

# 胰高血糖素样肽 1 受体激动剂治疗阿尔茨海默病的潜在靶点预测及验证

韩维娜<sup>1</sup>, 徐晓庆<sup>1</sup>, 史晋宁<sup>1</sup>, 李欣儒<sup>2</sup>, 蔡红艳<sup>3</sup>

<https://doi.org/10.12307/2024.306>

投稿日期: 2023-03-22

采用日期: 2023-04-20

修回日期: 2023-06-02

在线日期: 2023-06-17

中图分类号:

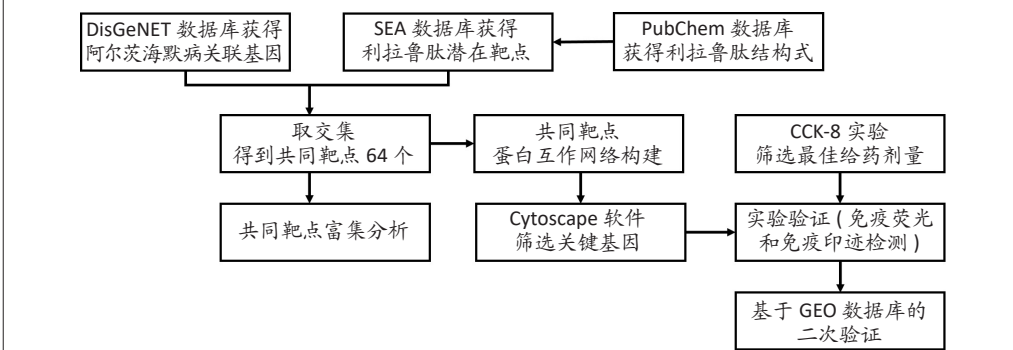
R453; R338; R741

文章编号:

2095-4344(2024)16-02568-06

文献标识码: A

文章快速阅读: 以生物信息学方法预测阿尔茨海默病的药物治疗靶点和疾病差异基因



文题释义:

**阿尔茨海默病:** 是一种起病隐匿的进行性发展的神经退行性疾病, 在临床上以记忆障碍、执行功能障碍以及人格和行为改变等全面性痴呆表现为特征, 缺乏明确的治疗手段。

**生物信息学:** 是一门包括以信息科学的原理和方法对生物信息进行获取、处理、存储、传播、分析和解释等方面知识和方法的学科, 通常用来预测药物治疗靶点和疾病差异基因。

摘要

**背景:** 阿尔茨海默病的机制探究过程中揭示了生物信息学对共同靶点筛选的重要作用, 能够利用其筛选结果为基础, 探究药物对该疾病的治疗效果。

**目的:** 采用生物信息学与分子生物学等方法预测胰高血糖素样肽1受体激动剂利拉鲁肽治疗阿尔茨海默病的作用靶点。

**方法:** 利用DisGeNET数据库及SEA数据库获取阿尔茨海默病和利拉鲁肽作用的共同基因; 利用DAVID在线数据库对共同靶点进行GO/KEGG富集分析; 使用STRING数据库构建蛋白互作网络; 使用CCK-8判断利拉鲁肽的最佳使用剂量; 使用免疫荧光和免疫印迹技术对关键蛋白的表达情况进行分析。采用小鼠海马神经元HT22细胞系进行体外实验, 细胞被随机分为3组: HT22组、HT22+Aβ组和HT22+Aβ+Lir组。HT22组不做特殊处理, HT22+Aβ组使用Aβ<sub>1-42</sub>干预HT22细胞系24 h构建Aβ损伤细胞模型, HT22+Aβ+Lir组在HT22+Aβ组的基础上添加利拉鲁肽12 h。

**结果与结论:** ①从DisGeNET数据库筛选出阿尔茨海默病相关联的基因, 共得到3 333个关联基因。再从SEA数据库中, 得到利拉鲁肽的潜在作用靶点147个。最后使用R包筛选出阿尔茨海默病与利拉鲁肽共同靶点64个。②用DAVID数据库进行共同靶点的GO/KEGG分析, 结果提示共同靶点主要富集在: 神经活性配体-受体相互作用、肾素-血管紧张素系统、膀胱癌、内肽酶活性、肽受体活性、G蛋白偶联肽受体活性和转运囊泡等生物进程。③将已经得到的64个共同靶点蛋白导入至SRTING在线数据库进行蛋白互作网络构建, 得到排名前3位的基因为基质金属蛋白酶2, 9和白细胞介素1β。④采用CCK-8试剂盒检测了培养细胞的活性, 确定利拉鲁肽拮抗Aβ<sub>1-42</sub>的最佳浓度为100 nmol/L。⑤在免疫印迹实验与免疫荧光实验中, 较HT22组相比, 在HT22+Aβ组内基质金属蛋白酶2, 9和白细胞介素1β表达量明显上升( $P < 0.05$ ); HT22+Aβ+Lir组较HT22+Aβ组相比基质金属蛋白酶2, 9和白细胞介素1β的表达量显著下降( $P < 0.05$ )。⑥结合上述生物信息学数据及在GEO数据库的差异基因二次验证结果提示, 基质金属蛋白酶2, 9和白细胞介素1β均可作为利拉鲁肽治疗阿尔茨海默病的潜在作用靶点。

**关键词:** 阿尔茨海默病; 利拉鲁肽; 胰高血糖素样肽1受体; 生物信息学; DisGeNET数据库; SEA数据库; GEO数据库; MMP9; MMP2; 白细胞介素1β

## Prediction and validation of potential targets for the glucagon-like peptide-1 receptor agonist in the treatment of Alzheimer's disease

Han Weina<sup>1</sup>, Xu Xiaoqing<sup>1</sup>, Shi Jinning<sup>1</sup>, Li Xinru<sup>2</sup>, Cai Hongyan<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Physiology, Puai School of Medicine (Health Science Center), Shaoyang University, Shaoyang 422000, Hunan Province, China; <sup>2</sup>Department of Physiology, <sup>3</sup>Department of Microbiology and Immunology, School of Basic Medical Sciences, Shanxi Medical University, Taiyuan 030000, Shanxi Province, China  
Han Weina, Master, Associate professor, Department of Physiology, Puai School of Medicine (Health Science Center), Shaoyang University, Shaoyang 422000, Hunan Province, China

<sup>1</sup>邵阳学院普爱医学院(医学部)生理学教研室, 湖南省邵阳市 422000; 山西医科大学, <sup>2</sup>生理学系, <sup>3</sup>基础医学院微生物与免疫教研室, 山西省太原市 030000

**第一作者:** 韩维娜, 女, 1986年生, 山西省人, 汉族, 2012年山西医科大学毕业, 硕士, 副教授, 主要从事阿尔茨海默病的神经生物学研究。

**通讯作者:** 韩维娜, 邵阳学院普爱医学院(医学部)生理学教研室, 湖南省邵阳市 422000

<https://orcid.org/0000-0002-1459-5725>(韩维娜)

**基金资助:** 国家自然科学基金委员会面上项目(82171428), 项目负责人: 蔡红艳; 湖南省自然科学基金青年项目(2020JJ5517),

项目负责人: 韩维娜; 湖南省教育厅科学研究项目(20C1671); 项目负责人: 韩维娜

**引用本文:** 韩维娜, 徐晓庆, 史晋宁, 李欣儒, 蔡红艳. 胰高血糖素样肽1受体激动剂治疗阿尔茨海默病的潜在靶点预测及验证

[J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(16):2568-2573.



**Corresponding author:** Han Weina, Department of Physiology, Puai School of Medicine (Health Science Center), Shaoyang University, Shaoyang 422000, Hunan Province, China

## Abstract

**BACKGROUND:** In the process of exploring the mechanism of Alzheimer's disease, the important role of bioinformatics for common target screening has been revealed, enabling the use of its screening results as a basis for exploring the therapeutic effects of drugs on the disease.

**OBJECTIVE:** To predict the targets of liraglutide, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, in the treatment of Alzheimer's disease by bioinformatics and molecular biology.

**METHODS:** DisGeNET database and SEA database were used to obtain the common genes of Alzheimer's disease and liraglutide. GO/KEGG enrichment analysis of common targets was conducted using DAVID online database. Protein-protein interaction networks were constructed using STRING database. The optimal dosage of liraglutide was determined using cell counting kit-8 assay. Expression of key proteins was analyzed using immunofluorescence and immunoblotting techniques. The mouse hippocampal neuron HT22 cell line was used for *ex vivo* experiments, and the cells were randomly divided into three groups: HT22 group, HT22+A $\beta$  group, and HT22+A $\beta$ +Lir group. No special treatment was done in the HT22 group, while A $\beta$ <sub>1-42</sub> was used to intervene in the HT22 cell line for 24 hours to construct an A $\beta$  injury cell model in the HT22+A $\beta$  group. In addition to modeling, liraglutide was added to the HT22+A $\beta$ +Lir group for 12 hours.

**RESULTS AND CONCLUSION:** A total of 3 333 genes associated with Alzheimer's disease were screened from DisGeNET database. Then 147 potential targets of liraglutide were obtained from SEA database. Finally, 64 common targets of Alzheimer's disease and Liraglutide were determined using R packets. GO/KEGG analysis of common targets using DAVID online database suggested that common targets were mainly enriched in the following biological processes: neuroactive ligand-receptor interaction, renin-angiotensin system, bladder cancer, endopeptidase activity, peptide receptor activity, G protein-coupled peptide receptor activity, and transport vesicles. The obtained 64 common target proteins were imported into SRTING online database for protein-protein interaction network construction, and the top three genes, matrix metalloproteinases 2, 9 and interleukin 1 $\beta$ , were obtained. The activity of cultured cells was detected by the cell counting kit-8 kit. Liraglutide at 100 nmol/L was the optimal concentration for antagonizing A $\beta$ <sub>1-42</sub>. In the western blot and immunofluorescence assays, the expression of matrix metalloproteinases 2, 9 and interleukin 1 $\beta$  was significantly increased in the HT22+A $\beta$  group compared with the HT22 group ( $P < 0.05$ ) but significantly decreased in the HT22+A $\beta$ +Lir group compared with the HT22+A $\beta$  group ( $P < 0.05$ ). To conclude, the above bioinformatics data and secondary validation of differential genes in the GEO database suggest that both matrix metalloproteinases 2,9 and interleukin 1 $\beta$  could be potential targets of liraglutide in the treatment of Alzheimer's disease.

**Key words:** Alzheimer's disease; liraglutide; glucagon-like peptide-1 receptor; bioinformatics; DisGeNET database; SEA database; GEO database; MMP9; MMP2; interleukin 1 $\beta$

**Funding:** National Natural Science Foundation of China (General Program), No. 82171428 (to CHY); Natural Science Foundation of Hunan Province for Young Scholars, No. 2020JJ5517 (to HWN); Scientific Research Project of Education Department of Hunan Province, No. 20C1671 (to HWN)

**How to cite this article:** HAN WN, XU XQ, SHI JN, LI XR, CAI HY. Prediction and validation of potential targets for the glucagon-like peptide-1 receptor agonist in the treatment of Alzheimer's disease. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2024;28(16):2568-2573.

## 0 引言 Introduction

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种常见的神经退行性疾病, 在老年人群中高发, 并与遗传相关。阿尔茨海默病在临床上多表现为患者认知功能障碍、记忆功能下降、执行力下降乃至生活无法自理, 耗费了大量的社会及医疗资源<sup>[1]</sup>。据报道, 2000-2019 年死于阿尔茨海默病的患者数增加了 145% 以上<sup>[2]</sup>, 估计到 2050 年, 全球将有超过 1.52 亿阿尔茨海默病患者<sup>[3]</sup>。对于阿尔茨海默病的研究层出不穷, 但是多局限于改善症状与控制疾病的进展, 并不能从根源上治疗阿尔茨海默病。因此, 对于阿尔茨海默病致病机制的研究迫在眉睫。

常见的胰高血糖素样肽 1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) 受体激动剂有艾塞那肽、贝拉鲁肽和利拉鲁肽等。利拉鲁肽 (Liraglutide) 是一种常见的 GLP-1 受体激动剂, 已于 2011-04-13 在中国批准用于治疗成人 2 型糖尿病。利拉鲁肽是以葡萄糖依赖性方式促进胰岛素的分泌, 从而最大限度地减少血糖过低的危险<sup>[4-5]</sup>。利拉鲁肽还可抑制胰高血糖素的分泌, 减慢胃排空的速率, 重建  $\beta$  细胞对胰岛素的敏感性, 促进产生饱腹感从而导致能量摄入的减少和体质量的减轻<sup>[6]</sup>。利拉鲁肽通过抑制细胞的凋亡和促进细胞分裂增殖, 来增加  $\beta$  细胞的数量<sup>[7-8]</sup>。已有研究表明 2 型糖尿病发病机制与阿尔茨海默病相似<sup>[9-10]</sup>, 病理联系可能与蛋白异常聚集、胰岛素抵抗及信号系统紊乱、炎症反应和氧化应激等因素有关<sup>[11]</sup>。利拉鲁肽能够穿过血脑屏障, 作为神经营养因子对阿尔茨海默病发挥神经保护作用 and 抗炎作用<sup>[12]</sup>。但利拉鲁肽治疗阿尔茨海默病目前尚未被广泛使用, 研究者们尝试挖掘其治疗机制。生物信息学是一种将生物学与计算机科学结合的新兴学科, 基于在线数据库可以有效预测药物或疾病的潜在作用靶点。该实验先从 DisGeNET 数据库和 SEA 数据库中获取阿尔茨海默病关联基因和利拉鲁肽潜在作用靶点, 获取二者共同基因并进行富集分析、蛋白互作网络分析及关键基因的筛选, 最终决定基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase-2, MMP2)、基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase-9, MMP9) 和白细胞介素 1 $\beta$  作为该试验的实验目标蛋白。文章目的在于寻找利拉鲁肽和阿尔茨海默病的共同靶点, 以及在细胞实验中探究利拉鲁肽能否通过影响共同靶点相关蛋白表达, 从而延缓阿尔茨海默病的发生发展。

基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 是一种锌蛋白酶家族依赖性内肽酶, 与阿尔茨海默病有关, 特别是 MMP2 和 MMP9 能够触发几种神经炎症和神经退行性疾病<sup>[13]</sup>。而白细胞介素 1 $\beta$  是先天

免疫应答的关键细胞因子, 在病理学水平可增强 A $\beta$  斑块的沉积和 tau 蛋白聚集, 白细胞介素 1 $\beta$  也可激活星形胶质细胞, 星形胶质细胞衍生的蛋白质 (如白细胞介素 6 和一些补体蛋白) 的释放可能有助于斑块形成<sup>[14]</sup>。相关研究发现, MMP2 和 MMP9 在 2 月龄 5xT 阿尔茨海默病小鼠海马组织中无明显表达差异, 在 6 月龄小鼠海马组织中 MMP2 和 MMP9 的表达明显上调; 对于白细胞介素 1 $\beta$  而言, 在 2 月龄小鼠脑组织中即产生上调, 到 4-6 月龄时上调幅度达到 12 倍, 提示 MMP2、MMP9 和白细胞介素 1 $\beta$  在阿尔茨海默病模型中均显著上调并具有预测意义<sup>[15]</sup>。MMPs 和白细胞介素 1 $\beta$  在阿尔茨海默病的发生发展中均起到推动作用, 若抑制它们的表达是否可以在一定程度上阻止阿尔茨海默病的产生? 利拉鲁肽本质上是一种肠促胰岛素, 肠促胰岛素已被证明具有抗炎作用<sup>[16]</sup>, 但是在阿尔茨海默病中是否起作用尚不明确。综上实验提出猜想: 已知 MMPs 和白细胞介素 1 $\beta$  都能够推动阿尔茨海默病的进展, 而利拉鲁肽在许多研究中被推测有治疗阿尔茨海默病的可能性, 那么利拉鲁肽能否通过作用于前述靶点, 从而在延缓阿尔茨海默病进展中起作用?

为了证实实验前期的猜想, 先使用 CCK8 判断利拉鲁肽的最佳给药剂量, 随后使用免疫荧光技术分析 MMP9、MMP2 和白细胞介素 1 $\beta$  的表达情况。实验发现 100 nmol/L 是利拉鲁肽的最佳给药剂量, 另外证实 MMP9、MMP2 和白细胞介素 1 $\beta$  均可作为利拉鲁肽治疗阿尔茨海默病的作用靶点。

## 1 资料和方法 Data and methods

**1.1 设计** 基因信息学实验结合细胞学体外实验结果验证。单因素方差分析分析结合 Tukey 法事后检验。

**1.2 时间及地点** 实验于 2022 年 7 月至 2023 年 3 月在邵阳学院和山西医科大学实验室完成。

**1.3 资料** 软件及数据库信息见表 1。

**1.4 实验方法**

**1.4.1 阿尔茨海默病相关基因的获取** DisGeNET 数据库是一个与人类疾病相关的基因数据库, 此数据库收集了大量与人类疾病相关的变异基因。实验从 DisGeNET 数据库筛选出阿尔茨海默病中相关联的基因, 进入网站后选择 “search”, 接下来选择 “diseases”, 输入 “Alzheimer's Disease”, 选择  $P < 0.05$  的差异基因, 以供后续分析。



表 1 | 软件及数据库信息

| 软件及数据库名称       | 来源网址                                                                              | 版本     |
|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------|--------|
| DisGeNET 数据库   | <a href="https://www.disgenet.org">https://www.disgenet.org</a>                   | 在线数据库  |
| SEA 数据库        | <a href="https://sea.bkslab.org/">https://sea.bkslab.org/</a>                     | 在线数据库  |
| GEO 数据库        | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/</a> | 在线数据库  |
| DAVID 数据库      | <a href="https://david.ncifcrf.gov/">https://david.ncifcrf.gov/</a>               | 在线数据库  |
| PubChem 数据库    | <a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/</a> | 在线数据库  |
| R 软件           | <a href="https://www.r-project.org/">https://www.r-project.org/</a>               | v4.1.3 |
| Cytoscape 软件   | <a href="https://cytoscape.org/">https://cytoscape.org/</a>                       | v3.9.1 |
| Image J 软件     | <a href="https://imagej.nih.gov/">https://imagej.nih.gov/</a>                     | v1.5.3 |
| GraphPad Prism | <a href="https://www.graphpad.com">https://www.graphpad.com</a>                   | v8.0   |

**1.4.2 利拉鲁肽药物靶点的获取** PubChem 数据库是一种化学模组的数据库, 由美国国家健康研究院支持, 美国国家生物技术信息中心负责维护。实验从 PubChem 上获取利拉鲁肽的 2D 结构和 SMLIE 编码结构式, 以供后续靶点预测, 获取方法: 进入网站后, 在“SEARCH”中输入“Liraglutide”, 下载对应 2D 结构图和“Isomeric SMILES”。SEA 数据库是一种完全基于化合物结构进行预测的数据库, 实验将先前在 PubChem 数据库中得到的 SMLIE 编码结构式导入 SEA 数据库中, 以获取利拉鲁肽潜在药物靶点。分析方法: 在首页选择“Datasets”, 将 Pubchem 中的“Isomeric SMILES”结构式输入下方搜索栏, 点击“Try SEA”即可得到靶点基因。

**1.4.3 阿尔茨海默病与利拉鲁肽共同靶点的筛选** 将先前得到的阿尔茨海默病相关基因和利拉鲁肽相关靶点取交集, 并使用 R 语言进行可视化以绘制韦恩图, 阿尔茨海默病和利拉鲁肽的交集基因提示利拉鲁肽可能通过调控这些基因治疗阿尔茨海默病, 后续使用一系列实验来验证利拉鲁肽治疗阿尔茨海默病的作用靶点。

**1.4.4 共同靶点的 GO/KEGG 富集分析** GO 富集分析包含 3 个模块, 分为生物过程 (biological process, BP), 细胞组分 (cellular component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF); KEGG 则可以在分子通路水平研究特定的生物进程。使用 DAVID 在线数据库进行 GO 富集分析及 KEGG 通路分析。 $P < 0.05$  认为差异有显著性意义。随后使用 R 软件进行可视化。

**1.4.5 共同靶点的蛋白互作网络构建及关键蛋白的筛选** 随后使用 STRING 在线数据库 (<https://string-db.org/>) 构建阿尔茨海默病与利拉鲁肽共同靶点的蛋白互作网络。随后使用 Cytoscape 软件 (v3.9.1) 中的 cytoHubba 插件, 根据基因的链接程度筛选关键基因 (hub gene), 连接度最高的 5 个基因被作为关键基因。

#### 1.4.6 细胞学体外实验验证

**细胞培养、处理及分组:** 使用小鼠海马神经元细胞系 HT22 (购于武汉普诺赛生命科技有限公司, CL-0697) 进行细胞实验。HT22 细胞使用 DMEM 高糖培养基 (Solarbio 公司, PYG0073) 在 37 °C 和体积分数 5%CO<sub>2</sub> 的培养箱内进行培养, 添加体积分数 10% 胎牛血清 (Boster 公司, PYG0001-500) 和 50 U/mL 青链霉素混合液 (Solarbio 公司, P1400) 共同培养; 隔天换一次培养基。待细胞铺满 95% 培养瓶底时, 使用胰蛋白酶 (Solarbio 公司, T1300) 37 °C 消化 5 min 后, 完全培养基终止消化。

使用 A $\beta_{1-42}$  构建阿尔茨海默病细胞模型是一种公认的造模手段。A $\beta_{1-42}$  与利拉鲁肽 (纯度 95%) 均合成并购于湖北强耀生物科技有限公司。为了构建 A $\beta$  细胞损伤模型, 实验将 20  $\mu$ mol/L 浓度的 A $\beta_{1-42}$  与 HT22 细胞系共培养 24 h, 随后移除 A $\beta_{1-42}$  并给予利拉鲁肽。使用 100 nmol/L 浓度的利拉鲁肽干预 A $\beta$  预处理的细胞, 观察利拉鲁肽改善阿尔茨海默病特定蛋白表达的作用。因此实验将细胞分为 3 组: HT22 组、HT22+A $\beta$  组和 HT22+A $\beta$ +Lir 组。其中给药组在 A $\beta$  预处理 24 h 后, 撤去 A $\beta$ , 加入利拉鲁肽培养 12 h, 随后进行后续实验。所有分组细胞保证同时段并行培养。

**CCK-8 检测:** 为了确定利拉鲁肽拮抗 A $\beta_{1-42}$  的最佳浓度, 实验采用 CCK-8 试剂盒检测了培养细胞的活性。取消消化后的细胞加培养基重悬成细胞悬液, 随后均匀地接种在 96 孔板中, 保证每孔 2 $\times$ 10<sup>4</sup> 细胞, 使接种细胞浓度保持在 80% 以上。将细胞分为对照组 (不加 A $\beta$  干预)、20  $\mu$ mol/L A $\beta_{1-42}$  加入不同浓度利拉鲁肽干预组 (0, 40, 80, 100, 150, 200 nmol/L)。将细胞在 37 °C 培养箱中培养 24 h 后, 每孔加入 10  $\mu$ L 的 CCK-8 溶液 (CK04, Solarbio 公司), 轻轻振荡 96 孔板, 随后将培养板在

培养箱中孵育 1 h, 使用酶标仪在 450 nm 处读取吸光度。

**免疫荧光分析:** 待 HT22 细胞在培养瓶内长满 80% 浓度后, 将细胞消化下来并均匀地接种在提前放置细胞专用爬片 (特制爬片, 无需黏附包被处理) 的 6 孔板中, 并将 6 孔板放在培养箱中培养 24 h, 使细胞贴壁在爬片上。待给药处理完后, 使用 40 g/L 多聚甲醛 4 °C 固定 30 min, 随后加入含体积分数 1% TritonX-100 的 PBS 室温孵育 15 min, 用体积分数 5% BSA 室温封闭 1 h 后, 弃去封闭液, 直接滴加一抗工作液 (MMP9 兔抗小鼠一抗, Proteintech Group Inc., 货号: 10375-2-AP, 稀释比例 1 : 100; MMP2 兔抗小鼠一抗, ABclonal Technology Co., Ltd, 货号: A11144, 稀释比例 1 : 100; 白细胞介素 1 $\beta$  兔抗小鼠一抗, Affinity Biosciences, 货号: BF8021, 稀释比例 1 : 300), 4 °C 过夜。次日加入荧光二抗 (FITC Goat Anti-Rabbit IgG, AS011, ABclonal Technology Co., Ltd., 稀释比例 1 : 100), 避光 37 °C 孵育 1 h, 加入 DAPI 染色液 (Solarbio, C0065) 常温染色 10 min 后, 使用抗淬灭试剂 (Solarbio, S2100) 封固, 置于荧光显微镜下观察, 为了控制变量以 HT22 组的荧光参数 (曝光时间 3 s, 增益 7.1) 为标准分析其他两组细胞。并用 Image J 软件读取目的蛋白通道的 mean 值 [平均荧光强度 (Mean) = 该区域荧光强度总和 (IntDen)/该区域面积 (Area)], 对平均荧光强度进行分析来判断蛋白表达量。

**免疫印迹分析:** 待细胞融合度达到 80%-90% 时, 用胰酶消化并离心, 弃掉上清, 保留剩余细胞团块。添加蛋白酶抑制剂、RIPA 裂解液至沉淀中, 充分吹打混匀, 置于超声细胞破碎仪破碎处理后, 在冰上裂解 30 min。在高速离心机中 13 000 r/min 离心 25 min, 取上清。采用 BCA 蛋白测定法进行蛋白定量 (30  $\mu$ g/ $\mu$ L)。95 °C 煮样 10 min 充分变性后, 加入 Maker 5  $\mu$ L 和样品 10  $\mu$ L 于聚丙烯酰胺凝胶上电泳。从负极到正极依次为超厚滤纸、凝胶、PVDF 膜、超厚滤纸, 半干转膜 20 min。放在脱脂奶粉中室温封闭 2 h; 加入对应一抗工作液 (一抗厂家与免疫荧光实验保持一致, 稀释比例: MMP2 为 1 : 1 000; MMP9 为 1 : 1 000; 白细胞介素 1 $\beta$  为 1 : 1 000) 4 °C 孵育过夜; 次日加入对应二抗 (HRP 山羊抗兔 IgG, AS014, ABclonal Technology Co., Ltd., 稀释比例 1 : 5 000) 常温孵育 1 h; 室温下使用 ECL 发光液孵育 2 min, 凝胶成像系统曝光, 最后使用 Image J 软件对条带的灰度值进行分析, 所有目的蛋白灰度值均除以内参蛋白 (GAPDH) 进行标准化处理。

**1.4.7 GEO 数据库数据获取及处理** 为了二次验证实验的结论, 实验从 GEO 数据库中检索到阿尔茨海默病相关数据集: GSE132903, 该数据集包含 97 例阿尔茨海默病患者和 98 例非痴呆对照人群, 采集样本来源为脑组织中颞回。使用 GEO2R 在线数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r>) 筛选上述 GEO 数据库内获得的阿尔茨海默病与健康人群差异基因, 并使用 R 语言软件进行可视化。

**1.5 主要观察指标** 首先使用 CCK8 试剂盒探索利拉鲁肽最佳给药剂量, 接下来使用免疫荧光和免疫印迹技术观察不同分组细胞内 MMP9、MMP2 和白细胞介素 1 $\beta$  的蛋白表达情况。采用免疫荧光实验通过分析蛋白平均荧光强度确定蛋白表达量, 免疫印迹实验通过判断目的蛋白条带的灰度值来确定蛋白表达量。

**1.6 统计学分析** 采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据统计学处理以及绘图, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 实验的组间比较均使用单因素方差分析进行分析, 并使用 Tukey 法进行事后检验,  $P < 0.05$  表示差异有显著性意义。文章统计学方法已经通过邵阳学院生物统计学专家审核。

## 2 结果 Results

**2.1 阿尔茨海默病与利拉鲁肽共同靶点的筛选结果** 实验从 DisGeNET 数据库筛选出阿尔茨海默病相关联的基因, 共得到 3 333 个关联基因。从 PubChem 上获取利拉鲁肽的 2D 结构和 SMLIE 编码结构式, 见图 1A, 随后将 SMLIE 编码结构式输入至 SEA 数据库中, 得到 147 个利拉鲁肽的潜在作用靶点。随后使用 R 包筛选出阿尔茨海默病与利拉鲁肽共同靶点, 共 64 个, 并使用 R 包进行可视化, 见图 1B。

**2.2 共同靶点的 GO/KEGG 分析结果** 实验使用 DAVID 数据库进行共同靶点的 GO/KEGG 分析后发现, 共同靶点主要富集在: 神经活性配体-受体体相互作用、肾素-血管紧张素系统、膀胱癌、内酯酶活性、肽受体活性、G 蛋白偶联肽受体活性、转运囊泡、膜筏、蛋白酶体核心复合物、 $\beta$  亚单位复合物、蛋白质加工、内分泌过程及胶原分解代谢过程。实验

使用 R 包可视化展示了富集结果排名前 3 位的结果, 见图 2。

**2.3 蛋白互作网络的构建及关键基因的筛选结果** 实验将先前得到的 64 个共同靶点蛋白导入至 SRTING 在线数据库进行蛋白互作网络构建, 见图 3A。最后使用 Cytoscape 软件中的 cytoHubba 插件, 根据基因的链接程度筛选关键基因, 连接度最高的 10 个基因被作为关键基因, 见图 3B。其中 MMP9、MMP2 和白细胞介素 1 $\beta$  为排名前 3 位的基因, 因此, 此次实验围绕 MMP9、MMP2 和白细胞介素 1 $\beta$  展开。

**2.4 利拉鲁肽可以抑制 A $\beta$  对 HT22 细胞的损伤作用, 且 100 nmol/L 为最佳浓度** 实验采用 CCK-8 试剂盒检测了培养细胞的活性, 确定 100 nmol/L 利拉鲁肽是拮抗 A $\beta_{1-42}$  的最佳浓度, 见图 4。0 nmol/L 利拉鲁肽组与对照组相比细胞活性明显下降, 且有显著性差异 ( $P < 0.001$ ), 提示 A $\beta$  有细胞毒性作用; 40, 80, 100, 150, 200 nmol/L 浓度的利拉鲁肽均可拮抗 A $\beta$  的细胞毒性作用, 其中 100 nmol/L 时细胞活性最佳, 且与 0 nmol/L 组相比有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。由于 150 nmol/L 浓度的利拉鲁肽组细胞活力开始下降, 因此提示 100 nmol/L 浓度的利拉鲁肽为拮抗 A $\beta_{1-42}$  的最佳干预剂量。

**2.5 利拉鲁肽对关键基因 MMP2、MMP9 和 IL1 $\beta$  的影响** 实验结果发现, HT22+A $\beta$  组 MMP2、MMP9 较 HT22 组相比表达量显著上升 ( $P < 0.001$ ); HT22+A $\beta$ +Lir 组较 HT22+A $\beta$  组相比, MMP2、MMP9 和白细胞介素 1 $\beta$  的表达量显著下降 ( $P < 0.001$ ), 提示利拉鲁肽可以抑制阿尔茨海默病中上调的 MMP2、MMP9 和白细胞介素 1 $\beta$ , 见图 5。

**2.6 在免疫印迹实验中, 得到了与免疫荧光实验相符的结果** 实验发现, 较 HT22 组相比, 在 HT22+A $\beta$  组内 MMP2 ( $P < 0.01$ )、MMP9 ( $P < 0.05$ ) 和白细胞介素 1 $\beta$  ( $P < 0.05$ ) 表达量明显上升; HT22+A $\beta$ +Lir 组较 HT22+A $\beta$  组相比 MMP2 ( $P < 0.01$ )、MMP9 ( $P < 0.05$ ) 和白细胞介素 1 $\beta$  ( $P < 0.01$ ) 的表达量显著下降。同样提示利拉鲁肽可以抑制阿尔茨海默病中上调的 MMP2、MMP9 和白细胞介素 1 $\beta$  的表达。以上结果与免疫荧光结果共同提示 MMP2、MMP9 和白细胞介素 1 $\beta$  均可作为利拉鲁肽治疗阿尔茨海默病的潜在作用靶点, 见图 6。

**2.7 基于 GEO 数据库的差异基因二次验证** 以  $P < 0.05$ , LogFC 绝对值  $\geq 0.5$  为标准筛选到 807 个差异基因, 其中上调基因 432 个, 下调基因 375 个。MMP2、MMP9 和白细胞介素 1 $\beta$  均位于上调差异基因中, 见图 7。该结果证实 MMP2、MMP9 和白细胞介素 1 $\beta$  在阿尔茨海默病中是上调的, 与前期的实验结果相吻合。

### 3 讨论 Discussion

文章中前期的生物信息学结果发现, MMP2、MMP9 和白细胞介素 1 $\beta$  可能是利拉鲁肽治疗阿尔茨海默病的潜在治疗靶点。对此结果行免疫荧光实验进行初步验证, 发现 MMP2、MMP9 和白细胞介素 1 $\beta$  在阿尔茨海默病中均显著上调, 而给予利拉鲁肽后 MMP2、MMP9 和白细胞介素 1 $\beta$  表达均下调。后续的免疫印迹实验得到了类似的结果, 基于 GEO 数据库的二次验证, 亦证实 MMP2、MMP9 和白细胞介素 1 $\beta$  在阿尔茨海默病中是上调的。在现有研究中, 尚未有报道利拉鲁肽通过介导 MMPs 和白细胞介素 1 $\beta$  来发挥抗阿尔茨海默病作用, 文章通过细胞实验的结果, 证明了 MMP2、MMP9 及白细胞介素 1 $\beta$  在利拉鲁肽作用下发生下调, 提示 MMP2、MMP9 和白细胞介素 1 $\beta$  可以作为利拉鲁肽治疗阿尔茨海默病的作用靶点, 但是具体的机制尚不明确。

利拉鲁肽属于 GLP-1 受体激动剂, 是一种神经营养因子, 研究发现其有可能发挥神经保护作用 and 抗炎作用, 其能通过血脑屏障, 还通过神经元祖细胞增殖、改善学习、减少大脑斑块形成和炎症反应<sup>[17-18]</sup>。在动物实验中, 利拉鲁肽通过降低 tau 蛋白的磷酸化改善阿尔茨海默病小鼠的学习记忆能力<sup>[19]</sup>, GLP-1 类似物西那肽可有效拮抗 A $\beta$  引起的神经元损伤和空间记忆障碍<sup>[20]</sup>。实验先前的研究证实利拉鲁肽既能够改善阿尔茨海默病动物模型学习记忆水平以及海马神经可塑性<sup>[21]</sup>, 同时还具有促进海马区神经再生并改善抑郁症状的效应<sup>[22]</sup>。

MMPs 是参与细胞外基质几乎所有蛋白质成分重塑的蛋白水解酶, 其不受控制或不适当的表达导致了不同的病理改变, 包括炎症、肿瘤生长、癌细胞入侵和感染<sup>[23]</sup>, 参与脑组织和血脑屏障的许多生理和病理过程<sup>[24]</sup>。其中 MMP2 和 MMP9 能够结合较大的底物如明胶, 并具有有效

切割的能力, 在神经退行性疾病和神经炎症发生发展中起到重要作用<sup>[13]</sup>。MMPs 还通过影响修饰结构蛋白的功能并破坏细胞因子的正常功能, 引起神经系统疾病, 并最终导致疾病恶化。

A $\beta$  沉积是阿尔茨海默病的常见病理表现, BJERKE 等<sup>[25]</sup>提出基质金属蛋白酶抑制剂 1 (tissue inhibitors of metalloproteinase 1, TIMP-1) 和 MMP9 可以作为阿尔茨海默病的生物标志物, 仅次于 P-tau、T-tau、脑白质病变和 A $\beta$  沉积, 提示 MMPs 和阿尔茨海默病之间有很密切的关系。相关研究发现在轻度认知障碍患者中, MMP9 的高表达与认知障碍的产生高度相关<sup>[26]</sup>。同时 LORENZL 等<sup>[27]</sup>发现阿尔茨海默病患者血清中 MMP9 水平升高, 同时在阿尔茨海默病患者的神经纤维缠结、神经元细胞质、血管组织和淀粉样斑块中均表达上调。在动物模型中, 脑室内注射 A $\beta$  后, 海马组织中的 MMP9 表达明显上调, 同时 MMP9 的高表达诱导了认知障碍的产生<sup>[28]</sup>。研究发现, 5xT 阿尔茨海默病小鼠体内 MMP 的过表达可能与淀粉样蛋白产生具有相关性, 提示 MMP 可能是一种新的前淀粉样蛋白生成酶, 并诱发 A $\beta$  的产生<sup>[15]</sup>。MMP 基因表达的这种选择性调节可能是由于促炎细胞因子刺激 MMPs 所致, TIMP 似乎也受到细胞因子的调节, 特别是 TIMP-1, 其表达被白细胞介素 1 $\beta$  显著上调。

以往研究显示, MMP2、MMP9 可被 A $\beta$  激活, 应用广谱的 MMP 抑制剂后, 可以降低由于 A $\beta$  沉积导致的血管内皮细胞连接受损引起的血脑屏障通透性增加<sup>[29]</sup>, 这提示 MMP2、MMP9 在阿尔茨海默病的病程中损伤正常的血脑屏障, 血脑屏障通透性增加又可促使更多炎症因子透过血脑屏障, 炎症因子沉积在神经细胞周围或进入细胞内引起各种炎性反应, 并加速阿尔茨海默病的发病。以上结果提示, MMPs 家族与阿尔茨海默病等神经退行性疾病的发生发展具有相关性。

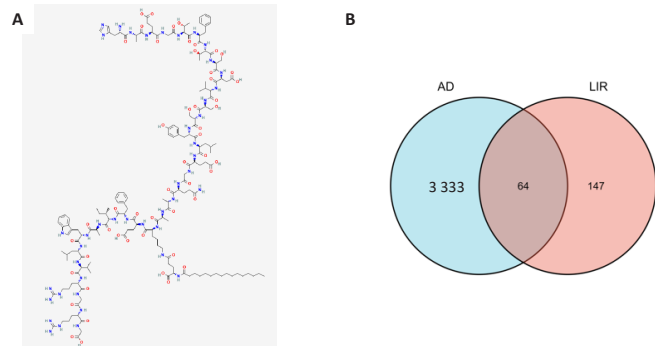
白细胞介素 1 $\beta$  是一种十分常见的炎症因子, 同时参与调控多种细胞功能, 包括细胞增殖和分化。在阿尔茨海默病中, 白细胞介素 1 $\beta$  是小胶质细胞因 A $\beta$  沉积而产生和分泌的一种促炎因子, 诱导阿尔茨海默病慢性神经炎症, 最终导致神经组织受损、神经变性和功能障碍<sup>[30]</sup>。A $\beta_{1-42}$  寡聚体通过诱导小胶质细胞释放促炎因子白细胞介素 1 $\beta$  和肿瘤坏死因子  $\alpha$ , 并干扰抗炎细胞因子 (如转化生长因子  $\beta 1$ ) 的合成, 促进阿尔茨海默病脑中的神经炎症和神经元死亡<sup>[31]</sup>。因此白细胞介素 1 $\beta$  在阿尔茨海默病的发生发展中起到重要作用。

GLP-1 受体激动剂利拉鲁肽本质上是一种肠促胰岛素, 它能够与 GLP-1 受体结合, 激活 PI3K/MAPK 信号通路, 并通过调控脑脊液中 A $\beta$  转运蛋白的活性来促进 A $\beta$  的清除<sup>[32]</sup>。肠促胰岛素具有抗炎作用, 这种作用是 cAMP/PKA 信号通路所介导的, 相关研究发现, Teneeligiptin 是一种 DPP-4 抑制剂, 能够明显抑制白细胞介素 1 $\beta$ 、白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子  $\alpha$  等炎症因子的表达<sup>[16]</sup>。同时另一项研究发现, 利拉鲁肽可以通过上调肥胖和 2 型糖尿病患者体内 SIRT1 的表达来抑制促炎核转录因子  $\kappa B$  通路的激活, 通过上调 SIRT1 的表达, 下调促炎因子并减轻患者体内的炎症反应来阻止疾病的发展<sup>[33-34]</sup>。相关研究发现, 白细胞介素 1 $\beta$  的进一步上调会引起由炎症所诱导的神经元和突触功能障碍, 并促进 A $\beta$  斑块的累积作用, 白细胞介素 1 活性升高还与神经纤维缠结的产生有关, 并且能够诱导 Tau 蛋白过度磷酸化<sup>[35]</sup>。另一项研究发现白细胞介素 1 $\beta$  的过表达会进一步诱发 3xTg- 阿尔茨海默病小鼠的 Tau 蛋白磷酸化, 而抑制白细胞介素 1 $\beta$  后, Tau 蛋白水平有所改善, 认知能力亦改善<sup>[36]</sup>。以上研究均证实白细胞介素 1 $\beta$  与阿尔茨海默病的神经炎症高度相关, 而利拉鲁肽可以抑制阿尔茨海默病的神经炎症。

正如前文所述, MMP2、MMP9 和白细胞介素 1 $\beta$  的高表达与阿尔茨海默病模型的神经炎症相关。实验也发现, 在阿尔茨海默病细胞模型中 MMP2、MMP9 和白细胞介素 1 $\beta$  的表达均显著升高, 提示阿尔茨海默病的发病机制与炎症相关。实验发现, 使用利拉鲁肽后 MMP2、MMP9 和白细胞介素 1 $\beta$  等炎症因子的表达均显著下调, 提示利拉鲁肽可以改善阿尔茨海默病的炎症反应, 并且可能通过 MMP2、MMP9 和白细胞介素 1 $\beta$  所介导。

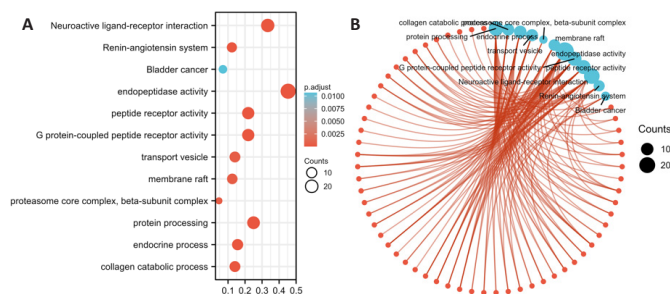
综上所述, 文章认为 MMP2、MMP9 和白细胞介素 1 $\beta$  是利拉鲁肽治疗阿尔茨海默病的潜在治疗靶点, 且可能通过减轻阿尔茨海默病神经炎症来发挥作用。





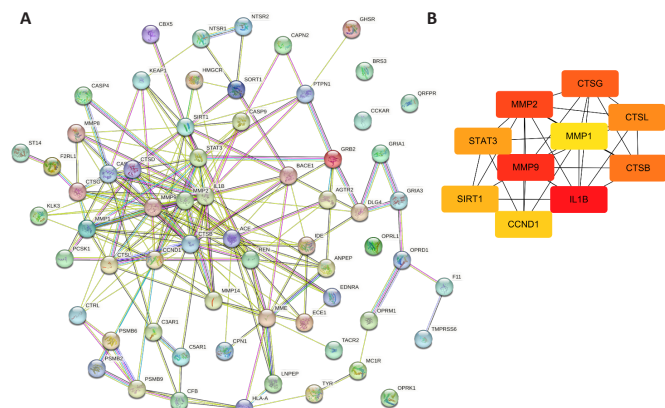
图注：图 A 为利拉鲁肽的 2D 结构示意图；B 为利拉鲁肽和阿耳茨海默病共同靶点示意图

图 1 | 利拉鲁肽 (LIR) 的化学结构及其与阿耳茨海默病 (AD) 发病的共同靶点



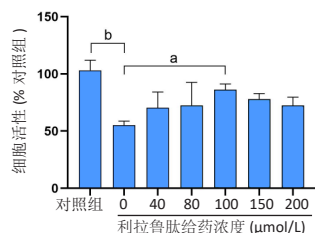
图注：图 A 为共同靶点 GO/KEGG 富集结果 (top3)，圆球颜色越红，统计学差异越显著，圆球越大，富集到这条通路的基因越多；B 为共同靶点 GO/KEGG 富集结果环状示意图，红色点表示差异基因，与连接越多红色点的通路越有意义。图 A 中各靶点的英文注释 (从上至下)：神经活性配体-受体相互作用、肾素-血管紧张素系统、膀胱癌、内肽酶活性、肽受体活性、G 蛋白偶联肽受体活性、转运囊泡、膜筏、蛋白酶体核心复合物、 $\beta$  亚单位复合物、蛋白质加工、内分泌过程及胶原降解代谢过程

图 2 | 利拉鲁肽和阿耳茨海默病共同靶点富集情况分析图



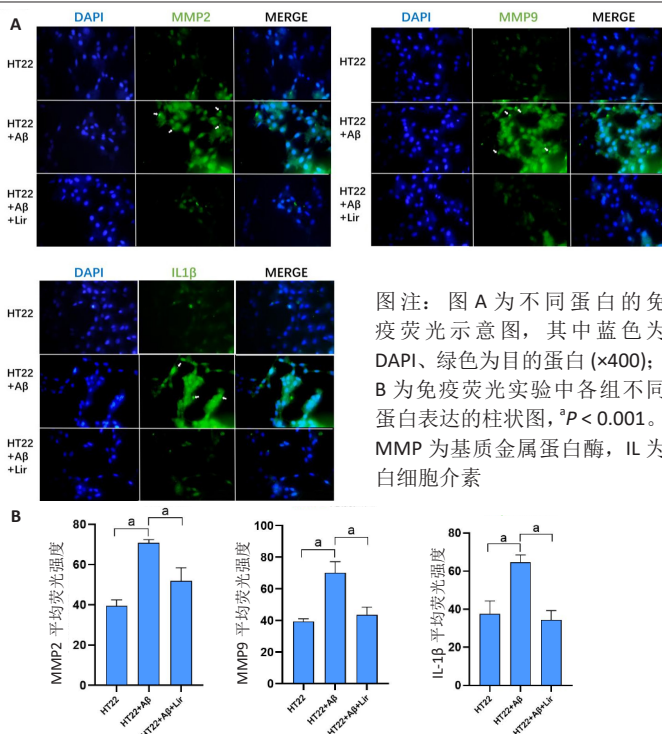
图注：图 A 为共同靶点的蛋白互作网络示意图，线条表示蛋白之间的关联度，关联度越高线条数目越多；B 为共同靶点中排名前 10 位的关键基因。关联性由黄色到红色逐渐增强。MMP 为基质金属蛋白酶，IL 为白细胞介素

图 3 | 筛选利拉鲁肽和阿耳茨海默病共同靶点中关键蛋白网络图



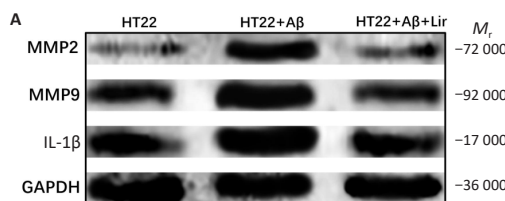
图注：<sup>a</sup> $P < 0.01$ , <sup>b</sup> $P < 0.001$

图 4 | 利拉鲁肽拮抗 A $\beta$  毒性作用的最佳浓度



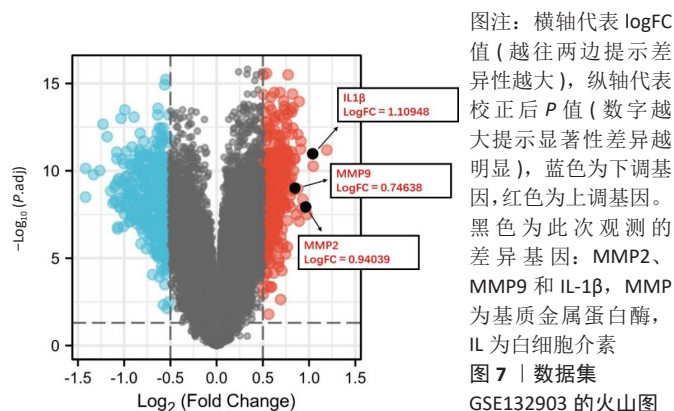
图注：图 A 为不同蛋白的免疫荧光示意图，其中蓝色为 DAPI、绿色为目的蛋白 ( $\times 400$ )；B 为免疫荧光实验中各组不同蛋白表达的柱状图，<sup>a</sup> $P < 0.001$ 。MMP 为基质金属蛋白酶，IL 为白细胞介素

图 5 | 利拉鲁肽 (Lir) 通过调控 MMP2、MMP9 和 IL-1 $\beta$  的表达减轻 A $\beta_{1-42}$  预处理 HT22 细胞系诱导的阿耳茨海默病



图注：图 A 为不同蛋白的免疫印迹条带示意图；B-D 为免疫印迹实验中各组不同蛋白表达的柱状图。<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ 。MMP 为基质金属蛋白酶，IL-1 $\beta$  为白细胞介素 1 $\beta$

图 6 | 利拉鲁肽 (Lir) 通过调控 MMP2、MMP9 和 IL-1 $\beta$  蛋白的表达减轻 A $\beta_{1-42}$  预处理 HT22 细胞系诱导的阿耳茨海默病



图注：横轴代表 logFC 值 (越往两边提示差异性越大)，纵轴代表校正后 P 值 (数字越大提示显著性差异越明显)，蓝色为下调基因，红色为上调基因。黑色为此次观测的差异基因：MMP2、MMP9 和 IL-1 $\beta$ ，MMP 为基质金属蛋白酶，IL 为白细胞介素

图 7 | 数据集 GSE132903 的火山图

**致谢:** 感谢山西医科大学李欣儒为实验提供的生物信息学分析思路, 感谢山西医科大学神经生理学课题组为实验提供的技术支持。

**作者贡献:** 韩维娜和蔡红艳负责实验设计。韩维娜和李欣儒负责实验实施、论文撰写和实验数据分析处理。徐晓庆负责实验指标检测。韩维娜和史晋宁负责数据和文章的校对。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

**版权转让:** 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

**出版规范:** 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发表宗旨。

#### 4 参考文献 References

- [1] CARMONA S, HARDY J, GUERREIRO R. The genetic landscape of Alzheimer disease. *Handb Clin Neurol*. 2018;148:395-408.
- [2] 2021 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*. 2021; 17(3):327-406.
- [3] ZHANG Y, LI Y, MA L. Recent advances in research on Alzheimer's disease in China. *J Clin Neurosci*. 2020;81:43-46.
- [4] KNUDSEN LB, NIELSEN PF, HUUSFELDT PO, et al. Potent derivatives of glucagon-like peptide-1 with pharmacokinetic properties suitable for once daily administration. *J Med Chem*. 2000;43(9):1664-1669.
- [5] NAUCK MA, QUAST DR, WEFERS J, et al. GLP-1 receptor agonists in the treatment of type 2 diabetes- state-of-the-art. *Mol Metab*. 2021;46:101102.
- [6] VILSBOLL T. The effects of glucagon-like peptide-1 on the beta cell. *Diabetes Obes Metab*. 2009;11 Suppl 3:11-18.
- [7] LOVSHIN JA, DRUCKER DJ. Incretin-based therapies for type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2009;5(5):262-269.
- [8] ROLIN B, LARSEN MO, GOTTFREDSEN CF, et al. The long-acting GLP-1 derivative NN2211 ameliorates glycemia and increases beta-cell mass in diabetic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002;283(4):E745-E752.
- [9] LIU XY, ZHANG N, ZHANG SX, et al. Potential new therapeutic target for Alzheimer's disease: Glucagon-like peptide-1. *Eur J Neurosci*. 2021;54(10): 7749-7769.
- [10] MENG L, LI XY, SHEN L, et al. Type 2 diabetes mellitus drugs for alzheimer's disease: current evidence and therapeutic opportunities. *Trends Mol Med*. 2020;26(6):597-614.
- [11] 张峥, 张兆辉. 阿尔茨海默病与 2 型糖尿病的相关性研究进展 [J]. 卒中与神经疾病. 2018,25(1):112-117.
- [12] PALADUGU L, GHARAIBEH A, KOLLI N, et al. Liraglutide has anti-inflammatory and anti-amyloid properties in streptozotocin-induced and 5xFAD mouse models of Alzheimer's disease. *Int J Mol Sci*. 2021;22(2):860.
- [13] CICCONE L, VANDOOREN J, NENCETTI S, et al. Natural marine and terrestrial compounds as modulators of matrix metalloproteinases-2 (MMP-2) and MMP-9 in Alzheimer's disease. *Pharmaceutics (Basel)*. 2021;14(2):86.
- [14] REVUELTA M, URRUTIA J, VILLARROEL A, et al. Microglia-mediated inflammation and neural stem cell differentiation in Alzheimer's disease: possible therapeutic role of K(V)1.3 channel blockade. *Front Cell Neurosci*. 2022;16:868842.
- [15] PY NA, BONNET AE, BERNARD A, et al. Differential spatio-temporal regulation of MMPs in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease: evidence for a pro-amyloidogenic role of MT1-MMP. *Front Aging Neurosci*. 2014;6:247.
- [16] HIRANO T, MORI Y. Anti-atherogenic and anti-inflammatory properties of glucagon-like peptide-1, glucose-dependent insulinotropic polypeptide, and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in experimental animals. *J Diabetes Investig*. 2016;7 Suppl 1:80-86.
- [17] MCCLEAN PL, GAULT VA, HARRIOTT P, et al. Glucagon-like peptide-1 analogues enhance synaptic plasticity in the brain: a link between diabetes and Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol*. 2010;630(1-3):158-162.
- [18] HAMILTON A, PATTERSON S, PORTER D, et al. Novel GLP-1 mimetics developed to treat type 2 diabetes promote progenitor cell proliferation in the brain. *J Neurosci Res*. 2011;89(4):481-489.
- [19] QI L, KE L, LIU X, et al. Subcutaneous administration of liraglutide ameliorates learning and memory impairment by modulating tau hyperphosphorylation via the glycogen synthase kinase-3beta pathway in an amyloid beta protein induced alzheimer disease mouse model. *Eur J Pharmacol*. 2016;783:23-32.
- [20] 原丽, 韩玲娜, 常永丽, 等. 肠促胰岛素类似物拮抗 APP/PS1 转基因鼠认知功能损伤的研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学. 2019,24(7):721-729.
- [21] HAN WN, HOLSCHER C, YUAN L, et al. Liraglutide protects against amyloid-beta protein-induced impairment of spatial learning and memory in rats. *Neurobiol Aging*. 2013;34(2):576-588.
- [22] WEINA H, YUHU N, CHRISTIAN H, et al. Liraglutide attenuates the depressive- and anxiety-like behaviour in the corticosterone induced depression model via improving hippocampal neural plasticity. *Brain Res*. 2018;1694:55-62.
- [23] MANNELLO F. New implications of the proteolytic balance between matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in migraine with and without aura. *Clin Chim Acta*. 2009;409(1-2):1-3.
- [24] REMPE RG, HARTZA, BAUER B. Matrix metalloproteinases in the brain and blood-brain barrier: versatile breakers and makers. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2016;36(9):1481-1507.
- [25] BJERKE M, ZETTERBERG H, EDMAN A, et al. Cerebrospinal fluid matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in combination with subcortical and cortical biomarkers in vascular dementia and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2011;27(3):665-676.
- [26] BRUNO MA, MUFSON EJ, WU J, et al. Increased matrix metalloproteinase 9 activity in mild cognitive impairment. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2009; 68(12):1309-1318.
- [27] LORENZ S, BUERGER K, HAMPEL H, et al. Profiles of matrix metalloproteinases and their inhibitors in plasma of patients with dementia. *Int Psychogeriatr*. 2008;20(1):67-76.
- [28] MIZOGUCHI H, TAKUMA K, FUKUZAKI E, et al. Matrix metalloproteinase-9 inhibition improves amyloid beta-mediated cognitive impairment and neurotoxicity in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;331(1):14-22.
- [29] WEEKMAN EM, WILCOCK DM. Matrix metalloproteinase in blood-brain barrier breakdown in dementia. *J Alzheimers Dis*. 2016;49(4):893-903.
- [30] ROSENBERG GA. Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases. *Lancet Neurol*. 2009;8(2):205-216.
- [31] TEIXEIRA AL, REIS HJ, COELHO FM, et al. All-or-nothing type biphasic cytokine production of human lymphocytes after exposure to Alzheimer's beta-amyloid peptide. *Biol Psychiatry*. 2008;64(10):891-895.
- [32] HAMPEL H, CARACI F, CUELLO AC, et al. A path toward precision medicine for neuroinflammatory mechanisms in Alzheimer's disease. *Front Immunol*. 2020;11:456.
- [33] WICINSKI M, SOCHA M, MALINOWSKI B, et al. Liraglutide and its neuroprotective properties-focus on possible biochemical mechanisms in Alzheimer's disease and cerebral ischemic events. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(5):1050.
- [34] KHAVINSON V, LINKOVA N, DYATLOVA A, et al. Senescence-associated secretory phenotype of cardiovascular system cells and inflammaging: perspectives of peptide regulation. *Cells*. 2022;12(1):106.
- [35] SHAFTEL SS, GRIFFIN WS, O'BANION MK. The role of interleukin-1 in neuroinflammation and Alzheimer disease: an evolving perspective. *J Neuroinflammation*. 2008;5:7.
- [36] ZHENG C, ZHOU XW, WANG JZ. The dual roles of cytokines in Alzheimer's disease: update on interleukins, TNF-alpha, TGF-beta and IFN-gamma. *Transl Neurodegener*. 2016;5:7.

(责任编辑: WJ, ZN, WL, LWJ)