α -细辛醚、 β -细辛醚改善 $A\beta_{25-35}$ 诱导的PC12细胞损伤及机制

石坚宏¹,李瑞芝²,杨元宵³,姬丽婷¹,李昌煜¹

1. 浙江中医药大学药学院,浙江 杭州 310053

2. 海宁市中医院科教科,浙江 嘉兴 314400

3. 杭州医学院药学院,浙江 杭州 310053

[摘要] 目的:探究 α -细辛醚、 β -细辛醚对 β 淀粉样蛋白活性片段 $A\beta_{25-35}$ 诱导的PC12细胞损伤模型的保护作用及相关作用机制。方法:采用 $A\beta_{25-35}$ 诱导PC12细胞建立 $A\beta$ 毒性损伤细胞模型。将PC12细胞分为空白对照组、模型对照组、 α -细辛醚组(0.5、1.0、1.5 $\mu\text{g/mL}$)、 β -细辛醚组(6.3、12.5、25.0 $\mu\text{g/mL}$)、血管活性肠肽(VIP)组,并设VIP拮抗剂对照。采用细胞计数试剂盒(CCK-8)法检测细胞存活率;流式细胞术检测细胞凋亡率;酶联免疫吸附试验检测炎症因子白介素(IL)-1、IL-10、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、氧化因子诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、一氧化氮(NO)和凋亡因子caspase-3、p53水平;蛋白质印迹法检测细胞c-Jun氨基端激酶(JNK)、p38丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)蛋白表达。结果:与模型对照组比较, α -细辛醚组、 β -细辛醚组和VIP组细胞存活率增加,细胞凋亡率下降,凋亡因子caspase-3、p53和炎症因子IL-1、TNF- α 水平下降,IL-10水平升高,氧化因子iNOS和NO水平下降,c-Jun氨基端激酶(JNK)、p38MAPK蛋白表达减少(均 $P<0.05$)。VIP拮抗剂干预后, β -细辛醚组细胞存活率下降,细胞凋亡率增加,凋亡因子caspase-3、p53和炎症因子IL-1、TNF- α 水平升高,IL-10水平下降,氧化因子iNOS和NO水平升高,JNK、p38MAPK蛋白表达增加(均 $P<0.05$); α -细辛醚组无显著变化(均 $P>0.05$)。结论: α -细辛醚、 β -细辛醚对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的PC12细胞损伤模型具有保护作用, β -细辛醚可通过促进VIP的分泌,调控JNK/MAPK通路从而抑制炎症因子、氧化因子水平,改善PC12细胞凋亡; α -细辛醚作用机制与VIP分泌水平无明显联系。

[关键词] 阿尔茨海默病; α -细辛醚; β -细辛醚;PC12细胞;炎症;氧化因子;JNK/MAPK通路;血管活性肠肽

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A

Protective effect of α -asarone and β -asarone on $A\beta_{25-35}$ -induced

收稿日期:2021-06-11 接受日期:2021-09-18

基金项目:浙江省自然科学基金(Q21H280028)

第一作者:石坚宏,硕士研究生,主要从事中药药理和新产品开发研究;E-mail:980844591@qq.com;https://orcid.org/0000-0003-0513-6655

通信作者:李昌煜,教授,博士生导师,主要从事中药药理和新产品开发研究;E-mail:lcyzcmu@sina.com;https://orcid.org/0000-0001-8656-0428

inflammatory response in PC12 cells and its mechanism

SHI Jianhong¹, LI Ruizhi², YANG Yuanxiao³, JI Liting¹, LI Changyu¹ (1. College of Pharmaceutical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2. Department of Science and Education, Haining Traditional Chinese Medicine Hospital, Jiaxing 314400, Zhejiang Province, China; 3. School of Pharmacy, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310053, China)

Corresponding author: LI Changyu, E-mail: lcyzcmu@sina.com, <https://orcid.org/0000-0001-8656-0428>

[**Abstract**] **Objective:** To investigate effects of α -asarone and β -asarone on $A\beta_{25-35}$ -induced PC12 cell injury and related mechanisms. **Methods:** $A\beta$ toxic injury cell model was induced by $A\beta_{25-35}$ in PC12 cells. PC12 cells were divided into blank control group, model control group, α -asarone group (0.5, 1.0, 1.5 $\mu\text{g/mL}$), β -asarone group (6.3, 12.5, 25.0 $\mu\text{g/mL}$), vasoactive intestinal peptide (VIP) group, and VIP antagonist control group. Cell survival rate was detected by CCK-8 kit; cell apoptosis rate was detected by flow cytometry. The levels of inflammatory cytokines interleukin (IL)-1, IL-10, tumor necrosis factor (TNF)- α , oxidation-related inducible nitric oxide synthase (iNOS), nitric oxide (NO), apoptosis factors caspase-3 and p53 were detected by ELISA method. The expressions of C-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) were detected by Western blotting. **Results:** Compared with model control group, cell survival rates of α -asarone group, β -asarone group and VIP group increased; the cell apoptosis rate decreased; levels of apoptosis-related factors caspase-3, p53, inflammatory factors IL-1, TNF- α decreased; IL-10 level increased; levels of oxidization-related factors iNOS and NO decreased; the expression of JNK and p38MAPK protein decreased (all $P < 0.05$). After VIP antagonist intervention, the survival rate of β -asarone group decreased; apoptosis rate increased; apoptosis related factors caspase-3, p53, inflammatory factors IL-1, TNF- α increased; IL-10 decreased; oxidation related factors iNOS and NO increased; the expression of JNK and p38MAPK protein increased (all $P < 0.05$); while there were no significant changes in these indicators of α -asarone group (all $P > 0.05$). **Conclusion:** α -asarone and β -asarone have protective effects on PC12 cell injury induced by $A\beta_{25-35}$. β -asarone may inhibit inflammatory factors and oxidation-related factors through promoting VIP secretion, regulating JNK/MAPK pathway, and reducing PC12 cell apoptosis; however, the effect of α -asarone may be not related to VIP secretion.

[**Key words**] Alzheimer's disease; α -Asarone; β -Asarone; PC12 cell; Inflammation; Oxidation factor; JNK/MAPK pathway; Vasoactive intestinal peptide

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2021, 50(5): 591-600.]

[**缩略语**] 阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD);淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP); β 淀粉样蛋白(amyloid β -protein, $A\beta$);血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP);白介素(interleukin, IL);肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF);诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS);一氧化氮(nitric oxide, NO);胱天蛋白酶(cysteine aspartic acid specific protease, caspase);c-Jun氨基端激酶(c-Jun N-terminal

kinase, JNK); p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38MAPK); 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS); 细胞计数试剂盒(cell counting kit, CCK); 异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC); 酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)

AD是一种年龄相关的神经系统变性疾病,病理特征为 β 淀粉样斑块沉积、神经纤维缠结以及神经元丢失^[1]。目前AD病因不清,发病机制不明,存在多种假说,包括 $A\beta$ 级联假说、 τ 蛋白假说、神经炎症假说以及氧化应激假说等^[2]。APP是一种完整的膜蛋白,在神经元突触中高表达,经 β 分泌酶、 γ 分泌酶剪切后产生有毒的 $A\beta_{1-40}$ 、 $A\beta_{1-42}$,形成 $A\beta$ 低聚物,在神经元间沉积形成 β 淀粉样斑块,导致神经炎症、氧化应激反应、神经元功能障碍和死亡等一系列反应。而炎症反应会加重氧化应激反应,从而加重神经元损伤,加快AD进程,是AD的重要发病机制之一^[3-6]。因此,降低炎症因子、氧化因子水平可缓解神经元损伤,对于减轻AD的症状或减缓疾病的进程具有重要作用。

石菖蒲为天南星科植物石菖蒲(*Acorus tatarinowii* Schott)的干燥根茎,具有开窍豁痰、醒神益智、化湿和胃等功效^[7]。 α -细辛醚、 β -细辛醚为石菖蒲的主要有效成分^[8-9]。笔者团队前期研究表明,石菖蒲挥发油可以有效改善东莨菪碱所致学习记忆障碍模型大鼠的学习记忆能力,具有显著的神经保护作用(待发表),但其相关的作用及机制尚未明确。

$A\beta_{25-35}$ 是 $A\beta_{1-42}$ 的活性片段,具有与 $A\beta$ 类似的神经毒性特征,广泛用于AD细胞模型制备。本研究通过体外细胞实验进一步探讨了石菖蒲有效成分 α -细辛醚、 β -细辛醚对 $A\beta_{25-35}$ 诱导PC12细胞的抗炎、抗氧化损伤、抗凋亡作用及其机制,为AD临床药物研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 药物、试剂和仪器

α -细辛醚(纯度98%,批号S18779)为美国Sigma公司产品; β -细辛醚(纯度98%,批号H0506)为金坛市威德龙化学有限公司产品; $A\beta_{25-35}$ (纯度95.36%,批号P110428-ZJ051106)、L-8-K(纯度95.74%,批号PP0426-KC087444)为吉尔生化(上海)有限公司产品;VIP(批号19032218)为武汉中弘生物科技有限公司产品;IL-1(批号20110327)、

IL-10(批号20110327)、TNF- α (批号20110327)、iNOS(批号20110327)、NO(批号20110327)、caspase-3(批号20110327)、p53(批号20110327)、ELISA试剂盒为上海拜沃生物科技有限公司产品;磷酸化-JNK/SAPK抗体(批号20110105)、JNK/SAPK抗体(批号20110221)、磷酸化-p38MAPK抗体(批号20110217)、p38MAPK抗体(批号20110214)为上海碧云天生物技术有限公司产品;BCA蛋白定量试剂盒(批号20101104)为南京碧波生物科技有限公司产品; β -actin(BM0627)为美国Boster Immunoleader公司产品。PC12细胞购自中国科学院细胞库。HEPA CLASS100型细胞二氧化碳培养箱为美国Thermo公司产品;96孔细胞培养板与细胞培养瓶为美国Corning公司产品;多功能酶标仪为美国Thermo Scientific公司产品;流式细胞仪为美国Bio-rad公司产品;Odyssey双色红外激光成像系统为美国Licor公司产品。

1.2 细胞处理

将1 mg $A\beta_{25-35}$ 溶于943 μ L灭菌去离子水,配制成1 mmol/L的母液,分装,-20 $^{\circ}$ C保存。用PBS配制成400 μ mol/L的 $A\beta_{25-35}$ 溶液,在37 $^{\circ}$ C培养箱中孵育4 d,使其老化聚集产生神经毒性。从液氮灌中取出冻存的PC12细胞,37 $^{\circ}$ C水浴,融化,2 min后取出冻存管,75%乙醇消毒后吸出细胞悬液,置于离心管中,1100 $\times g$ 离心5 min。吸弃上清液,向离心管中加入10 mL含10%胎牛血清的DMEM培养液,吹打成细胞悬液,计数,调整细胞密度,接种于20 mL培养瓶中,于37 $^{\circ}$ C、5%二氧化碳培养箱静置培养。

取对数生长期的PC12细胞,消化、离心后用完全培养基重悬(2×10^4 /mL),分别接种于96孔板(100 μ L,用于细胞存活率的检测)、24孔板(1 mL,用于炎症因子、氧化因子和凋亡因子的检测)及六孔板(2 mL,用于细胞凋亡率及蛋白的检测),置于37 $^{\circ}$ C、5%二氧化碳饱和湿度的培养箱中培养,待用。实验分为空白对照组、模型对照组、 α -细辛醚组(0.5、1.0、1.5 μ g/mL)、 β -细辛醚组(6.3、12.5、25.0 μ g/mL)和VIP组、VIP拮抗剂组,其中 α -细辛

醚组、 β -细辛醚组和VIP组均同时设VIP拮抗剂干预。模型对照组加入 $A\beta_{25-35}$ (终浓度为 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$,下同); α -细辛醚组分别加入终浓度为 0.5 、 1.0 、 $1.5\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的 α -细辛醚和 $A\beta_{25-35}$; β -细辛醚组分别加入终浓度为 6.3 、 12.5 、 $25.0\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的 β -细辛醚和 $A\beta_{25-35}$;VIP组分别加入终浓度为 10 nmol/L 的VIP和 $A\beta_{25-35}$;VIP拮抗剂组加入L-8-K(终浓度为 $5\text{ }\mu\text{mol/L}$,下同)和 $A\beta_{25-35}$;各组VIP拮抗剂干预系在给药24 h后加入VIP拮抗剂L-8-K,1 h后再加入 $A\beta_{25-35}$ 。各组均继续培养24 h后再进行以下各项实验。

1.3 CCK-8法检测细胞存活率

各组PC12细胞每孔加入 $10\text{ }\mu\text{L}$ CCK-8,置培养箱中孵育1 h后,用酶标仪在 450 nm 波长处记录各孔的吸光度值。取三孔吸光度值的平均数,计算细胞存活率:细胞存活率(%)=各处理组吸光度值/空白对照组吸光度值 $\times 100\%$ 。实验重复三次。

1.4 流式细胞术检测细胞凋亡情况

吸出各组PC12细胞培养液至离心管内,PBS洗涤贴壁细胞,并用胰蛋白酶消化,收集细胞培养液, $1000\times g$ 离心 5 min ,弃上清液,收集细胞,用PBS重悬细胞并计数。取 $5\sim 10$ 万个重悬细胞, $1000\times g$ 离心 5 min ,弃上清液,加入 $500\text{ }\mu\text{L}$ FITC-Annexin V结合液重悬细胞。加入 $5\text{ }\mu\text{L}$ FITC-Annexin V,混匀,室温避光孵育 10 min ,加入 $5\text{ }\mu\text{L}$ 碘化丙啶染色液,混匀,冰浴避光。随即进行流式细胞仪检测,FITC-Annexin V为绿色荧光,碘化丙啶为红色荧光。

1.5 ELISA法测定炎症因子、氧化因子和凋亡因子水平

吸出各组PC12细胞培养液至离心管内,PBS洗涤贴壁细胞,胰蛋白酶消化, $1000\times g$ 离心 20 min ,取上清液,然后按照ELISA试剂盒说明书上的方法分别测定炎症因子(IL-1、IL-10、TNF- α)、氧化因子(iNOS和NO)和凋亡因子(caspase-3、p53)的水平。

1.6 蛋白质印迹法检测细胞JNK、p38MAPK蛋白表达

各组PC12细胞用胶头滴管吹打后将细胞溶液转移至离心管中, $2000\times g$ 离心 5 min ,吸去上清液;用 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷的 0.01 mol/L PBS(酸碱度为 7.2)清洗一次, $2000\times g$ 离心 5 min ,吸去上清液,加入冷RIPA裂解液工作液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 $16\text{ }128\times g$ 离心 30 min ,

取上清液为蛋白提取物,BCA法测定蛋白浓度。采用 10% 分离胶、 5% 浓缩胶,加样,跑胶,转PVDF膜, 5% 脱脂奶粉封闭,一抗孵育($1:500$), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜; $1\times\text{TBS}$ 缓冲液、 0.1% 吐温-20洗三遍,二抗($1:5000$)室温孵育 1 h ,同上洗三遍。采用Odyssey双色红外激光成像系统进行扫膜及分析,相对灰度值=(样本灰度值/样本内参)/(对照灰度值/对照内参)。

1.7 统计学方法

采用SPSS 13.0软件分析数据,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,各组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 α -细辛醚、 β -细辛醚对细胞存活率的影响

与空白对照组比较,模型对照组的细胞存活率下降($P<0.01$);与模型对照组比较, α -细辛醚、 β -细辛醚及VIP组细胞存活率均提高(均 $P<0.05$)。VIP拮抗剂干预后, β -细辛醚组(12.5 、 $25.0\text{ }\mu\text{g/mL}$)、VIP组细胞存活率均降低(均 $P<0.05$); α -细辛醚各剂量组则差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。见图1。结果提示, α -细辛醚、 β -细辛醚均具有抗 $A\beta_{25-35}$ 毒性作用,其中 β -细辛醚抗 $A\beta_{25-35}$ 毒性作用与拮抗VIP有关。

2.2 α -细辛醚、 β -细辛醚对细胞凋亡的影响

与空白对照组比较,模型对照组的细胞凋亡率升高($P<0.01$);与模型对照组比较, α -细辛醚各剂量组和 β -细辛醚组(12.5 、 $25.0\text{ }\mu\text{g/mL}$)的细胞凋亡率均下降($P<0.01$)。VIP拮抗剂干预后, β -细辛醚组(12.5 、 $25.0\text{ }\mu\text{g/mL}$)、VIP组细胞凋亡率均升高(均 $P<0.05$); α -细辛醚各剂量组则差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。见图2、3。

与空白对照组比较,模型对照组凋亡相关因子caspase-3、p53水平升高(均 $P<0.05$);与模型对照组比较, α -细辛醚组($1.5\text{ }\mu\text{g/mL}$)、 β -细辛醚组(12.5 、 $25.0\text{ }\mu\text{g/mL}$)、VIP组caspase-3水平均降低(均 $P<0.05$); α -细辛醚组(1.0 、 $1.5\text{ }\mu\text{g/mL}$)、 β -细辛醚各剂量组、VIP组p53水平均降低(均 $P<0.05$)。VIP拮抗剂干预后, β -细辛醚组(12.5 、 $25.0\text{ }\mu\text{g/mL}$)、VIP组caspase-3、p-53水平均升高(均 $P<0.05$); α -细辛醚各剂量组则差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。见图3。

上述结果提示, α -细辛醚、 β -细辛醚均具有抗

细胞凋亡、降低凋亡因子水平的作用,其中 β -细辛醚抑制细胞凋亡的作用与VIP有关。

2.3 α -细辛醚、 β -细辛醚对细胞炎症因子及氧化因子水平的影响

与空白对照组比较,模型对照组IL-1、TNF- α 水平升高,IL-10水平下降(均 $P<0.05$)。与模型对照组比较, α -细辛醚各剂量组、 β -细辛醚各剂量组、

VIP组的IL-1、TNF- α 水平均下降(均 $P<0.05$); α -细辛醚各剂量组、 β -细辛醚组(12.5、25.0 $\mu\text{g/mL}$)、VIP组的IL-10水平均升高(均 $P<0.05$)。VIP拮抗剂干预后, β -细辛醚各剂量组和VIP组的IL-1水平均升高, β -细辛醚组(12.5、25.0 $\mu\text{g/mL}$)、VIP组的IL-10水平均降低, β -细辛醚组(25.0 $\mu\text{g/mL}$)、VIP组的TNF- α 水平均升高(均 $P<0.05$); α -细辛醚各剂量组差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。见图4。

与空白对照组比较,模型对照组iNOS、NO水平均升高(均 $P<0.01$)。与模型对照组比较, α -细辛醚组(1.0、1.5 $\mu\text{g/mL}$)、 β -细辛醚各剂量组和VIP组iNOS、NO水平均降低(均 $P<0.05$)。VIP拮抗剂干预后, β -细辛醚组(12.5、25.0 $\mu\text{g/mL}$)、VIP组的iNOS、NO水平均升高(均 $P<0.05$); α -细辛醚各剂量组差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。见图5。

结果提示, α -细辛醚、 β -细辛醚具有下调细胞炎症因子、氧化因子水平的作用,其中 β -细辛醚抑制细胞炎症

与空白对照组比较, ** $P<0.01$;与模型对照组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$;与无VIP拮抗剂比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ 。VIP: 血管活性肽。

图1 各组细胞存活率比较($n=3$)

Figure 1 Survival rates of PC12 cells in each group ($n=3$)

VIP: 血管活性肽。

图2 流式细胞术检测各组细胞凋亡结果($n=3$)

Figure 2 Flow cytometry results of cell apoptosis in each group ($n=3$)

A: 各组细胞凋亡率比较; B: 各组caspase-3水平比较; C: 各组p53水平比较。与空白对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与模型对照组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$; 与无VIP拮抗剂比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ 。VIP: 血管活性肠肽; caspase: 胱天蛋白酶。

图3 各组细胞凋亡率和凋亡因子表达水平比较($n=3$)

Figure 3 Cell apoptosis rates and apoptosis-associated factors in each group ($n=3$)

因子和氧化因子水平作用可能与VIP有关。

2.4 α -细辛醚、 β -细辛醚对细胞JNK、p38MAPK蛋白表达的影响

与空白对照组比较, 模型对照组JNK、

p38MAPK蛋白表达水平均升高(均 $P<0.01$)。与模型对照组比较, α -细辛醚各剂量组、 β -细辛醚各剂量组、VIP组JNK、p38MAPK蛋白表达水平均降低(均 $P<0.05$)。VIP拮抗剂干预后, β -细辛醚各剂量组、VIP组JNK、p38MAPK蛋白表达水平均升高($P<0.01$); α -细辛醚各剂量组差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。见图6、7。结果提示, α -细辛醚、 β -细辛醚可抑制JNK和p38MAPK蛋白表达,其中 β -细辛醚对JNK、p38MAPK蛋白表达的抑制作用可能与VIP有关。

3 讨论

AD是一种年龄相关的神经系统变性疾病,其发病机制与脑内A β 沉积、神经炎症反应等关系密切。笔者团队前期研究表明,石菖蒲挥发油可以改善东莨菪碱所致学习记忆障碍模型大鼠的学习记忆能力,其机制可能与抗氧化损伤相关。石菖蒲挥发油的主要成分为 α -细辛醚和 β -细辛醚。 α -细辛醚可通过调节谷氨酸转运体-1和N-甲基-D-天冬氨酸受体等谷氨酸相关受体蛋白的异常表达,降低谷氨酸蓄积过多引起的兴奋性神经毒性,从而改善乙醇诱导的认知功能障碍小鼠的学习记忆^[10]。徐燕等^[11]研究发现, α -细辛醚对脂多糖诱导的大鼠小胶质细胞炎症反应有抑制作用,其机制可能是抑制活化后小胶质细胞核内核因子 κ B的表达,从而降低炎症因子IL-1 β 、TNF- α 的水平。研究表明, α -细辛醚与低浓度神经生长因子共同作用可增强神经生长因子对PC12细胞的诱导分化作用,可见 α -细辛醚具有神经元营养作用,其或许是治疗神经系统变性疾病潜在药物^[12]。 β -细辛醚具有抗炎、抗氧化应激、抗A β 沉积、抗神经元凋亡等药理作用^[13-15]。 β -细辛醚可减少A β_{25-35} 诱导的神经母细胞瘤炎症因子TNF- α 、IL-1 β 和IL-6水平,减轻炎症反应;降低过氧化氢诱导PC12细胞

A: 各组IL-1水平比较; B: 各组IL-10水平比较; C: 各组TNF- α 水平比较。与空白对照组比较, * P <0.05, ** P <0.01; 与模型对照组比较, # P <0.05, ## P <0.01; 与无VIP拮抗剂比较, Δ P <0.05, $\Delta\Delta$ P <0.01。VIP: 血管活性肠肽; IL: 白介素; TNF: 肿瘤坏死因子。

图4 各组细胞炎症因子比较($n=3$)

Figure 4 Expression of inflammatory factors in each group ($n=3$)

中氧化损伤标记物活性氧含量和丙二醛活性并且提高细胞中抗氧化物超氧化物歧化酶、谷胱甘肽和过氧化氢酶活性^[16-17]。Yang等^[18]研究发现 β -细辛醚灌胃4周可降低APP/PS1双转基因AD小鼠晚期糖基化终末产物水平,减少大脑皮质和海马中 $A\beta$ 的沉积,提高神经元的存活率。本文资料进一步探究了 α -细辛醚、 β -细辛醚对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的PC12细胞损伤模型的保护作用及相关机制。

神经元间出现 $A\beta$ 沉积是AD的主要病理表现之一。寡聚体的 $A\beta_{1-42}$ 对细胞具有强毒性,可导致

神经炎症发生发展,从而引起严重的神经元损伤^[19]; $A\beta_{25-35}$ 是 $A\beta_{1-42}$ 的活性片段,该片段与全长的 $A\beta$ 具有类似的神经毒性特征^[20-21]。PC12细胞来源于成年大白鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤,具有较典型的神经内分泌细胞的特征,常用于体外神经元损伤作用的机制研究,是研究药物对神经元保护作用的理想细胞^[22]。因此,本研究选用 $A\beta_{25-35}$ 诱导PC12细胞从而建立 $A\beta$ 毒性损伤细胞模型,模拟神经元损伤情况。

细胞损伤水平与细胞炎症因子TNF- α 、IL-1和IL-10水平密切相关^[23],降低炎症因子水平对于改善细胞损伤具有重要作用。氧化应激反应可促进炎症反应的发展,氧化应激相关因子NO、iNOS水平与炎症反应密切相关^[24]。炎症反应和氧化应激反应会导致细胞损伤,促进细胞凋亡。本文资料显示, β -细辛醚、 α -细辛醚均可降低炎症因子和氧化因子水平,改善氧化应激反应,从而降低细胞凋亡因子水平,改善细胞存活情况,提示 β -细辛醚、 α -细辛醚具有良好的抗炎、抗氧化应激、抗 $A\beta$ 毒性和抗细胞凋亡作用。

VIP是保持中枢神经系统内环境稳定的重要神经肽。Zhou等^[25]通过动物实验发现,VIP具有拮抗兴奋性毒素ibotenate介导的兴奋性神经毒性的作用;Korkmaz等^[26]发现,5 $\times$ FAD小鼠在VIP持续给药2个月后,其皮质区域的 $A\beta_{1-40}$ 和 $A\beta_{1-42}$ 斑块显著减少,海马/大脑和胼胝体/大脑比值增加,大脑萎缩情况改善。此外,还有研究发现VIP通过非腺苷酸环化酶—环磷酸腺苷依赖的IKK/I κ B途径降低IL-12、TNF- α 的水平,从而减轻大脑炎症反应^[27]。因此,VIP具有减轻 $A\beta$ 神经毒性的作用。

研究发现,JNK/MAPK通路 with 细胞增殖、炎症、凋亡等信号通路相关^[28-30]。MAPK是炎症反应中促炎症因子的关键调节因子,在启动和维持炎症反应中发挥重要作用。本文资料显示, β -细

辛醚通过抑制JNK/MAPK通路,降低炎症因子水平,从而减轻炎症反应。本文资料显示, β -细辛醚通过抑制JNK/MAPK通路,降低炎症因子水平,从而减轻炎症反应。

图5 各组细胞氧化因子比较($n=3$)

Figure 5 Expression of oxidation-related factors in each group ($n=3$)

辛醚显著降低了JNK、p38MAPK蛋白水平;VIP拮抗剂干预后,JNK、p38MAPK蛋白的表达水平又显著升高,表明具体机制可能与促进VIP的分泌有关。此结果与Yi等^[31]研究β-细辛醚通过DNA甲基化和JNK/c-Jun介导的转录调节在损伤神经元中抑制炎症因子TNF-α表达的结果相吻合。研究还发现,α-细辛醚也可以抑制JNK、p38MAPK蛋白表达,但VIP拮抗剂干预后,JNK、p38MAPK蛋白表达水平无明显变化,提示其机制与VIP分泌水平

无关。

综上所述,本文资料表明,α-细辛醚、β-细辛醚可改善Aβ₂₅₋₃₅诱导PC12细胞炎症反应。其中,β-细辛醚可能通过促进VIP的分泌调控JNK/MAPK通路,从而抑制炎症因子、氧化因子水平,改善PC12细胞凋亡,而α-细辛醚的作用机制与VIP分泌水平无明显关联,有待后期进一步开展研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] LANE C A, HARDY J, SCHOTT J M. Alzheimer's disease[J]. *Eur J Neurol*, 2018, 25(1): 59-70.
- [2] SHOJI M. Drug therapy for Alzheimer's disease[J]. *Brain Nerve*, 2010, 62(7): 777-785.
- [3] NHAN H S, CHIANG K, KOO E H. The multifaceted nature of amyloid precursor protein and its proteolytic fragments: friends and foes[J]. *Acta Neuropathol*, 2015, 129(1): 1-19.
- [4] ANDREW R J, KELLETT K A B, THINAKARAN G, et al. A greek tragedy: the growing complexity of alzheimer amyloid precursor protein proteolysis[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(37): 19235-19244.
- [5] GENG Y, LI C, LIU J, et al. Beta-asarone improves cognitive function by suppressing neuronal apoptosis in the beta-amyloid hippocampus injection rats[J]. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33(5): 836-843.
- [6] XIAO B, HUANG X, WANG Q, et al. Beta-asarone alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury by

A: α-细辛醚组JNK、p38蛋白条带图; B: β-细辛醚组JNK、p38蛋白条带图。VIP: 血管活性肠肽; JNK: c-Jun氨基端激酶; p38MAPK: p38丝裂原活化蛋白激酶。

图6 各组JNK、p38MAPK蛋白表达电泳图

Figure 6 Electrophoregrams of JNK and p38MAPK protein expression in each group

A: α -细辛醚组与其他各组JNK蛋白表达水平比较; B: α -细辛醚组与其他各组p38蛋白表达水平比较; C: β -细辛醚组与其他各组JNK蛋白表达水平比较; D: β -细辛醚组与其他各组p38蛋白表达水平比较. 与空白对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型对照组比较, ## $P < 0.01$; 与无VIP拮抗剂比较, $\Delta\Delta P < 0.01$. VIP: 血管活性肠肽; JNK: c-Jun氨基端激酶; p38MAPK: p38丝裂原活化蛋白激酶.

图7 各组JNK、p38MAPK蛋白表达水平比较($n=3$)

Figure 7 Expression of JNK and p38MAPK protein in each group ($n=3$)

inhibiting inflammatory response and NLRP3 inflammasome mediated pyroptosis[J]. *Biol Pharm Bull*, 2020, 43(7): 1046-1051.

- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 142-143. National Pharmacopoeia Commission. The Pharmacopoeia of the People's Republic of China: 2020 Edition One[S]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020: 142-143. (in Chinese)
- [8] 韩建卫, 李晶, 王知斌, 等. GC-MS联用法分析石菖蒲挥发油的化学成分[J]. *化学工程师*, 2019, 33(4): 33-36. HAN Jianwei, LI Jing, WANG Zhibin, et al. Analysis of chemical constituents of volatile oil from *Acorus Tatarinowii* Schott by GC-MS[J]. *Chemical Engineers*, 2019, 33(4): 33-36. (in Chinese)
- [9] FU Y, YANG Y, SHI J, et al. *Acori tatarinowii* rhizoma extract ameliorates Alzheimer's pathological syndromes by repairing myelin injury and lowering Tau phosphorylation in mice[J]. *Pharmazie*, 2020, 75(8): 395-400.
- [10] LI Q, XU F, ZHANG Q, et al. Effect of α -asarone on ethanol-induced learning and memory impairment in mice and its underlying mechanism[J]. *Life Sci*, 2019, 238: 116898.
- [11] 徐燕, 苗静琨, 刘辉娟, 等. α -细辛醚对脂多糖诱

导大鼠小胶质细胞炎症反应的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2017, 33(2): 140-143.

- XU Yan, MIAO Jingkun, LIU Huijuan, et al. Effect of α -asarone on lipopolysaccharide induced inflammatory responses in primary cultured microglial cells of rat[J]. *Chinese Journal of Clinical Medicine Journal of Pharmacology*, 2017, 33(2): 140-143. (in Chinese)
- [12] DONG H, GAO Z, RONG H, et al. β -asarone reverses chronic unpredictable mild stress-induced depression-like behavior and promotes hippocampal neurogenesis in rats[J]. *Molecules*, 2014, 19(5): 5634-5649.
- [13] 包玉婷, 何滢, 周小杰, 等. β -细辛醚对 $A\beta_{1-42}$ 诱导PC12细胞炎症因子表达的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2017, 35(12): 3019-3023. BAO Yuting, HE Lian, ZHOU Xiaojie, et al. Experimental study on impact of β -asarone on inflammatory cytokines secreted by PC12 cells induced by $A\beta_{1-42}$ [J]. *Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2017, 35(12): 3019-3023. (in Chinese)
- [14] 王博林, 宣玲, 戴世杰, 等. β -细辛醚对 $A\beta_{1-42}$ 联合2-VO致AD大鼠的保护作用及机制初探[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(24): 4847-4854. WANG Bolin, XUAN Ling, DAI Shijie, et al. Protective effect of β -asarone on AD rat model induced by intracerebroventricular injection of $A\beta_{1-42}$ com-

- bined 2-VO and its mechanism[J]. **Chinese Journal of Chinese Materia Medica**, 2017, 42(24): 4847-4854. (in Chinese)
- [15] WANG N, WANG H, LI L, et al. β -asarone inhibits amyloid- β by promoting autophagy in a cell model of alzheimer's disease[J]. **Front Pharmacol**, 2019, 10: 1529-1538.
- [16] CHANG W, TENG J. β -asarone prevents A β 25-35-induced inflammatory responses and autophagy in SH-SY5Y cells: down expression Beclin-1, LC3B and up expression Bcl-2[J]. **Int J Clin Exp Med**, 2015, 8(11): 20658-20663.
- [17] 黑鑫鑫. 石菖蒲活性成分 β -细辛醚对H₂O₂诱导的PC12细胞损伤的保护作用及机制研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2020.
- HEI Xinxin. The research of the protective effect of β -asarone, an active ingredient of *Acorus tatarinowii*, on H₂O₂-induced PC12 cells and its underlying mechanism[D]. Nanjing: Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, 2020. (in Chinese)
- [18] YANG C, LI X, MO Y, et al. β -asarone mitigates amyloidosis and downregulates rage in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease[J]. **Cell Mol Neurobiol**, 2016, 36(1): 121-130.
- [19] ZHANG P, KISHIMOTO Y, GRAMMATIKAKIS I, et al. Senolytic therapy alleviates A β -associated oligodendrocyte progenitor cell senescence and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model[J]. **Nat Neurosci**, 2019, 22(5): 719-728.
- [20] KAMINSKY Y G, MARLATT M W, SMITH M A, et al. Subcellular and metabolic examination of amyloid- β peptides in Alzheimer disease pathogenesis: evidence for A β ₂₅₋₃₅[J]. **Exp Neurol**, 2010, 221(1): 26-37.
- [21] MILLUCCI L, GHEZZI L, BERNARDINI G, et al. Conformations and biological activities of amyloid beta peptide 25-35[J]. **Curr Protein Pept Sci**, 2010, 11(1): 54-67.
- [22] WIATRAK B, KUBIS-KUBIAK A, PIWOWAR A, et al. PC12 cell line: cell types, coating of culture vessels, differentiation and other culture conditions[J]. **Cells**, 2020, 9(4): 958-972.
- [23] SUBHRAMANYAM C S, WANG C, HU Q, et al. Microglia-mediated neuroinflammation in neurodegenerative diseases[J]. **Semin Cell Dev Biol**, 2019, 94: 112-120.
- [24] BLANCO S, HERNÁNDEZ R, FRANCHELLI G, et al. Melatonin influences NO/NOS pathway and reduces oxidative and nitrosative stress in a model of hypoxic-ischemic brain damage[J]. **Nitric Oxide**, 2017, 62: 32-43.
- [25] ZHOU J N, HOFMAN M A, SWAAB D F. VIP neurons in the human SCN in relation to sex, age, and Alzheimer's disease[J]. **NeuroBiol Aging**, 1995, 16(4): 571-576.
- [26] KORKMAZ O T, AY H, AYTAN N, et al. Vasoactive intestinal peptide decreases β -amyloid accumulation and prevents brain atrophy in the 5xfad mouse model of alzheimer's disease[J]. **J Mol Neurosci**, 2019, 68(3): 389-396.
- [27] DELGADO M, POZO D, GANEA D. The significance of vasoactive intestinal peptide in immunomodulation[J]. **Pharmacol Rev**, 2004, 56(2): 249-290.
- [28] SETERNES O M, KIDGER A M, KEYSE S M. Dual-specificity MAP kinase phosphatases in health and disease[J]. **Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res**, 2019, 1866(1): 124-143.
- [29] FERGUSON B S, NAM H, MORRISON R F. Dual-specificity phosphatases regulate mitogen-activated protein kinase signaling in adipocytes in response to inflammatory stress[J]. **Cell Signal**, 2019, 53: 234-245.
- [30] LI M, ZHANG D, GE X, et al. TRAF6-p38/JNK-ATF2 axis promotes microglial inflammatory activation[J]. **Exp Cell Res**, 2019, 376(2): 133-148.
- [31] YI M, WANG D, CHEN Y, et al. β -Asarone suppresses TNF- α expression through DNA methylation and c-Jun-mediated transcription modulation in scratch-injured neuronal cells[J/OL]. **J Biochem Mol Toxicol**, 2021, 35(7): e22798.

[本文编辑 刘丽娜 沈 敏]