

· 基础研究 ·

鱼腥草提取物去甲头花千金藤二酮 B 对 H_2O_2 诱导的海马神经元损伤的作用及可能机制

曹桂花¹, 李娟², 王晓明¹, 贾新^{1*}

(空军军医大学第一附属医院,¹ 老年病科,² 神经外科, 西安 710032)

【摘要】 目的 探讨鱼腥草提取物去甲头花千金藤二酮 B (NB) 对 H_2O_2 诱导的海马神经元细胞损伤的作用及可能机制。**方法** 将对数生长期的 HT22 海马神经细胞分为正常对照组、 H_2O_2 处理组、NB 干预组 (H_2O_2 +NB)、单独 NB 组和阳性药物对照组 (H_2O_2 +NAC)。其中 H_2O_2 组为加入终浓度为 300 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 与细胞共孵育 24 h; H_2O_2 +NB 组和 H_2O_2 +NAC 组是于 H_2O_2 处理前 2 h 分别给予 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 NB 或 5 mmol/L 的 NAC 共孵育 24 h。为明确磷脂酰肌醇-3 激酶/蛋白激酶 B/血红素氧合酶 1 (PI3K/Akt/HO-1) 途径是否参与了 NB 的神经保护作用, 对细胞给予 PI3K 抑制剂 Ly294002 预处理 30 min, 再加入 NB 及 H_2O_2 共孵育 24 h。CCK-8 法检测细胞存活率, 流式细胞仪检测细胞凋亡率, 生化试剂盒检测细胞超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 及谷胱甘肽 (GSH) 及细胞上清液乳酸脱氢酶 (LDH) 水平, Western blotting 检测凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bax, 及相关信号通路蛋白 p-Akt 和 HO-1 水平。采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 组间比较采用方差分析或 Tukey's 检验。**结果** (1) 细胞活性。与空白对照组比较, H_2O_2 组细胞存活率明显下降, 细胞上清 LDH 含量显著增加, 细胞形态出现明显皱缩、空泡变性及细胞减少。给予 NB 或 NAC 干预可显著增加细胞活性、减少 LDH 释放, 细胞形态的破坏得到明显改善。(2) 氧化损伤指标。与正常对照组比较, H_2O_2 组细胞 MDA 水平显著增加, SOD 及 GSH 活性显著降低; 与 H_2O_2 组比较, 加入 NB 或 NAC 的细胞 MDA 漏出量显著降低, SOD、GSH 活性显著升高。(3) 细胞凋亡情况。流式细胞术结果显示, 与正常对照组比较, H_2O_2 组细胞凋亡率明显增高, 加入 NB 及 NAC 处理后, 与 H_2O_2 组比较, 细胞凋亡率显著降低 ($P<0.05$)。Western blotting 结果显示, 与正常对照组比较, H_2O_2 处理组 Bcl-2 表达显著下降, Bax 水平显著升高; 与 H_2O_2 处理组比较, 给予 NB 或阳性药物 NAC 处理的细胞 Bcl-2 显著升高, Bax 水平显著下降。(4) 相关信号通路蛋白表达。Western blotting 显示, 与正常对照组比较, H_2O_2 组 p-Akt、HO-1 水平升高; 与 H_2O_2 组相比, NB + H_2O_2 组 p-Akt、HO-1 水平显著升高 ($P<0.05$)。上述所有指标在正常对照组与 NB 组细胞间比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。另外, 加入 Ly294002 组的细胞 p-AKT 及 HO-1 表达水平均较 H_2O_2 +NB 组显著降低。**结论** NB 可通过抗氧化、抗凋亡减轻 H_2O_2 诱导的神经元损伤, 发挥神经保护作用, 其机制可能是激活 PI3K/Akt/HO-1 信号通路。

【关键词】 氧化应激; 信号通路; 神经保护; 去甲头花千金藤二酮 B

【中图分类号】 R745.1 **【文献标志码】** A **【DOI】** 10.11915/j.issn.1671-5403.2019.12.194

Effects of norcepharadion B extracted from *Houttuynia cordata* on hippocampal neurons injury induced by H_2O_2 and its possible mechanism

CAO Gui-Hua¹, LI Juan², WANG Xiao-Ming¹, JIA Xin^{1*}

(¹Department of Geriatrics, ²Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital of the Air Force Medical University, Xi'an 710032, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of norcepharadion B (NB) extracted from *Houttuynia cordata* on the injury of hippocampal neurons induced by H_2O_2 and its possible mechanism. **Methods** Hippocampal nerve cells (HT22) in logarithmic growth phase were divided into control group, H_2O_2 group, H_2O_2 +NB group, NB group and H_2O_2 +NAC group. H_2O_2 group were incubated with H_2O_2 at a final concentration of 300 $\mu\text{mol/L}$ for 24 h; the H_2O_2 +NB group were treated with 100 $\mu\text{mol/L}$ NB and H_2O_2 +NAC group with 5 mmol/L NAC for 2 hours before incubation with H_2O_2 for 24 h. To determine whether phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B/heme oxygenase-1 (PI3K/Akt/HO-1) pathway is involved in the neuroprotection of NB, the neurons were pretreated with Ly294002, a PI3K inhibitor, for 30 min before incubation with NB and H_2O_2 for 24 h. Cell survival rate was detected by CCK-8 test and apoptosis by flow cytometry. Lactate dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH) and malondialdehyde malonic dialdehyde (MDA) were measured by biochemical kit. Western blotting was performed to detect the expression of B-cell

收稿日期: 2019-07-24; 接受日期: 2019-08-28

基金项目: 国家自然科学基金 (81870184)

通信作者: 贾新, E-mail: qianhao0916@163.com

lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein(Bax), and phosphorylated Akt (p-Akt) and HO-1. SPSS statistics 19.0 was used for analysis. ANOVA or Tukey's test was used for intergroup comparison. **Results** (1) Cell activity. Compared with control group, the survival rate of H_2O_2 group decreased significantly, LDH in the cell supernatant increased significantly, cell shrinkage, vacuole degeneration and cell reduction were observed. However, intervention with NB or NAC significantly increased cell activity, reduced LDH release, and significantly improved cell morphological damage. (2) Oxidative damage indicators. Compared with control group, MDA in H_2O_2 group increased significantly, and SOD and GSH decreased significantly; compared with H_2O_2 group, MDA leakage decreased significantly after the intervention with NB or NAC, and the SOD and GSH activities increased significantly. (3) Apoptosis. Flow cytometry showed that the apoptosis rate in the H_2O_2 group was significantly higher than that in the control group, and the apoptosis rate of H_2O_2 group was significantly lower than that in H_2O_2 +NB group and H_2O_2 +NAC group ($P<0.05$). Western blotting showed that compared with control group, Bcl-2 in H_2O_2 group decreased significantly, and the Bax level increased significantly; compared with H_2O_2 group, Bcl-2 in the H_2O_2 +NB group or H_2O_2 +NAC group increased significantly, and the Bax level decreased significantly. (4) Western blotting showed that p-Akt and HO-1 in H_2O_2 group were higher than those in control group, and p-Akt and HO-1 in the NB+ H_2O_2 group were significantly higher than those in H_2O_2 group ($P<0.05$). There was no significant differences between control group and NB group in the indicators all above ($P>0.05$). In addition, the expression level of p-Akt and HO-1 in Ly294002 + H_2O_2 + NB group was significantly lower than that in H_2O_2 +NB group. **Conclusion** NB provides neuroprotection by mitigating the neural injuries induced by H_2O_2 through anti-oxidation and anti-apoptosis, whose underlying mechanism may be attributed to signaling pathway of the activation of the PI3K/Akt/HO-1.

【Key words】 oxidative stress; signaling pathways; neuroprotection; norcepharadione B

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81870184).

Corresponding author: JIA Xin, E-mail: qianhao0916@163.com

氧化应激与中枢神经系统多种疾病如脑卒中、帕金森病、阿尔兹海默病等的发生发展密切相关^[1,2]。氧化应激所导致的机体内氧化系统和抗氧化系统失衡,可引起细胞内蛋白质、脂质及DNA过氧化修饰,继而引发线粒体功能障碍,导致细胞损伤或死亡,而脑组织的氧代谢率极高,其抗氧化活性较低,且再生能力差,对氧化应激更为敏感,因此保护脑细胞、抵抗氧化损伤具有重要意义^[3,4]。去甲头花千金藤二酮B(norcepharadione B,NB)是提取自传统中草药鱼腥草的一种阿朴菲型生物碱。既往研究表明,NB具有诸多器官保护功效,其在抗氧化、改善心肌缺血、改善神经功能方面作用显著;除此之外,NB还有较强的抗病毒、抗炎及抗血小板聚集功效^[5]。但目前关于NB是否具有抗氧化及抵抗氧化应激损伤的神经保护作用还未可知。因此,本实验采用 H_2O_2 诱导小鼠海马HT22神经细胞制备氧化损伤模型,探讨NB发挥神经元保护作用的可能分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

HT22细胞系由空军军医大学西京医院神经外科实验室馈赠。NB(纯度>98%)购自中国武汉天植生物技术公司;DMEM培养基及PBS缓冲液购自美国Corning公司;胎牛血清购自英国Gibco公司;DMSO及 H_2O_2 购自美国Sigma公司;CCK-8试剂盒购自美国MCE公司;RIPA裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒、超敏ECL化学发光试剂盒购自广州碧云天生物技术研究;乳酸脱氢酶(lactate dehydro-

genase,LDH)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)、丙二醛(malondialdehyde malonic dialdehyde,MDA)及谷胱甘肽(glutathione,GSH)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;N-乙酰-L-半胱氨酸(N-acetyl-L-cysteine,NAC)和PI3K抑制剂Ly294002购自碧云天生物技术研究;蛋白激酶B(protein kinase,Akt)、磷酸化的Akt(p-Akt)、B细胞淋巴瘤/白血病-2原癌蛋白(B-cell lymphoma/leukemia-2,Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 associated X protein,Bax)抗体购自美国Cell Signaling公司; β -actin及血红素氧合酶1(heme oxygenase-1,HO-1)抗体购自美国Santa Cruz公司。

1.2 细胞培养及处理

将HT22细胞置于5% CO_2 、37℃培养箱,用含10%胎牛血清的高糖DMEM培养基(含1%青链霉素)培养,隔天换液一次。当细胞成长融合至80%以上时用0.25%胰蛋白酶消化传代;当细胞进入对数生长期即可进行后续加药处理。将细胞分为正常对照组、 H_2O_2 处理组、NB干预组(H_2O_2 +NB)、单独NB组和阳性药物对照组(H_2O_2 +NAC,NAC是一种含巯基的抗氧化剂,具有基于巯基功能的抗氧化特性,能保护机体免受氧化应激损伤,亦可抑制神经细胞凋亡)。根据预实验结果, H_2O_2 组是加入终浓度为300 μ mol/L的 H_2O_2 与细胞共孵育24h; H_2O_2 +NB组是于 H_2O_2 处理前2小时加入100 μ mol/L的NB共孵育24h; H_2O_2 +NAC组是 H_2O_2 处理前2小时预先给予5 mmol/L的NAC共孵育24h,然后进行下一步实验。

1.3 细胞形态观察及细胞活性检测

HT22 细胞以 5×10^3 个/ml、100 μ l 每孔接种于 96 孔板,经过不同处理后,各组细胞置于相差显微镜下观察细胞生长情况及形态变化。细胞的存活率用 CCK-8 试剂盒检测,酶标仪震荡溶解后于 490 nm 波长下测各孔光密度值。

1.4 细胞上清指标检测

将各处理组细胞吸掉培养基,PBS 清洗 3 次,加入 0.25%胰蛋白酶消化细胞,待其收缩变圆时终止消化,移入 EP 管中,加入适量细胞裂解液于冰上裂解 20 min,4℃ 12 000 转/min 离心 10 min,将上清液移至预冷的离心管中,严格按照试剂盒说明书操作,测定反映细胞损伤的指标 LDH,及氧化应激指标(MDA、SOD 及 GSH)水平。

1.5 细胞凋亡率检测

将各处理组的 HT22 细胞培养基吸弃,加入 PBS 清洗 2~3 遍后,加 0.25%的胰酶消化细胞,待其收缩变圆时终止消化,加入 PBS 重悬细胞,制成 3×10^5 /ml 的细胞悬液,用 Annexin V-FITC/PI 标记细胞(根据试剂盒说明操作),用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

1.6 Western blotting 检测相关蛋白

将 HT22 细胞接种于 6 孔培养板上,密度为 5×10^6 个/孔,各组处理完毕后,每孔加入 100 μ l 含有 10%蛋白酶抑制剂(100 mmol/L)的 RIPA 细胞裂解液,冰上裂解 30 min,然后将细胞用细胞刮收集至离心管,4℃、12 000 转/分,离心 15 min,收集上清蛋白

溶液。BCA 蛋白定量法定量后用于检测。蛋白质经聚丙烯酰胺凝胶电泳后,转移至聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上。5%脱脂奶粉封闭,37℃ 孵育 1 h,分别加入稀释的兔抗鼠一抗凋亡相关蛋白 Bcl-2(1 : 800)、Bax(1 : 800),及相关信号通路蛋白 Akt(1 : 1 000)、p-Akt(1 : 1 000)、HO-1(1 : 1 000),4℃ 过夜;再加上山羊抗兔二抗,室温孵育 1 h。采用化学发光法显色,凝胶成像系统(Bio-Rad 公司,美国)进行图像分析。应用 β 肌动蛋白(β -actin)作为内参。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。数据以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,使用单因素方差分析进行组间差异性检验,组间的两两比较采用 Tukey's 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 5 组细胞损伤情况比较

本试验通过检测细胞存活率、LDH 释放量,并通过相差显微镜观察细胞形态,评价 NB 对 HT22 细胞的保护作用。结果显示,与空白对照组比较, H_2O_2 组细胞存活率明显下降,细胞上清中 LDH 含量显著增加,细胞形态出现明显皱缩、空泡变性及细胞减少。而 NB 或 NAC 干预可显著增加细胞活性、减少 LDH 释放,细胞形态的破坏得到明显改善。而单纯使用 NB(NB 组)并未对细胞造成影响,提示 NB 确实对 H_2O_2 诱导的 HT22 细胞损伤具有一定的保护作用(图 1)。

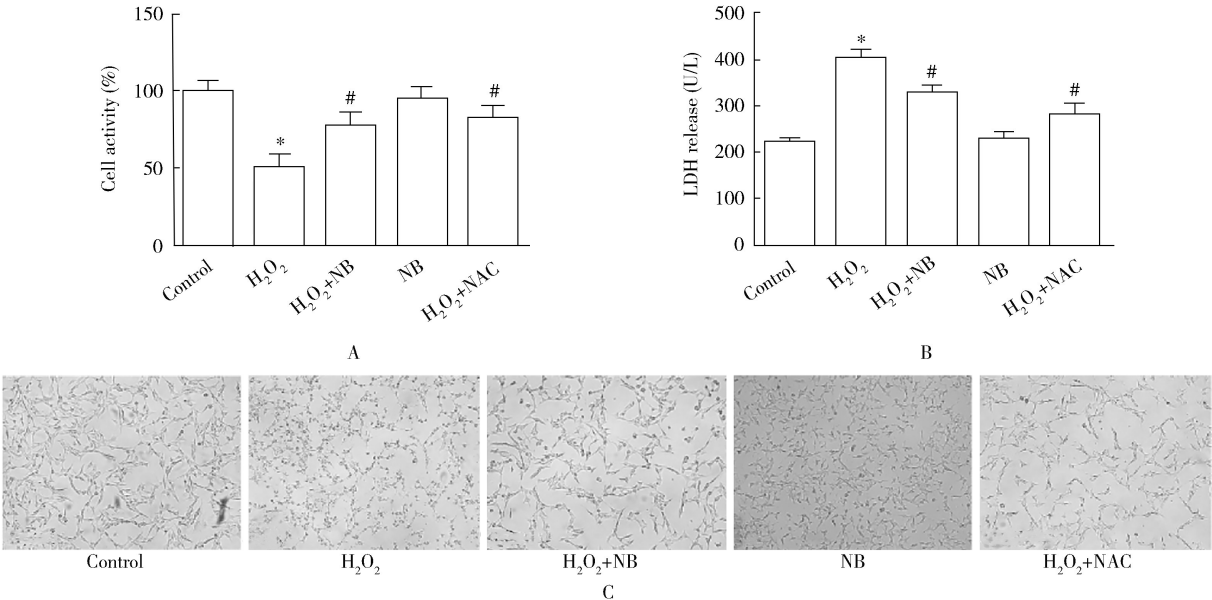


图 1 5 组 HT22 细胞损伤情况比较

Figure 1 Comparison of cell injury among 5 groups (n=5)

A: cell activity by CCK-8; B: LDH release level; C: cytomorphology (x200). NB: norcepharadione B; LDH: lactate dehydrogenase. Compared with control group, * $P < 0.05$; compared with H_2O_2 group, # $P < 0.05$.

2.2 5组细胞SOD、MDA及GSH水平比较

与正常对照组比较,H₂O₂组细胞MDA水平显著增加,SOD及GSH活性显著降低;与H₂O₂组比较,加入NB或NAC干预后,细胞MDA漏出量显著降低,SOD、GSH活性显著升高;而单纯NB处理与正常对照组比较差异不显著,提示单纯NB对细胞SOD、MDA及GSH水平影响不大(表1)。

2.3 5组细胞凋亡情况比较

流式细胞术检测结果显示(图2A,2B),与正常对照组比较,H₂O₂组细胞凋亡率明显增高,加入NB或NAC处理后,与H₂O₂组比较,细胞凋亡率显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。Western blotting检测结果显示(图2C-2E),与正常对照组比较,H₂O₂处理组Bcl-2表达显著下降,Bax水平显著升高;与H₂O₂处理组比较,给予NB或阳性药物NAC处理的细胞Bcl-2显著升高,Bax水平显著下降;而NB单独处理组对细胞凋亡率无明显影响。

2.4 NB对H₂O₂诱导的HT22细胞PI3K/Akt/HO-1信号通路的调节

为进一步探讨NB发挥神经保护的潜在机制,本研究采用Western blotting技术检测了磷脂酰肌醇-3激酶/Akt/HO-1(phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/HO-1,PI3K/Akt/HO-1)信号通路在H₂O₂诱导细胞损伤中相关蛋白的表达。与正常对照组比较,H₂O₂组p-Akt水平升高,提示一定剂量的H₂O₂可诱导Akt的磷酸化;与H₂O₂组相比,给予NB处理后的细胞p-Akt水平有显著升高,表明NB可明显增

强Akt的磷酸化水平($P<0.05$);而单纯NB处理组与正常组相比,p-Akt水平变化不明显(图3A; $P>0.05$)。我们还检测了抗氧化酶HO-1蛋白的表达,结果显示,H₂O₂处理组细胞HO-1水平较正常对照组显著升高,加入NB处理后,与H₂O₂处理组比较,HO-1表达亦显著升高,同时H₂O₂+NAC组的HO-1表达水平稍低于H₂O₂+NB处理组,但差异无统计学意义($P>0.05$);单纯NB处理组与模型组比较差异亦无统计学意义($P>0.05$;图3B)。为了明确PI3K/Akt/HO-1途径是否参与了NB的神经保护作用,我们对细胞给予PI3K抑制剂Ly294002预处理30 min,然后加入NB及H₂O₂共孵育24 h。结果显示(图3C),加入Ly294002的细胞p-AKT及HO-1表达水平均较H₂O₂+NB处理组显著降低,提示PI3K/Akt/HO-1信号通路确实参与了NB的神经保护作用。

表1 NB对H₂O₂诱导细胞氧化损伤指标的影响

Table 1 Effect of NB on oxidative damage indicators

Group	induced by H ₂ O ₂ (n=5, $\bar{x}\pm s$)		
	SOD (U/mg)	MDA (nmol/mg)	GSH (nmol/mg)
Control	11.26±0.67	0.25±0.07	32.08±2.07
H ₂ O ₂	6.21±0.56*	0.56±0.09*	17.58±3.21*
H ₂ O ₂ +NB	9.08±0.78#	0.35±0.08#	27.66±2.67#
NB	12.01±0.66	0.27±0.08	31.01±2.18
H ₂ O ₂ +NAC	10.12±0.75#	0.31±0.06#	28.89±1.79#

NB: norcepharadione B; SOD: superoxide dismutase; MDA: malondialdehyde malonic dialdehyde; GSH: glutathione. Compared with control group, * $P<0.05$; compared with H₂O₂ group, # $P<0.05$.

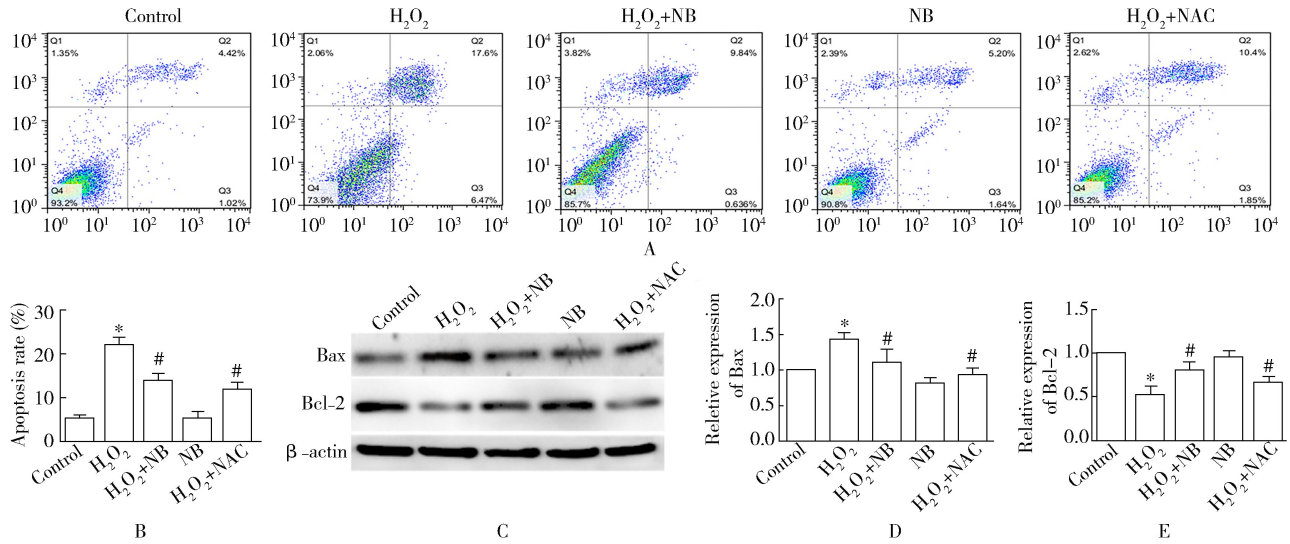


图2 5组细胞凋亡情况比较

Figure 2 Comparison of apoptosis among 5 groups (n=3)

A: detection of apoptosis rate by flow cytometry; B: quantitative analysis of the percentage of apoptotic cells by histogram; C-E: quantitative analysis of Bax and Bcl-2 expression by Western blotting. NB: norcepharadione; Bcl-2: B-cell lymphoma/leukemia-2; Bax: Bcl-2 associated X protein. Compared with control group, * $P<0.05$; compared with H₂O₂ group, # $P<0.05$.

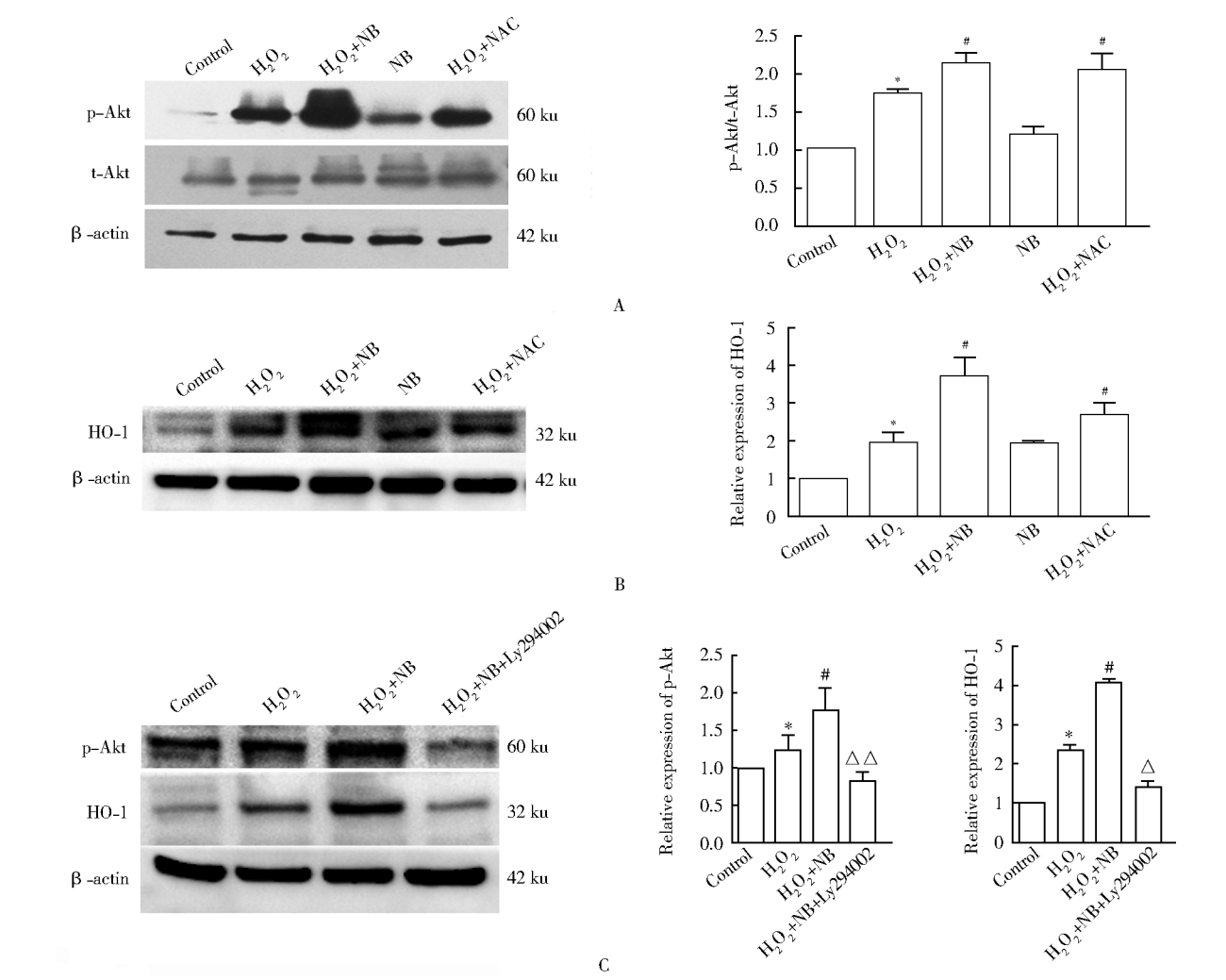


图 3 NB 通过激活 PI3K/Akt/HO-1 信号途径发挥神经保护作用

Figure 3 Role of NB in neuroprotection through PI3K/Akt/HO-1 signaling pathway (n=3)

A: expression and quantitative analysis of p-Akt and total Akt; B: expression and quantitative analysis of HO-1; C: effect of PI3K inhibitor Ly294002 on expression of p-Akt and HO-1. NB; norcepharadion B; Akt; protein kinase B; p-Akt; phosphorylated Akt; HO-1; heme oxygenase-1. Compared with control group, *P<0.05; compared with H₂O₂ group, #P<0.05; compared with H₂O₂+NB group, Δ P<0.05, $\Delta\Delta$ P<0.01.

3 讨论

鱼腥草是一种传统中草药,具有广泛的生物活性和较高的食用价值,在临床上具有广阔的应用前景。NB 是从鱼腥草中提取的一种生物碱。既往研究表明,NB 具有较强的抗菌、抗炎、抗病毒和抗血小板聚集作用,其中抑制血小板聚集的潜在机制可能与 NB 抑制了环氧合酶的活性有关^[6-8]。最近的研究表明,鱼腥草提取物可以改善痴呆、帕金森病和癫痫患者的记忆功能^[9],为 NB 在神经系统的作用研究提供了理论支持。本实验采用 H₂O₂ 诱导 HT22 海马神经细胞制备氧化损伤模型,首次阐明了 NB 这一生物碱的抗氧化、抗凋亡的神经保护作用,为天然类中药提取物的临床应用提供了理论依据。

氧化应激损伤在多种中枢神经系统疾病引起的

神经损伤中起着重要作用,如脑缺血-再灌注损伤、脑外伤和阿尔兹海默病等。氧化应激损伤发生后,神经元细胞内的抗氧化物质可被大量消耗,引起细胞内的氧化还原状态失衡,继而引起神经元细胞的损伤死亡,因此减少自由基产生、减轻氧化应激损伤是降低上述疾病危害的重要途径^[10-11]。SOD 和 GSH 是机体内的主要自由基清除酶,前者能通过歧化作用清除病理状态下产生的氧自由基,减轻细胞损害,后者能抑制脂质过氧化反应,对脑缺血缺氧损伤起到保护作用。MDA 能导致细胞功能受损,且细胞受损程度与 MDA 含量成正比,因此上述三者能有效反映细胞受损程度^[12,13]。在本实验中,我们首先观察了 NB 对 H₂O₂ 作用下 HT22 细胞形态、存活率及凋亡率的影响,结果显示,H₂O₂ 作用于细胞 24 h 后,镜下可见细胞形态出现细胞皱缩、空泡变性

及细胞减少,而给予 NB 处理后细胞受损形态明显减轻,细胞数目减少不明显。细胞活力及凋亡率结果显示,与 H₂O₂ 组比较,给予 NB 或 NAC 处理后细胞存活率显著增加,细胞凋亡率显著减少,并且 LDH 释放减少。为明确 NB 对氧化应激所致细胞损伤的作用,我们检测了细胞内 SOD、GSH 及 MDA 的变化。结果显示,H₂O₂ 刺激可诱导细胞内 SOD 活性及 GSH 水平明显降低,MDA 含量显著增加;而给予 NB 或 NAC 处理后 MDA 水平显著降低,SOD、GSH 活性较 H₂O₂ 组升高。同时,我们也观察了抗氧化酶 HO-1 蛋白的变化,结果显示,H₂O₂ 处理组细胞 HO-1 的表达水平较正常对照组升高,加入 NB 处理后,HO-1 的表达亦显著升高,表明 NB 可以对氧化应激产生的损伤。而在本实验中,H₂O₂+NAC 组 HO-1 的表达稍低于 H₂O₂+NB 处理组,这可能与不同的实验条件有关。

线粒体凋亡途径主要通过 Bcl-2 家族和 Caspase 家族进行调控,Bcl-2 作为 Bcl-2 家族蛋白的抗凋亡蛋白,存在于线粒体外膜上,以保护线粒体膜的完整性,抑制神经元的凋亡^[14,15]。为进一步明确 NB 发挥抗凋亡的潜在机制,我们检测了 Akt 下游信号通路蛋白 Bcl-2 和 Bax 的变化,结果表明,H₂O₂ 处理组 Bax 的表达明显升高,而 Bcl-2 的水平显著下降,给予 NB 处理可减轻 H₂O₂ 诱导的神经元损伤,上调 Bcl-2 的蛋白表达,下调 Bax 表达,提示 NB 可能通过抑制线粒体凋亡保护受损神经元。

PI3K/Akt 是重要的细胞存活信号通路,与中枢神经系统损伤的保护机制密切相关,可通过促使凋亡相关因子磷酸化而失活、磷酸化 Bcl-2 家族成员、影响转录因子家族(Forkhead、核因子 κ B、cAMP 反应元件结合蛋白、p53 等)、阻止线粒体释放细胞色素 C 等方面发挥抗凋亡的调控作用^[16]。有研究发现,依达拉奉可通过激活 PI3K/Akt 信号传导抑制氧化反应、清除自由基及降低脑水肿途径,发挥拮抗细胞凋亡的作用^[17]。此外,大量研究表明,PI3K/Akt 信号通路参与了 Nrf2 的活化和核转位过程,可促使下游一系列抗氧化酶基因的表达,如过氧化氢酶(catalase, CAT)、SOD、GST 以及 HO-1 等^[18-20]。NB 是否通过调控 PI3K/Akt 信号通路来发挥抗氧化的神经保护作用呢? 我们采用 Western blotting 方法进一步探讨相关分子蛋白的表达,结果发现,H₂O₂ 可诱导 HT22 细胞的 Akt 磷酸化水平,而加入 NB 后可进一步增强 Akt 的磷酸化程度;且下游 HO-1 表达明显升高。为了进一步验证 NB 是否增强了 Akt 的磷酸化水平,我们给予 PI3K 抑制剂

Ly294002 预处理 30 min,然后给予 NB 及 H₂O₂ 共培养 24 h,结果显示,抑制剂处理后的细胞 p-Akt 表达明显降低,HO-1 表达显著下降,提示 PI3K/Akt/HO-1 信号通路参与了 NB 的神经保护作用。

综上所述,NB 对 H₂O₂ 诱导损伤的海马神经元细胞具有良好的保护作用,其作用机制可能通过激活 PI3K/Akt/HO-1 信号通路而抑制了氧化应激、增强了机体抗氧化能力及减少了细胞凋亡。

【参考文献】

- [1] Hsieh HL, Yang CM. Role of redox signaling in neuroinflammation and neurodegenerative diseases[J]. Biomed Res Int, 2013, 761(4): 85-94. DOI: 10.1155/2013/484613.
- [2] Dias-Santagata D, Fulga TA, Duttaroy A, et al. Oxidative stress mediates tau-induced neurodegeneration in Drosophila[J]. J Clin Invest, 2007, 117(1): 236-245. DOI: 10.1172/JCI28769.
- [3] Brown DR, Schmidt B, Kretschmar HA. Effects of oxidative stress on prion protein expression in PC12 cells[J]. Int J Dev Neurosci, 1997, 15(8): 961-972. DOI: 10.1016/s0736-5748(97)00042-7.
- [4] Rasool M, Malik A, Qureshi MS, et al. Recent updates in the treatment of neurodegenerative disorders using natural compounds[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2014, 2014: 979730. DOI: 10.1155/2014/979730.
- [5] 刘敏, 蒋跃平, 刘韶. 鱼腥草中生物碱类化学成分及其生物活性研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(1): 141-145. DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.1.024.
Liu M, Jiang YP, Liu S. Research progress on alkaloids and their biological activities in *Houttuynia cordata*[J]. Nat Prod Res Dev, 2018, 30(1): 141-145. DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.1.024.
- [6] Ahn J, Chae HS, Chin YW, et al. Alkaloids from aerial parts of *Houttuynia cordata* and their anti-inflammatory activity[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2017, 27(12): 2807-2811. DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.04.072.
- [7] 蒋跃平, 陈章义, 刘敏, 等. 鱼腥草中抗血栓活性生物碱成分的虚拟筛选[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(8): 1623-1634. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20190125.003.
Jiang YP, Chen ZY, Liu M, et al. Virtual screening of antithrombotic alkaloids from *Houttuynia cordata*[J]. China J Chin Mater Med, 2019, 44(8): 1623-1634. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20190125.003.
- [8] Dai SH, Chen T, Wang YH, et al. Sirt3 attenuates hydrogen peroxide-induced oxidative stress through the preservation of mitochondrial function in HT22 cells[J]. Int J Mol Med, 2014, 34(4): 1159-1168. DOI: 10.3892/ijmm.2014.1876.
- [9] Huh E, Kim HG, Park H, et al. *Houttuynia cordata* improves cognitive deficits in cholinergic dysfunction Alzheimer's disease-like models[J]. Biomol Ther(Seoul), 2014, 22(3): 176-183. DOI: 10.4062/biomolther.2014.040.
- [10] Islam MT. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders[J]. Neurol Res, 2017, 39(1): 73-82. DOI: 10.1080/01616412.2016.1251711.

- [11] Chen L, Liu B. Relationships between stress granules, oxidative stress, and neurodegenerative diseases [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 1809592. DOI: 10.1155/2017/1809592.
- [12] 刘俊乐, 张良成. 线粒体功能障碍及炎症与衰老的相关关系[J]. *中华老年多器官疾病杂志*, 2019, 18(6): 469-472. DOI: 10.11915/j.issn.1671-5403.2019.06.099.
- Liu JL, Zhang LC. Correlation of mitochondrial dysfunction and inflammation with aging [J]. *Chin J Mult Organ Dis Elderly*, 2019, 18(6): 469-472. DOI: 10.11915/j.issn.1671-5403.2019.06.099.
- [13] Ji Y, Yan X, Hu Y, *et al.* DhHP6 attenuates cerebral ischemia reperfusion injury in rats through the inhibition of apoptosis[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(5): 7229-7236. DOI: 10.3892/mmr.2017.7569.
- [14] Kinarivala N, Patel R, Boustany RM, *et al.* Discovery of aromatic carbamates that confer neuroprotective activity by enhancing autophagy and inducing the anti-apoptotic protein B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)[J]. *J Med Chem*, 2017, 60(23): 9739-9756. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b01199.
- [15] Jin Y, Fan JT, Gu XL, *et al.* Neuroprotective activity of cerebro-sides from typhonium giganteum by regulating caspase-3 and Bax/Bcl-2 signaling pathways in PC12 cells[J]. *J Nat Prod*, 2017, 80(6): 1734-1741. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b00954.
- [16] Zhu H, Zhang Y, Shi Z, *et al.* The neuroprotection of liraglutide against ischaemia-induced apoptosis through the activation of the PI3K/AKT and MAPK pathways[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 26859. DOI: 10.1038/srep26859.
- [17] 王鹏军, 宋荣蓉, 赫丹丹. P13K/Akt 信号在阿尔茨海默病样细胞中的作用及依达拉奉对其影响[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2010, 27(1): 12-15.
- Wang PJ, Song RR, Hao DD. The role of P13K/Akt signal in Alzheimer's disease-like cells and the effect of edaravone on them[J]. *J Apoplexy Nerv Dis*, 2010, 27(1): 12-15.
- [18] Ali T, Kim T, Rehman SU, *et al.* Natural dietary supplementation of anthocyanins *via* PI3K/Akt/Nrf2/HO-1 pathways mitigate oxidative stress, neurodegeneration, and memory impairment in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(7): 6076-6093. DOI: 10.1007/s12035-017-0798-6.
- [19] Ya BL, Li HF, Wang HY, *et al.* 5-HMF attenuates striatum oxidative damage *via* Nrf2/ARE signaling pathway following transient global cerebral ischemia[J]. *Cell Stress Chaperones*, 2017, 22(1): 55-65. DOI: 10.1007/s12192-016-0742-0.
- [20] Feng S, Xu Z, Wang F, *et al.* Sulforaphane prevents methylmercury-induced oxidative damage and excitotoxicity through activation of the Nrf2-ARE pathway[J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(1): 375-391. DOI: 10.1007/s12035-015-9643-y.

(编辑: 张美)

· 消 息 ·

《中华老年多器官疾病杂志》调整文末参考文献著录格式

自 2017 年 1 月起, 本刊调整录用稿件的文末参考文献著录格式: (1) 中文参考文献采用中英文双语著录, 中文在前, 英文在后; (2) 参考文献如有“数字对象唯一标识符 (DOI)”编码, 应著录, 列于末尾。

示例:

- [1] Williamson JD, Supiano MA, Applegate WB, *et al.* Intensive *vs* standard blood pressure control and cardiovascular disease outcomes in adults aged ≥ 75 years: a randomized clinical trial[J]. *JAMA*, 2016, 315(24): 2673-2682. DOI: 10.1001/jama.2016.7050.
- [2] 李葳, 邓雅丽, 卓琳, 等. 阿司匹林对于心血管疾病一级预防的效果及安全性的系统综述及 meta 分析[J]. *中华老年多器官疾病杂志*, 2016, 15(12): 896-901. DOI: 10.11915/j.issn.1671-5403.2016.12.215.
- Li W, Deng YL, Zhuo L, *et al.* Effect and safety of aspirin for primary prevention of cardiovascular diseases: a systematic review and meta analysis[J]. *Chin J Mult Organ Dis Elderly*, 2016, 15(12): 896-901. DOI: 10.11915/j.issn.1671-5403.2016.12.215.

地址: 100853 北京市复兴路 28 号, 《中华老年多器官疾病杂志》编辑部

电话: 010-66936756

网址: www.mode301.cn

E-mail: zhldnqg@mode301.cn