

本文引用: 马宝君, 叶涵斌, 孟高强, 叶 子. 牛膝提取物含药血清对 $A\beta_{1-42}$ 诱导的神经元氧化应激和凋亡的调控机制研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(8): 1366-1372.

牛膝提取物含药血清对 $A\beta_{1-42}$ 诱导的神经元氧化应激和凋亡的调控机制研究

马宝君, 叶涵斌, 孟高强, 叶 子*

南通市第一人民医院神经外科, 江苏 南通 226001

[摘要] 目的 探讨牛膝提取物含药血清对 β 淀粉样蛋白₁₋₄₂(amyloid β -protein₁₋₄₂, $A\beta_{1-42}$)诱导的神经元氧化应激和凋亡的影响及作用机制。方法 体外培养大鼠海马神经元,分为对照组,模型组($A\beta_{1-42}$ 诱导神经元),牛膝低、中、高剂量组(15、30、45 $\mu\text{g/mL}$ 的牛膝提取物含药血清作用于 $A\beta_{1-42}$ 诱导的神经元),si-ZBTB20-AS1组 [$A\beta_{1-42}$ 诱导转染锌指和 BTB 结构域蛋白 20 的反义 RNA 小干扰 RNA 的神经元]和 si-NC 组($A\beta_{1-42}$ 诱导转染乱序无意义阴性序列的神经元)。ELISA 法检测超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量,CCK-8 法检测细胞存活率,流式细胞术检测细胞凋亡率,RT-qPCR 法检测 ZBTB20-AS1 表达水平,Western blot 法检测细胞增殖抗原 Ki67 和胱天蛋白酶-3(cysteine aspartic acid specific protease-3, Caspase-3)表达水平。结果 与对照组比较,模型组 SOD 含量、细胞存活率、Ki67 蛋白表达均降低($P<0.05$),MDA 含量、细胞凋亡率、BTB20-AS1 表达、Caspase-3 蛋白表达均升高($P<0.05$)。与模型组比较,牛膝中、高剂量组 SOD 含量、细胞存活率、Ki67 蛋白表达均升高($P<0.05$),MDA 含量、细胞凋亡率、BTB20-AS1 表达、Caspase-3 蛋白表达均降低($P<0.05$)。与 si-NC 组比较,si-ZBTB20-AS1 组 SOD 含量、细胞存活率、Ki67 蛋白表达均升高($P<0.05$),MDA 含量、细胞凋亡率、BTB20-AS1 表达、Caspase-3 蛋白表达均降低($P<0.05$)。结论 牛膝提取物含药血清可能通过下调 ZBTB20-AS1 表达抑制 $A\beta_{1-42}$ 诱导的海马神经元氧化应激和凋亡。

[关键词] 牛膝提取物; β 淀粉样蛋白₁₋₄₂; 海马神经元; 氧化应激; 凋亡

[中图分类号]R285.5

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.08.003

Regulatory mechanism of Achyranthis bidentatae Radix extract-containing serum on neuronal oxidative stress and apoptosis induced by $A\beta_{1-42}$

MA Baojun, YE Hanbin, MENG Gaoqiang, YE Zi*

Department of Neurosurgery, The First People's Hospital of Nantong, Nantong, Jiangsu 226001, China

[Abstract] **Objective** To explore the effects and mechanism of Achyranthis bidentatae Radix extract-containing serum on neuronal oxidative stress and apoptosis induced by amyloid β -protein₁₋₄₂ ($A\beta_{1-42}$). **Methods** Rat hippocampal neurons were cultured in vitro and divided into control group, model group ($A\beta_{1-42}$ induced nerves), low-, medium-, and high-dose Achyranthis bidentatae Radix groups (15, 30, 45 $\mu\text{g/mL}$ Achyranthis bidentatae Radix extract-containing serum on $A\beta_{1-42}$ -induced nerves), si-ZBTB20-AS1 group [$A\beta_{1-42}$ induced neurons transfected with antisense RNA of zinc finger and BTB domain protein 20 small interfering RNA] and si-NC group ($A\beta_{1-42}$ induced neurons transfected with disorderly meaningless negative sequence). Content of superoxide

[收稿日期]2024-06-12

[基金项目]江苏省自然科学基金项目(BK20221043)。

[通信作者]* 叶 子,男,硕士,主治医师,E-mail:ntsyymybj@163.com。

dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) were determined by ELISA; CCK-8 method was used to check the cell survival rate; flow cytometry was used to test the apoptosis rate; RT-qPCR was used to check the expression level of ZBTB20-AS1; Western blot method was used to measure the expression levels of cell proliferation antigen Ki67 and cysteine aspartic acid-specific protease-3 (Caspase-3) protein. **Results** Compared with control group, SOD content, cell survival rate, and the protein expression of Ki67 in model group were lower ($P<0.05$), MDA content, apoptosis rate, the expression of BTB20-AS1, and the protein expression of Caspase-3 were higher ($P<0.05$). Compared with the model group, SOD content, cell survival rate, and the protein expression of Ki67 in the middle- and high-dose *Achyranthis bidentatae* Radix extract groups were higher ($P<0.05$), and MDA content, apoptosis rate, the expression of BTB20-AS1, and the protein expression of Caspase-3 were lower ($P<0.05$). Compared with the si-NC group, SOD content, cell survival rate, and the protein expression of Ki67 in the si-ZBTB20-AS1 group were higher ($P<0.05$), and MDA content, apoptosis rate, the expression of BTB20-AS1, and the protein expression of Caspase-3 were lower ($P<0.05$). **Conclusion** *Achyranthis bidentatae* Radix extract-containing serum may inhibit $A\beta_{1-42}$ induced oxidative stress and apoptosis of hippocampal neurons by down-regulating the expression of ZBTB20-AS1.

[**Keywords**] *Achyranthis bidentatae* Radix extract; amyloid β -protein₁₋₄₂; hippocampal neurons; oxidative stress; apoptosis

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种以记忆减退、认知障碍、人格改变为特征的神经退行性疾病,其发病率呈现增长趋势,严重威胁老年人身心健康^[1]。 β 淀粉样蛋白(amyloid β -protein, $A\beta$)沉积引起的神经细胞氧化应激和凋亡是AD发病的关键因素^[2]。因此,降低 $A\beta$ 引起的神经细胞氧化应激和凋亡对AD的治疗尤为重要。中药牛膝是苋科植物牛膝的根,具有活血化瘀、补肝肾、强筋骨等功效。研究表明,牛膝中含有一种神经再生素,可促进神经细胞再生^[3]。但目前,牛膝对 $A\beta$ 诱导的神经元氧化应激和凋亡的影响及分子机制还未见相关报道。

锌指和 BTB 结构域蛋白 20 的反义 RNA (anti sense RNA of zinc finger and BTB domain protein 20, ZBTB20-AS1)是一种长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA),芯片杂交实验结果显示ZBTB20-AS1在AD模型细胞中显著上调^[4],且近期研究发现敲低ZBTB20-AS1可抑制 β 淀粉样蛋白₁₋₄₂(amyloid β -protein₁₋₄₂, $A\beta_{1-42}$)诱导的神经元凋亡^[5],但其对 $A\beta$ 诱导的神经元氧化应激和凋亡的影响仍未知。有研究表明,lncRNA可介导中药对AD的治疗过程^[6]。故本研究采用 $A\beta_{1-42}$ 诱导大鼠海马神经元建立AD细胞模型,观察牛膝提取物含药血清对 $A\beta_{1-42}$ 诱导的神经元氧化应激和凋亡的影响及其能否通过调控ZBTB20-AS1发挥作用,以期为AD治疗药物的研发提供一定的实验依据。

1 材料

1.1 主要药物与试剂

大鼠海马神经元(武汉普诺赛生命科技有限公司,批号:CP-R107);怀牛膝饮片(焦作保和堂制药有限公司,批号:210918);Neurobasal-A培养基、B27

无血清添加剂(美国Gibco公司,批号:10888022、12587010);丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:A003-1-2、A001-3-2);CCK-8检测试剂盒、Annexin V-FITC/PI细胞凋亡试剂盒、Lipofectamine™ 2000试剂盒、二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号:CA1210、CA1020、YT11668、PC0020);ZBTB20-AS1的小干扰RNA(si-ZBTB20-AS1)、乱序无意义阴性序列(si-NC)(上海吉凯基因公司,批号:20211023、20211024);逆转录试剂盒、PCR试剂盒(大连宝生物工程有限公司,批号:RR390A、RR820A);Trizol试剂(美国Invitrogen公司,批号:15596018);PCR引物(上海生工生物工程有限公司);兔抗鼠细胞增殖抗原Ki67、胱天蛋白酶-3(cysteine aspartic acid specific protease-3, Caspase-3)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)多克隆抗体(美国Santa Cruz公司,批号:sc-23900、sc-56053、sc-365062)。

1.2 主要仪器

Mx3005P型PCR仪(美国Stratagene公司);i-Mark680型多功能酶标仪、BD FACSCanto II型流式细胞仪(美国Bio-Rad公司)。

1.3 实验动物

实验动物为健康新西兰大白兔,共12只,雌雄各半,2~3月龄,体质量(1.66±0.37) kg。所有实验动物均由江苏集萃药康生物科技股份有限公司提供,动物生产许可证号:SCXK(苏)2023-0009。动物饲养在相对无菌环境中,温度(17.29±0.27)℃,相对湿度59.96%±0.42%,光照/黑暗12 h,自然通风,自由饮

食饮水。实验获得南通市第一人民医院实验动物伦理委员会批准(伦理批号:2023085)。

2 方法

2.1 牛膝提取物制备

参考文献方法制备牛膝提取物^[7]。怀牛膝饮片粉碎,称取 1 000 g 粉末,加入 400 mL 50%无水乙醇,密封浸渍 7 d。取上清液,继续加 300 mL 50%无水乙醇,同样浸渍 7 d。再次取上清液,加 300 mL 50%无水乙醇,浸渍 7 d。取上清液,与浸出液合并,静置 24 h 后过滤、浓缩,即得到牛膝醇提物,浓度为 1 g 生药/mL。

2.2 细胞培养和转染

复苏大鼠海马神经元,培养至对数生长期,以 1×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,先用 50 μ L Opti-MEM 稀释 10 pmol si-ZBTB20-AS1、10 pmol si-NC 和 2 μ L Lipofectamine 2000 试剂,然后将稀释后的 si-ZBTB20-AS1、si-NC 分别与 Lipofectamine 2000 混匀,20 min 后将 250 μ L 复合物加入 6 孔板中。转染 6 h 后,更换培养基。再培养 24 h,收集细胞用于后续实验。

2.3 牛膝醇提物含药血清制备

依据 2020 年版《中华人民共和国药典》,牛膝的常规用量为 12 g^[8]。根据药理实验中动物与人体的等效剂量换算^[9],实验兔的每日用量约为 1 g/kg。按照常规用药量的 6 倍,给予 12 只实验兔牛膝醇提物 6 g/(kg·d)。每日灌胃 2 次,每次使用蒸馏水配制成 10 mL 溶液。连续用药 7 d 后,制备牛膝醇提物含药血清。

2.4 牛膝提取物含药血清的作用浓度筛选

将大鼠海马神经元接种在 96 孔板中(5×10^3 个细胞/孔),每组设 6 个复孔,24 h 后,进行如下实验。(1)用体积分数为 10%的含不同浓度牛膝提取物血清(终浓度为 0、5、10、15、30、45、60、75 μ L/mL)的 DMEM 培养基处理细胞 24 h,然后加入 CCK-8 溶液(10 μ L/孔),并在 37 $^{\circ}$ C 下再孵育 2 h。在酶标仪上于 450 nm 处测定每孔的吸光度(absorbance, A)值,计算细胞存活率,筛选牛膝提取物血清的无毒剂量。(2)分别用体积分数为 10%的含不同浓度牛膝提取物血清(终浓度为 0、5、10、15、30、45 μ L/mL)的 DMEM 培养基处理细胞 24 h,随后更换为含 30 μ mol/L $A\beta_{1-42}$ 的培养基培养 24 h, CCK-8 法检测细胞存活率,筛选牛膝提取物血清对 $A\beta_{1-42}$ 致大鼠海马神经元细胞损伤的最佳作用浓度。细胞存活率 = $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

2.5 细胞分组及处理

大鼠海马神经元分为对照组、模型组及牛膝低、中、高剂量组。对照组细胞正常培养,模型组细胞使用含 30 μ mol/L $^{100}A\beta_{1-42}$ 的培养基培养 24 h,牛膝低、中、高剂量组分别使用含体积分数为 10%的牛膝提取物血清与 30 μ mol/L $A\beta_{1-42}$ 的培养基共同培养 24 h。转染 si-ZBTB20-AS1、si-NC 的细胞均用含 30 μ mol/L $A\beta_{1-42}$ 的培养基培养 24 h,记为 si-ZBTB20-AS1 组和 si-NC 组。

2.6 ELISA 法检测细胞中 SOD 和 MDA 含量

细胞以 2.5×10^4 个/孔接种于 24 孔板中,每组设 3 个复孔。结束 24 h 后,弃培养基,收集细胞并裂解。3 500 r/min 离心 5 min(离心半径 10 cm),分别参照 SOD 和 MDA 试剂盒说明书检测上清液中 SOD、MDA 的水平。

2.7 CCK-8 法检测细胞存活率

细胞以 0.5×10^4 个/孔接种于 96 孔板中,每组设 3 个复孔。培养 24 h 后,加 10 μ L CCK-8 溶液,孵育 1.5 h,酶标仪 450 nm 处测定 A 值,计算细胞存活率。细胞存活率 = $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

2.8 流式细胞术检测细胞凋亡率

细胞以 2.5×10^4 个/孔接种于 24 孔板中,每组设 3 个复孔。培养 24 h 后,弃培养基,收集细胞。加 500 μ L 结合缓冲液,用移液器轻轻吹打混悬细胞。加 10 μ L Annexin V-FITC,避光孵育 10 min。再加入 5 μ L PI,避光孵育 10 min,流式细胞仪检测细胞凋亡率。

2.9 RT-qPCR 法检测细胞中 ZBTB20-AS1 表达水平

Trizol 试剂提取各组细胞中总 RNA,将 RNA 逆转录为 cDNA,行 PCR 扩增。扩增条件:95 $^{\circ}$ C 10 min,95 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,共 35 个循环。引物序列:ZBTB20-AS1 正向引物 5'-GTTTCGTGATCGTACGTCGTGTGGG-3',反向引物 5'-CGTGGGGAAGTGTGTTACGT-3';内参 GAPDH 正向引物 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAG-3',反向引物 5'-TGTGAAGACGCCAGTGA-3'。 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 ZBTB20-AS1 表达水平。

2.10 Western blot 法检测细胞中 Ki67、Caspase-3 蛋白表达水平

RIPA 试剂提取细胞中总蛋白,BCA 试剂盒对蛋白定量,以 20 μ g/孔蛋白行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳后,将分离蛋白电转移至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉封闭 1 h。分别加入 Ki67(1:

1 000)、Caspase-3 (1:800) 和 GAPDH (1:1 000) 一抗,4 ℃ 孵育过夜。加入辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:3 000),37 ℃ 孵育 1 h。加化学发光试剂避光显影,凝胶成像系统曝光拍照。以 GAPDH 为内参,采用 Image J 软件分析目的蛋白条带灰度值。目的蛋白的相对表达水平以其条带灰度值与 GAPDH 条带灰度值的比值表示。

2.11 统计学分析

利用 SPSS 22.0 软件分析实验数据。符合正态分布的计量资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。两组间比较采用独立样本 *t* 检验;多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 牛膝提取物含药血清的作用浓度筛选

与 0 $\mu\text{g/mL}$ 牛膝提取物含药血清比较,60、75 $\mu\text{L/mL}$ 牛膝提取物含药血清干预使大鼠海马神经

元细胞存活率降低 ($P < 0.05$);5、10、15、30、45 $\mu\text{L/mL}$ 牛膝提取物血清干预对大鼠海马神经元细胞存活率无明显影响,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),即为无毒剂量。详见图 1。

与 0 $\mu\text{L/mL}$ 牛膝提取物含药血清+0 $\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{1-42}$ 比较,0 $\mu\text{L/mL}$ 牛膝提取物含药血清+30 $\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{1-42}$ 干预使大鼠海马神经元细胞存活率降低 ($P < 0.05$)。与 0 $\mu\text{L/mL}$ 牛膝提取物含药血清+30 $\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{1-42}$ 比较,30、45 $\mu\text{L/mL}$ 牛膝提取物含药血清+30 $\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{1-42}$ 干预使大鼠海马神经元细胞存活率升高 ($P < 0.05$)。详见图 1。后续采用 15、30、45 $\mu\text{L/mL}$ 牛膝提取物含药血清进行实验。

3.2 牛膝提取物含药血清对 $\text{A}\beta_{1-42}$ 诱导的海马神经元氧化应激的影响

与对照组比较,模型组细胞中 SOD 含量降低 ($P < 0.05$),MDA 含量升高 ($P < 0.05$)。与模型组及牛膝低剂量组比较,牛膝中、高剂量组细胞中 SOD 含量升高 ($P < 0.05$),MDA 含量降低 ($P < 0.05$)。与牛膝

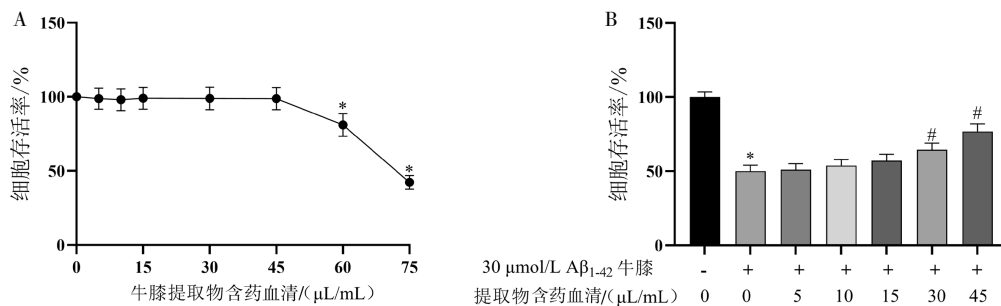


图 1 不同浓度牛膝提取物含药血清对大鼠海马神经元细胞存活率的影响

Fig.1 The effect of different concentrations of Achyranthes extract containing serum on the survival rate of rat hippocampal neurons

注:A.牛膝提取物含药血清对大鼠海马神经元细胞存活率的影响,与 0 $\mu\text{L/mL}$ 牛膝提取物含药血清相比,* $P < 0.05$; B.牛膝提取物含药血清对 $\text{A}\beta_{1-42}$ 致大鼠海马神经元细胞存活率的影响,与 0 $\mu\text{L/mL}$ 牛膝提取物含药血清+0 $\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{1-42}$ 相比,* $P < 0.05$;与 0 $\mu\text{L/mL}$ 牛膝提取物含药血清+30 $\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{1-42}$ 相比,* $P < 0.05$ 。

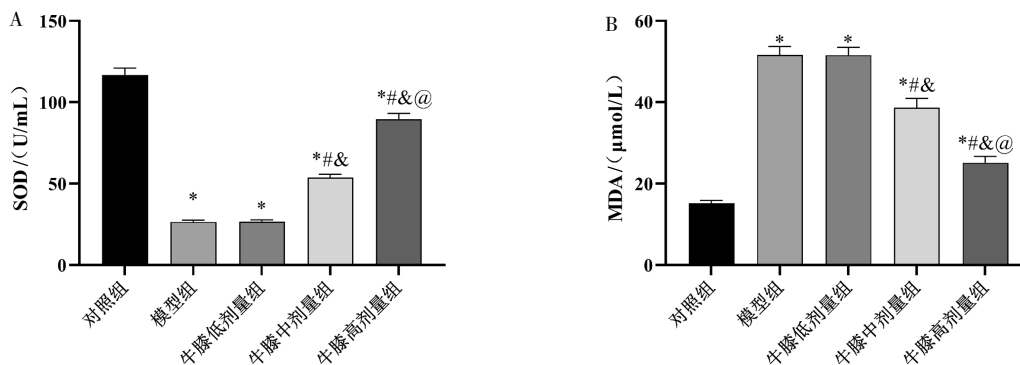


图 2 各组细胞 MDA 和 SOD 含量比较

Fig.2 Comparison of MDA and SOD content in different groups of cells

注:A.各组细胞 SOD 含量比较;B.各组细胞 MDA 含量比较。与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,* $P < 0.05$;与牛膝低剂量组比较,* $P < 0.05$;与牛膝中剂量组比较,* $P < 0.05$ 。

中剂量组比较,牛膝高剂量组细胞中SOD含量升高($P<0.05$),MDA含量降低($P<0.05$)。详见图2。

3.3 牛膝提取物含药血清对 $A\beta_{1-42}$ 诱导的海马神经元细胞存活率和凋亡率的影响

与对照组比较,模型组细胞存活率降低($P<0.05$),细胞凋亡率升高($P<0.05$)。与模型组及牛膝低剂量组比较,牛膝中、高剂量组细胞存活率升高($P<0.05$),细胞凋亡率降低($P<0.05$)。与牛膝中剂量组比较,牛膝高剂量组细胞存活率升高($P<0.05$),细胞凋亡率降低($P<0.05$)。详见图3。

3.4 牛膝提取物含药血清对 $A\beta_{1-42}$ 诱导的海马神经元中 ZBTB20-AS1 及 Ki67 和 Caspase-3 蛋白表达的影响

与对照组比较,模型组细胞中 ZBTB20-AS1 和 Caspase-3 蛋白表达水平升高($P<0.05$),Ki67 蛋白表达水平降低($P<0.05$)。与模型组及牛膝低剂量组比较,牛膝中、高剂量组细胞中 ZBTB20-AS1 和 Caspase-3 蛋白表达水平降低($P<0.05$),Ki67 蛋白表达水平升高($P<0.05$)。与牛膝中剂量组比较,牛膝

高剂量组细胞中 ZBTB20-AS1 和 Caspase-3 蛋白表达水平降低($P<0.05$),Ki67 蛋白表达水平升高($P<0.05$)。详见图4。

3.5 下调 ZBTB20-AS1 对 $A\beta_{1-42}$ 诱导的海马神经元氧化应激的影响

与 si-NC 组比较,si-ZBTB20-AS1 组细胞中 SOD 含量升高($P<0.05$),MDA 含量降低($P<0.05$)。详见图5。

3.6 下调 ZBTB20-AS1 对 $A\beta_{1-42}$ 诱导的海马神经元细胞存活率和凋亡率的影响

与 si-NC 组比较,si-ZBTB20-AS1 组细胞存活率升高($P<0.05$),细胞凋亡率降低($P<0.05$)。详见图6。

3.7 下调 ZBTB20-AS1 对 $A\beta_{1-42}$ 诱导的海马神经元中 ZBTB20-AS1 及 Ki67 和 Caspase-3 蛋白表达的影响

与 si-NC 组比较,si-ZBTB20-AS1 组细胞中 ZBTB20-AS1 和 Caspase-3 蛋白表达水平降低($P<0.05$),Ki67 蛋白表达水平升高($P<0.05$)。详见图7。

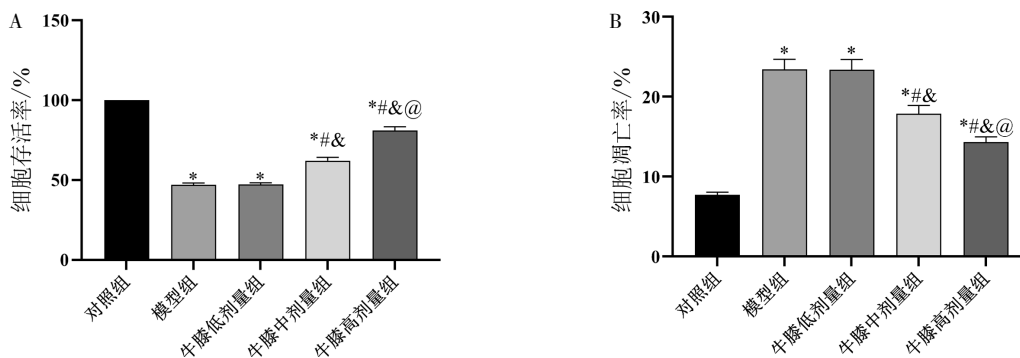


图3 各组细胞存活率和凋亡率比较

Fig.3 Comparison of cell survival rate and apoptosis rate in different groups

注:A.各组细胞存活率比较;B.各组细胞凋亡率比较。与对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$;与牛膝低剂量组比较,& $P<0.05$;与牛膝中剂量组比较,@ $P<0.05$ 。

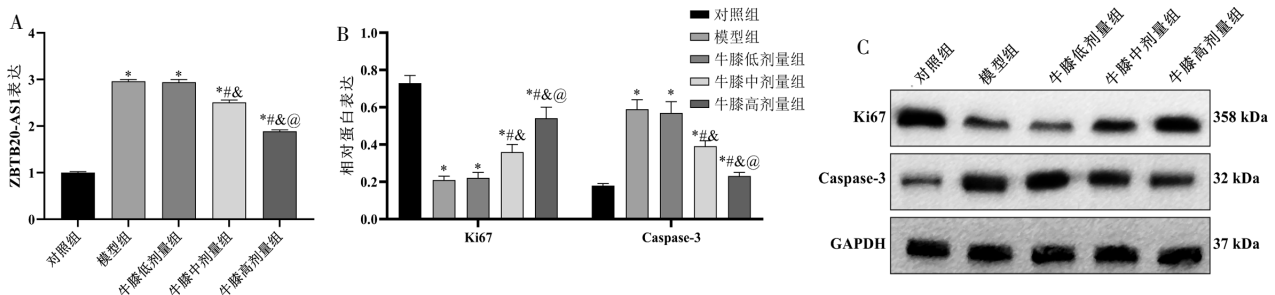


图4 各组细胞中 ZBTB20-AS1 和 Ki67、Caspase-3 蛋白表达水平比较

Fig.4 Comparison of protein expression levels of ZBTB20-AS1, Ki67, and Caspase-3 in different groups of cells

注:A.各组细胞 ZBTB20-AS1 表达水平比较;B.各组细胞 Ki67、Caspase-3 蛋白表达水平比较。与对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$;与牛膝低剂量组比较,& $P<0.05$;与牛膝中剂量组比较,@ $P<0.05$ 。

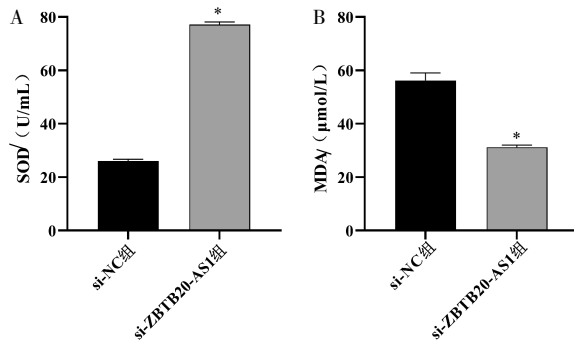


图5 ZBTB20-AS1对 $A\beta_{1-42}$ 诱导的神经元中MDA和SOD表达量的影响

Fig.5 The effect of ZBTB20-AS1 on the expression levels of MDA and SOD in neurons induced by $A\beta_{1-42}$
注:A.各组细胞SOD含量比较;B.各组细胞MDA含量比较。与si-NC组比较,* $P < 0.05$ 。

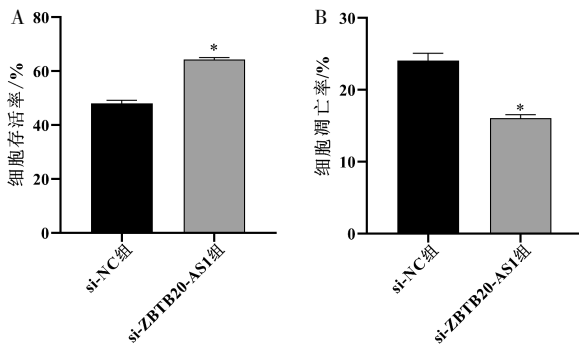


图6 ZBTB20-AS1对 $A\beta_{1-42}$ 诱导的神经元存活率和凋亡率的影响

Fig.6 The effect of ZBTB20-AS1 on the survival and apoptosis rates in neurons induced by $A\beta_{1-42}$
注:A.各组细胞存活率比较;B.各组细胞凋亡率比较。与si-NC组比较,* $P < 0.05$ 。

4 讨论

随着年龄的增长,AD的发病率呈现上升趋势。流行病学调查结果显示,65岁以上老年人群中AD

的发病率约为5%,而85岁以上的老年人群AD的发病率高达20%^[11]。由于人口老龄化的加剧,AD的防治已成为亟须解决的医学难题。

$A\beta$ 可引起神经元氧化应激和凋亡,这是AD发病的关键因素^[12]。氧化应激反应可导致细胞线粒体功能障碍^[13]。MDA是脂质过氧化产物之一,其水平高低可间接反映氧化应激水平^[14]。SOD是机体内重要的抗氧化酶,其主要功能是清除多余的自由基,维持机体氧化和抗氧化平衡,减轻自由基对机体组织的损伤^[15]。本研究结果显示, $A\beta_{1-42}$ 诱导神经元后,细胞中MDA含量显著升高,SOD水平显著降低,与相关研究结果一致^[16],表明 $A\beta_{1-42}$ 诱导神经元产生了氧化应激。而牛膝提取物含药血清降低了 $A\beta_{1-42}$ 诱导的神经元中MDA含量,提高了SOD活力,表明牛膝提取物含药血清可降低 $A\beta_{1-42}$ 引起的的神经元氧化应激。

神经元凋亡是引起神经元丢失的主要原因之一,与AD的发生发展密切相关。Ki67是细胞增殖相关蛋白,可反映细胞增殖活性^[17]。Caspase家族属于半胱氨酸蛋白酶,在细胞凋亡中发挥关键作用。Caspase-3是Caspase级联反应的关键调控分子,其活化后可切割抗凋亡蛋白B淋巴细胞瘤-2、细胞骨架蛋白等多种蛋白质底物,诱导细胞凋亡^[18]。本研究结果显示, $A\beta_{1-42}$ 作用于神经元后,细胞存活率和Ki67蛋白表达降低,而细胞凋亡率和Caspase-3蛋白表达升高,说明 $A\beta_{1-42}$ 处理抑制了神经元增殖并诱导其凋亡;而牛膝提取物含药血清增强了 $A\beta_{1-42}$ 诱导的神经元活性并抑制了其凋亡。

ZBTB20是一种锌指蛋白,在海马组织中广泛表达,参与大脑神经元的发育过程^[19]。ZBTB20-AS1是ZBTB20的反义RNA,其在神经元生长发育中的作用尚未明确。本研究结果显示, $A\beta_{1-42}$ 促进了神经元中ZBTB20-AS1的表达,与相关报道结果一致^[5],

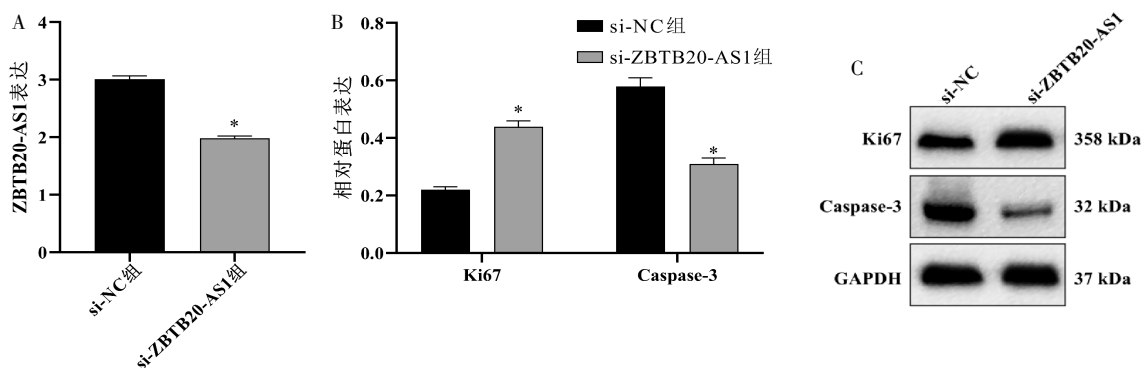


图7 ZBTB20-AS1对 $A\beta_{1-42}$ 诱导的神经元Ki67和Caspase-3蛋白表达的影响

Fig.7 The effect of ZBTB20-AS1 on the expression of Ki67 and Caspase-3 proteins in neurons induced by $A\beta_{1-42}$
注:A.各组细胞中ZBTB20-AS1表达水平比较;B.各组细胞中Ki67和Caspase-3蛋白表达水平比较。与si-NC组比较,* $P < 0.05$ 。

提示 ZBTB20-AS1 可能参与调控神经元的生理功能,在 AD 的发生发展过程中发挥作用。通过转染 ZBTB20-AS1 小干扰 RNA 下调神经元中 ZBTB20-AS1 表达后, $A\beta_{1-42}$ 诱导的神经元氧化应激和凋亡显著降低。表明下调 ZBTB20-AS1 表达可降低 $A\beta_{1-42}$ 诱导的神经元氧化应激和凋亡,减轻神经元损伤, ZBTB20-AS1 可能是 AD 治疗的潜在分子靶点。为探究牛膝提取物含药血清影响神经元氧化应激和凋亡的分子机制,本研究检测了牛膝提取物含药血清作用于 $A\beta_{1-42}$ 诱导的神经元中 ZBTB20-AS1 的表达水平,结果显示,牛膝提取物含药血清可降低 $A\beta_{1-42}$ 诱导的神经元中 ZBTB20-AS1 的表达,提示牛膝提取物含药血清可能通过下调 ZBTB20-AS1 表达来抑制 $A\beta_{1-42}$ 诱导的神经元氧化应激和凋亡。WANG 等^[5] 研究表明, ZBTB20-AS1 通过靶向下调 ZBTB20 表达,促进 GSK-3 β 表达和 Tau 磷酸化,进而促进 $A\beta_{1-42}$ 诱导 SH-SY5Y-AD 细胞凋亡。李文玲等^[20] 研究发现, miR-132-3p 是 ZBTB20-AS1 的靶点,且 miR-132-3p 能靶向下调 MAPT 表达,敲低 ZBTB20-AS1 可通过 miR-132-3p/MAPT 轴减轻 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 SK-N-SH 细胞凋亡。故本研究推测牛膝提取物含药血清可能通过下调 ZBTB20-AS1 进而影响 ZBTB20/GSK-3 β /Tau 通路或 miR-132-3p/MAPT 轴,最终抑制 $A\beta_{1-42}$ 诱导的神经元氧化应激和凋亡,但具体还需进一步研究证实。

综上所述,牛膝提取物含药血清可有效降低 $A\beta_{1-42}$ 诱导的神经元氧化应激和凋亡,保护 $A\beta_{1-42}$ 诱导的神经元损伤,其作用机制可能与下调细胞中 ZBTB20-AS1 表达有关。未来研究将筛选牛膝提取物含药血清减轻 $A\beta_{1-42}$ 诱导神经元损伤的最佳浓度,并进一步验证牛膝提取物含药血清对 ZBTB20-AS1 的抑制作用,以探究其具体作用机制。

参考文献

- [1] 曹颖颖, 张绍兰, 杨楠, 等. 补肾益志方通过 β 淀粉样蛋白和 tau 蛋白调节大鼠阿尔茨海默病的实验研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(8): 1271-1276.
- [2] ZHANG Y, CHEN H, LI R, et al. Amyloid β -based therapy for Alzheimer's disease: Challenges, successes and future[J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2023, 8(1): 248.
- [3] CAI E G, CHENG Q, YU S, et al. Achyranthes bidentata polypeptide k enhances the survival, growth and axonal regeneration of spinal cord motor neurons in vitro[J]. Neuroreport, 2021, 32(6): 518-524.
- [4] 李蒙蒙. 阿尔茨海默病细胞模型中 lncRNA RP11-543N12.1 对 CDH13 表达的调控作用[D]. 济南: 山东大学, 2016.
- [5] WANG Y W, CAI M, LOU Y, et al. ZBTB20-AS1 promoted Alzheimer's disease progression through ZBTB20/GSK-3 β /Tau

- pathway [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2023, 640: 88-96.
- [6] YANG L X, LUO M, LI S Y. Tanshinone IIA improves Alzheimer's disease via RNA nuclear-enriched abundant transcript1/microRNA-291a-3p/member RAS oncogene family Rab22a axis[J]. World Journal of Psychiatry, 2024, 14(4): 563-581.
- [7] 马笃军, 彭力平, 裴军宇, 等. CCK-8 法检测牛膝醇提物体外诱导 BMSCs 增殖活性的研究[J]. 湖南中医杂志, 2016, 32(10): 187-189.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 123.
- [9] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [10] 谭峰浪, 任宏丽, 王宏飞. 黄柏提取物对 $A\beta_{1-42}$ 诱导的海马神经细胞的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2022, 27(11): 1213-1220.
- [11] GUSTAVSSON A, NORTON N, FAST T, et al. Global estimates on the number of persons across the Alzheimer's disease continuum[J]. Alzheimer's & Dementia, 2023, 19(2): 658-670.
- [12] ZHANG Y C, CHEN D Q, TIAN R, et al. Resveratrol alleviates amyloid β -induced neuronal apoptosis, inflammation, and oxidative and endoplasmic reticulum stress by circ_0050263/miR-361-3p/PDE4A axis during Alzheimer's disease[J]. Chemical Biology & Drug Design, 2023, 102(5): 1121-1132.
- [13] REDDY P H, KSHIRSAGAR S, BOSE C, et al. Rlip overexpression reduces oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease: Mechanistic insights[J]. Biochimica et Biophysica Acta Molecular Basis of Disease, 2023, 1869(7): 166759.
- [14] GHASEMI-TARIE R, KIASALARI Z, FAKOUR M, et al. Nobiletin prevents amyloid β_{1-40} -induced cognitive impairment via inhibition of neuroinflammation and oxidative/nitrosative stress[J]. Metabolic Brain Disease, 2022, 37(5): 1337-1349.
- [15] ARCONI R, D'ERRICO A, NASSO R, et al. Inhibition of enzymes involved in neurodegenerative disorders and $A\beta_{1-40}$ aggregation by Citrus limon peel polyphenol extract[J]. Molecules, 2023, 28(17): 6332.
- [16] 范红娟, 康凯宁, 栗志英. 芹菜素对 $A\beta_{1-42}$ 致阿尔茨海默病大鼠海马组织氧化应激和炎症反应的影响[J]. 中医学报, 2023, 38(3): 602-608.
- [17] MIRZA F J, ZAHID S. Ursolic acid and rosmarinic acid ameliorate alterations in hippocampal neurogenesis and social memory induced by amyloid beta in mouse model of Alzheimer's disease[J]. Frontiers in Pharmacology, 2022, 13: 1058358.
- [18] LI X Q, QIN Y P, YE S, et al. Protective effect of Huangpu Tongqiao capsule against Alzheimer's disease through inhibiting the apoptosis pathway mediated by endoplasmic reticulum stress in vitro and in vivo[J]. Saudi Pharmaceutical Journal, 2022, 30(11): 1561-1571.
- [19] GULBRANSON D R, HO K, YU G Q, et al. Phenotypic differences between the Alzheimer's disease-related hAPP-J20 model and heterozygous Zbtb20 knock-out mice[J]. eNeuro, 2021, 8(3): ENEURO.0089-ENEURO.0021.2021.
- [20] 李文玲, 陈伯华, 徐新, 等. LncRNA ZBTB20-AS1 靶向 miR-132-3p/MAPT 轴影响阿尔茨海默病的发生发展[J]. 中国老年学杂志, 2020, 40(19): 4189-4195.