DOI:10.16016/j.2097-0927.202504118

骨钙素在阿尔茨海默病细胞模型中的神经保护作用与机制研究

方俪霖[1,4],朱其凤[2,3],张明达[1],崔 旻[1],鲁世金[3],闫 雨[1] [1]广西中医药大学研究生院,广西 贵港;[2]广西中医药大学附属瑞康医院神经内科,广西 贵港;[3]广西中医药大学附属瑞康医院中西医结合转化医学中心,广西 贵港;[4]平南县中医院脑病科,广西 南宁

[**摘要**] **目的** 探讨骨钙素(Osteocalcin,OCN)对阿尔茨海默病(Alzheimer's Disease,AD)细胞模型的神经保护作用和潜在机制,为寻找治疗AD新靶点提供科学依据。**方法** 利用40 nmol/L冈田酸(Okada acid,OA)对人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)处理24 h以构建AD细胞模型,把细胞分成正常组(未干预SH-SY5Y细胞)、模型组(40 nmol/L OA干预)和OCN干预组(不同浓度OCN干预,AD细胞模型),在AD模型细胞敲除/过表达AKT分为AKT-KO(3 μg/μL)组、AKT-OE(3 μg/μL)组和OCN干预后的AKT-KO+OCN组、AKT-OE+OCN组。采用CCK-8法检测AD模型细胞存活率变化;瑞氏染色观察AD模型细胞形态变化;Western blot法检测Tau、p-Tau、Bax、Bcl-2、Caspase-3及其裂解型,以及AD模型细胞敲除/过表达后各组Tau、p-Tau、mTOR、AKT、p-AKT的蛋白表达量变化;利用TUNEL染色法及流式细胞仪检测OCN干预AD细胞模型的早晚期凋亡细胞和凋亡率的变化。**结果** ①与正常组相比,模型组的细胞存活率显著降低,形态和结构明显受损,p-Tau及Caspase-3蛋白表达量上调,早晚期凋亡增加,细胞凋亡率明显提高($P<0.05$)。②与AD模型细胞组相比,不同浓度的OCN处理24 h后,细胞存活率均有不同程度的提高,其中100 pg/mL OCN组的存活率明显提高($P<0.01$),细胞数量、形态明显改善($P<0.01$)。③与AD细胞模型组相比,不同浓度OCN组p-Tau/Tau比值减少,尤其在100 pg/mL OCN干预组中,p-Tau/Tau的比值显著低于模型组($P<0.01$)。④与模型组相比,在OCN浓度处于1~100 pg/mL时,Cleaved Caspase-3/Caspase-3的比值出现浓度依赖性的显著降低的情况,100 pg/mL Bax/Bcl-2的比值显著降低($P<0.000\ 1$)。⑤TUNEL染色及流式细胞仪结果显示,与模型组相比,各浓度OCN均能有效抑制AD模型细胞的凋亡程度,100 pg/mLOCN组的早晚期凋亡细胞和凋亡率明显减少。⑥与对照组和模型组相比,AKT过表达后,AKT-OE组的P-AKT显著上升($P<0.05$);而使用AKT通路敲除后AKT-KO组的AKT蛋白表达水平下降($P<0.05$);细胞内的p-Tau表达随着AKT/mTOR通路的改变而变化,当AKT通路受抑制时,AKT-KO组细胞内p-Tau表达水平与对照组相比高于模型组($P<0.05$),当AKT过表达后,细胞内p-Tau表达水平明显被抑制($P<0.05$)。**结论** OCN可能通过调节Caspase-3/Caspase-3、Bax/Bcl-2的比值来抑制细胞凋亡、减少p-Tau蛋白表达从而改善AD模型细胞形态,有效保护神经细胞,其机制可能与调节AKT/mTOR通路相关。

[**关键词**] 骨钙素;阿尔茨海默病;Tau过度磷酸化;细胞凋亡;AKT/mTOR

[**中图法分类号**] R745.7;R965;R977.6 [**文献标志码**] A

[**基金项目**] 广西自然科学基金资助项目(编号:2023GXNSFAA026458)、国家自然科学基金地区基金项目(82260944)

[**通信作者**] 朱其凤,E-mail:591520062@qq.com

2097-0927/Copyright © 2025,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

引用格式:方俪霖,朱其凤,张明达,等. 骨钙素在阿尔茨海默病细胞模型中的神经保护作用与机制研究[J]. 陆军军医大学学报,2025,47(16):1883-1893. DOI:10.16016/j.2097-0927.202504118.

Citation:FANG L L,ZHU Q F,ZHANG M D,*et al*. Neuroprotective effects and mechanisms of osteocalcin in an Alzheimer's disease cell model[J]. J Army Med Univ,2025,47(16):1883-1893. DOI:10.16016/j.2097-0927.202504118.

Neuroprotective effects and mechanisms of osteocalcin in an Alzheimer's disease cell model

FANG Lilin[1,4], ZHU Qifeng[2,3], ZHANG Mingda[1], CUI Man[1], LU Shijin[3], YAN Yu[1] [1]Graduate School of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi; [2]Department of Neurology; [3]Center for Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi; [4]Department of Encephalopathy, Pingnan County Hospital of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, China

[**Abstract**] Objective To explore the neuroprotective effects of osteocalcin (OCN) on an Alzheimer's disease (AD) cell model and its potential mechanisms, providing a scientific basis for new therapeutic targets for AD. Methods Human neuroblastoma cell line SH-SY5Y was treated with 40 nmol/L okadaic acid (OA) for 24 h to establish an AD cell model. The cells were divided into a normal group (untreated SH-SY5Y cells), a model group (40 nmol/L OA intervention), and an OCN intervention group (intervention with various concentrations of OCN in the AD cell model), and AKT knockout/overexpression groups(AKT-KO group and AKT-OE group), and AKT-KO OCN group and AKT-OE OCN group. CCK-8 assay was used to detect the changes in cell viability. Wright's staining was employed to observe the morphological changes of AD cells. Western blotting was utilized to detect the protein levels of Tau, p-Tau, Bax, Bcl-2, Caspase-3 and their lytic types, as well as the expression of Tau, p-Tau, mTOR, AKT and p-AKT in each group after AKT knockout/overexpression. TUNEL staining and flow cytometry were applied to detect the changes in early and late apoptotic cells and the apoptotic rate in the OCN-treated AD cell model. Results ① Compared to the normal group, the model group exhibited a significant decrease in cell viability, noticeable morphological and structural damage, upregulation of p-Tau and Caspase-3, increased early and late apoptosis, and a significantly higher apoptotic rate ($P<0.05$). ② After treatment of different concentrations of OCN for 24 h, cell viability was increased to varying degrees compared to the AD model group, with the 100 pg/mL OCN group showing a significant increase in cell viability ($P<0.01$) and marked improvement in cell number and morphology ($P<0.01$). ③ Compared to the AD cell model group, the p-Tau/Tau ratio was decreased in all OCN treatment groups, particularly in the 100 pg/mL OCN intervention group, where the p-Tau/Tau ratio was significantly lower than that of the model group ($P<0.01$). ④ Compared to the model group, a significant concentration-dependent decrease in the Cleaved Caspase-3/Caspase-3 ratio was observed when OCN concentrations ranged from 1 to 100 pg/mL, with a significant reduction in the Bax/Bcl-2 ratio in the 100 pg/mL group ($P<0.000\ 1$). ⑤ The results of TUNEL staining and flow cytometry showed that, compared to the model group, all concentrations of OCN effectively inhibited the apoptosis in the AD model cells, with a significant reduction in early and late apoptotic cells and apoptotic rate in the 100 pg/mL OCN group. ⑥ Compared with the control group and the model group, the P-AKT was significantly increased in the AKT-OE group after AKT overexpression ($P<0.05$). The expression level of AKT protein was decreased in the AKT-KO group after AKT knockout ($P<0.05$). When the AKT pathway was inhibited, the expression level of p-Tau was higher in the AKT-KO group than the control group ($P<0.05$), and when the AKT was overexpressed, the expression level was significantly inhibited ($P<0.05$). Conclusion OCN may inhibit cell apoptosis and reduce p-tau protein level by regulating the ratio of Caspase-3/Caspase-3 and Bax/Bcl-2, and thereby improve the morphology of AD model cells and effectively protect nerve cells, which may be related to the regulation of the AKT/mTOR pathway.

[**Key words**] osteocalcin; Alzheimer's disease; Tau hyperphosphorylation; cell apoptosis; AKT/mTOR

Supported by the Natural Science Foundation of Guangxi (2023GXNSFAA026458) and the Regional Fund Project of National Natural Science Foundation of China (82260944). Corresponding author: ZHU Qifeng, E-mail: 591520062@qq.com

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种进行性认知功能衰退、认知功能受损、行为异常为主要表现的神经系统退行性疾病,严重影响患者的生活质量[1-2]。随着经济的发展和人口老龄化的加剧,AD的发病率也在不断上升。流行病学数据显示,2021年中国的AD及其他痴呆类型患病人数已达到16 990 827例,占全球总数的29.8%[3]。阿尔茨海默病的发病机制非常复杂,涉及多种生物学过程[4-5],其中Tau蛋白的过度磷酸化和细胞凋亡被认为是关键因素[6-8]。然而,目前对于如何有效干预这些过程,仍存在诸多争议和研究空白。因此,探索潜在的神经保护机制对于阿尔茨海默病的治疗具有重要意义。近年来,OCN受到越来越多的关注,其在维持神经系统功能和疾病治疗方面展现出显著的研究价值和应用潜力[9]。研究表明,OCN可能为早期筛查AD患者提供另一种方法[10-11]。OCN被发现除了调节骨代谢外,其活性形式参与调节髓鞘稳态[12]、大脑发育以及焦虑、抑郁和认知障碍等行为[13-14],还通过多种机制为神经系统提供保护[15-16]。近期研究揭示了OCN在AD中的潜在治疗价值,例如,有研究发现OCN可显著减少AD模型小鼠的Aβ沉积并改善认知功能[9],另有研究证实OCN可能对AD病理发挥改善作用[17],但其具体作用机制仍存在关键空白。现有证据多集中于整体动物水平,但细胞层面的分子机制研究相对匮乏。本研究聚焦于OCN在AD细胞模型中的作用机制,我们构建了AD细胞模型体系,通过解析OCN的特异性作用,揭示其神经保护功能,为开发OCN信号通路的AD干预策略提供理论依据。

冈田酸(Okada acid, OA)是一种诱导Tau蛋白过度磷酸化的化合物,常用于科研实验中AD细胞模型的构建。本研究旨在探讨OCN对AD模型细胞的神经保护和损伤修复作用,采用40 nmol/L的OA处理SH-SY5Y细胞来建立AD细胞模型,观察OCN对AD模型细胞的存活率、细胞形态、Tau蛋白过度磷酸化水平和细胞凋亡程度的影响,揭示其在AD治疗中的潜在价值,并为开发新的治疗策略提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 细胞

人神经母细胞瘤SH-SY5Y细胞源自中国医学科学院基础研究所。

1.2 药物与试剂

DMEM/F12基础培养基购自上海双洇生物科技有限公司;PBS购自武汉塞维尔生物科技有限公司;胎牛血清(FBS)、青链霉素混合液细胞培养专用、二甲基亚砜(DMSO)均购自北京索莱宝科技有限公司;0.25%胰蛋白酶消化液购自武汉赛维尔生物科技有限公司;OA购自上海源叶生物科技有限公司;瑞氏染色液、细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒、一步法PAGE凝胶快速制备试剂盒、Tunel细胞凋亡原位检测试剂盒购自上海碧云天生物技术股份有限公司;Bax、Bcl-2,Caspase-3及其裂解型,Tau及p-Tau抗体购自爱博泰克生物科技有限公司;AKT、mTOR抗体购自美国CST公司。

1.3 细胞培养与处理

将SH-SY5Y细胞取出并进行复苏,配制培养基,细胞于5% CO_2、37 ℃的培养箱中培养,当密度达到90%以上加入胰酶消化,收集细胞悬液并进行传代。AD模型通过40 nmol/L OA处理24 h构建。

1.4 CCK-8法检测OCN对AD模型细胞的存活率影响

实验分为正常组(未处理SH-SY5Y细胞)、模型组(OA处理SH-SY5Y细胞组)、OCN干预(1 pg/mL、10 pg/mL、100 pg/mL和1 ng/mL、10 ng/mL OCN+AD模型细胞)组。将细胞传入96孔板中,隔天换液,加入含40 nmol/mL OA培养基以构建AD模型细胞,培养24 h后,处理组加入OCN置于恒温培养箱中培养,24 h后取出并弃去原液,每孔加10 μL CCK-8溶液及适量培养基,孵育2 h后,使用酶标仪测定吸光度(波长450 nm),并计算细胞存活率,进行组间比较。细胞存活率计算公式为:细胞存活率(%)=(实验组-空白组)/(对照组-空白组)×100%。

1.5 OCN作用于AD模型细胞后形态变化的观察

消化并重悬SH-SY5Y细胞,按细胞密度为3×10^5个/mL接种细胞悬液至6孔板中,加入含40 nmol/L OA的培养基以构建AD细胞模型。实验分为模型组(OA处理SH-SY5Y细胞组)和OCN干预(1 pg/mL、10 pg/mL、100 pg/mL和1 ng/mL OCN+AD模型细胞)组。细胞贴壁后向干预组中加入不同浓度的OCN,24 h培养结束后使用瑞氏染色液对细胞进行染色和固定。通过显微镜观察不同浓度OCN对AD模型细胞形态的影响,并记录细胞未染色及染色状态下的形态变化。

1.6 AKT质粒制备

配制LB液体培养基(胰蛋白胨1 g、酵母提取物0.5 g、NaCl 1 g,溶于100 mL双纯水)和固体培养基配制(胰蛋白胨1 g、酵母提取物1 g、NaCl 1 g、琼脂粉1 g/100 mL双纯水),4 ℃保存;取TransStbl 3感受态细胞100 μL,分别加入AKT OE/KO质粒,冰浴、摇菌、离心弃上清,

重悬菌液涂布于固体培养基,37 ℃培养16 h;挑取单菌落至含500 μL LB+1 μL Amp的EP管中,混匀后37 ℃振荡培养6 h,4 ℃暂存;配制100 mL LB液体培养基(胰蛋白胨1 g、酵母提取物1 g、NaCl 1g),分别加入200 μL AKT OE/KO菌液及100 μL A mp,摇菌16 h(200 r/min),离心收集菌体,使用质粒提取试剂盒Solution I重悬→Solution II裂解→预冷N3 Buffer沉淀→过柱纯化(GPS/HBC/DNA Wash Buffer洗涤);预热Endo-Free Elution Buffer 1 mL洗脱质粒并进行浓度检测,AKT OE质粒浓度682.38 ng/μL,AKT KO为225.26 ng/μL,-20 ℃保存。

1.7 Western-blot检测各组相关蛋白表达

本实验共分为3组,为正常组(未处理SH-SY5Y细胞)、模型组(OA处理SH-SY5Y细胞组)和OCN干预(1 pg/mL、10 pg/mL、100 pg/mL和1 ng/mL OCN+AD模型细胞)组。细胞培养结束后裂解细胞并提取蛋白,电泳分离蛋白,将PVDF膜放入活化液中浸润,按照"三明治"法将滤纸、PVDF膜和凝胶块进行组装,转膜、洗涤、封闭后再次洗涤,随后加入抗体孵育,使用化学发光液进行显影拍照,并分析各组蛋白条带的灰度值。

1.8 TUNEL染色检测细胞凋亡

将细胞种植于细胞玻片上,加入含40 nmol/mL OA的培养基放入培养箱中培养以构建AD细胞模型。实验分为模型组(OA处理SH-SY5Y细胞)和OCN干预(1 pg/mL、10 pg/mL、100 pg/mL和1 ng/mL OCN+AD模型细胞)组。干预组处理24 h后,将细胞与TUNEL反应液共孵育。使用荧光显微镜拍摄荧光图片。细胞凋亡率计算公式为:细胞凋亡率=TUNEL阳性细胞数量/DAPI细胞总数×100%。

1.9 流式细胞仪检测各组的细胞凋亡

细胞培养结束后用PBS清洗、胰酶消化,1 500 r/min、5 min离心收集,细胞计数、重悬为1×10^6个/mL,用Binding Buffer 500 μL吹匀细胞悬液。实验分组与第1.7小节相同。将每组细胞悬液分别加5 μL Annexin V-APC和5 μL 7-AAD,混匀后反应孵育。反应结束,加入PBS缓冲液离心,再重悬细胞。用APC通道检测Annexin V-APC荧光,FL-2通道检测7-AAD荧光。依据结果绘制散点图,标记四个象限:左下(Annexin V^-/7-AAD^-)为活细胞,右下(Annexin V^+/7-AAD^-)为早期凋亡细胞,右上(Annexin V^+/7-AAD^+)为晚期凋亡/坏死细胞,左上(Annexin V^-/7-AAD^+)通常为坏死细胞。使用Prism分析细胞凋亡情况。

1.10 Wb检测AKT、mTOR等指标变化

在该部分实验中,AKT质粒浓度取3 μg/μL,实验分组设为对照组、模型组、AKT-KO组、AKT-OE组、OCN组、AKT-KO+OCN组和AKT-OE+OCN组。具体实验方法同1.7。

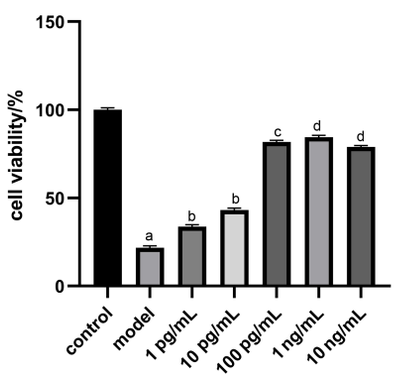
1.11 统计学方法

通过GraphPad Prism、ImageJ等软件进行统计分析和图像处理。对于组间多个样本均数的差异,采用单因素方差分析进行评估。当P值小于0.05时,认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 OCN干预后的AD模型细胞存活率提高

CCK-8法结果显示,与正常组相比,模型组细胞存活率显著下降($P<0.05$);与模型组相比,1~100 pg/mL OCN干预24 h后,AD模型细胞的细胞存活率随着OCN浓度的提高而上升($P<0.05$),其中,100 pg/mL OCN干预组的细胞存活率变化显著升高($P<0.01$);与100 pg/mL组相比,1、10 ng/mL OCN干预组的细胞存活率虽有增加,但呈下降趋势($P<0.05$)。如图1所示。故后续选择浓度范围在1~100 pg/mL、1ng/mL的OCN进行下一步实验。



The confidence interval for the data is 95%; a: $P<0.05$ compared to the control group, b: $P<0.05$ or c: $P<0.01$ compared to the model group, and d: $P<0.05$ compared to the 100 pg/mL group.

图1 OCN对AD模型细胞的细胞存活率影响

Figure 1 Effect of OCN on cell viability of AD model cells

2.2 OCN可保护AD模型细胞的形态

在镜下可以看到,未处理的SH-SY5Y细胞多为贴壁生长,核仁明显,细胞质丰富,突起较为明显,细胞之间紧密连接;模型组的细胞体积变小,形态皱缩,细胞变圆,胞质凝聚,突起回缩或消失,且数量减少,细

胞之间分布不均,多聚团生长,在未染色下观察还可见到许多细胞碎片散落在培养基中;而各浓度OCN作用24 h后AD模型细胞的形态均有所改善。与模型组相比,OCN处理后细胞贴壁性增强,细胞形态恢复,呈圆柱形或不规则形,细胞皱缩变形或脱壁现象明显减少,聚集现象减少,分布更为均匀且数量增多,细胞的突起逐渐恢复,其中,1 pg/mL至100 pg/mL OCN组的细胞数量显著增加,且形态改善明显,且100 pg/mL OCN组的效果最为显著,可见该组细胞数量、形态、分布等与正常组细胞最为接近;而1 ng/mL OCN干预组的细胞数量和形态变化与浓度之间的关系并不显著,与100 pg/mL OCN干预组相比,改善效果有所减弱。如图2所示。

2.3　OCN降低AD模型细胞p-Tau/Tau蛋白的比值

与正常组对比,模型组p-Tau蛋白表达量明显升高,p-Tau/Tau比值增加(P<0.05),造模成功;与模型组比较,100 pg/mL OCN干预组中的比值明显减少(P<0.01);与100 pg/mL组相比,1 ng/mL组的比值增加(P<0.05)。如图3所示。

2.4　OCN减少AD模型细胞凋亡蛋白的表达

与正常组相比,模型组的Cleaved Caspase-3/Caspase-3、Bax/Bcl-2的比值显著提高(P<0.01、P<0.000 1)。1-100 pg/mL OCN干预组Bcl-2、Caspase-3

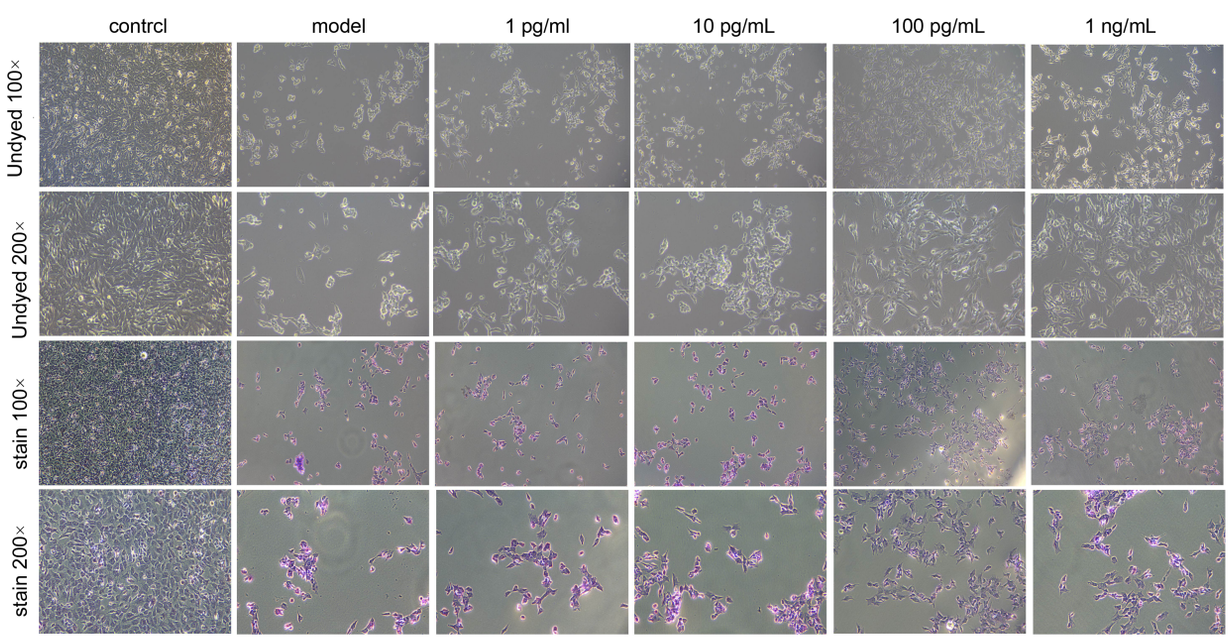
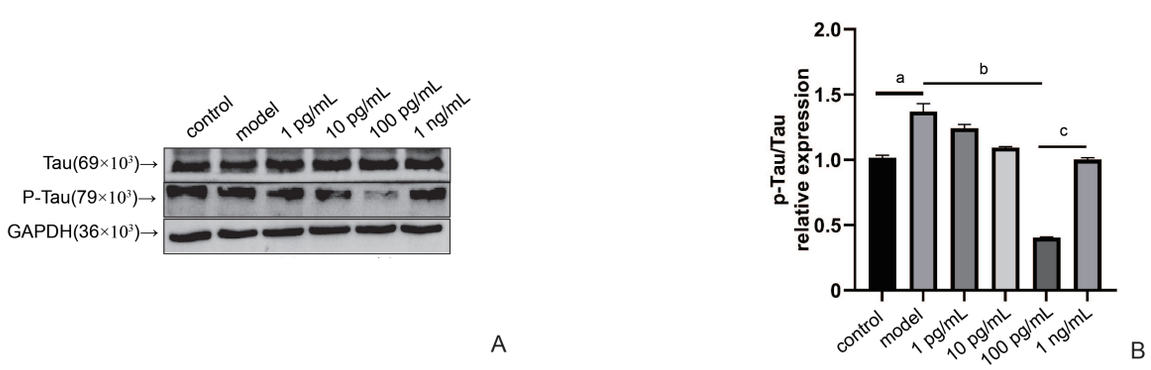


图2　OCN对AD模型细胞形态的影响(×100、×200)

Figure 2　Effects of OCN on morphology of AD model cells(×100、×200)



The confidence interval for the data is 95%; a: P<0.05 compared with the control group, b: P<0.01 compared with the model group, and c: P<0.05 compared with the 100 pg/mL group

图3　OCN对AD模型细胞p-Tau/Tau蛋白比值的影响

Figure 3　Effect of OCN on p-Tau/Tau protein ratio in AD model cells

的表达变化有一定的浓度依赖性,与模型组相比,OCN干预的AD细胞模型的Cleaved Caspase-3/Caspase-3、Bax/Bcl-2的比值有所减少,其中,100 pg/mL OCN组的Cleaved Caspase-3/Caspase-3、Bax/Bcl-2比值显著下降(P<0.05、P<0.000 1);与100 pg/mL OCN组相比,1 ng/mL OCN组的Bax/Bcl-2比值增加(P<0.01)。见图4。

2.5 OCN可减少AD模型细胞的凋亡率

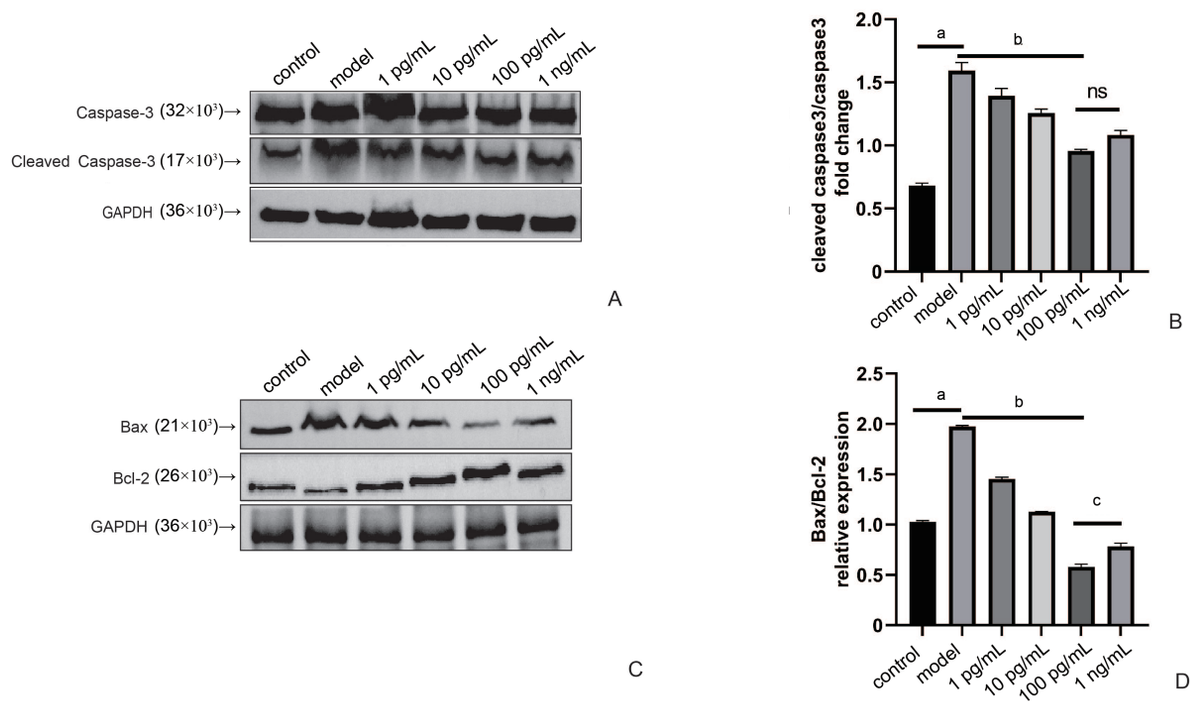
如图5、图6所示,与模型组相比,各OCN干预组的活细胞数量增多(DAPI通道),TUNEL阳性细胞数量有所减少(TUNEL通道);各浓度OCN组的细胞凋亡率均明显低于模型组的细胞凋亡率,且差异具有统计学意义,其中,100 pg/mL、1 ng/mL OCN对细胞凋亡的抑制作用最为明显(P<0.01);与100 pg/mL OCN组相比,1 ng/mL OCN组的凋亡率升高,且差异具有统计学意义。

2.6 OCN干预后AD模型细胞的早、晚期凋亡细胞减少

如图7-A所示,模型组早、晚期凋亡细胞和死细胞较多,以晚期凋亡为主;与模型组相比,各OCN干预组的早期凋亡细胞和死细胞群落均有减少,其中,100 pg/mL组和1 ng/mL组的早、晚期凋亡细胞及死细胞群明显减少,结果如图7B至F所示;与100 pg/mL组相比,1 ng/mL组的早、晚期凋亡细胞增加,结果如图7D、E所示。与模型组相比,各组细胞的凋亡率显著降低(P<0.05),100 pg/mL组的细胞凋亡率降低最为明显(P<0.01);与100 pg/mL组相比,1 ng/mL组的细胞凋亡率明显上升(P<0.05),结果如图7F所示。

2.7 OCN通过AKT/mTOR通路抑制Tau过度磷酸化

如图8所示,与对照组和模型组相比,细胞内的总Tau未见明显变化。与对照组和模型组比较,在AKT-OE和AKT-OE+OCN组AKT的下游通路mTOR被明显激活(P<0.05)。与对照组和模型组相比,AKT过表达后,AKT-OE组的p-AKT显著上升(P<0.05);而使用AKT通路敲除后AKT-KO和AKT-KO+OCN的AKT蛋白表达水平下降(P<0.05)。细胞内的p-Tau表达随着AKT/mTOR通路的改变而变化,当AKT通路受抑制时,AKT-KO组细胞内p-Tau表达水平与对照组相比高于模型组(P<0.05),当AKT过表达后,细胞内p-Tau表达水平明显被抑制,AKT-OE+OCN的抑制效果好于AKT-OE组(P<0.05)。当AKT/mTOR通路受抑制时AKT-KO+OCN组的抑制p-Tau表达比OCN组较弱(P<0.05)。



The confidence interval for the data is 95%; Compared with the control group, a: P<0.000 1, compared with the model group, b: P<0.000 1, and compared with the 100pg/mL group, c: P<0.01

图4 OCN对AD模型细胞的相关凋亡蛋白表达的影响

Figure 4 Effect of OCN on the expression of related apoptotic proteins in AD model cells

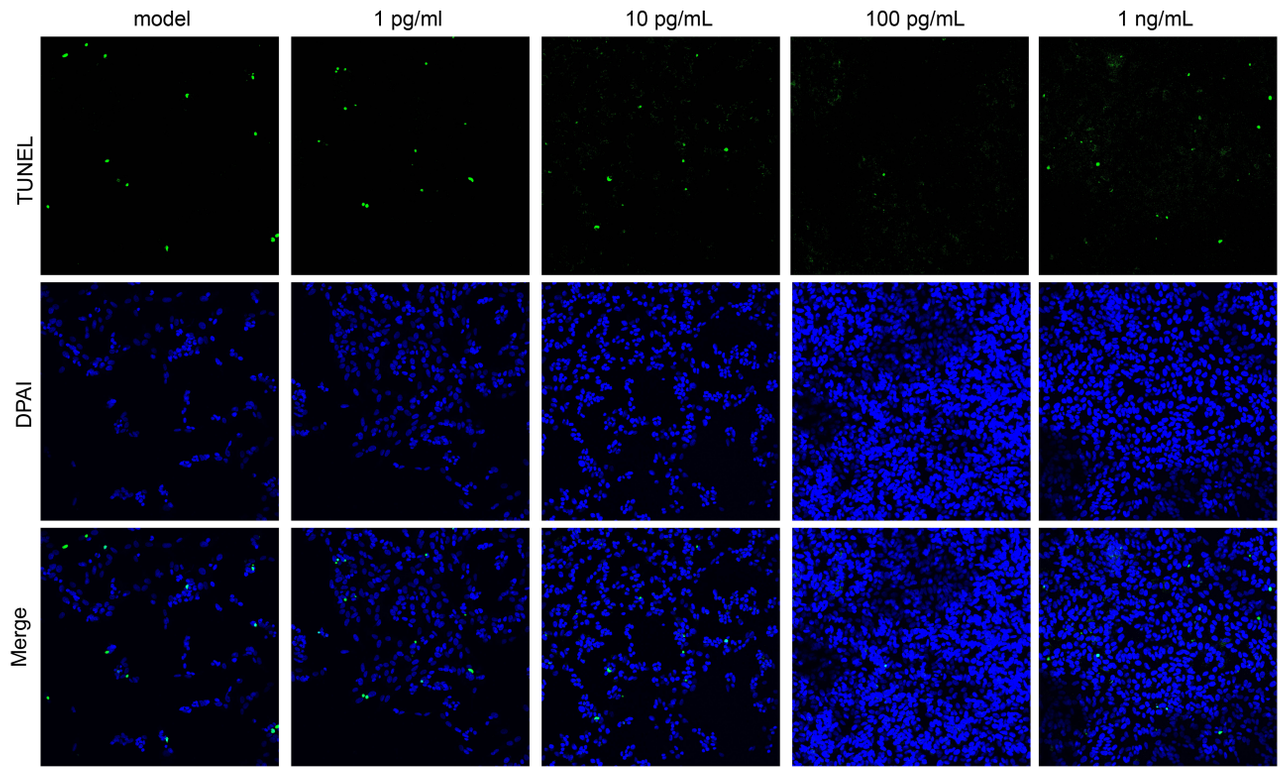
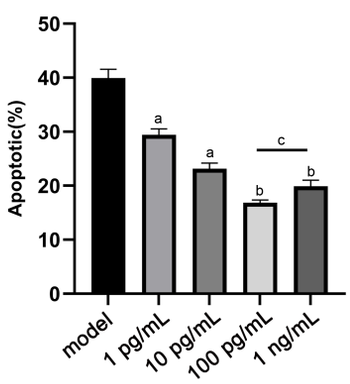


图5 OCN对AD模型细胞的细胞凋亡率的影响（TUNEL,200×）

Figure 5 Effect of OCN on apoptotic rate of AD model cells（TUNEL,200×）



The confidence interval for the data is 95%; Compared with the model group, a: $P<0.05$ or b: $P<0.01$; compared with the 100 pg/mL group, c: $P<0.05$

图6 OCN对AD模型细胞的细胞凋亡率的影响

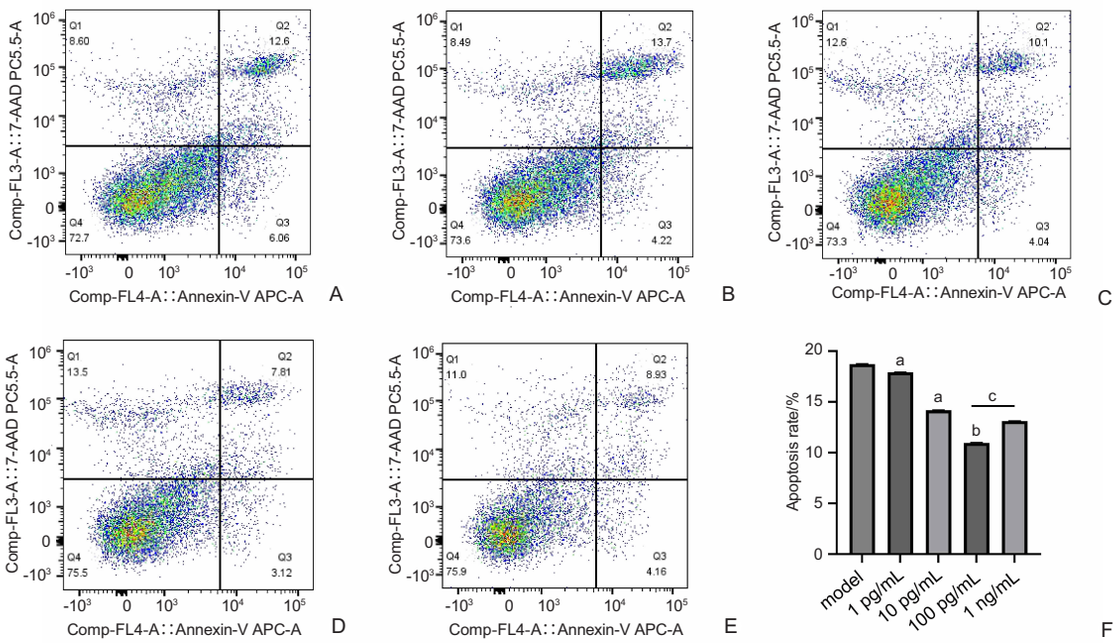
Figure 6 Effect of OCN on apoptotic rate of AD model cells

3 讨论

阿尔茨海默病作为一种全球性公共健康问题,给许多患者及家属带来巨大的痛苦,因此积极寻找潜在的治疗药物及措施具有重大的意义。尽管AD的研究已有多年历史,但其确切发病机制仍未完全阐明。阿尔茨海默病的核心病理特征包括β-淀粉样斑块(Aβ plaques)的异常沉积和Tau蛋白过度磷酸化介导的神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles,NFTs)。这些病理变化通过诱导突触功能障碍、线粒体损伤及氧化应激级联反应,最终导致神经元变性死亡[18-21]。研究表明,OCN作为来源于骨组织的骨源性激素,可以调节能量代谢和糖稳态[22],能穿过血脑屏障[14],有保护神经、改善认知功能和衰老的影响[23-25]、促进神经营养因子表达[26]、抑制炎性因子(如IL-6、TNF-α)释放[27]等作用。近年来发现,OCN通过血脑屏障后与特异性受体结合可以直接影响神经元细胞的增殖、分化和存活[28],此外,有研究发现Tau(AT8,AT100)可与OCN在海马神经元中共定位[29],大鼠记忆与其海马体中OCN基因表达有关[30]。

3.1 OCN对AD模型细胞凋亡的调控作用及其机制探讨

Bcl-2和Caspase-3在细胞凋亡的过程中有着重要的影响作用。Bcl-2参与了对Caspase-3活性的调节[31],Caspase级联反应是细胞凋亡信号通路的核心,其中的Caspase-3被视为凋亡发生的标志性酶[32]。以往的研究发现,Caspase-3在神经系统疾病的细胞凋亡



A, B, C, D, and E in the figure represent the model group, the 1, 10, 100 pg/mL group, and the 1 ng/mL group, respectively. F is the apoptosis rate of each group, and the confidence interval of the data is 95%, compared with the model group, a: $P<0.05$ or b: $P<0.01$; compared with the 100 pg/mL group, c: $P<0.05$.

图7 OCN对AD模型细胞早、晚期凋亡及细胞凋亡率的影响

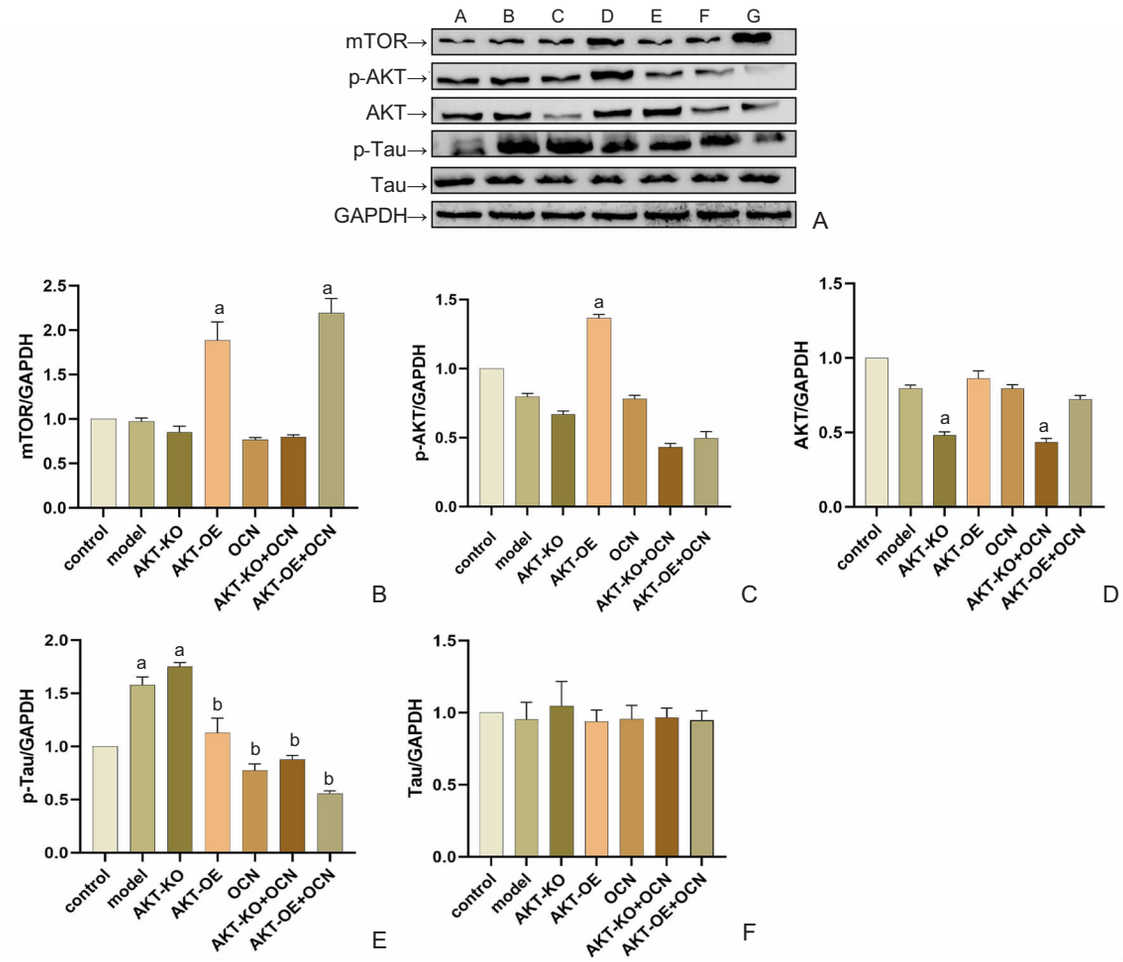
Figure 7 Effects of OCN on early and late apoptosis and apoptotic rate of AD model cells

中的表达量异常升高[33-34],AD模型大鼠的Caspase-3水平升高,神经元损伤也明显高于正常组[35]。TUNEL染色实验是利用脱氧核糖核苷酸末端转移酶(TDT)的催化作用,通过识别细胞凋亡阶段DNA断裂产生的3′-OH末端,将标记物与DNA3′端连接,从而实现细胞凋亡的识别。我们的实验结果显示,OCN可以影响AD模型细胞中Caspase-3和Bcl-2这两种与细胞凋亡有关的蛋白表达,这意味着OCN可以对这两种蛋白的表达水平进行一定程度的调节,从而对脑细胞的破坏和细胞凋亡起到抑制作用。而TUNEL染色结果也进一步表明了OCN能减少凋亡细胞的产生,减轻AD细胞损伤,对其产生保护作用。与模型组相比,各OCN干预组中TUNEL阳性细胞(即凋亡细胞)的数量较之减少,凋亡率明显下降($P<0.05$)。流式细胞仪能够借助荧光标记实现对细胞群体凋亡状态的多参数分析,可精准识别细胞群体中的早期、晚期凋亡状态以及死亡细胞。在本实验中,流式细胞仪检测结果显示AD细胞模型处于较高的凋亡状态,细胞损伤较为严重;而OCN干预后,各组的细胞凋亡率均可降低,特别是100 pg/mL组的凋亡率显著低于模型组,这一实验结果揭示了OCN对AD模型细胞凋亡的显著影响,具体表现为能够有效降低细胞的早期及晚期凋亡、死亡的发生。进一步对比100 pg/mL组和1 ng/mL组,发现1 ng/mL组的早期凋亡细胞和晚期凋亡细胞数量有所增加,这暗示在较高浓度下,OCN对细胞凋亡的抑制作用可能会有所减弱,甚至可能在一定程度上促进了细胞的凋亡。

由此可知,OCN在AD进展过程中可能通过不同的机制对细胞凋亡产生影响,因此,未来我们将会更加关注OCN在AD疾病模型中的细胞凋亡相关的信号通路的调节及其机制。

3.2 OCN对AD模型细胞形态和存活率的改善作用

在本研究中,我们通过加入不同浓度OCN,观察到OCN显著改善了AD模型细胞的形态和存活率,尤其是在100 pg/mL OCN干预组中,存活率提升最为明显。这表明OCN可能通过保护细胞结构的完整性,从而对AD模型细胞产生良好影响。这一结果与其他研究结果相符,表明细胞形态变化与功能损害之间存在密切关联[36]。另外,CCK-8实验结果显示,OCN能显著恢复经OA处理后活力下降的AD模型细胞,且随着OCN浓度的增加,AD模型细胞活力呈增长趋势。然而,过高浓度的OCN并未带来额外的活力提升效果,反而可能产生了一定的细胞毒性,这也提示我们在AD治疗中,需要精确控制OCN的浓度以实现最佳疗效。



A~F represent the control group, model group, AKT-KO group, AKT-OE, OCN group, AKT-KO OCN group, and AKT-OE OCN group, respectively. The confidence interval of the data was 95%, a: $P<0.05$ compared with the control, and b: $P<0.05$ compared with the model group

图8 OCN对AKT KO/OE后AD模型细胞的Tau等指标的影响

Figure 8 Effects of OCN on Tau and other indicators in AD model cells after AKT KO/OE

3.3 OCN对AD模型细胞中Tau蛋白异常磷酸化的抑制作用及机制

Tau蛋白是微管相关蛋白的重要组成部分,参与微管网络的组装,其异常磷酸化被认为是AD的一个关键病理特征。已有研究证明,p-Tau会损害细胞微管结构的稳定性,导致神经纤维缠结的形成和突触的丢失[37],进而对神经元的功能产生负面影响,最终容易导致认知功能的下降[38]。本实验结果发现,在OCN干预后,AD模型细胞p-Tau/Tau蛋白比值明显减少,这说明OCN对AD模型细胞的保护作用与其抑制Tau蛋白的过度磷酸化密切相关,OCN可能通过降低p-Tau的表达水平,维持微管结构的稳定性,从而直接或间接地保护神经元免受损伤。进一步对AD模型细胞进行AKT基因敲除/过表达,各组比较后发现,抑制AKT通路(AKT-KO组)时p-Tau表达显著升高,激活AKT通路(AKT-OE组)时p-Tau表达下降;同时AKT-OE+OCN组对p-Tau的抑制效果显著强于AKT-OE组,抑制AKT通路(AKT-KO+OCN组)时,OCN对p-Tau的抑制作用弱于单用OCN组,这说明AKT通路的激活能够和OCN共同增强对Tau过度磷酸化的抑制效果。因此,OCN在AD的病理进程中有着重要的神经保护作用,其作用可能通过调节AKT/mTOR信号通路来减轻这种磷酸化现象[39-40]。

综上所述,OCN可能通过调节相关的细胞凋亡蛋白表达和早、晚期凋亡及细胞凋亡率,抑制Tau蛋白过度磷酸化来保护AD模型细胞的细胞形态,减轻细胞损伤。本实验通过研究OCN在AD模型细胞中神经保护作用及其机制,为治疗AD提供了新的证据,但OCN

的具体作用机制尚未完全阐明,未来需要进一步研究OCN经AKT/mTOR信号通路在动物模型中发挥的神经保护作用,进一步验证OCN在体内的神经保护效果和安全性。

利益冲突 本文所有作者声明不存在利益冲突

参考文献:

[1] Alzheimer's Association. 2024 Alzheimer's disease facts and figures[J]. Alzheimers Dement, 2024, 20(5): 3708-3821. DOI: 10.1002/alz.13809.

[2] LIU R M. Aging, cellular senescence, and Alzheimer's disease[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(4): 1989. DOI: 10.3390/ijms23041989.

[3] 王刚, 齐金蕾, 刘馨雅, 等. 中国阿尔茨海默病报告2024[J]. 诊断学理论与实践, 2024, 23(3): 219-256. DOI: 10.16150/j.1671-2870.2024.03.001.
WANG G, QI J L, LIU X Y, *et al*. China Alzheimer report 2024[J]. J Diagn Concepts & Pract, 2024, 23(3): 219-256. DOI: 10.16150/j.1671-2870.2024.03.001.

[4] MONTEIRO A R, BARBOSA D J, REMIÃO F, *et al*. Alzheimer's disease: Insights and new prospects in disease pathophysiology, biomarkers and disease-modifying drugs[J]. Biochem Pharmacol, 2023, 211: 115522. DOI: 10.1016/j.bcp.2023.115522.

[5] ZHANG S, GAO Y, ZHAO Y N, *et al*. Peripheral and central neuroimmune mechanisms in Alzheimer's disease pathogenesis[J]. Mol Neurodegener, 2025, 20(1): 22. DOI: 10.1186/s13024-025-00812-5.

[6] WANG Y, WANG J, CHEN X, *et al*. Tau pathology is associated with postsynaptic metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) in early Alzheimer's disease in a sex-specific manner[J]. Alzheimers Dement, 2025, 21(2): e70004. DOI: 10.1002/alz.70004.

[7] SCHELTENS P, DE STROOPER B, KIVIPELTO M, *et al*. Alzheimer's disease[J]. Lancet, 2021, 397(10284): 1577-1590. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)32205-4.

[8] KUMARI S, DHAPOLA R, REDDY D H. Apoptosis in Alzheimer's disease: insight into the signaling pathways and therapeutic avenues[J]. Apoptosis, 2023, 28(7/8): 943-957. DOI: 10.1007/s10495-023-01848-y.

[9] SHAN C, ZHANG D, MA D N, *et al*. Osteocalcin ameliorates cognitive dysfunctions in a mouse model of Alzheimer's Disease by reducing amyloid β burden and upregulating glycolysis in neuroglia[J]. Cell Death Discov, 2023, 9(1): 46. DOI: 10.1038/s41420-023-01343-y.

[10] PU Z P, TANG X Q, FEI Y E, *et al*. Bone metabolic biomarkers and bone mineral density in male patients with early-stage Alzheimer's disease[J]. Eur Geriatr Med, 2020, 11(3): 403-408. DOI: 10.1007/s41999-020-00289-z.

[11] LUCKHAUS C, MAHABADI B, GRASS-KAPANKE B, *et al*. Blood biomarkers of osteoporosis in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease[J]. J Neural Transm (Vienna), 2009, 116(7): 905-911. DOI: 10.1007/s00702-009-0241-x.

[12] QIAN Z J, LI H C, YANG H Y, *et al*. Osteocalcin attenuates oligodendrocyte differentiation and myelination *via* GPR37 signaling in the mouse brain[J]. Sci Adv, 2021, 7(43): eabi5811. DOI: 10.1126/sciadv.abi5811.

[13] OURY F, KHRIMIAN L, DENNY C A, *et al*. Maternal and offspring pools of osteocalcin influence brain development and functions[J]. Cell, 2013, 155(1): 228-241. DOI: 10.1016/j.cell.2013.08.042.

[14] KHRIMIAN L, OBRI A, RAMOS-BROSSIER M, *et al*. Gpr158 mediates osteocalcin's regulation of cognition[J]. J Exp Med, 2017, 214(10): 2859-2873. DOI: 10.1084/jem.20171320.

[15] KANG Y T, YAO J, GAO X H, *et al*. Exercise ameliorates anxious behavior and promotes neuroprotection through osteocalcin in VCD-induced menopausal mice[J]. CNS Neurosci Ther, 2023, 29(12): 3980-3994. DOI: 10.1111/cns.14324.

[16] HOU Y F, SHAN C, ZHUANG S Y, *et al*. Gut microbiota-derived propionate mediates the neuroprotective effect of osteocalcin in a mouse model of Parkinson's disease[J]. Microbiome, 2021, 9(1): 34. DOI: 10.1186/s40168-020-00988-6.

[17] LIU W M, HU Q, ZHANG F, *et al*. Investigation of the causal relationship between osteocalcin and dementia: a Mendelian randomization study[J]. Heliyon, 2023, 9(10): e21073. DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e21073.

[18] ITTNER L M, GÖTZ J. Amyloid-β and tau: a toxic pas de deux in Alzheimer's disease[J]. Nat Rev Neurosci, 2011, 12(2): 65-72. DOI: 10.1038/nrn2967.

[19] HAN S, ZHANG M Y, JEONG Y Y, *et al*. The role of mitophagy in the regulation of mitochondrial energetic status in neurons[J]. Autophagy, 2021, 17(12): 4182-4201. DOI: 10.1080/15548627.2021.1907167.

[20] SCHMIDT M F, GAN Z Y, KOMANDER D, *et al*. Ubiquitin signalling in neurodegeneration: mechanisms and therapeutic opportunities[J]. Cell Death Differ, 2021, 28(2): 570-590. DOI: 10.1038/s41418-020-00706-7.

[21] LIU M Y, SUI D X, DEXHEIMER T, *et al*. Hyperphosphorylation renders tau prone to aggregate and to cause cell death[J]. Mol Neurobiol, 2020, 57(11): 4704-4719. DOI: 10.1007/s12035-020-02034-w.

[22] GUO X Z, YANG Y Y, ZHOU R, *et al*. Causal effect of blood osteocalcin on the risk of Alzheimer's disease and the mediating role of energy metabolism[J]. Transl Psychiatry, 2024, 14(1): 205. DOI: 10.1038/s41398-024-02924-w.

[23] KOSMIDIS S, POLYZOS A, HARVEY L, *et al*. RbAp48 protein is a critical component of GPR158/OCN signaling and ameliorates age-related memory loss [J]. Cell Rep, 2018, 25(4): 959-973.e6. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.09.077.

[24] SUN D, MILIBARI L, PAN J X, *et al*. Critical roles of embryonic born dorsal dentate granule neurons for activity-dependent increases in BDNF, adult hippocampal neurogenesis, and antianxiety-like behaviors [J]. Biol Psychiatry, 2021, 89(6): 600-614. DOI: 10.1016/j.biopsych.2020.08.026.

[25] ZHAO Y, YANG L L, CHEN M, *et al*. Study on undercarboxylated osteocalcin in improving cognitive function of rats with type 2 diabetes mellitus by regulating PI3K-AKT-GSK/3β signaling pathwaythrough medical images[J]. Biotechnol Genet Eng Rev, 2024, 40(3): 2246-2261. DOI: 10.1080/02648725.2023.2199238.

[26] AKTITIZ S, ATAKAN M M, TURNAGÖL H H, *et al*. Interleukin-6, undercarboxylated osteocalcin, and brain-derived neurotrophic factor responses to single and repeated sessions of high-intensity interval exercise [J]. Peptides, 2022, 157: 170864. DOI: 10.1016/j.peptides.2022.170864.

[27] GUO X Z, SHAN C, HOU Y F, *et al*. Osteocalcin ameliorates motor dysfunction in a 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's disease rat model through AKT/GSK3β signaling [J]. Front Mol Neurosci, 2018, 11: 343. DOI: 10.3389/fnmol.2018.00343.

[28] ANDO E, HIGASHI S, MIZOKAMI A, *et al*. Osteocalcin promotes proliferation, differentiation, and survival of PC12 cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021, 557: 174-179. DOI: 10.1016/j.bbrc.2021.03.146.

[29] NI R Q, ZARB Y, KUHN G A, *et al*. SWI and phase imaging reveal intracranial calcifications in the P301L mouse model of human tauopathy [J]. MAGMA, 2020, 33(6): 769-781. DOI: 10.1007/s10334-020-00855-3.

[30] GUMUS H, BALTACI S B, UNAL O, *et al*. Zinc ameliorates nogo-a receptor and osteocalcin gene expression in memory-sensitive rat hippocampus impaired by intracerebroventricular injection of streptozotocin [J]. Biol Trace Elem Res, 2023, 201(7): 3381-3386. DOI: 10.1007/s12011-022-03410-4.

[31] CORY S, ADAMS J M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch [J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(9): 647-656. DOI: 10.1038/nrc883.

[32] SNIGDHA S, SMITH E D, PRIETO G A, *et al*. Caspase-3 activation as a bifurcation point between plasticity and cell death [J]. Neurosci Bull, 2012, 28(1): 14-24. DOI: 10.1007/s12264-012-1057-5.

[33] FENG X, ZHU F, DAI L H, *et al*. Caspase-3 in glioma indicates an unfavorable prognosis by involving surrounding angiogenesis and tumor cell repopulation[J]. J Neurooncol, 2023, 163(2): 313-325. DOI: 10.1007/s11060-023-04339-x.

[34] ZHANG Y, YANG X, GE X H, *et al*. Puerarin attenuates neurological deficits *via* Bcl-2/Bax/cleaved caspase-3 and Sirt3/SOD2 apoptotic pathways in subarachnoid hemorrhage mice [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 109: 726-733. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.10.161.

[35] 李旭华, 王钰莹, 李腾, 等. 滋肾醒脑汤对阿尔茨海默病模型大鼠行为学及海马组织中Caspase-3、Caspase-9表达的影响[J]. 世界中医药, 2022, 17(13): 1890-1894. DOI: 10.3969/j.issn.1673-7202.2022.13.015. LI X H, WANG Y Y, LI T, *et al*. Effect of zishen Xingnao decoction on behaviors and expression of caspase-3 and caspase-9 in hippocampus of Alzheimer's disease rats [J]. World Chin Med, 2022, 17(13): 1890-1894. DOI: 10.3969/j.issn.1673-7202.2022.13.015.

[36] SERRANO G E, SHPRECHER D, CALLAN M, *et al*. Cardiac sympathetic denervation and synucleinopathy in Alzheimer's disease with brain Lewy body disease[J]. Brain Commun, 2020, 2(1): fcaa004. DOI: 10.1093/braincomms/fcaa004.

[37] WANG J, HUANG Q, CHEN X, *et al*. Tau pathology is associated with synaptic density and longitudinal synaptic loss in Alzheimer's disease [J]. Mol Psychiatry, 2024, 29(9): 2799-2809. DOI: 10.1038/s41380-024-02501-z.

[38] BOCCALINI C, RIBALDI F, HRISTOVSKA I, *et al*. The impact of tau deposition and hypometabolism on cognitive impairment and longitudinal cognitive decline [J]. Alzheimers Dement, 2024, 20(1): 221-233. DOI: 10.1002/alz.13355.

[39] WALLACE L M K, THEOU O, GODIN J, *et al*. Investigation of frailty as a moderator of the relationship between neuropathology and dementia in Alzheimer's disease: a cross-sectional analysis of data from the Rush Memory and Aging Project [J]. Lancet Neurol, 2019, 18(2): 177-184. DOI: 10.1016/S1474-4422(18)30371-5.

[40] JIANG Y L, LI L F, DAI C L, *et al*. Effect of peripheral insulin administration on phosphorylation of tau in the brain [J]. J Alzheimers Dis, 2020, 75(4): 1377-1390. DOI: 10.3233/JAD-200147.

(收稿:2025-04-28;修回:2025-08-01)
(编辑 邓强庭)