the AD group had elevated serum TNF- α and IL-6 levels ($P<0.05$), elevated levels of A β_{1-40} and A β_{1-42} ($P<0.05$), increased expression of Flotillin-1 protein ($P<0.05$), and increased co-expression of Flotillin-1 and A β_{1-42} /APP/PS1/BACE1 in the cortical brain tissue ($P<0.05$) compared with the Control group. Compared with mice in the AD group, those in the AD+LPS group had further increases in serum inflammatory factors and A β levels in the brain ($P<0.05$) and increased co-expression of Flotillin-1 and A β_{1-42} /APP/BACE1 double-labeled proteins in their cortical brain tissue ($P<0.05$). Compared with mice in the AD+LPS group, those in the AD+LPS+FA group had lower *in vivo* inflammation levels and A β content in the brain ($P<0.05$), lower brain tissue Flotillin-1 protein expression ($P<0.05$), and lower Flotillin-1 and A β_{1-42} /APP/PS1/BACE1 protein co-expression in cortical brain tissue ($P<0.05$). **Conclusions** Folic acid supplementation may reduce Flotillin-1 protein expression and A β deposition in the brain of AD inflammatory mice.

【Keywords】 folic acid; β -amyloid protein; Flotillin-1; Alzheimer's disease; inflammation
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种起始于老年期或老年前期、以进行性认知功能损伤为典型特征的神经退行性疾病,以 β 淀粉样蛋白 (β -amyloid, A β) 沉积和 tau 蛋白过度磷酸化 (microtubule-associated protein tau, p-tau) 为主要病理特征^[1]。“A β 级联反应”假说是目前较为公认的 AD 的主要发病机制^[2],即淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 经 β 分泌酶 (β -secretase 1, BACE1) 和 γ 分泌酶 (其催化亚基为 PSEN1) 代谢产生的 A β 是 AD 的触发因素^[3]。

浮靛蛋白 (Flotillin-1) 是一种主要在哺乳动物神经系统中表达的脂筏标记蛋白,与 AD 的发病存在关联。研究发现,Flotillin-1 在 AD 患者脑标本中的细胞外 A β 斑块和携带神经原纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFT) 的神经元中高度富集^[4]。在 APP/PS1 转基因小鼠中,细胞内 A β 积聚在 Flotillin-1 阳性内吞囊泡中^[5],通过敲除 Flotillin-1 基因或运动下调 Flotillin-1 水平,能够减弱 β -淀粉样蛋白的产生^[6-7]。脂筏是 APP 顺序性酶切生成 A β 的异常代谢过程的工作平台^[8],Chen 等^[9]在人脑 cDNA 文库中使用酵母双杂交系统筛选出 Flotillin-1 与 APP 的细胞内结构域 (APP intracellular domain, AICD) 直接相互作用,推测 Flotillin-1 可能诱导 APP 募集到脂筏上,影响 APP 的定位和加工,进而影响 A β 的含量。有研究则认为 Flotillins 改变了网格蛋白介导的内吞作用而影响 APP^[10-11];此

外,Flotillin-1 作为外泌体主要成分之一,可介导 A β 在细胞间传播^[12]。以上研究结果表明,Flotillin-1 与 AD 的病理发展密切相关,现被认为是一种在阿尔茨海默病诊断中的新兴的生物标志物^[13-14]。

叶酸 (folic acid, FA) 是一种水溶性 B 族维生素,流行病学研究显示低水平的叶酸与认知功能下降相关^[15-16]。随机临床试验表明,叶酸单独使用或与其他物质联合使用,可以改善轻度认知障碍患者认知功能,降低血液中 A β 相关生物标志物水平^[17-18]。在体内研究中,叶酸缺乏可增强 APP/PS1 小鼠脑中 A β 的积累,降低淀粉样蛋白相关 miRNAs 的表达^[19],而叶酸补充能够减少 AD 小鼠脑组织中 A β 沉积及 A β_{1-42} 含量^[20]。此外,叶酸还可以通过调节 N2a-APP 细胞中的 DNA 甲基转移酶活性来抑制 A β 的产生^[21]。如前所述,Flotillin-1 与 AD 的发病关系密切,叶酸对脑组织 A β 沉积的影响是否与 Flotillin-1 有关是本研究的关注重点。

近些年研究发现,神经炎症是 AD 疾病进程中的一个重要环节^[22],炎性介质会通过上调 β -分泌酶刺激 APP 的加工过程,促进 A β 的产生和聚集,A β 沉积又可刺激胶质细胞加剧炎症反应,两者相互影响^[23],直接或间接驱动神经元损伤,加速认知障碍进展。

APP/PS1 双转基因小鼠是 AD 主要的动物模型之一^[24],本研究给予 APP/PS1 小鼠脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 的炎症刺激构建认知障碍

炎症模型,以更好地模拟 AD 患者体内炎症状态。通过检测炎症因子水平、脑内 A β 含量、Flotillin-1 及其与 A β 代谢相关蛋白共定位的表达情况,探讨叶酸对 AD 炎症小鼠脑内 Flotillin-1 及 A β 的影响,为叶酸对 AD 的防治机制提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选用 SPF 级 APP/PS1 双转基因雄性小鼠 27 只,野生型 C57BL/6J 小鼠 9 只,均为 6 月龄,体重 25~30 g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司[SCXK(京)2019-0010]。于天津医科大学实验动物中心屏障设施内进行[SYXK(津)2019-0004],温度(22 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C,相对湿度(60 $\pm$ 5)%,光照/黑暗 12 h/12 h 交替。所有实验动物操作经天津医科大学实验动物伦理委员会批准(TMUaMEC2022022),遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

脂多糖 LPS(*Escherichia coli* 055:B5)(Sigma,美国);8 mg/kg 叶酸补充饲料(Moldiets)(上海博奥派克生物科技有限公司,中国);A β_{1-40} 与 A β_{1-42} 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(酶免科技有限公司,中国,货号:MM-0461M1、MM-0220M1);BCA 蛋白定量试剂盒(山东思科捷生物技术有限公司,中国,货号:EC0001-A);HRP-山羊抗兔二抗(山东思科捷生物技术有限公司,中国,货号:EF0002);A β_{1-42} 抗体(北京博奥森生物技术有限公司,中国,货号:bs-0076M);Flotillin-1 抗体(Abcam,美国,货号:EPR6041);APP 抗体(武汉赛维尔生物技术有限公司,中国,货号:GB121197);PS1 抗体(北京博奥森生物技术有限公司,中国,货号:bs-0025M);BACE1 抗体(成都正能生物技术有限责任公司,中国,货号:220934);山羊抗兔荧光二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司,中国,货号:ZF-0316);山羊抗鼠荧光二抗(山东思科捷生物技术有限公司,中国,货号:EF0004)。

ChemiDocTM XRS 成像系统(Bio-Rad,美国,型号:721BR03087);多功能酶标仪(Bio-Rad,美国,型号:SYNERGYMx);电泳仪(Bio-Rad,美国,型号:024BR09569);倒置荧光显微镜(Olympus,日本,型号:IX2-UCB)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组与干预

适应性喂养 1 周后,将 C57BL/6J 小鼠作为野

生对照(Control)组,APP/PS1 小鼠随机分为 AD 组、AD+LPS 组和 AD+LPS+FA 组,每组各 9 只。AD+LPS+FA 组给予叶酸补充饲料(8 mg/kg)干预 3 个月,其他 3 组给予普通饲料喂养。实验结束前 1 周,对 AD+LPS 组与 AD+LPS+FA 组小鼠腹腔注射脂多糖溶液(LPS,250 μ g/(kg $\cdot$ d)),其余两组注射生理盐水。实验结束,所有小鼠禁食过夜,采用吸入 CO₂ 安乐死处理,取血并断头取出完整脑组织,每组随机选取 5 只快速冷冻后保存于-80 $^{\circ}$ C 冰箱备用,另外 4 只于 4%多聚甲醛固定,进行石蜡包埋及切片。

1.3.2 酶联免疫吸附试验(ELISA)

取适量脑组织,按质量/体积为 1:9 加入 PBS 缓冲液,机器研磨,裂解组织,然后将组织匀浆于 4 $^{\circ}$ C 14 000 r/min 离心 15 min,取上清液备用。使用小鼠 A β_{1-40} 和 A β_{1-42} 的 ELISA 试剂盒,根据说明书的方法和操作步骤进行操作,酶标仪测定各孔吸光值(A450),根据标准曲线,测量脑组织匀浆中 A β_{1-40} 和 A β_{1-42} 的浓度。使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定脑组织匀浆上清液的总蛋白量。最后根据蛋白定量的浓度,换算脑组织内 A β 的含量。取外周血,离心得到血清,使用小鼠 TNF- α 和 IL-6 的 ELISA 试剂盒,按照说明书步骤操作,检测小鼠外周血中 TNF- α 、IL-6 含量。

1.3.3 Western blot 检测

取适量小鼠脑组织匀浆,加入 RIPA 裂解液提取总蛋白,BCA 试剂盒测定蛋白浓度。使用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离总蛋白,然后将分离的蛋白条带转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,5%脱脂奶粉封闭。TBST 洗膜后,将 PVDF 膜放入一抗稀释液(Flotillin-1(1:2000)、GAPDH(1:10 000))中,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。弃去一抗稀释液,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,加入二抗(1:10 000),室温孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次后,使用 ECL 试剂盒显影,全自动凝胶成像仪拍照,用 Image Proplus 6.0 软件计算各个条带的灰度值。以 GAPDH 为内参,Control 组为 1 进行均一化处理,计算各组 Flotillin-1 蛋白的相对表达量。

1.3.4 免疫荧光染色

采用荧光双标法观察脑组织 Flotillin-1 与 AD 相关蛋白 A β_{1-42} 、APP、PS1、BACE1 的共定位。将石蜡切片于 60 $^{\circ}$ C 恒温箱烤片 15 min 后进行免疫荧光染色。依次进行脱蜡、水化、洗涤、消除内源性过氧化物酶、抗原修复、山羊血清封闭的过程,与重组单

克隆兔抗 Flotillin-1 (1 : 100)、鼠抗 $\text{A}\beta_{1-42}$ (1 : 100)、鼠抗 APP (1 : 100)、鼠抗 PS1 (1 : 100)、鼠抗 BACE1 (1 : 100) 4 ℃ 孵育 12~16 h, PBST 洗涤切片后, 与荧光偶联二抗 (山羊抗兔 1 : 100 和山羊抗鼠 1 : 500) 常温孵育 1 h 后, 使用含 DAPI 的抗荧光淬灭剂封片, 倒置荧光显微镜下观察。随机选取每只小鼠脑组织 3 个非重叠皮质区的高倍镜视野 ($\times 1000$), 计算单位面积下荧光双标的蛋白情况, 取平均值进行组间比较。

1.4 统计学方法

数据处理采用 SPSS 25.0 和 GraphPad Prism 8.0 统计软件, 计量资料以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示。比较采用方差分析, 两两比较采用 LSD 检验或 Welch 校正后采用 Tamhane's T_2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清炎症水平

各组小鼠血清炎症因子 TNF- α 含量的比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 68.625, P = 0.000$), 与 Control 组相比, AD 组小鼠体内 TNF- α 水平升高 ($P<0.05$); 与 AD 组相比, AD+LPS 组小鼠 TNF- α 水平进一步升高 ($P<0.05$); 与 AD+LPS 组相比, AD+LPS+FA 组小鼠血清 TNF- α 含量降低 ($P<0.05$)。经方差分析, 各组小鼠血清炎症因子 IL-6 的差异具有统计学意义 ($F = 14.359, P = 0.000$), 与 Control 组相比, AD 组小鼠 IL-6 水平升

高 ($P<0.05$); 与 AD 组相比, AD+LPS 组小鼠血清 IL-6 水平进一步升高 ($P<0.05$); 与 AD+LPS 组相比, AD+LPS+FA 组小鼠血清 IL-6 含量降低 ($P<0.05$), 见表 1。

2.2 脑组织 $\text{A}\beta$ 水平

各组小鼠脑组织 $\text{A}\beta_{1-40}$ 含量的比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 10.271, P = 0.001$), 与 Control 组相比, AD 组小鼠脑内 $\text{A}\beta_{1-40}$ 水平升高 ($P<0.05$); 与 AD 组相比, AD+LPS 组小鼠脑内 $\text{A}\beta_{1-40}$ 水平升高 ($P<0.05$); 与 AD+LPS 组相比, AD+LPS+FA 组小鼠脑内 $\text{A}\beta_{1-40}$ 降低 ($P<0.05$)。经方差分析, 各组小鼠脑组织 $\text{A}\beta_{1-42}$ 含量的差异具有统计学意义 ($F = 13.613, P = 0.000$), 与 Control 组相比, AD 组小鼠脑内 $\text{A}\beta_{1-42}$ 水平升高 ($P<0.05$); 与 AD 组相比, AD+LPS 组小鼠脑内 $\text{A}\beta_{1-42}$ 水平升高 ($P<0.05$); 与 AD+LPS 组相比, AD+LPS+FA 组小鼠脑内 $\text{A}\beta_{1-42}$ 降低 ($P<0.05$), $\text{A}\beta_{1-42}/\text{A}\beta_{1-40}$ 也具有同样的差异性结果。见表 2。

2.3 脑组织 Flotillin-1 标记蛋白表达

各组小鼠脑组织 Flotillin-1 蛋白表达量的比较, 经 Control 组均一化处理后方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 35.385, P = 0.000$), 与 Control 组相比, AD 组小鼠脑内 Flotillin-1 蛋白表达增加 ($P<0.05$); 与 AD 组相比, AD+LPS 组小鼠脑内 Flotillin-1 蛋白表达差异无统计学意义; 与 AD+LPS 组相比, AD+LPS+FA 组小鼠脑内 Flotillin-1 蛋白表达量减少 ($P<0.05$), 见图 1。

表 1 各组小鼠血清 TNF- α 与 IL-6 含量 ($\bar{x}\pm s, n=5$)
Table 1 Levels of TNF- α and IL-6 in the serum of mice

组别 Groups	Control	AD	AD+LPS	AD+LPS+FA
TNF- α /(ng/L)	93.12 $\pm$ 4.911	175.94 $\pm$ 15.82 ^{*#}	221.96 $\pm$ 21.91 [*]	174.43 $\pm$ 9.08 [#]
IL-6/(pg/mL)	6.73 $\pm$ 0.65	9.10 $\pm$ 0.67 ^{*#}	10.49 $\pm$ 1.60 [*]	7.83 $\pm$ 0.50 ^{*#}

注: 与 Control 组比较, ^{*} $P<0.05$; 与 AD+LPS 组比较, [#] $P<0.05$ 。
Note. Compared with Control group, ^{*} $P<0.05$. Compared with AD+LPS group, [#] $P<0.05$.

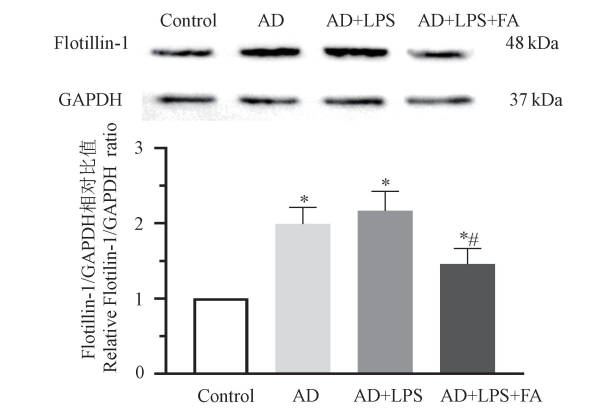
表 2 各组小鼠脑组织 $\text{A}\beta_{1-40}$ 与 $\text{A}\beta_{1-42}$ 含量 ($\bar{x}\pm s, n=5$)
Table 2 Levels of $\text{A}\beta_{1-40}$ and $\text{A}\beta_{1-42}$ in the brain tissue of mice

组别 Groups	Control	AD	AD+LPS	AD+LPS+FA
$\text{A}\beta_{1-40}$ (pg/mg)	102.54 $\pm$ 9.31	130.24 $\pm$ 13.08 ^{*#}	160.10 $\pm$ 27.63 [*]	119.56 $\pm$ 10.83 [#]
$\text{A}\beta_{1-42}$ (pg/mg)	17.74 $\pm$ 2.04	26.50 $\pm$ 5.25 ^{*#}	36.84 $\pm$ 7.15 [*]	24.68 $\pm$ 2.93 ^{*#}
$\text{A}\beta_{1-42}/\text{A}\beta_{1-40}$	0.17 $\pm$ 0.01	0.20 $\pm$ 0.02 ^{*#}	0.23 $\pm$ 0.02 [*]	0.21 $\pm$ 0.01 ^{*#}

注: 与 Control 组比较, ^{*} $P<0.05$; 与 AD+LPS 组比较, [#] $P<0.05$ 。
Note. Compared with Control group, ^{*} $P<0.05$. Compared with AD+LPS group, [#] $P<0.05$.

2.4 脑组织皮质区 Flotillin-1 与 Aβ₁₋₄₂ 荧光共表达

如图 2 所示,各组小鼠脑组织皮质区 Flotillin-1 蛋白呈现出非扩散性的荧光信号,因此本研究比较了单位面积下荧光双标信号分子的数量,来表示



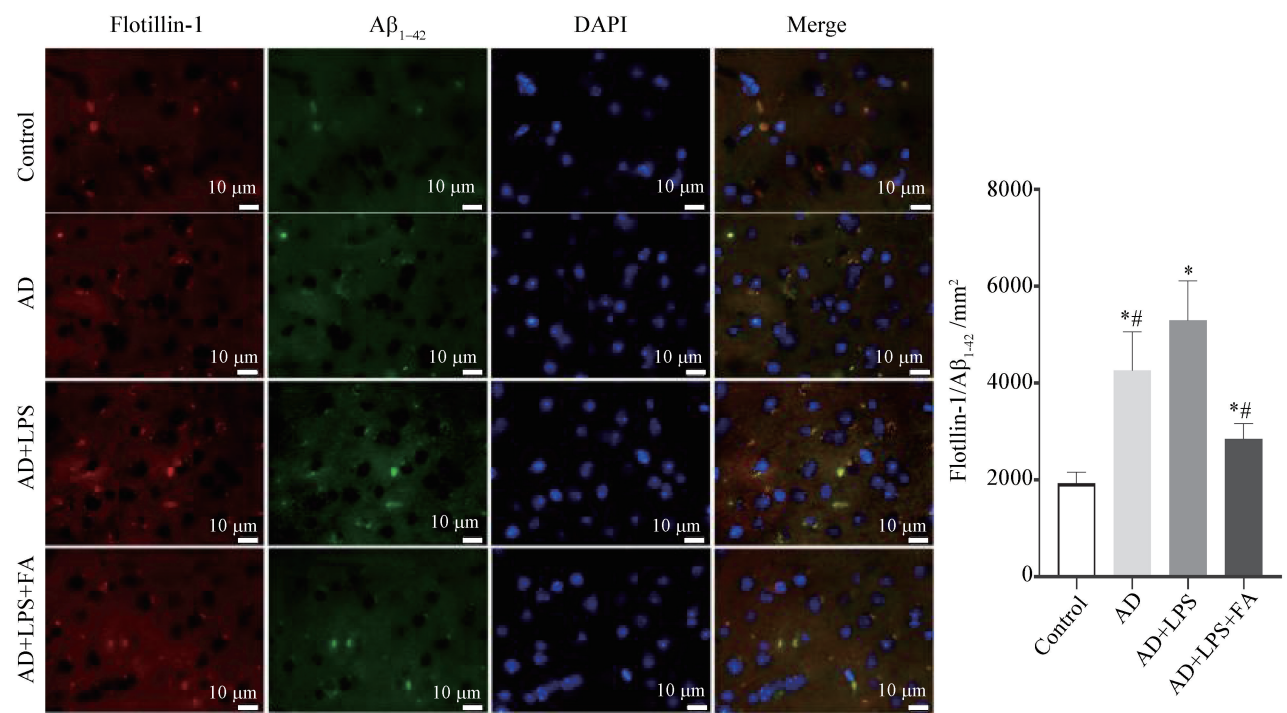
注:与 Control 组比较, * $P<0.05$;与 AD+LPS 组比较, # $P<0.05$ 。
图 1 各组小鼠脑组织 Flotillin-1 蛋白表达($n=5$)
Note. Compared with Control group, * $P<0.05$. Compared with AD+LPS group, # $P<0.05$.

Figure 1 Expression of protein Flotillin-1 in brain tissues of mice

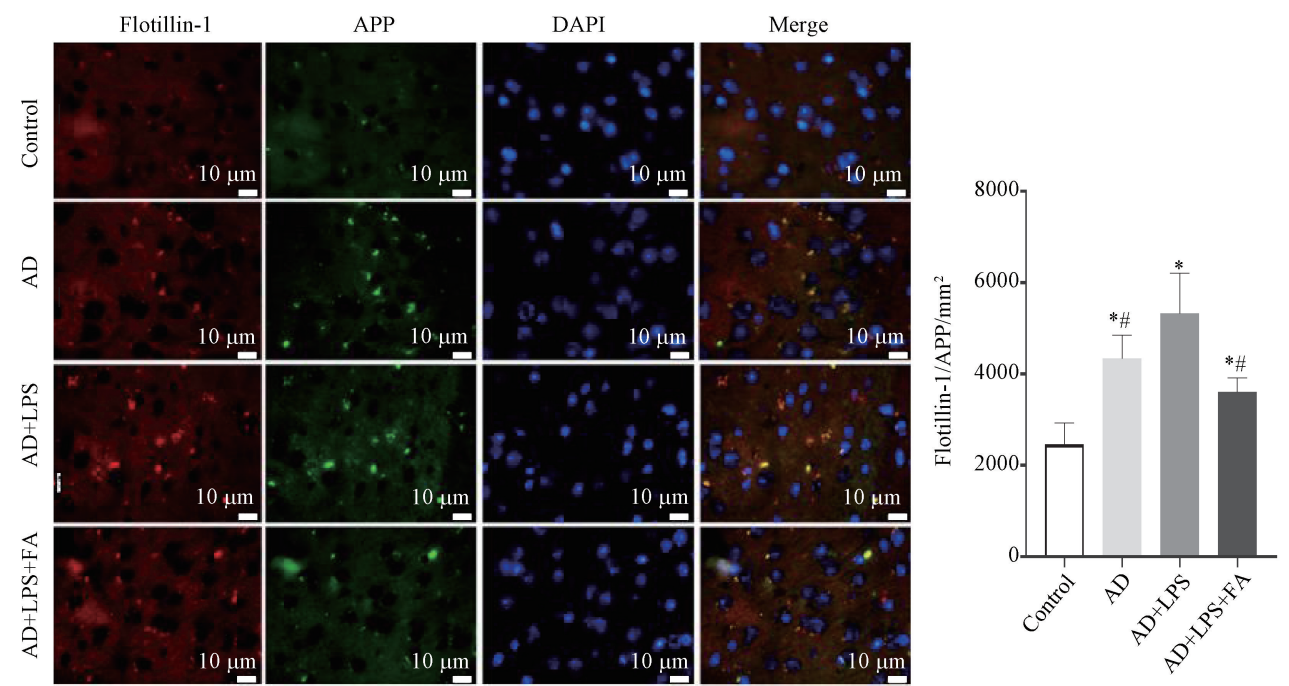
Flotillin-1 与 Aβ 及代谢相关蛋白的共表达情况。结果表明,各组间差异有统计学意义($F=73.300, P=0.000$),与 Control 组相比,AD 组小鼠脑内 Flotillin-1/Aβ₁₋₄₂ 双标蛋白增加($P<0.05$);与 AD 组相比,AD+LPS 组双标蛋白增加($P<0.05$);与 AD+LPS 组相比,AD+LPS+FA 组 Flotillin-1/Aβ₁₋₄₂ 双标蛋白减少($P<0.05$),见图 2。

2.5 脑组织皮质区 Flotillin-1 与 Aβ 生成相关蛋白 (APP、PS1、BACE1) 荧光共表达

如图 3 ~ 图 5 所示,各组小鼠脑组织皮质区 Flotillin-1 与 Aβ 代谢相关蛋白荧光共表达比较,经方差分析,差异具有统计学意义 (APP: $F=52.256, P=0.000$; PS1: $F=30.693, P=0.000$; BACE1: $F=62.549, P=0.000$),与 Control 组相比,AD 组小鼠脑内 Flotillin-1/APP、Flotillin-1/PS1、Flotillin-1/BACE1 的双标蛋白增多($P<0.05$);与 AD 组相比,AD+LPS 组 Flotillin-1/APP、Flotillin-1/BACE1 双标蛋白增加($P<0.05$),Flotillin-1/PS1 双标蛋白无统计学意义;与 AD+LPS 组相比,AD+LPS+FA 组小鼠脑组织皮质区 Flotillin-1 与 APP、PS1、BACE1 共定位表达的蛋白均减少($P<0.05$)。



注:脑组织切片图标尺 = 10 μm (1000×)。与 Control 组比较, * $P<0.05$;与 AD+LPS 组比较, # $P<0.05$ 。
图 2 各组小鼠脑组织 Flotillin-1/Aβ₁₋₄₂ 免疫荧光结果($n=4$)
Note. Brain biopsy scale = 10 μm (1000×). Compared with Control group, * $P<0.05$. Compared with AD+LPS group, # $P<0.05$.
Figure 2 Immunofluorescence result of Flotillin-1/Aβ₁₋₄₂ in the brain tissue of each group of mice

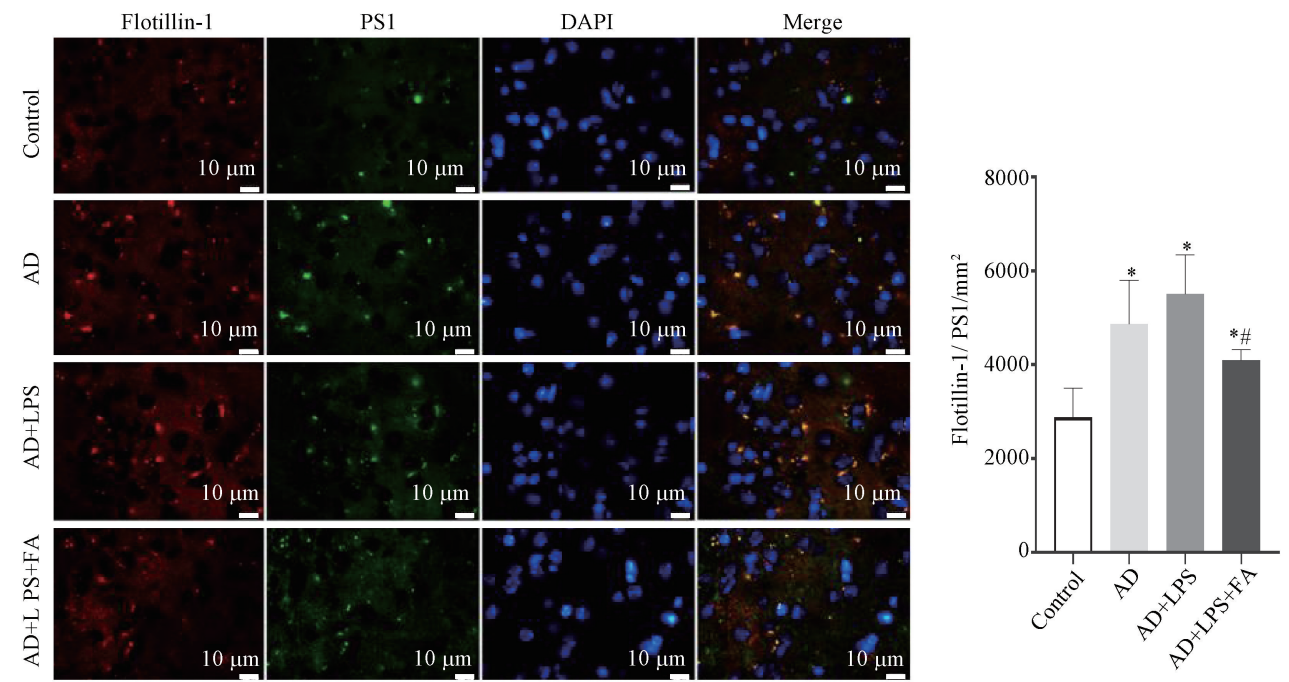


注:脑组织切片图标尺=10 μm (1000×)。与 Control 组比较, **P*<0.05;与 AD+LPS 组比较, #*P*<0.05。

图 3 各组小鼠脑组织 Flotillin-1/APP 免疫荧光结果(*n*=4)

Note. Brain biopsy scale=10 μm (1000×). Compared with Control group, **P*<0.05. Compared with AD+LPS group, #*P*<0.05.

Figure 3 Immunofluorescence result of Flotillin-1/APP in the brain tissue of each group of mice

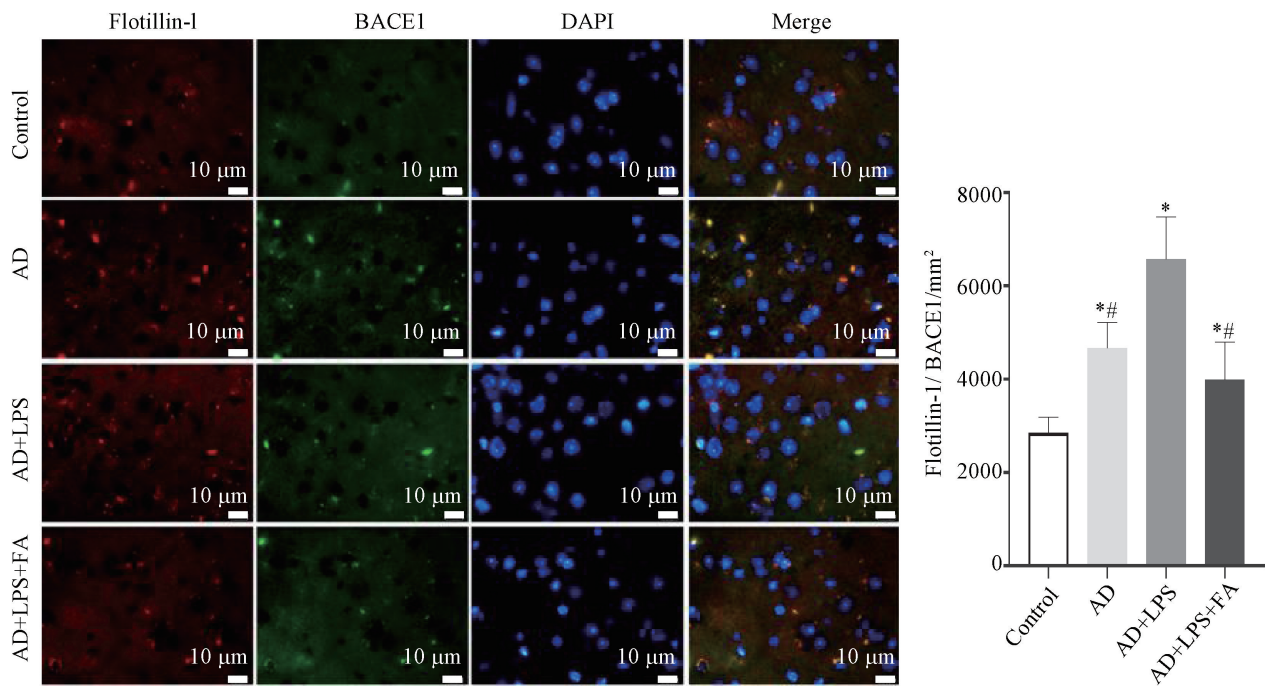


注:脑组织切片图标尺=10 μm (1000×)。与 Control 组比较, **P*<0.05;与 AD+LPS 组比较, #*P*<0.05。

图 4 各组小鼠脑组织 Flotillin-1/PS1 免疫荧光结果(*n*=4)

Note. Brain biopsy scale=10 μm (1000×). Compared with Control group, **P*<0.05. Compared with AD+LPS group, #*P*<0.05.

Figure 4 Immunofluorescence result of Flotillin-1/PS1 in the brain tissue of each group of mice



注:脑组织切片图标尺=10 μm (1000×)。与 Control 组比较, * $P<0.05$;与 AD+LPS 组比较, # $P<0.05$ 。

图 5 各组小鼠脑组织 Flotillin-1/BACE1 免疫荧光结果($n=4$)

Note. Brain biopsy scale=10 μm (1000×). Compared with Control group, * $P<0.05$. Compared with AD+LPS group, # $P<0.05$.

Figure 5 Immunofluorescence result of Flotillin-1/BACE1 in the brain tissue of each group of mice

3 讨论

炎症与 AD 的病程发展密切相关,神经炎症促进 Aβ 的产生与积累^[25]。本研究采用对 APP/PS1 小鼠腹腔注射 LPS 的方法构建认知障碍炎症模型,放大 Aβ 病理特征。结果发现,LPS 刺激 AD 小鼠体内炎症水平显著提高,脑组织 Aβ₁₋₄₀ 与 Aβ₁₋₄₂ 含量均显著增加。

Flotillins 是位于细胞内和细胞外囊泡脂筏中的疏水蛋白,主要参与信号转导和膜-蛋白相互作用,且越来越多的证据表明 Flotillin-1 的积累与 AD 的进展有关^[13],Flotillin-1 将 APP 募集到脂筏上,参与淀粉样蛋白生成途径^[9]。本研究发现,与 Control 组小鼠相比,AD 小鼠及 AD 炎症小鼠脑内 Flotillin-1 蛋白的表达显著增加,可能是 Flotillin-1 的表达增强使 APP 生成 Aβ 的工作平台增多,进而导致 Aβ 的产生过多。Aβ₁₋₄₂ 相较于 Aβ₁₋₄₀ 更具聚集倾向性,易形成寡聚体,有更大的神经毒性^[26]。因此本研究对 Flotillin-1 和 Aβ₁₋₄₂ 及 APP、PS1、BACE1 进行了共定位检测。结果发现,与 Control 组小鼠相比,AD 组和 AD+LPS 组小鼠脑内 Flotillin-1 与 Aβ₁₋₄₂/APP/PS1/BACE1 共标记蛋白的表达均显著增多,

表明 Flotillin-1 与 Aβ 代谢相关蛋白的相关性增强。此外,相比于 AD 组,AD+LPS 组小鼠大脑皮质区中与 Aβ₁₋₄₂ 和 APP、BACE1 共标记蛋白进一步增多,提示炎症加剧状态下,Flotillin-1 蛋白与 Aβ₁₋₄₂ 及前体物 APP、酶 BACE1 之间可能会产生更强的相关性,增加对 APP 的加工,影响 APP 的裂解。此外,Flotillin-1 被视为外泌体标记蛋白,因此 AD 小鼠的 Flotillin-1 表达增多表明可能存在外泌体携带 β-淀粉样蛋白的进行朊病毒样传播^[27],从而增加脑内 Aβ 水平,加重认知障碍。

叶酸是必需的微量营养素,可提供神经保护作用,低叶酸水平与认知减退相关^[17,28]。既往研究已经证明,补充叶酸可减少 AD 小鼠脑组织中 Aβ 沉积^[20],其机制可能与叶酸抑制 BACE1 表达、修饰 DNA 甲基化^[21,29]或影响 Aβ 代谢相关 miRNA 表达有关^[19]。本研究则关注到了 Flotillin-1 蛋白,对认知障碍炎症模型小鼠进行了 3 个月的叶酸补充干预,结果显示,叶酸对炎症加剧的脑内 Aβ₁₋₄₂ 和 Aβ₁₋₄₀ 沉积也能产生减弱作用。叶酸补充可降低 AD 炎症小鼠脑内 Flotillin-1 蛋白的表达量,减少脑内皮质区 Flotillin-1 与 Aβ₁₋₄₂、APP、PS1、BACE1 共定位的蛋白表达,这表明补充叶酸可以调节

Flotillin-1 蛋白的表达,减少 A β ,并且叶酸对脑组织 A β 沉积的作用可能与 Flotillin-1 有关。课题组前期研究发现,叶酸缺乏可影响体外 N2a-APP 细胞 A β 与外泌体的分泌增多^[14],叶酸对 Flotillin-1 的调节也反映出其可能减少外泌体携带 A β 相关蛋白在脑内的传播作用。本研究发现,叶酸干预能够降低 AD 炎症小鼠外周炎症水平,与既往研究结果一致^[30-32],即叶酸在一定程度上减弱了促炎细胞因子对 A β 沉积的促进作用。

综上,本研究发现补充叶酸能够减少 AD 炎症小鼠脑内 Flotillin-1 及 A β 的表达,为探索叶酸防治 AD 提供新的线索。然而,本研究仍存在一定不足,如只是在该动物模型中发现叶酸补充能够降低 AD 炎症小鼠脑内 Flotillin-1 及 A β 代谢相关蛋白表达这一现象,尚不能证明叶酸通过影响 Flotillin-1 进而减少 A β 的生成,后续研究需对动物敲除 Flotillin-1 相关基因以进一步验证。此外,尚不清楚炎症刺激在叶酸调节 Flotillin-1 过程中的影响,未来仍要继续深入探索叶酸对 AD 的保护作用机制。

参考文献:

- [1] BUSCHE M A, HYMAN B T. Synergy between amyloid- β and tau in Alzheimer's disease [J]. *Nat Neurosci*, 2020, 23(10): 1183-1193.
- [2] 王蓬文,李瑞晟,王虹,等. 姜黄素对 APPswe/PS1dE9 双转基因小鼠 A β 生成和降解的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2010, 18(5): 367-371.
WANG P W, LI R S, WANG H, et al. Effect of curcumin on production and degradation of A β in APPswe/PS1dE9 double transgenic mice [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2010, 18(5): 367-371.
- [3] 隋小龙,梁良,张玲,等. 中药 I 号方对 APP/PS1 双转基因模型小鼠 APP 代谢的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2014, 22(6): 49-53, I0004, I0005.
SUI X L, LIANG L, ZHANG L, et al. Effect of a Chinese traditional prescription PN-1 on the amyloid precursor protein processing in transgenic mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2014, 22(6): 49-53, I0004, I0005.
- [4] KOKUBO H, LEMERE C A, YAMAGUCHI H. Localization of flotillins in human brain and their accumulation with the progression of Alzheimer's disease pathology [J]. *Neurosci Lett*, 2000, 290(2): 93-96.
- [5] RAJENDRAN L, KNOBLOCH M, GEIGER K D, et al. Increased A β production leads to intracellular accumulation of Abeta in flotillin-1-positive endosomes [J]. *Neurodegener Dis*, 2007, 4(2/3): 164-170.
- [6] BITSIKAS V, RIENTO K, HOWE J D, et al. The role of

- flotillins in regulating a β production, investigated using flotillin 1 $-/-$, flotillin 2 $-/-$ double knockout mice [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e85217.
- [7] ZHANG X L, ZHAO N, XU B, et al. Treadmill exercise inhibits amyloid- β generation in the hippocampus of APP/PS1 transgenic mice by reducing cholesterol-mediated lipid raft formation [J]. *Neuroreport*, 2019, 30(7): 498-503.
- [8] EHEHALT R, KELLER P, HAASS C, et al. Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts [J]. *J Cell Biol*, 2003, 160(1): 113-123.
- [9] CHEN T Y, LIU P H, RUAN C T, et al. The intracellular domain of amyloid precursor protein interacts with flotillin-1, a lipid raft protein [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 342(1): 266-272.
- [10] GLEBOV O O, BRIGHT N A, NICHOLS B J. Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2006, 8(1): 46-54.
- [11] ALSAQATI M, THOMAS R S, KIDD E J. Proteins involved in endocytosis are upregulated by ageing in the normal human brain: implications for the development of Alzheimer's disease [J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2018, 73(3): 289-298.
- [12] VINGTDEUX V, SERGEANT N, BUÉE L. Potential contribution of exosomes to the prion-like propagation of lesions in Alzheimer's disease [J]. *Front Physiol*, 2012, 3: 229.
- [13] ANGELOPOULOU E, PAUDEL Y N, SHAIKH M F, et al. Flotillin: a promising biomarker for Alzheimer's disease [J]. *J Pers Med*, 2020, 10(2): 20.
- [14] ABDULLAH M, KIMURA N, AKATSU H, et al. Flotillin is a novel diagnostic blood marker of Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2019, 72(4): 1165-1176.
- [15] MA F, WU T, ZHAO J, et al. Plasma homocysteine and serum folate and vitamin B₁₂ levels in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: a case-control study [J]. *Nutrients*, 2017, 9(7): 725.
- [16] O'CONNOR D M A, SCARLETT S, DE LOOZE C, et al. Low folate predicts accelerated cognitive decline: 8-year follow-up of 3140 older adults in Ireland [J]. *Eur J Clin Nutr*, 2022, 76(7): 950-957.
- [17] MA F, LI Q, ZHOU X, et al. Effects of folic acid supplementation on cognitive function and A β -related biomarkers in mild cognitive impairment: a randomized controlled trial [J]. *Eur J Nutr*, 2019, 58(1): 345-356.
- [18] JIANG X, GUO Y, CUI L, et al. Study of diet habits and cognitive function in the Chinese middle-aged and elderly population: the association between folic acid, B vitamins, vitamin D, coenzyme Q10 supplementation and cognitive ability [J]. *Nutrients*, 2023, 15(5): 1243.
- [19] LIU H, TIAN T, QIN S, et al. Folic acid deficiency enhances abeta accumulation in APP/PS1 mice brain and decreases amyloid-associated miRNAs expression [J]. *J Nutr Biochem*, 2015, 26(12): 1502-1508.

- [20] 田甜, 孙杨, 王渭诗, 等. 叶酸对 AD 模型小鼠脑内 A β 沉积及 BACE1 表达影响 [J]. 中国公共卫生, 2018, 34(3): 368–372.
- TIAN T, SUN Y, WANG W S, et al. Effects of folic acid on A β deposition and BACE1 expression in brain of APP/PS1 transgenic mouse [J]. Chin J Public Health, 2018, 34(3): 368–372.
- [21] LI W, JIANG M, ZHAO S, et al. Folic acid inhibits amyloid β -peptide production through modulating DNA methyltransferase activity in N2a-APP cells [J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(10): 25002–25013.
- [22] 强伟杰, 陈颖, 蔡维艳, 等. 基于神经炎症的神经退行性疾病模型及中药治疗策略 [J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(4): 461–466.
- QIANG W J, CHEN Y, CAI W Y, et al. Research model of neurodegenerative diseases based on neuroinflammation and its traditional Chinese medicine treatment strategies [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2017, 25(4): 461–466.
- [23] CAI Z, HUSSAIN M D, YAN L J. Microglia, neuroinflammation, and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease [J]. Int J Neurosci, 2014, 124(5): 307–321.
- [24] 尚培骏, 姬乃春, 杨锦雯, 等. 基于 APP/PS1 双转基因小鼠与野生型小鼠比较综述学习记忆相关行为学实验优缺点和注意事项 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(8): 969–984.
- SHANG P J, JI N C, YANG J W, et al. Comparison of APP/PS1 double transgenic and wild-type mice to review the advantages, disadvantages, and cautions of behavioral tests related to learning and memory [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(8): 969–984.
- [25] VENEGAS C, KUMAR S, FRANKLIN B S, et al. Microglia-derived ASC specks cross-seed amyloid- β in Alzheimer's disease [J]. Nature, 2017, 552(7685): 355–361.
- [26] 刘心朗, 贾建新. β 淀粉样蛋白在阿尔茨海默病中的作用机制研究进展 [J]. 解剖学杂志, 2020, 43(1): 60–63.
- LIU X L, JIA J X. Research progress on the mechanism of beta Amyloid protein in Alzheimer's disease [J]. Chin J Clin Anat, 2020, 43(1): 60–63.
- [27] SARDAR SINHA M, ANSELL-SCHULTZ A, CIVITELLI L, et al. Alzheimer's disease pathology propagation by exosomes containing toxic amyloid-beta oligomers [J]. Acta Neuropathol, 2018, 136(1): 41–56.
- [28] BABYLON L, SCHMITT F, FRANKE Y, et al. Effects of combining biofactors on bioenergetic parameters, A β levels and survival in alzheimer model organisms [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(15): 8670.
- [29] LI W, LIU H, YU M, et al. Folic acid administration inhibits amyloid β -peptide accumulation in APP/PS1 transgenic mice [J]. J Nutr Biochem. 2015, 26(8): 883–891.
- [30] Paniz C, Bertinato J F, Lucena M R, et al. A daily dose of 5 mg folic acid for 90 days is associated with increased serum unmetabolized folic acid and reduced natural killer cell cytotoxicity in healthy Brazilian adults [J]. J Nutr, 2017, 147(9): 1677–1685.
- [31] ZHANG Q, WU H, ZOU M, et al. Folic acid improves abnormal behavior via mitigation of oxidative stress, inflammation, and ferroptosis in the BTBR T⁺ tf/J mouse model of autism [J]. J Nutr Biochem, 2019, 71: 98–109.
- [32] CIANCIULLI A, SALVATORE R, PORRO C, et al. Folic acid is able to polarize the inflammatory response in LPS activated microglia by regulating multiple signaling pathways [J]. Mediators Inflamm, 2016; 5240127.

[收稿日期]2024-02-29