

# 三明治培养人源永生生化肝细胞中 $A\beta$ 分布的体外研究

辜浩桢, 李颖麒, 叶菲菲, 张莹\*

广州市天河区妇幼保健院药剂科, 广东 广州

收稿日期: 2025年8月11日; 录用日期: 2025年9月9日; 发布日期: 2025年9月23日

## 摘要

阿尔茨海默病(Alzheimer's Disease, AD)是一种神经退行性疾病, 发病率高且疾病负担重。已有研究发现PXR激动剂是AD的潜在治疗药物, 肝实质细胞中P-gp和LRP1在 $A\beta_{42}$ 的快速清除中发挥了重要作用, 本研究旨在探索PXR激动剂是否通过影响肝脏中P-gp和LRP1的表达发挥AD治疗作用。首先选择HSEC细胞进行CCK-8实验确定HYP给药浓度, 通过免疫印迹检测HepG2细胞中LRP1、P-gp蛋白量, 最后通过Transwell模型检测对FAM- $A\beta$ 及罗丹明123 (Rho123)转运能力。实验结果证明, 选择HYP (0.5  $\mu$ M)进行免疫印迹实验证明了HYP能够上调P-gp蛋白表达, 但对LRP1有轻微下调影响。用Rho123流出实验表明了HYP增强HepG2细胞中P-gp的外排能力。最后研究了HepG2细胞对 $A\beta_{42}$ 转运能力影响, 其显示HYP能够增强HSEC和HepG2细胞双层膜屏障对 $A\beta_{42}$ 转运, 并且通过P-gp抑制维拉帕米验证HYP是通过增强hCMEC/D3中P-gp活性导致 $A\beta_{42}$ 转运增多。结果论证激动PXR可能通过上调HepG2细胞中P-gp的表达增加并肝脏对外周 $A\beta_{42}$ 的快速清除能力发挥治疗AD的作用。经过科学严谨的研究, 我们发现HYP在未来有望作为一种新型AD治疗候选药物, 其潜在疗效将为HYP的临床应用提供坚实科学支撑。

## 关键词

PXR, P-gp, 三明治模型, 阿尔茨海默病

## *In Vitro* Study on the Distribution of $A\beta$ in Sandwich Cultured Human Immortalized Liver Cells

Tiancheng Gu, Yingqi Li, Feifei Ye, Ying Zhang\*

Department of Pharmacy, Tianhe District Maternal and Child Health Hospital, Guangzhou Guangdong

Received: Aug. 11<sup>th</sup>, 2025; accepted: Sep. 9<sup>th</sup>, 2025; published: Sep. 23<sup>th</sup>, 2025

\*通讯作者。

文章引用: 辜浩桢, 李颖麒, 叶菲菲, 张莹. 三明治培养人源永生生化肝细胞中  $A\beta$  分布的体外研究[J]. 生物过程, 2025, 15(3): 225-233. DOI: 10.12677/bp.2025.153030

## Abstract

Alzheimer's Disease (AD) is a neurodegenerative disorder with high incidence and significant disease burden. Previous studies have suggested that PXR agonists may be potential therapeutic agents for AD treatment. Additionally, P-glycoprotein (P-gp) and LRP1 play crucial roles in the rapid clearance of  $A\beta_{42}$ . PXR agonists have been shown to increase the expression of P-gp protein. This study aims to further investigate whether PXR agonists exert their therapeutic effects by affecting the expression of P-gp and LRP1 in liver. In the cellular experiments, we choose HSEC cells CCK-8 assay was performed to determine the concentrations of HYP. The protein levels of LRP1, P-gp in HepG2 cells were detected by immunoblotting experiments. Transwell assay was conducted to evaluate the transport capacity of FAM- $A\beta_{42}$  and Rhodamine 123 by HSEC and HepG2 cell bilayer membrane barrier. The results showed that HYP (0.5  $\mu$ M) was found to upregulate P-gp protein expression in a concentration-dependent manner but little effect on LRP1. Rho123 efflux assay showed that HYP enhanced the efflux capacity of P-gp in HSEC and HepG2 cell bilayer membrane barrier. Furthermore, HYP enhanced the barrier function of HSEC and HepG2 cell bilayer membrane barrier. for  $A\beta_{42}$  transport in normal, this effect was confirmed to be mediated by increasing P-gp activity through verapamil inhibition. The study suggests that PXR agonists may exert therapeutic effects on AD by upregulating the expression of P-gp and LRP1 and increasing the rapid clearance of  $A\beta_{42}$  in the liver. These findings provide scientific evidence for the future clinical application of HYP, which may become a promising candidate drug for AD treatment.

## Keywords

PXR, P-gp, Sandwich Model, Alzheimer's Disease

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 介绍

阿尔茨海默病(Alzheimer's Disease, AD)是一种进行性神经退行性疾病,也是导致老年人认知障碍和痴呆最常见的原因。临床上表现为记忆障碍、失语、失用、失认、视空间能力损害等[1]。AD的主要发病机制之一是淀粉样蛋白( $A\beta$ )的肽不溶性沉积,它是一种叫做淀粉样前体蛋白(APP)由 $\beta$ 和 $\gamma$ 分泌酶依次顺序裂解而成的[2]。 $A\beta$ 具有折叠性和粘性,易于聚集成大型的不溶性纤维,这些纤维以斑块形式在大脑中沉积。在AD模型的大脑中所观察到的 $A\beta$ 在脑实质中异常聚集( $A\beta$ 斑块),主要的原因是 $A\beta$ 清除能力下降,而不是 $A\beta$ 生成过多[3]。从肽类物质的特性来看, $A\beta$ 的被动转运能力欠佳,需要依赖转运蛋白才能穿过血脑屏障(BBB)。低密度脂蛋白受体相关蛋白-1 (LRP1)是介导 $A\beta$ 以游离形式或者与伴侣分子(如载脂蛋白E)相结合后通过血脑屏障进行清除的主要受体[4]。在血脑屏障腔侧有所表达的P-糖蛋白(P-gp),则发挥着介导 $A\beta$ 流出至外周循环的作用[5]。据相关报道,在AD患者体内,血脑屏障处LRP1和P-gp的表达水平有所降低,这一变化有利于 $A\beta$ 在大脑中不断积累[6]。血浆中的 $A\beta$ (其中包含了从大脑中流出的 $A\beta$ ),主要是通过肝脏以游离状态或者与血浆脂蛋白相结合的形式被快速清除掉。近期,部分研究报道称,内源性可溶性循环低密度脂蛋白受体相关蛋白(sLRP)在清除全身 $A\beta$ 的“汇活性”以及维持 $A\beta$ 脑内稳态方面,有着至关重要的作用。通常情况下,LRP能够结合70%~90%的 $A\beta$ 并形成复合物,该复合物无法穿过血脑屏障进入大脑,进而有利于 $A\beta$ 主要通过肝脏来消除。然而,在AD疾病状态下,sLRP1大部分会发生氧化,这

就阻碍了它与循环中的 A $\beta$ 40 相结合, 进而导致游离 A $\beta$ 40 的血浆水平急剧升高[7]。

LRP1 在肝脏中呈现高表达, 并且已被证实可抑制小鼠肝脏对 A $\beta$  的摄取[8], 在中发现, 通过对小鼠投喂高脂饮食, 能够以时间依赖性的方式降低肝脏 LRP1 在细胞膜上的表达量, 同时还能以促进小胶质细胞活化的同时增加淀粉样斑块[9]。多项研究均已证明, 肝脏是外周循环中 A $\beta$  清除的主要途径, 并且指出血浆 A $\beta$  若不能被正常清除, 在很大程度上会诱发阿尔茨海默病(AD)。然而, 过往的这些研究大多将重点聚焦于 LRP1 对 A $\beta$  肝脏清除所做出的贡献。尽管 LRP1 已被认定为 A $\beta$  全身清除的主要途径, 但在 A $\beta$  肝脏清除过程中, 其他发挥作用的肝脏转运机制仍有待进一步深入探究。鉴于此, 在本研究中, 我们致力于对 A $\beta$ 40 肝脏摄取以及胆汁排泄的机制进行详细的表征, 并且运用体外 HepG2 细胞联合培养 HSCE 细胞(SCH)来研究 P-gp、LRP1 等转运蛋白在这一过程中所扮演的角色。之所以采用这一细胞模型, 是因为它为研究底物载体转运赋予了独特的优势。由于 P-gp 在脑组织中有所表达, 且有助于维持 A $\beta$  的脑内稳态, 我们由此提出假设: 除 LRP1 之外, P-gp 也参与介导 A $\beta$  的肝脏摄取以及胆汁消除过程。

## 2. 实验材料

### 2.1. 主要试剂

人肝窦内皮细胞永生化(批号: iCell-0019a)、ECM 培养基(批号: iCell-h070-001b)和 DMEM 高糖培养基(批号: iCell-138-0001)购自上海赛百康; 胎牛血清(德国 PAN-Biotech, 批号: P150407); LRP1 蛋白一抗(批号: ab3572)和 P-gp 蛋白一抗(批号: ab3366); 购自英国 Abcam 公司; GAPDH 蛋白一抗(批号: P60037M)和羊抗兔 Ig(H+L)-HRP(批号: Ab392644)均购自中国 Abmart 公司; 罗丹明 123 (上海麦克林, 批号: R817327); Transwell-膜嵌套(美国 corning 公司, 批号: 3460); FITC-A $\beta$ 42 (Absci, 批号: FT-42-T1)。

### 2.2. 主要仪器

电子天平(瑞士梅特勒 - 托利多公司); 无菌超净台(Thermo 公司); 酶标仪(Leica 公司); 光学显微镜(德国 Leica 公司); 荧光显微镜(Leica 公司); 生物显微镜(日本 Nikon 公司); 二氧化碳恒温培养箱(Thermo 公司); 电泳仪(BIO-RAD 公司); 电泳槽(BIO-RAD 公司)。显影仪(LAS 500 公司)。

## 3. 实验步骤

### 3.1. 细胞复苏和培养

预热培养基和一个细胞培养瓶。将 HepG2 和 HSCE 细胞瓶从液氮罐取出后置于 37℃ 的水浴锅中解冻。解冻后吸出细胞混悬液转入装有 15 mL 离心管中, 向离心管中加入 2 mL 预热后的细胞培养基, 在 25℃, 1000 r/min 离心机中离心 5 min。弃上清液, 加入 1 mL 预热培养基使细胞重悬并接种于培养瓶中置于 5% CO<sub>2</sub>, 37℃ 细胞培养箱中培养并标记细胞名称、日期。

HSCE 细胞被放置在含有 5% 胎牛血清、1% 青霉素 - 链霉素混合物的 ECM 培养基中培养, 而 HepG2 细胞被放置在含有 5% 胎牛血清和 1% 青霉素 - 链霉素混合物的 DEME 培养基中培养, 以确保其正常生长和繁殖。细胞被放置在 5% CO<sub>2</sub> 的 37℃ 恒温培养箱中, 以维持稳定的生长环境。

### 3.2. 药物的制备

贯叶金丝桃素由本课题组自己提取, 其原液浓度为 450 mg/25 mL。

#### 维拉帕米

精密称取 0.010 g 的维拉帕米, 将药物溶解于 0.1 mL DMSO 中, 用纯水稀释至 1 mL, 配制成原液浓度为 22,000  $\mu$ M。后续用母液进行稀释, 终浓度为 50  $\mu$ M 进行后续实验。

### 3.3. 体外细胞实验浓度筛选

本实验采用 CCK-8 方法分别测定不同浓度的贯叶金丝桃素对细胞的毒性作用, 筛选出最佳药物浓度。将 100  $\mu\text{L}$  的细胞悬液( $2 \times 10^5$  个/孔)与等体积的培养基混合后, 分别加入 96 孔板的每个孔中。将培养板置于培养箱中预培养 24 h, 使细胞贴壁生长。随后, 移除原有培养基, 并向每个孔中加入 100 微升不同浓度的贯叶金丝桃素溶液(0、0.01、0.1、1、10、100  $\mu\text{M}$ ) [4]刺激细胞 24 h 后, 在每个孔中加入 10  $\mu\text{L}$  的 CCK-8 溶液和 90  $\mu\text{L}$  无血清 DEME 培养基, 继续放入培养箱内孵育 2 h。用酶标仪测定各孔在 450 nm 的吸光度。

### 3.4. 慢病毒转录

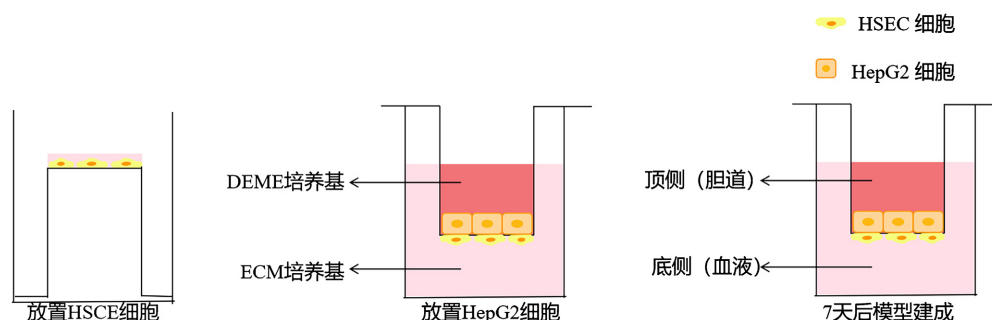
将 HepG2 细胞进行传代铺板, 每个孔接种  $2 \times 10^5$  个细胞, 铺板后将细胞置于  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中孵育 24 h。取 0.2 ml 的病毒置于适量的 20 ml 培养基中, 轻轻混匀。每个培养瓶中加入 2 ml 培养基孵育过夜。去除含病毒的培养基, 并用新鲜的完全培养基替换。去除含病毒的培养基, 并用新鲜的完全培养基替换。在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  至 48~72 小时, 使病毒基因与靶细胞整合并表达。然后, 收获细胞进行 WesternBlot 检测细胞 P-gp 蛋白表达, 验证基因沉默细胞是否构建成功, 将成功构建的 PXR 基因沉默细胞株分进行后续的实验。

### 3.5. Western Blot 法测定蛋白

采用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度后, 根据蛋白上样量和细胞样品蛋白浓度, 计算蛋白体积并加入相对体积 5 倍的蛋白上样缓冲液, 以蛋白裂解液补齐剩余体积, 以使蛋白上样缓冲液被稀释至 1 倍。取 30  $\mu\text{g}$  蛋白经变性后用 10%的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离, 湿转移至硝酸纤维素(NC)膜, 用含 5%脱脂奶粉的 Tris-Hcl 缓冲盐溶液(TBST)室温封闭 2 h, 分别孵育 P-gp (180 kD)、LRP1 (85 kD)、和 GADPSH (36 kD)的一抗,  $4^\circ\text{C}$ 摇床过夜。洗涤后孵育二抗 1 h, 与 ECL 化学发光液反应后, 成像系统进行自动曝光, 并用 ImageJ 软件测定各显色条带的光密度值进行分析。以各组目的蛋白/内参灰度值的比值作为各组蛋白表达的相对含量。

### 3.6. 肝细胞双层膜屏障的建立

transwell 小室倒置将 0.5 mL HSEC 细胞( $2 \times 10^5$  个/孔)接种到小室, 放置 4~6 h 至细胞贴壁。再将 1mLHpeG2 细胞( $2 \times 10^5$  个/孔)接种到 12 孔 Transwell 板。在顶侧(Apicalside, AP)加入 0.2 mL DEME 培养基, 在基底侧(Besideside, BL)加入 1 mL 的 ECM 培养基并在  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中培养。之后每天更换 ECM 培养基至 7 天后形成膜, 做后续实验(见图 1)。



**Figure 1.** Establishment of liver cell sandwich model  
**图 1.** 肝细胞三明治模型建立

### 3.7. 罗丹明 123 在三明治培养肝细胞模型中的外排

为了确定 ABCB1/P-gp 转运活性, 在建立好的模型中加入 P-gp 特异性底物 Rho123 孵育 4 小时[10]。

取 100 mg Rho123 加入 10 mL PBS 中并用 PBS 稀释至 1 mg/mL, 得到储备液。精密吸取储备液适量, 用 PBS 稀释至 50  $\mu\text{g/mL}$ , 作为转运实验的给药浓度。然后同样的方法加 Rho123 储备液稀释得到 0、3.125、6.25、12.5、25、50  $\mu\text{g/mL}$  的标准曲线溶液。

在各外室加入 1.5 mL 浓度为 50  $\mu\text{M}$  的 Rho123, 内室加入 0.5  $\mu\text{L}$  PBS 共培育 4 h 后取出外 AP 侧取出 100  $\mu\text{L}$  的转运溶液至 96 孔板中, 复孔 5 个, 并在酶标仪上测定取出溶液和标准曲线中 Rho123 ( $\text{Ex} = 500$ ) 的 OD 值, 从而计算从 AP 侧取出的转运溶液中伊文思蓝的浓度及通透系数 Pa 值[11]。

$$P_{\text{app}} = (dQ/dt)/(A * C_0)$$

( $C_0$  是药物初始浓度,  $dQ/dt$  为接收的药物出现的速率,  $A$  为聚碳酸酯膜的表面积。一般认为, 吸收良好的药物, 其表观渗透系数为  $P_{\text{app}} > 1 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ ; 而吸收较差的药物, 其  $P_{\text{app}} < 1 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$ 。)

### 3.8. FAM-A $\beta$ 在三明治培养肝细胞模型中的外排

FAM-A $\beta$  储备液稀释得到 0、31.25、62.5、125、250、500 ng/mL 的标准曲线溶液, 用 485 nm 激发光和 535 nm 发射光检测其荧光值。

在各外室加入 1.5 mL 浓度为 500 ng/mL FITC-A $\beta$ 42, 内室加入 500  $\mu\text{L}$  PBS 共培育 4 h 后取出 BP 测上清液至 96 孔板中, 使用酶标仪检测 FITC-A $\beta$ 42, 的荧光。根据其标准曲线检测每组样品中 FITC-A $\beta$ 42 的浓度(单位为 ng/mL), FITC-A $\beta$ 42 用  $P_{\text{app}}$  表观通透系数的 A $\beta$  转换。

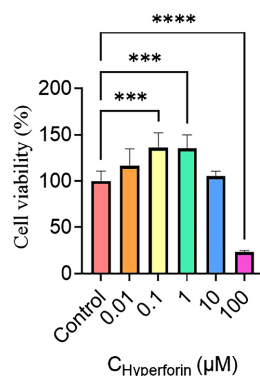
### 3.9. 统计学分析

数据采用 excel 进行分析, 计量数据采用  $\pm s$  表示, 多组间比较采用方差分析, 两组间比较采用 t 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 4. 结果

### 4.1. 贯叶金丝桃素给药剂量的确定

用 0.01、0.1、1、10、100  $\mu\text{M}$  的 HYP 处理细胞 24 h 后, 其 CCK-8 结果显示, 100  $\mu\text{M}$  HYP 显著降低细胞存活率( $P < 0.05$ ) (见图 2), 结合参考文献, 本研究选择了 0.5  $\mu\text{M}$  进行后续实验[12]。



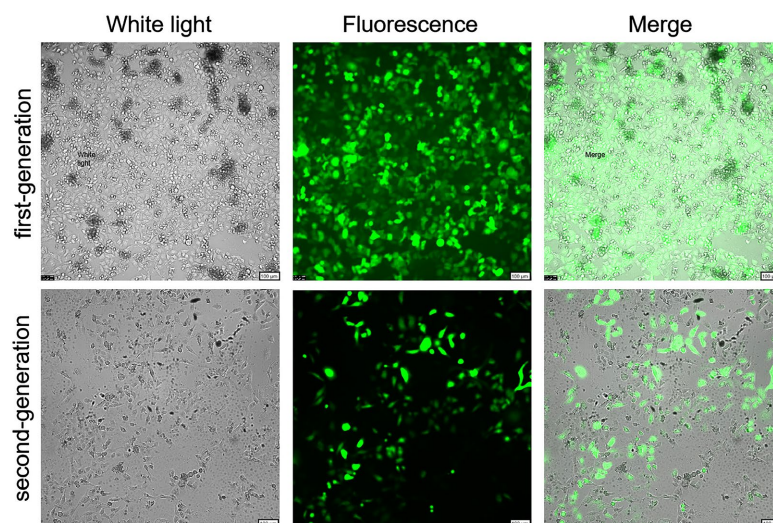
**Figure 2.** The effect of different concentrations of Hypericin on the activity of HSEC cells compared to the control group ( $n = 6$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.001$  compared to the control group)

**图 2.** 不同浓度的贯叶金丝桃素对 HSEC 细胞的活性影响其数据显示与对照组相比 ( $n = 6$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.001$  与对照组相比)

## 4.2. PXR 基因沉默细胞的验证

表达 PXR 的慢病毒采用 MOI 由于慢病毒载体含荧光, 为此转染 24 小时后, 我们选择激发波长 488 nm/发射波长 507 nm, 在蓝光激发下观察 GFP/RFP 阳性细胞比例, 阳性率  $\geq 80\%$ , 证明转染效率良好(见图 3)。

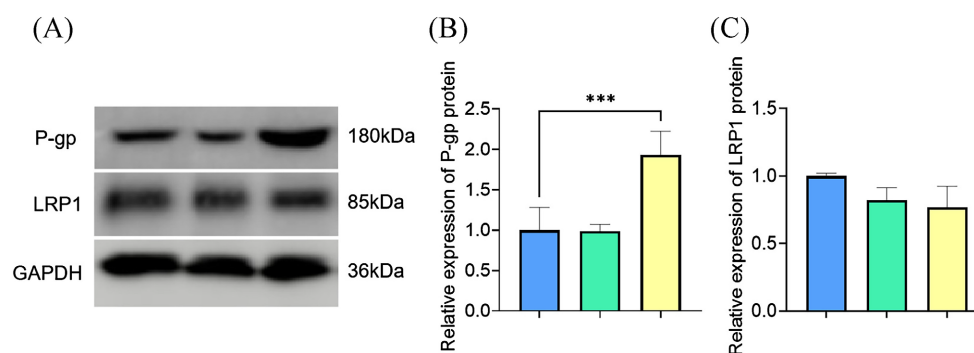
经 2 代传代培养, 通过荧光显微镜观察到 GFP 标记基因阳性率  $\geq 80\%$ , 则证明 GFP 标记基因稳定传代表达。



**Figure 3.** Results of transfection of HpeG2 with lentivirus

**图 3.** 慢病毒转染 HpeG2 结果

慢病毒转染后的 HepG2 细胞, 予以 HYP 干预后, P-gp 蛋白表达增加, 但 LRP1 蛋白水平略微降低(详见图 4), 证明转染成功。



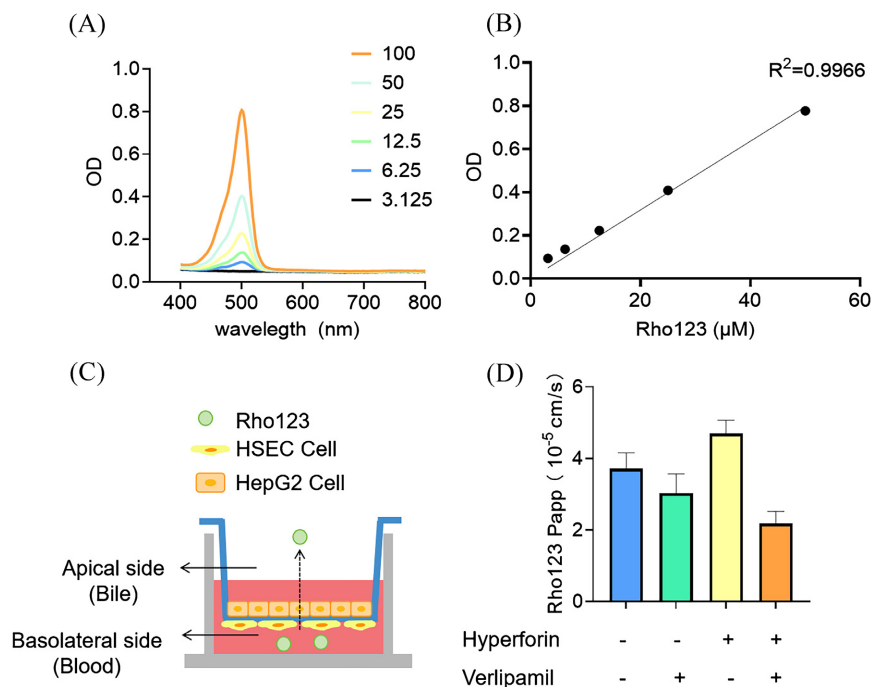
**Figure 4.** Effects of different treatments on P-gp protein expression in HepG2 cells

**图 4.** 不同处理对 HepG2 细胞中 P-gp 蛋白表达影响

## 4.3. hCMEC/D3 细胞单层膜屏障转运能力测定

通过酶标仪对罗丹明 123 溶液进行全波长扫描(400~800 nm), 结果显示其在 507 nm 处存在最强吸收峰, 表明该波长下染料分子对光能的吸收能力最强(见图 5)。HepG2 细胞和 HSCE 细胞共孵育 7 天后采用 HYP 处理 24 h, 用 Rho123 的表现通透性评估胆管细胞 P-gp 外排。图 5(C)的结果显示, 与对照组相比,

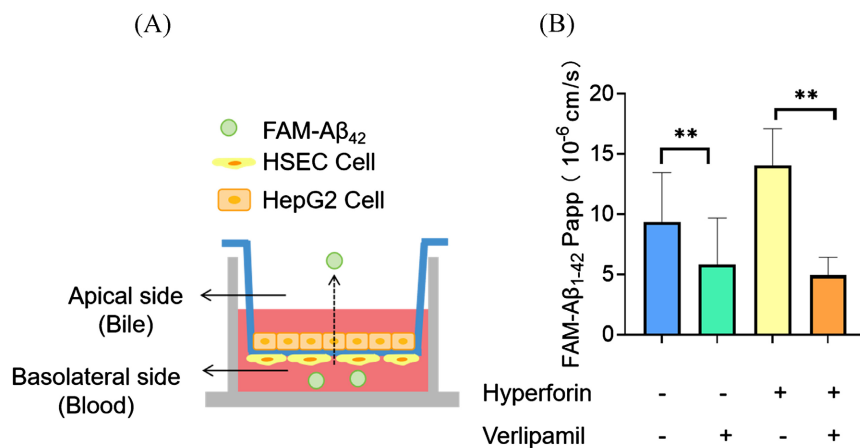
用 HYP 刺激 24 小时后, 其 Rho123 的 Papp 值增加, 表明模型中 P-gp 外排能力增强。并且使用维拉帕米导致 Rho123 的 Papp 值显著性下降。以上提示 HYP 可以增强 HepG2 细胞中 P-gp 的胆管细胞外排的活性, 但是这种效果能够被维拉帕米阻断。



注: (A) Rho123 波长; (B) Rho123 标准曲线; (C) Rho123 从 BP 侧到 AP 侧示意图; (D) Rho123 从 BP 侧到 AP 侧的表观通透性。

**Figure 5.** Measures the transport volume of Rho123 in the liver cell sandwich model and evaluates the transport function of P-gp

**图 5.** 测量 Rho123 在肝细胞三明治模型中的转运量, 评估 P-gp 的转运功能



注: (A) FITC-A $\beta_{42}$  在 hCMEC/D3 细胞单层膜中的转运量示意图; (B) FITC-A $\beta_{42}$  从 BP 侧到 AP 端的 Papp 值, 其数据显示与对照组相比(n=3; \*, P<0.05; \*\*, P<0.01; \*\*\*, P<0.001)。

**Figure 6.** Measures the transport capacity of FITC-A $\beta_{42}$  in the blood-brain barrier

**图 6.** 测量 FITC-A $\beta_{42}$  在血脑屏障中转运能力

图6的结果显示, HYP增加了 FITC-A $\beta$ <sub>42</sub> 从 BP 侧到 AP 侧的 Papp 值, 采用维拉帕米干预后, FITC-A $\beta$ <sub>42</sub> 从 BP 侧向 AP 侧的 Papp 值有显著性下降。以上结果提示 HYP 能够增强脑血管中内皮细胞里 P-gp 的活性从而增强 BBB 对 A $\beta$ <sub>42</sub> 转运能力。

## 5. 讨论

阐明 A $\beta$  的肝脏转运机制可能为开发新治疗靶点提供思路——通过增强肝脏对 A $\beta$  的全身清除效率, 进而降低脑内 A $\beta$  负荷。尽管现有研究已聚焦于 LRP1 在肝细胞转运 A $\beta$  中的作用[13], 但对于 P-gp 这一在 A $\beta$  跨血脑屏障(BBB)转运及肝脏清除中均具明确功能的转运蛋白, 其具体机制仍知之甚少[14]。因此, 为全面解析这些转运蛋白在 A $\beta$ <sub>42</sub> 肝脏清除中的作用机制, 本研究采用三明治培养的永生化人源 HepG2 肝细胞和肝窦内皮细胞(HSCE)开展相关实验。为此, 我们选择一种人源强效 PXR 激活剂 - 贯叶金丝桃素 (Hyperforin, HYP) [15]作为干预药物, 是圣·约翰草提取物的活性成分之一, 临床上主要用于治疗抑郁症。我们之前的研究发现 HYP 仅上调 P-gp 但对 LRP1 无任何作用, 提示 HYP 有治疗阿尔茨海默病(AD)的潜力, 但是具体的治疗机制尚不清楚。既往报道激活 PXR 可以诱导 P-糖蛋白和 CYP3A4 酶上调[16]。本章证明 HYP 激活 PXR 后可通过增强 HepG2 细胞中 P-gp 的活性来增加肝胆系统对 A $\beta$ <sub>42</sub> 转运机制。首先进行 HYP 安全浓度的评价, 通过不同浓度的 HYP 处理 HSCE 细胞后, 根据细胞存活率及 HYP 在血液中实际的含量选择 5  $\mu$ M 进行干预。多项研究通过定量 PCR (qPCR)和 Western blot 检测发现, HepG2 细胞中 hPXR 蛋白表达水平显著低于原代人肝细胞[17], 为了提高 hPXR 靶基因的基础表达, 通过慢病毒转染并稳定转染后 HYP 处理后可显著性升高 HepG2 细胞内 P-gp 的表达证明转染成功。

罗丹明 123 (Rhodamine123, Rdm123)作为一种荧光探针, 许多研究将其视作为染色胆管细胞一种标记染料。本章建立一种三明治模型建, 然后使用 Rho123 测试了胆管细胞的功能, Rho123 是通过多种跨膜通道蛋白如多药耐药蛋白 1 (P-gp)转运小物质。其 P-gp 主要定位于肝细胞的胆小管侧膜(Canalicular Membrane), 在三明治模型中属于顶膜(Apical Membrane)区域[18]。发现 Rdm123 可以被 HepG2 细胞摄取并储存于细胞质中, 并且在黄迪等人实验中发现 Rdm123 摄取后逐渐被排泄入胆管中[19]。为明确三明治模型成立, 我们选取 AP 侧的 Rho123 的 Papp 来计算转运能力。与正常组相比, HYP 能够增加 Rho123 Papp 值, 说明了 HYP 能够增强 Rho123 外排。并且应用了一种 P-gp 的特异性抑制剂维拉帕米, 维拉帕米能够在不减少 P-gp 表达量的同时抑制 P-gp 的转运活性[20]。给予维拉帕米后, 其 Rho123 的 Papp 值显著性降低, 证明在三明治模型中肝 - 胆的模型建立成功同时可以验证 P-gp 的转运活性。接下来我们使用 FITC-A $\beta$ <sub>42</sub> 以检测 P-gp 将 A $\beta$ <sub>42</sub> 转运胆管的能力, 研究结果显示: HYP 孵育 24 h 之后, 其 FITC-A $\beta$ <sub>42</sub> 的 Papp 值升高, 说明三明治模型对 A $\beta$ <sub>42</sub> 转运能力升高, 同时给予 Verlipamil 的 FITC-A $\beta$ <sub>42</sub> 的 Papp 值降低, 证明通过上调 HepG2 的 P-gp 蛋白的表达和转运活性水平, 能够提升该模型对 A $\beta$ <sub>42</sub> 外排能力。

总而言之, 本研究提供了一种永生化细胞的肝胆模型, 并使用 Rho123 验证模型成立同时证明上调 P-gp 能够促进肝胆排泄 A $\beta$ <sub>42</sub>。

## 参考文献

- [1] Ferrari, C. and Sorbi, S. (2021) The Complexity of Alzheimer's Disease: An Evolving Puzzle. *Physiological Reviews*, **101**, 1047-1081. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2020>
- [2] Grøntvedt, G.R., Schröder, T.N., Sando, S.B., White, L., Bråthen, G. and Doeller, C.F. (2018) Alzheimer's Disease. *Current Biology*, **28**, R645-R649. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.04.080>
- [3] Oh, H.S., Rutledge, J., Nachun, D., et al. (2023) Organ Aging Signatures in the Plasma Proteome Track Health and Disease. *Nature*, **624**, 164-172. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06802-1>
- [4] Shinohara, M., Tachibana, M., Kanekiyo, T. and Bu, G. (2017) Role of LRP1 In the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: Evidence from Clinical and Preclinical Studies. *Journal of Lipid Research*, **58**, 1267-1281.

- <https://doi.org/10.1194/jlr.R075796>
- [5] Wani, A., Al Rihani, S.B., Sharma, A., Weadick, B., Govindarajan, R., Khan, S.U., Sharma, P.R., Dogra, A., *et al.* (2021) Crocetin Promotes Clearance of Amyloid- $\beta$  By Inducing Autophagy Via the STK11/LKB1-Mediated AMPK Pathway. *Autophagy*, **17**, 3813-3832. <https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1872187>
  - [6] Alkhalifa, A.E., Al-Ghraiyyah, N.F., Odum, J., Shunnarah, J.G., Austin, N. and Kaddoumi, A. (2023) Blood-Brain Barrier Breakdown in Alzheimer's Disease: Mechanisms and Targeted Strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, **24**, Article 16288. <https://doi.org/10.3390/ijms242216288>
  - [7] Yang, W., Wei, Z. and Wang, T. (2025) Unraveling the Role of LRP1 In Alzheimer's Disease: A Focus on AB Clearance and the Liver-Brain Axis. *Journal of Molecular Neuroscience*, **75**, Article No. 43. <https://doi.org/10.1007/s12031-025-02339-2>
  - [8] 余琴. 慢性锰暴露对大鼠认知功能的影响及机制初探[D]: [硕士学位论文]. 遵义: 遵义医科大学, 2019.
  - [9] Kim, D.G., Krenz, A., Toussaint, L.E., Maurer, K.J., Robinson, S.A., Yan, A., Torres, L. and Bynoe, M.S. (2016) Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Induces Signs of Alzheimer's Disease (AD) in Wild-Type Mice and Accelerates Pathological Signs of AD In an AD Model. *Journal of Neuroinflammation*, **13**, Article No. 1. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0467-5>
  - [10] 蒋福霞. 苯海索对 OGD 后体外血脑屏障上 P-Gp 变化的影响[D]: [硕士学位论文]. 开封: 河南大学, 2021.
  - [11] Dauchy, S., Miller, F., Couraud, P.O., Weaver, R.J., Weksler, B., Romero, I.A., Scherrmann, J.M., de Waziers, I. and DeclÈves, X. (2009) Expression and Transcriptional Regulation of ABC Transporters and Cytochromes P450 In Hmcc/D3 Human Cerebral Microvascular Endothelial Cells. *Biochemical Pharmacology*, **77**, 897-909. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.11.001>
  - [12] Caccia, S. (2005) Antidepressant-Like Components of Hycicum Perforatum Extracts: An Overview of Their Pharmacokinetics and Metabolism. *Current Drug Metabolism*, **6**, 531-43. <https://doi.org/10.2174/138920005774832641>
  - [13] Sagare, A.P., Deane, R. and Zlokovic, B.V. (2012) Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1: A Physiological AB Homeostatic Mechanism with Multiple Therapeutic Opportunities. *Pharmacology & Therapeutics*, **136**, 94-105. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.07.008>
  - [14] Storck, S.E., Hartz, A.M.S., Bernard, J., Wolf, A., Kachlmeier, A., Mahringer, A., Weggen, S., Pahnke, J. and Pietrzik, C.U. (2018) The Concerted Amyloid-Beta Clearance of LRP1 and ABCB1/P-GP across the Blood-Brain Barrier Is Linked By PICALM. *Brain, Behavior, and Immunity*, **73**, 21-33. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.07.017>
  - [15] Moore, L.B., Goodwin, B., Jones, S.A., Wisely, G.B., Serabjit-Singh, C.J., Willson, T.M., Collins, J.L. and Klierer, S.A. (2000) John's Wort Induces Hepatic Drug Metabolism Through Activation of Thepregnane X Receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 7500-7502. <https://doi.org/10.1073/pnas.130155097>
  - [16] Šmeláková, M., Jendželovský, R. and Fedoročko, P. (2016) Drug Membrane Transporters and CYP3A4 Are Affected by Hypicin, HYP or Aristoforin in Colon Adenocarcinoma Cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **81**, 38-47. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.03.045>
  - [17] Staudinger, J.L., Goodwin, B., Jones, S.A., Hawkins-Brown, D., Mackenzie, K.I., Latour, A., Liu, Y., *et al.* (2001) The Nuclear Receptor PXR Is a Lithocholic Acid Sensor that Protects Against Liver Toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 3369-3374. <https://doi.org/10.1073/pnas.051551698>
  - [18] Wu, T., Sheng, Y., Qin, Y.Y., Kong, W.M., Jin, M.M., Yang, H.Y., Zheng, X.K., Dai, C., Liu, M., Liu, X.D. and Liu, L. (2021) Bile Duct Ligation Causes Opposite Impacts on the Expression and Function of BCRP and P-GP in Rat Brain Partly via Affecting Membrane Expression of Ezrin/Radixin/Moesin Proteins. *Acta Pharmacologica Sinica*, **42**, 1942-1950. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-00602-3>
  - [19] 黄迪, 黄宇, 黄子圣, 等. 罗丹明 123 联合 MDR1 抑制剂维拉帕米鉴别肝细胞和胆管细胞[J]. 江西医药, 2021, 56(11): 1868-1871+1884.
  - [20] 唐慧皓. 生地榆促黑素生成及其机制的研究[D]: [硕士学位论文]. 上海: 上海中医药大学, 2021.