

白藜芦醇通过 IRE1 α -XBP1 通路抑制衣霉素诱导的神经元凋亡和 GSK-3 β /Tau 蛋白磷酸化

林 淼^{1,2}, 刘芸如¹, 于佳欣^{1,2}, 张文轩^{1,2}, 劳凤学¹, 黄汉昌^{1,2*}

¹北京联合大学功能因子与脑科学研究院; ²北京联合大学天然产物开发与创新药物研究重点实验室, 北京 100023

摘要: 研究白藜芦醇(resveratrol, Res)对内质网应激途径细胞凋亡和糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)/Tau 蛋白磷酸化作用的影响。体外原代培养神经元细胞, 采用衣霉素(tunicamycin, TM)建立内质网应激模型, Western blot 法检测内质网分子伴侣蛋白葡萄糖调节蛋白 78 (glucose-regulated protein 78, GRP78)、未折叠蛋白反应相关的肌醇需要酶 1 α (inositol-requiring enzyme 1 α , IRE1 α) 的 Ser724 磷酸化、X 盒结合蛋白 1 (X-box binding protein 1, XBP1) 表达、GSK-3 β 的 Ser9 和 Tau 蛋白的 Ser396 磷酸化水平。生物化学方法分析细胞质中半胱天冬酶-12 (Caspase-12) 和半胱天冬酶-3 (Caspase-3) 活性、细胞凋亡水平。结果显示, TM 能够诱导内质网应激作用, 导致神经元细胞 GSK-3 β 的活化和 Tau 蛋白磷酸化水平升高 ($P < 0.01$)、神经元细胞经内质网途径凋亡 ($P < 0.05$)。与内质网应激抑制剂 4-苯基丁酸结果相似, Res 组显著降低了 GRP78 的表达 ($P < 0.01$)、降低了 IRE1 α -XBP1 通路的活性 ($P < 0.01$)。Res 可以减缓 TM 诱导的内质网途径细胞凋亡级联反应中 Caspase-12 和 Caspase-3 的活性 ($P < 0.01$)。Res 抑制了 TM 诱导的 GSK-3 β 的 Ser9 位点磷酸化水平和 Tau 蛋白 Ser396 位点的磷酸化水平 ($P < 0.01$)。结果表明, Res 能够降低 TM 诱导的 IRE1 α -XBP1 途径内质网应激作用、GSK3 β 的活性及 Tau 蛋白发生磷酸化水平, 减弱神经元细胞经内质网途径凋亡的级联反应作用。

关键词: 白藜芦醇; 内质网应激; 糖原合成酶激酶-3 β ; Tau 蛋白

中图分类号: R963

文献标识码: A

Resveratrol inhibits tunicamycin-induced neuronal apoptosis and phosphorylation of GSK-3 β /Tau protein through IRE1 α -XBP1 pathway

LIN Miao^{1,2}, LIU Yun-ru¹, YU Jia-xin^{1,2},

ZHANG Wen-xuan^{1,2}, LAO Feng-xue¹, HUANG Han-chang^{1,2*}

¹Institute of Functional Factors and Brain Sciences, Beijing Union University; ²Key Laboratory of Natural Products Development and Innovative Drug Research, Beijing Union University, Beijing 100023, China

Abstract: This study aims to investigate the effects of resveratrol (Res) on cell apoptosis through endoplasmic reticulum stress (ERS) pathway and phosphorylation of GSK-3 β and Tau protein. Primary cultured neurons were used *in vitro* to establish an ERS model induced by tunicamycin (TM). Western blot analysis was performed to detect the levels of the endoplasmic reticulum molecular chaperone protein GRP78, unfolded protein response

related IRE1 α phosphorylation and XBP1s expression, phosphorylation of GSK-3 β and Tau protein. Biochemical methods were used to analyze the activity of Caspase-12 and Caspase-3, as well as the level of cell apoptosis. The results indicated that TM induces endoplasmic reticulum stress, leading to increasing in neuronal GSK-3 β activation and Tau protein phosphorylation ($P<0.01$), as well as neuronal apoptosis through the endoplasmic reticulum pathway($P<0.05$). Compared with the TM model group, like the inhibitor of endoplasmic reticulum stress 4-phenylbutyric acid, the Res protection group significantly reduced the expression of GRP78, phosphorylated IRE1 α at Ser724, and XBP1s ($P<0.01$). Res reduced TM-induced the activity of both Caspase-12 and Caspase-3 and neuronal apoptosis($P<0.01$). Res also inhibited TM-induced the phosphorylation levels of GSK-3 β at Ser9 and Tau protein at Ser396 ($P<0.01$). In conclusion, Res can reduce TM induced endoplasmic reticulum stress on IRE1 α -XBP1 pathway, the activity of GSK-3 β , and the phosphorylation level of Tau protein. Res weaken the cascade reaction of neuronal apoptosis through the endoplasmic reticulum pathway.

Key words: resveratrol; endoplasmic reticulum stress; glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β); Tau protein

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种年龄相关的神经退行性疾病, 其病理特征主要表现为细胞外形成以 β -淀粉样蛋白 (amyloid- β peptide, A β) 为主要成分的神经炎性老年斑、细胞内包含 Tau 蛋白过度磷酸化而形成的神经原纤维缠结、神经元丢失^[1-3]。在 AD 病理中内质网应激可能是 Tau 蛋白发生过度磷酸化的重要促进因素^[4]。当在内质网中蛋白质折叠和降解过程失衡时会导致未折叠蛋白在内质网中的累积而导致内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS)。尸检结果发现, AD 患者脑组织中的 ERS 标志物含量增加^[5]。本课题组的前期研究表明, 内质网应激可触发 GSK-3 β 的活化, 导致 Tau 蛋白的高度磷酸化^[6]。缓解内质网应激对 GSK-3 β /Tau 蛋白磷酸化作用对 AD 的防治具有积极的意义。

白藜芦醇 (resveratrol, Res) 是非黄酮类多酚化合物, 具有比较广泛的生物活性, 如抗氧化、抗炎^[7]、免疫调节^[8]、降压^[9]和抗癌^[10]等多方面作用。近年来 Res 在 AD 预防和治疗中越来越受到关注。本课题组的前期研究发现, 白藜芦醇能改善衣霉素 (tunicamycin, TM) 诱导的 SH-SY5Y 神经元细胞内质网应激水平和细胞自噬作用^[11]。

本实验采用原代培养的小鼠神经元细胞, 探究 Res 对 TM 诱导的内质网应激触发的肌醇需要酶 1 α (inositol requiring enzyme 1 α , IRE1 α) /X 盒结合蛋白 1 (X-box binding protein 1, XBP1) 通路、GSK-3 β /Tau 蛋白磷酸化作用及内质网途径细胞凋亡的影响, 为白藜芦醇在预防神经退行性疾病方面的作用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

8 周龄雌性和雄性清洁级昆明系性成熟小鼠，购于北京维通利华实验动物技术有限公司，批号：SCXK（京）2019-0008。动物饲养在温度（25±2）°C、湿度为 55%~65%、光暗交替（12 h/12 h）环境。

1.1.2 实验试剂

白藜芦醇（上海源叶生物科技有限公司，批号：B20044）；衣霉素（北京华越洋生物有限公司，批号：C256-5）；Neurobasal™培养基、DMEM/F12 营养培养基、B-27 无血清添加剂（美国 Gibco 公司，批号：21103049、31765092、17504044）；4-苯基丁酸（4-phenylbutyric acid, 4-PBA）、pSer396-Tau 蛋白抗体（美国 Sigma-Aldrich 公司，批号：STBF7437V、SAB4504557）；Caspase-3、Caspase-12 试剂盒及 pSer9-GSK-3β抗体（美国 Abcam 公司，批号：Ab90437、Ab62484、Ab75814）；多聚-L-赖氨酸（poly-L-lysine, PLL）、Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒（上海碧云天股份有限公司，批号：C0312、C1062L）；GRP78 抗体、IRE1α 抗体、XBP1s 抗体、Tau 蛋白抗体及 GADPH 抗体（美国 CST 公司，批号：BS1154、3183S、12782S、4019、2118s）、pSer724-IRE1α抗体（上海爱必信公司，批号：abs155071）、GSK-3β 抗体（北京博奥森公司，批号：bsm-33293M）；β-actin 抗体（美国 Sigma 公司，批号：A1978）；NeuN 抗体（博士德生物公司，批号：A11954-1）。

1.2 方法

1.2.1 原代皮层神经元细胞的培养和药物处理

原代皮层神经元细胞的培养方法参考 Liu 等^[1]的实验方法。将出生 24 h 内的乳鼠置于冰冷的 75%乙醇中杀菌和冷冻处理 3~5 min。在无菌条件下取出大脑、分离皮层组织并剪碎至 1~2 mm³；用适量的 D-Hanks 溶液清洗后，加入 4 mL 浓度为 0.25%的胰酶和 50 μL DNase I，37 °C水浴中消化 15 min，加入含血清的 DMEM/F12 培养基以中止消化反应；轻轻吹打细胞悬浮液，经 200 目的尼龙筛网过滤至离心管中；4 °C、100 × g 离心 10 min，弃上清液，加入 DMEM/F12 培养基至 8mL，吹起沉淀的细胞并混匀；用含血清的 DMEM/F12 培养基稀释到 1×10⁶ 个/mL 的单细胞悬浮液，接种在预先用多聚-L-赖氨酸处理过的培养板中，置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养；原代神经元培养接种 24 h 后，用含 2% B27 的 Neurobasal-A 无血清培养液取代原来的 DMEM/F12 培养基，之后每 3 d 半量换液一次，直至第 7d 细胞完全成熟。

药物处理：实验分组为正常组（control, Con）、白藜芦醇组（resveratrol, Res）、TM模型组（TM）、白藜芦醇保护组（Res+TM）、4-苯基丁酸（内质网应激抑制剂）保护组（4-PBA+TM）。保护组中神经元细胞预先经 Res/4-PBA 预先孵育 10 h 后加 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TM 共处理 24h。依据我们前期研究的药物处理最佳浓度^[11]，药物浓度采用 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ Res、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TM、10 mmol/L 4-PBA。

1.2.2 神经元凋亡率的测定

采用 Annexin V-FITC/PI 双染—活细胞成像检测方法测定细胞凋亡水平。按照 5×10^5 个/mL 的密度接种于 6 孔细胞培养板中，待神经元成熟后按照实验分组加药处理。参照 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡测试试剂盒的说明书，弃掉细胞培养液，加入 PBS 洗涤 2 次；加入 500 μL 含 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI 的结合液；在室温 25 $^{\circ}\text{C}$ 下避光孵育 30min；在活细胞成像仪下进行绿色和红色荧光拍照。根据 Annexin V-FITC 与 PS 结合、PI 与凋亡中晚期的细胞和坏死细胞 DNA 染色的特性，通过荧光强度分析细胞凋亡水平。正常细胞：Annexin V-FITC (-)、PI (-)；早期凋亡细胞：Annexin V -FITC (+)、PI (-)；晚期凋亡细胞：Annexin V -FITC (+)、PI (+)。

1.2.3 Western blot 法检测

神经元细胞按 5×10^5 个/孔接种于直径为 3 cm 培养皿中，收集经药物处理后的神经元细胞，用预冷的 PBS 洗涤细胞 3 次后，将培养皿置于冰上，在培养皿内加入 150 μL RIPA 强裂解液和蛋白酶抑制剂后匀浆，使用细胞刮收集细胞于培养皿中，冰上裂解 30 min，4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 \times g 离心 10 min 后收集上清液，BCA 法测定上清液中总蛋白浓度。SDS-PAGE 电泳后湿转法转膜将蛋白转移至 PVDF 膜，5%脱脂奶粉室温封闭 2 h，一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡过夜孵育。TBST 缓冲液洗膜 3 次，二抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。将 ECL A 液和 ECL B 液等体积混合后在化学发光成像系统上曝光膜上条带。使用 Image J 软件分析条带的灰度。

1.2.4 胱天蛋白酶（Caspase）活性分析

神经元细胞按 5×10^5 个/孔接种于直径为 3 cm 培养皿中，加药处理后，提取细胞总蛋白。每皿细胞用 1 mL PBS 洗涤两遍后，加入 120 μL 含有磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液，4 $^{\circ}\text{C}$ 下收集细胞，12 000 \times g 离心 10 min，取细胞上清液，BCA 法测定总蛋白质浓度。参照 Caspase-12 和 Caspase-3 活性检测试剂盒的说明书，在 96 孔板中，按 50 μL 细胞裂解液中加入 40 μL 检测缓冲液和 10 μL 的检测底物（ATAD-AFC/DEVD-AFC，被酶解后释放出荧光物质 AFC），以检测缓冲液作为溶剂对照。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 120 min，用荧光酶标仪测定 $\lambda_{405 \text{ nm}}$ 激发 $\lambda_{505 \text{ nm}}$ 发射的荧光强度 (F)。用公式 (1) 计算实验组的 Caspase 相对活性 (A)。

$$A = \frac{F_2 - F_0}{C_2} / \frac{F_1 - F_0}{C_1} \times 100\% \quad (1)$$

其中： A —实验组的 Caspase 相对活性； F_2 —实验组的荧光强度； F_1 —正常组的荧光强度； F_0 —溶剂对照组的荧光强度； C_2 —实验组的蛋白浓度； C_1 —正常组的蛋白浓度。

1.2.5 数据处理与分析

采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析，数据以平均值±标准偏差表示，每组至少进行 3 次重复。用 Graph Pad Prism 软件作图。数据比较采用单因素方差分析（One-WayANOVA）法。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 白藜芦醇缓解 TM 诱导的神经元凋亡作用

采用 Annexin V-FITC/PI 双染—活细胞成像法测定的细胞凋亡率，白藜芦醇对 TM 诱导后的原代神经元细胞凋亡率的影响如图 1 及表 1 所示。与 Con 组比较，TM 组细胞的早期凋亡和晚期凋亡率水平均显著升高（ $P < 0.05$ ）。与 4-PBA+TM 组相似，与 TM 组比较，Res+TM 组细胞的早期凋亡和晚期凋亡率水平均显著降低（ $P < 0.05$ ）。结果表明，白藜芦醇能够缓解由 TM 诱导的原代神经元细胞凋亡作用。

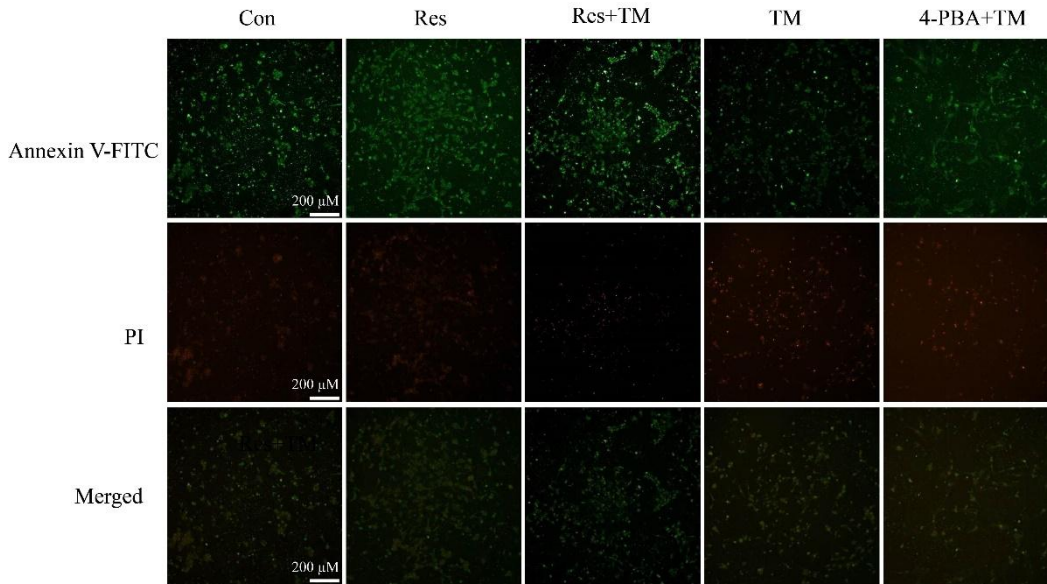


图 1 白藜芦醇对 TM 诱导的神经元凋亡的影响

Fig.1 Effect of Res on primary neuronal apoptosis

表1 不同药物处理下的细胞凋亡率（ $\bar{x} \pm s, n = 6$ ）

Table 1 Apoptosis of cells under different treatments（ $\bar{x} \pm s, n = 6$ ）

组别	晚期凋亡	早期凋亡
----	------	------

Group	Late apoptosis (%)	Early apoptosis (%)
Con	2.18±0.34	1.49±0.19
Res	3.12±0.46	1.86±0.25
Res+TM	16.24±2.18 [#]	8.12±1.13 [#]
TM	46.58±5.06 [*]	20.81±3.72 [*]
4-PBA+TM	27.23±3.23 [#]	13.26±1.64 [#]

注：与 Con 组比较，* $P < 0.05$ ；与 TM 组比较，[#] $P < 0.05$ 。

Note: Compared with Con group, * $P < 0.05$; Compared with TM group, [#] $P < 0.05$.

2.2 白藜芦醇减缓衣霉素诱导的原代神经元内质网应激作用

GRP78 蛋白的上调被视为内质网应激发生的标志。如图 2 所示，Res 组 GRP78 的表达水平无显著变化；与 Con 组比较，TM 组 2.5 $\mu\text{g/mL}$ TM 处理 24 h 后细胞 GRP78 的表达水平极显著升高 ($P < 0.01$)。与 TM 比较，Res+TM 组细胞 GRP78 表达水平极显著降低 ($P < 0.01$)。以上 GRP78 表达水平的结果提示，TM 诱导了 ERS，白藜芦醇可以减缓 TM 诱导的 ERS 作用。

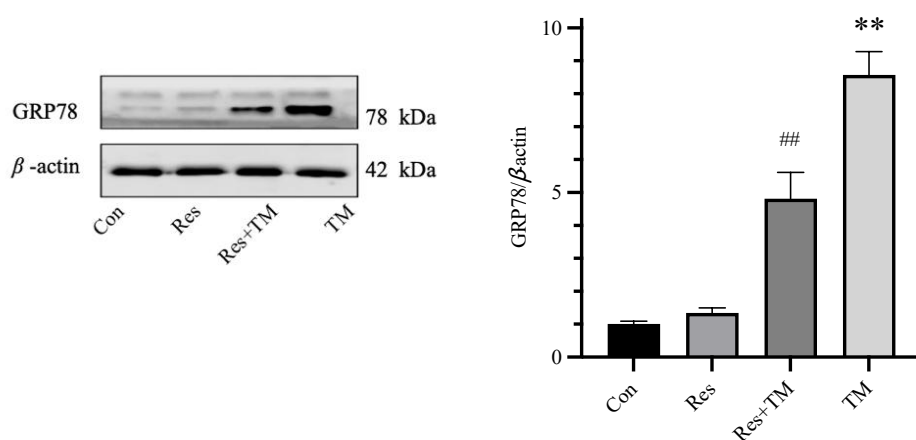


图 2 Res 对 TM 诱导的 GRP78 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of Res on TM-induced GRP78 expression ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注：与 Con 组比较，** $P < 0.01$ ；与 TM 组比较，^{##} $P < 0.01$ 。

Note: Compared with Con group, ** $P < 0.01$; Compared with TM group, ^{##} $P < 0.01$.

2.3 Res 抑制 TM 诱导的 IRE1 α -XBP1 通路的激活

如图 3、4 所示，与 Con 组比较，TM 组中的 p-IRE1 α /IRE1 α 的比值和 XBP1s 蛋白表达水平极显著升高 ($P < 0.01$)。与 TM 组比较，Res+TM 组的 IRE1 α 极显著升高、而 p-IRE1 α 及 p-IRE1 α /IRE1 α 比值、则极显著降低 ($P < 0.01$)。与 TM 组比较，4-PBA+TM 组的 p-IRE1 α

及 p-IRE1 α /IRE1 α 比值则极显著升高 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 这可能与 4-PBA 处理细胞后 IRE1 α 表达水平较低有关, 可能产生了代谢补充效应。以上结果提示, TM 能激活 IRE1 α 通路, 加速 ERS 的反应, IRE1 α 的磷酸化催化了 XBP1 mRNA 的剪切, 导致 XBP1s 蛋白表达的升高; 白藜芦醇能够抑制 TM 诱导的 IRE1 α 通路激活、缓解神经元细胞的内质网应激作用。

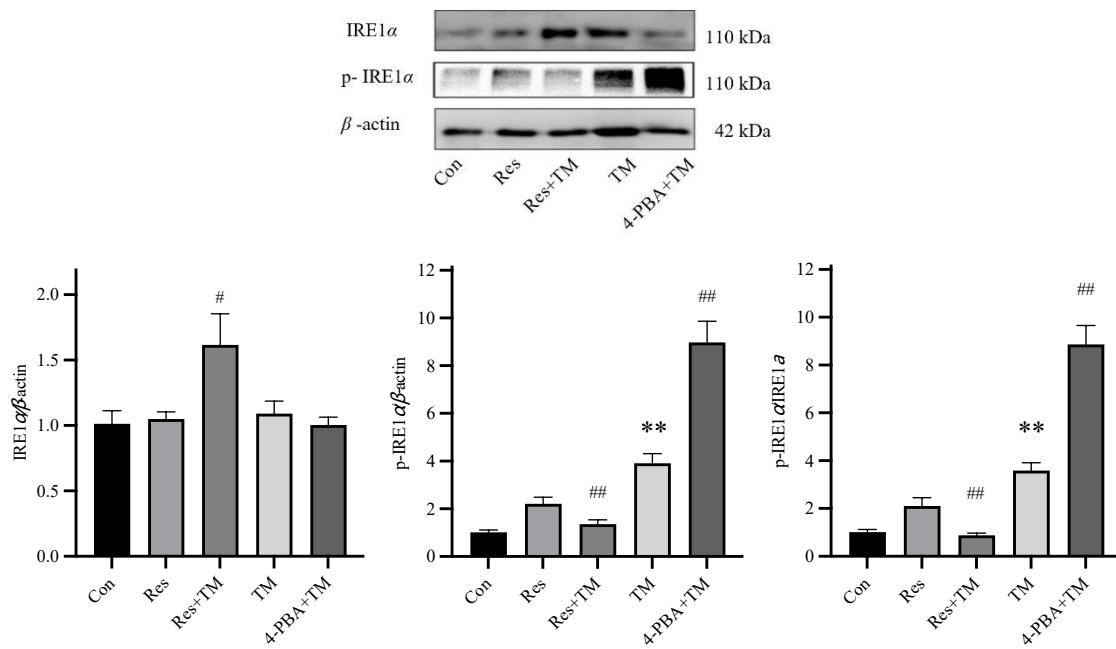


图 3 Res 对 TM 诱导的 IRE1 α 磷酸化水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig.3 Effect of Res on TM-induced IRE1 α phosphorylation ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

注: 与 Con 组比较, $**P < 0.01$; 与 TM 组比较, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$

Note: Compared with Con group, $**P < 0.01$; Compared with TM group, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$

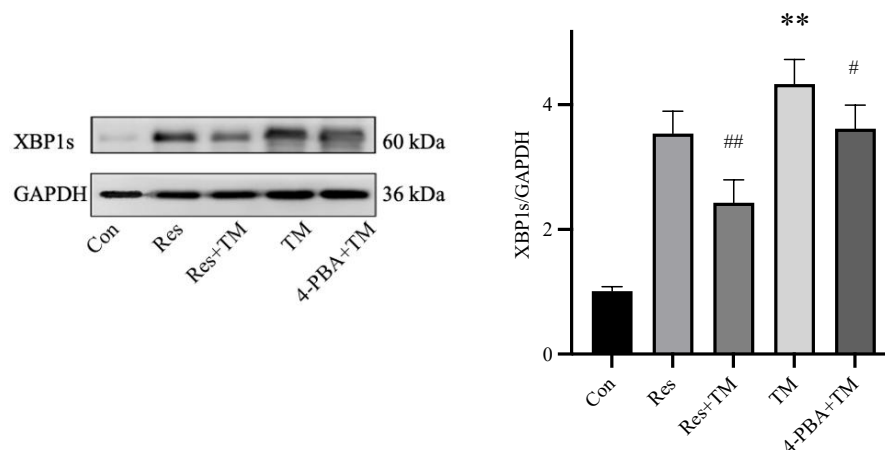


图 4 Res 对 TM 诱导的 XBP1s 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig.4 Effect of Res on TM-induced XBP1s expression ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

注: 与 Con 组比较 $**P < 0.01$; 与 TM 组比较, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$

Note: Compared with Con group, ** $P < 0.01$; Compared with TM group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

2.4 Res 抑制 TM 诱导的 Caspases 级联激活作用

Caspase-12 是 IRE1 α 下游信号效应蛋白,也是内质网途径细胞凋亡的启动者, Caspase-12 被激活后导致细胞凋亡执行者 Caspase-3 的激活,从而引起细胞凋亡的发生。如图 5 可见,与 Con 组比较, TM 组 Caspase-12 和 Caspase-3 蛋白的活性极显著增加 ($P < 0.01$)。Res+TM 组与 4-PBA+TM 组结果相同,与 TM 组比较, Caspase-12 和 Caspase-3 蛋白的活性极显著下降 ($P < 0.01$)。以上结果表明,白藜芦醇能够显著降低 TM 诱导的内质网应激引起的 Caspases 细胞凋亡级联信号,对内质网途径细胞凋亡具有抑制作用。

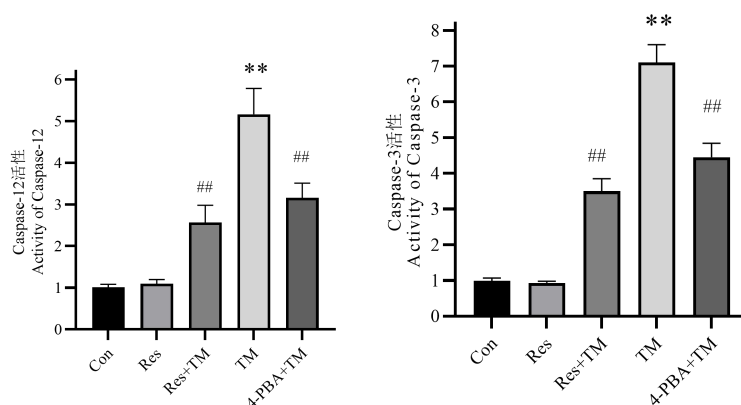


图 5 白藜芦醇对 Caspase-12/3 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

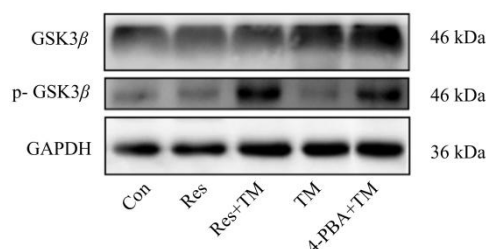
Fig. 5 Effect of Res on Caspase-12/3 activity ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注: 与 Con 组比较, ** $P < 0.01$; 与 TM 组比较, ## $P < 0.01$ 。

Note: Compared with Con group, ** $P < 0.01$; Compared with TM group, ## $P < 0.01$.

2.5 Res 缓解 TM 诱导的 GSK-3 β 激活作用

GSK-3 β 是一种普遍存在于真核细胞中的较保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, Ser9 位点发生去磷酸化导致 GSK-3 β 的激活。如图 6 所示,与 Con 组比较, TM 组 pSer9-GSK-3 β /GSK-3 β 比值显著降低 ($P < 0.05$)。与 TM 组比较, 4-PBA 缓解了 TM 诱导的 GSK-3 β 的活性 (显著增加 pSer9-GSK-3 β /GSK-3 β 比值, $P < 0.05$), Res+TM 组的 pSer9-GSK3 β 表达水平显著升高 ($P < 0.05$)、pSer9-GSK-3 β /GSK-3 β 比值极显著升高 ($P < 0.01$)。结果表明, Res 缓解了内质网应激引起的 GSK3 β 激活作用。



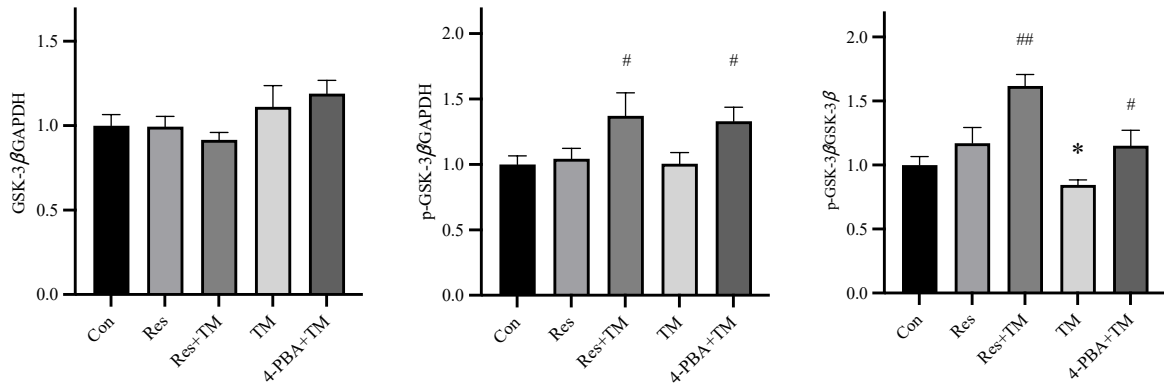


图6 Res对TM诱导的GSK-3 β 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.6 Effect of Res on TM-induced GSK-3 β activation ($\bar{x} \pm s, n=3$)

注: 与Con组比较, * $P < 0.05$; 与TM组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

Note: Compared with Con group, * $P < 0.05$; Compared with TM group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

2.6 Res降低TM诱导的Tau蛋白磷酸化作用

如图7所示, 与Con组比较, TM组的Ser396位点磷酸化的Tau蛋白 (pSer396-Tau) 水平和pSer396-Tau/Tau比值极显著上升 ($P < 0.01$)。4-PBA+TM组pSer396-Tau水平和pSer396-Tau/Tau比值的降低 ($P < 0.01$)。Res+TM组对Tau蛋白磷酸化的影响变化与4-PBA+TM组结果相似。与TM组比较, Res+TM组的pSer396-Tau水平和pSer396-Tau/Tau比值均极显著降低 ($P < 0.01$)。结果表明, 白藜芦醇能够抑制内质网应激引起的Tau蛋白的磷酸化。

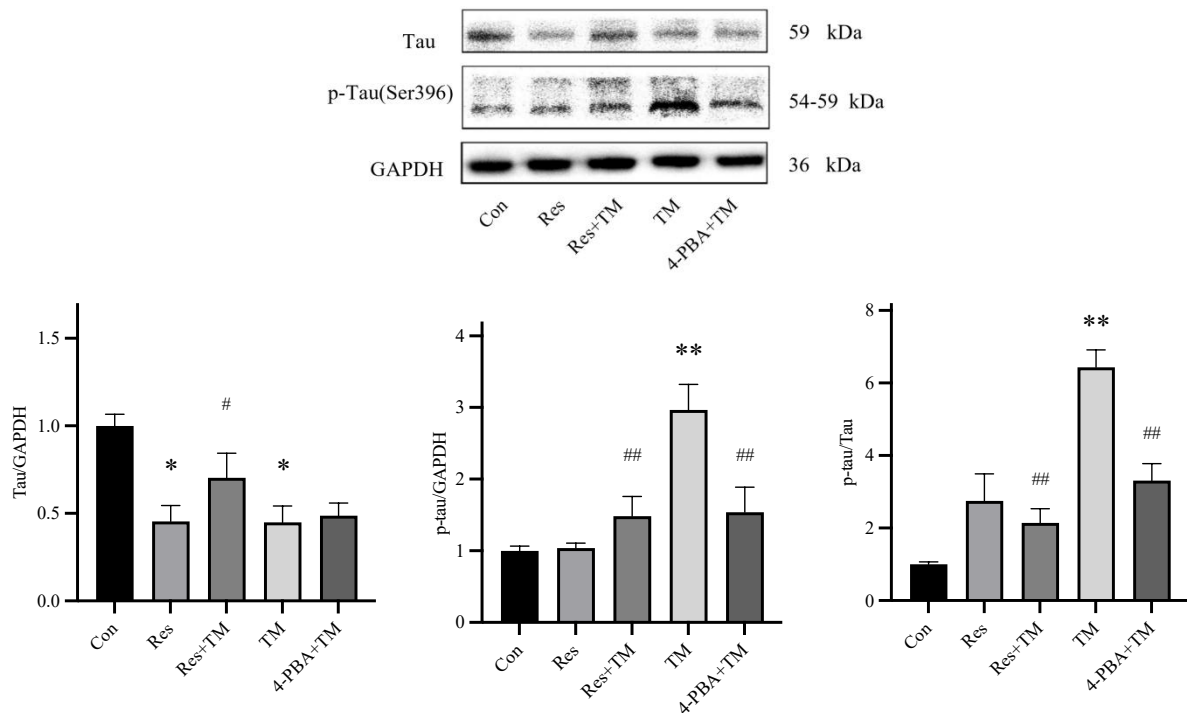


图 7 Res 对 TM 诱导的 Tau 蛋白磷酸化的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.7 Effect of Res on TM-induced Tau phosphorylation ($\bar{x} \pm s, n=3$)

与 Con 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 TM 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

Note: Compared with Con group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with TM group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

3 讨论与结论

AD的发病机制还有待阐明,有效治疗药物还有待开发。内质网是真核细胞内部相互连接的内膜性细胞器。粗面内质网含有大量核糖体,是蛋白质生物合成和折叠加工的场所^[12]。滑面内质网包含脱甲基酶、脱羧酶、脱氨酶、葡萄糖醛酸酶和多功能氧化酶等,是脂质合成的主要场所^[13]。蛋白质折叠和降解过程失衡会导致未折叠蛋白在内质网中的累积而导致内质网应激。

内质网应激可能是AD发生早期的诱导因素^[14]。在正常状态下,ERS的响应信号蛋白分别与葡萄糖调节蛋白78 (glucose-regulated protein 78, GRP78)结合,处于无活性状态。当内质网受到刺激时,GRP78与IRE1 α 等ERS效应器解离,IRE1 α -XBP1s信号通路可以被激活,从而启发ERS的下游应激信号。IRE1 α 作为内质网应激反应的重要启发效应器之一,介导XBP1 mRNA的可变剪接。IRE1 α 在内质网膜上发生二聚化,并通过Ser724位点的自身磷酸化激活其RNase活性,IRE1 α 的激活导致XBP1s蛋白的表达^[15]。XBP1s通过直接与内质网应激响应元件 (endoplasmic reticulum stress response element, ERSE) 相互结合,进一步增强内质网伴侣蛋白基因的转录水平^[16]。本研究中也发现,神经元细胞经TM诱导的内质网应激引起XBP1s、内质网伴侣蛋白GRP78表达的升高,而白藜芦醇能够降低TM诱导的XBP1s表达水平,其可能机制是白藜芦醇能阻止IRE1 α 与GRP78分离,从而抑制IRE1 α 激活后发生磷酸化,减弱XBP1 mRNA的XBP1s转录本的生成。另外白藜芦醇也减缓了TM诱导的GRP78表达水平,这可能与白藜芦醇下调了XBP1s表达水平有关。以上结果提示,白藜芦醇通过IRE1 α /XBP1s途径缓解了TM诱导的内质网应激水平。

内质网的持续应激可能会导致细胞凋亡的发生。实验结果显示,白藜芦醇可以抑制TM诱导的Caspase-3的活化^[17],白藜芦醇能够增加抗凋亡蛋白的表达^[18]。Caspase-12定位于内质网并被内质网应激激活,内质网钙稳态的破坏和内质网中过量蛋白质的积累都会导致Caspase-12的活化,并引起级联细胞凋亡信号反应^[19]。Caspase-12缺乏的小鼠对内质网应激诱导的细胞凋亡具有抵抗力^[20]。本研究结果表明,TM导致内质网凋亡通路相关的Caspase-12、Caspase-3活性极显著上升,神经元细胞早期和晚期凋亡水平显著增加;白藜芦醇抑制了TM

诱导的Caspase-12和Caspase-3的活化，从而抑制ERS触发的细胞凋亡级联反应，降低神经元内质网途径的凋亡水平。

GSK-3 β 是多数信号通路的调控者，GSK-3 β 的活性变化会影响Tau蛋白磷酸化。Tau蛋白是一种微管结合蛋白，对维持神经细胞的骨架结构起着重要作用，Tau蛋白的磷酸化导致其失去与微管的结合能力。研究表明，TM处理能极显著降低GSK-3 β 的Ser9位点的磷酸化水平、增加Tau的Ser396位点的磷酸化水平，Tau蛋白的Ser396位点磷酸化会加剧神经原纤维缠结的形成。白藜芦醇能上调了GSK-3 β 的Ser9位点磷酸化水平、降低Tau的Ser396位点磷酸化水平。这提示白藜芦醇能够降低TM诱导的GSK-3 β /Tau通路活性，可能缓解AD中Tau病理作用。

参考文献

- 1 Breijyeh Z and Karaman R.Comprehensive review on Alzheimer's disease:causes and treatment[J].Molecules,2020,25:5789.
- 2 Busche MA and Hyman BT.Synergy between amyloid-beta and tau in Alzheimer's disease[J].Nat Neurosci,2020,23:1183-1193.
- 3 Jucker M and Walker LC.Alzheimer's disease:From immunotherapy to immunoprevention[J].Cell,2023,186:4260-4270.
- 4 Nagar P,Sharma P,Dhapola R,et al.Endoplasmic reticulum stress in Alzheimer's disease:Molecular mechanisms and therapeutic prospects[J].Life Sci,2023,330:121983.
- 5 Roussel BD,Kruppa AJ,Miranda E,et al.Endoplasmic reticulum dysfunction in neurological disease[J].Lancet Neurol,2013,12:105-118.
- 6 Zhang LN,Li MJ,Shang YH,et al.Zeaxanthin attenuates the vicious circle between endoplasmic reticulum stress and tau phosphorylation:involvement of gsk-3 β activation[J].J Alzheimers Dis,2022,86:191-204.
- 7 Bartra C,Yuan Y,Vuraic K,et al.Resveratrol activates antioxidant protective mechanisms in cellular models of Alzheimer's disease inflammation[J].Antioxidants(Basel),2024,13:177.
- 8 Yoon J,Ku D,Lee M,et al.Resveratrol attenuates the mitochondrial rna-mediated cellular response to immunogenic stress[J].Int J Mol Sci,2023,24:7403.
- 9 Lu Y,Zhang L,Wang C,et al.Comparison of the antihypertensive effects of folic acid and resveratrol in spontaneously hypertensive rats combined with hyperhomocysteinemia[J].SAGE Open Med,2023,11:20503121231220813.
- 10 Sun XD,Zhou Z,Zeng L,et al.Resveratrol induces autophagic death of cervical cancer cells to exert antitumor effect[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2021,33:208-215.

- 11 Liu YR,Zhao FF,Ye HM,et al.Mechanism of action of resveratrol in attenuating endoplasmic reticulum stress induced by tunicamycin in primary neurons[J].Food Sci(食品科学),2022,43:180-190.
- 12 Schwarz DS and Blower MD.The endoplasmic reticulum:Structure,function and response to cellular signaling[J].Cell Mol Life Sci,2016,73:79-94.
- 13 Han J,Kaufman RJ.The role of ER stress in lipid metabolism and lipotoxicity[J].J Lipid Res,2016,57:1329-1338.
- 14 Li JQ,Yu JT,T J,et al.Endoplasmic reticulum dysfunction in Alzheimer's disease[J].Mol Neurobiol,2015,25:383-395.
- 15 Prischi F,Nowak PR,Carrara M,et al.Phosphoregulation of Ire1 RNase splicing activity[J].Nat Commun,2014,5:3554.
- 16 Grandjean JMD,Madhavan A,Cech L,et al.Pharmacologic IRE1 α /XBP1s activation confers targeted er proteostasis reprogramming[J].Nat Chem Biol,2020,16:1052-1061.
- 17 Li JQ,Yu JT,Jiang T,et al.Endoplasmic reticulum dysfunction in Alzheimer's disease[J].Mol Neurobiol,2015,51:383-395.
- 18 Zhou Q,Deng Y,Hu X,et al.Resveratrol ameliorates neuronal apoptosis and cognitive impairment by activating the SIRT1/RhoA pathway in rats after anesthesia with sevoflurane[J].Bosn J Basic Med Sci,2022,22:110-117.
- 19 Song J,Zhang Q,Wang S,et al.Cleavage of caspase-12 at Asp94,mediated by endoplasmic reticulum stress(ERS),contributes to stretch-induced apoptosis of myoblasts[J].J Cell Physiol,2018,233:9473-9487.
- 20 Nakagawa T,Zhu H,Morishima N,et al.Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta[J].Nature,2000,403:98-103.

收稿日期: 2024-05-20 接受日期: xxxx-xx-xx

基金项目: 北京联合大学科研项目 (ZKZD202304, ZK70202101)

*通信作者 Tel: 86-010-52072057; E-mail: hanchang@bnu.edu.cn