

芥子酸对A β_{42} 诱导PC12细胞损伤的改善作用及机制[△]

薛迪^{1*}, 刘学伟², 汪娜³, 刘宇超^{4#}, 徐涛¹, 裴芳艺⁴(1. 齐齐哈尔医学院药学院, 黑龙江齐齐哈尔 161006; 2. 齐齐哈尔医学院精神卫生学院, 黑龙江齐齐哈尔 161006; 3. 齐齐哈尔医学院基础医学院, 黑龙江齐齐哈尔 161006; 4. 齐齐哈尔医学院科研处, 黑龙江齐齐哈尔 161006)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)05-0597-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.05.15



摘要 目的 研究芥子酸对 β -淀粉样蛋白42(A β_{42})诱导PC12细胞损伤的改善作用及机制。方法 将PC12细胞分为对照组、模型组、芥子酸组、激活磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)抑制剂组、细胞外信号调节蛋白激酶(ERK)抑制剂组,各抑制剂组先分别加入LY294002和U0126(均为10 μ mol/L)培养1 h;然后除对照组外,其余4组分别加入2 μ mol/L A β_{42} 处理24 h以复制阿尔茨海默病细胞模型;除对照组及模型组外,其余3组再分别加入100 μ mol/L 芥子酸,继续培养24 h。检测细胞存活率并观察其形态,检测细胞中A β_{42} 含量、cAMP反应元件结合蛋白(CREB)mRNA表达水平以及环磷酸腺苷(cAMP)、蛋白激酶A(PKA)、CREB、磷酸化CREB(p-CREB)蛋白表达水平。结果 经芥子酸作用后,PC12细胞存活率、细胞中CREB mRNA表达水平以及cAMP、PKA、p-CREB蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$),细胞中A β_{42} 含量显著降低($P<0.05$),细胞形态明显改善、突触增多;而经PI3K、ERK抑制剂干预后,PC12细胞存活率及上述mRNA和蛋白表达水平均被显著逆转($P<0.05$ 或 $P<0.01$),细胞形态不规则、碎片增多,且突触连接减少。结论 芥子酸可升高A β_{42} 诱导损伤的PC12细胞存活率,改善细胞形态,降低细胞中A β_{42} 含量,其作用机制可能与促进细胞中CREB mRNA转录、激活cAMP/PKA/CREB信号通路有关。

关键词 芥子酸;cAMP/PKA/CREB信号通路;阿尔茨海默病; β -淀粉样蛋白

Improvement effects of sinapic acid on A β_{42} -induced injury of PC12 cells and the mechanism

XUE Di¹, LIU Xuewei², WANG Na³, LIU Yuchao⁴, XU Tao¹, PEI Fangyi⁴(1. School of Pharmacy, Qiqihar Medical University, Heilongjiang Qiqihar 161006, China; 2. School of Mental Health, Qiqihar Medical University, Heilongjiang Qiqihar 161006, China; 3. School of Basic Medicine, Qiqihar Medical University, Heilongjiang Qiqihar 161006, China; 4. Office of Academic Research, Qiqihar Medical University, Heilongjiang Qiqihar 161006, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To study the improvement effects of sinapic acid on A β_{42} -induced injury of PC12 cells and the mechanism. **METHODS** PC12 cells were divided into five groups: control group, model group, sinapic acid group, phosphoinositide-3-kinase (PI3K) inhibitor group and extracellular signal-regulated kinase (ERK) inhibitor group. Each inhibitor group was added with LY294002 and U0126 (10 μ mol/L) for 1 h; except for control group, other four groups were treated with 2 μ mol/L A β_{42} for 24 h to replicate the Alzheimer's disease cell model; except for control group and model group, other three groups were added with 100 μ mol/L sinapic acid respectively. After 24 hours of continuous culture, survival rate of PC12 cells was detected and the morphology of PC12 cells was observed. The content of A β_{42} , mRNA expression of cAMP response element binding protein (CREB), protein expression of cyclic adenosine monophosphate (cAMP), protein kinase A (PKA), CREB signaling pathway and phosphorylated CREB (p-CREB) were detected. **RESULTS** After treated with sinapic acid, the survival rate of PC12 cells, mRNA expression of CREB and protein expressions of cAMP, PKA and p-CREB were increased significantly ($P<0.05$), while the content of A β_{42} was decreased significantly ($P<0.05$); cell morphology was significantly improved and synapses increased. After intervened with PI3K and ERK inhibitors, the survival rate of PC12 cells, above mRNA and protein expressions were reversed significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$); cell morphology was irregular, the fragments increased, and the synaptic connections

[△] 基金项目:黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目(No.2021-KYYWF-0349)

* 助理研究员,硕士。研究方向:天然药物防治神经退行性疾病的活性成分筛选及作用机制。电话:0452-2663615。E-mail:282832817@qq.com

通信作者:工程师。研究方向:天然药物防治神经退行性疾病的活性成分筛选及作用机制。电话:0452-2663875。E-mail:liuyuchao1989@126.com

decreased. **CONCLUSIONS** Sinapic acid can improve the survival rate of PC12 cells injured by A β_{42} , improve cell morphology and decrease the content of A β_{42} , the mechanism of which may be associated with promoting the gene transcription of CREB, and activating cAMP/PKA/CREB signaling pathway.

KEYWORDS sinapic acid; cAMP/PKA/CREB signaling pathway; Alzheimer's disease; β -amyloid protein

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是与年龄高度相关的中枢神经系统退行性疾病,该疾病的症状始于轻度的记忆困难,并逐渐发展为认知障碍和日常活动功能障碍,现已成为严重威胁人类生命健康的重大疾病之一^[1]。AD的神经病理学特征包括一些异常蛋白的积累,如淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein)的分裂导致 β -淀粉样蛋白(amyloid β -protein, A β)沉积形成老年斑,使得突触丢失,造成神经退行性病变^[2-3],其中A β_{10} 在AD的发病机制具有保护作用,而A β_{42} 具有致病作用^[4]。因此,抑制A β_{42} 的神经毒性已成为现代AD领域研究热点,找到能够抑制A β_{42} 神经毒性的药物对有效预防和治疗AD具有重要意义。

芥子酸及其衍生物 canolol、芥子碱、丁香醛等对AD、帕金森病、共济失调、重症肌无力等均有一定的治疗功效^[5]。本课题组前期研究发现,大鼠灌胃中药远志后,在其脑脊液成分中检测出芥子酸;灌胃开心散后,在其血液中检测出远志糖酯类化合物 tenuifoliside A,该化合物与芥子酸存在相似的基本母核,并可以提高大鼠海马神经元的存活率。相关研究发现,芥子酸对A β_{1-42} 诱导的PC12细胞损伤具有保护作用,其作用机制可能与激活磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶B/糖原合成激酶3 β (phosphoinositide-3-kinase/protein kinase B/glycogen synthase kinase 3 β , PI3K/Akt/GSK3 β)和脑源性神经营养因子/酪氨酸激酶B/细胞外信号调节蛋白激酶(brain-derived neurotrophic factor/tyrosine kinase B/extracellular signal-regulated kinase, BDNF/TrkB/ERK)等信号通路有关^[6-9]。这提示芥子酸在治疗神经退行性疾病方面具有一定作用。另有相关研究发现,PI3K/Akt/GSK3 β 和BDNF/TrkB/ERK信号通路下游的环磷酸腺苷/蛋白激酶A/cAMP反应元件结合蛋白(cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A/cAMP response element binding protein, cAMP/PKA/CREB)信号通路也是大脑内重要的信号通路之一,对神经元的存活与分化、突触的形成等均具有重要作用^[10]。

在本课题组前期研究的基础上,本研究以具有神经细胞特性的PC12细胞作为研究对象,用A β_{42} 诱导该细胞损伤以制备AD的体外模型,然后研究芥子酸对A β_{42} 诱导PC12细胞损伤的改善作用,并基于cAMP/PKA/CREB信号通路探讨其作用机制,以期为芥子酸防治AD提供实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有Series 8000型CO₂培养箱、QuantStudio 5型荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪(美国Thermo Fisher Scientific公司),DL-CJ-2NDII型超净工作台(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司),CKX41-A32PH型倒置显微镜(日本Olympus公司),

M200 PRO型多功能酶标仪(瑞士Tecan公司),5804R型离心机(德国Eppendorf公司),S11-6-S型恒温水浴锅(上海跃进医疗器械有限公司),LDZH-200KBS型高压蒸汽灭菌器(上海申安自动化系统工程公司),C1000 Touch型基因扩增仪、165-8001型电泳仪、1703811型电转仪、Gel Doc XR型凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司)。

1.2 主要药品与试剂

本研究所用主要药品与试剂有芥子酸对照品(上海源叶生物科技有限公司,纯度 $\geq 97\%$,批号S30697);A β_{42} (北京博奥森生物技术有限公司,批号bs-0107p);胎牛血清(美国BI公司,批号04-007-1A);RPMI 1640培养基(美国HyClone公司,批号SH30809.01);胰蛋白酶、青霉素混合液(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为TB150、P1400);LY294002对照品(纯度100%)、U0126对照品(纯度100%)、CCK-8试剂盒(美国AbMole公司,批号分别为15447-36-6、109511-58-2、M4839);大鼠A β_{42} 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(上海蓝基生物科技有限公司,批号E02A0050);焦碳酸二乙酯(DEPC)、ECL化学发光试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为ST036、P0018AS);兔源PKA多克隆抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号24503-1-AP);兔源cAMP多克隆抗体(美国Abcam公司,批号ab76238);兔源CREB多克隆抗体、兔源磷酸化CREB(p-CREB)多克隆抗体(美国CST公司,批号分别为9197、9198);鼠源 β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗、HRP标记的山羊抗小鼠IgG二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为151218、122826、122011)。PCR引物由生物工程(上海)有限公司设计、合成(具体引物序列及扩增产物长度见表1)。其余试剂为实验室常用规格,水为去离子水。

表1 PCR引物序列及扩增产物长度

基因	引物序列(5'-3')	扩增产物长度/bp
CREB	上游引物:TGGAGCCGAGAACCAGCAGAG	83
	下游引物:GAGTTACGGTGGGAGCAGATGATG	
β -actin	上游引物:CAATGAGCGGTCCCGTTGCC	128
	下游引物:CCAGACAGCACTGTGTGGC	

1.3 细胞

大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤PC12细胞(高分化)由中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心提供。

2 方法

2.1 PC12细胞的培养

将PC12细胞置于含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素的RPMI 1640培养基(以下简称“培养基”)中,于5%CO₂、37℃、饱和湿度的培养箱中培养,每2~3 d换液1次,待细胞呈单层贴壁状并进入对数生长期时,用于后续实验。

2.2 A β_{42} 溶液的制备

将 1 mg A β_{42} 溶解于 221.5 μ L 去离子水中,制成浓度为 1 000 μ mol/L 的溶液,然后置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 培养箱中培养 24 h,以制备 A β_{42} 寡聚体^[9],于 -20 $^{\circ}$ C 保存,备用。

2.3 分组

根据本课题组前期 MTT 实验发现,A β_{42} 诱导 PC12 细胞损伤的最适浓度为 2 μ mol/L,芥子酸的最适给药浓度为 100 μ mol/L^[8-9]。根据文献^[11-12]报道,处理 PC12 细胞时,PI3K 抑制剂 LY294002 和 ERK 抑制剂 U0126 的最适给药浓度为均为 10 μ mol/L。本研究分组如下:对照组、模型组(A β_{42} 2 μ mol/L)、芥子酸组(A β_{42} 2 μ mol/L+芥子酸 100 μ mol/L)、PI3K 抑制剂组(A β_{42} 2 μ mol/L+芥子酸 100 μ mol/L+LY294002 10 μ mol/L)、ERK 抑制剂组(A β_{42} 2 μ mol/L+芥子酸 100 μ mol/L+U0126 10 μ mol/L)。

2.4 PC12 细胞存活率检测及形态观察

采用 CCK-8 法进行检测。取对数生长期 PC12 细胞,调整细胞密度为 1×10^5 mL $^{-1}$,接种于 6 孔板中,每孔 1.5 mL,按“2.3”项下方法分组,另设仅加入细胞培养基的空白组,每组设置 8 个复孔。培养 24 h 后,PI3K 抑制剂组、ERK 抑制剂组先加入 LY294002、U0126 培养 1 h;然后除对照组外,其余 4 组分别加入 2 μ mol/L A β_{42} 继续培养 24 h 以造模;除对照组及模型组外,其余 3 组再分别加入 100 μ mol/L 芥子酸继续培养 24 h 后,置于倒置显微镜下观察并拍照;随后加入 10 μ L CCK-8 试剂,继续培养 4 h,采用酶标仪于 450 nm 波长下检测各孔吸光度(OD)值,并计算细胞存活率[细胞存活率=(实验组 OD 值-空白组 OD 值)/(对照组 OD 值-空白组 OD 值) \times 100%]。

2.5 PC12 细胞中 A β_{42} 含量检测

采用 ELISA 法进行检测。取对数生长期 PC12 细胞,按“2.4”项下方法分组、造模与给药,每组设 3 个复孔。于细胞培养结束后,弃原培养基,以 PBS 清洗细胞 1 遍,用胰酶消化后,加入培养基终止消化,以 1 000 r/min 离心 5 min,收集细胞;以 PBS 清洗 3 遍后,重悬细胞,采用超声法裂解细胞,以 5 000 r/min 离心 15 min,取上清液,按照 ELISA 试剂盒说明书方法操作,测定 PC12 细胞中 A β_{42} 的含量。

2.6 PC12 细胞中 CREB mRNA 表达水平检测

采用 PCR 法进行检测。取对数生长期 PC12 细胞,按“2.4”项下方法分组、造模与给药,每组设 3 个复孔。于细胞培养结束后,按 RNAiso Plus 试剂盒说明书方法操作提取各组细胞的总 RNA,逆转录合成 cDNA 模板,再进行 PCR 反应。PCR 反应体系包括 cDNA 10 μ L、PrimeScript^{RT} Enzyme Mix I 1 μ L、RT Primer Mix 1 μ L、5 \times PrimeScript Buffer 4 μ L、RNase Free dH $_2$ O 4 μ L。PCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s;95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,60 $^{\circ}$ C 退火延伸 34 s,共 40 个循环。反应结束后,采用 2 $^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因的表达水平(以对照组为“1”计算其余组相对值)。实验重复 3 次。

2.7 PC12 细胞中 cAMP、PKA、CREB、p-CREB 蛋白表达水平检测

采用 Western blot 法进行检测。取对数生长期 PC12 细胞,按“2.4”项下方法分组、造模与给药,每组设 3 个复孔。于细胞培养结束后,收集细胞,提取细胞总蛋白;采用 BCA 法测定总蛋白含量,并制备蛋白样品。将蛋白样品加至聚丙烯酰胺凝胶中,以恒压(电压 110 V)电泳进行分离,再以恒压(电压 75 V,2 h)进行转膜,以 5% BSA 封闭液封闭 1 h,加入 cAMP、PKA、CREB、p-CREB 一抗(稀释度均为 1:800)及 β -actin 一抗(稀释度为 1:1 000),于 4 $^{\circ}$ C 过夜;以 TBST 溶液清洗 3 次,每次 5 min,加入二抗(稀释度为 1:1 000),于 37 $^{\circ}$ C 条件下反应 1 h;以 TBST 溶液清洗 3 次,每次 5 min,以 ECL 显色后,采用凝胶成像系统曝光成像。采用 Image Lab 4.0.1 图像分析软件进行分析,以目的蛋白与内参蛋白灰度值的比值表示目的蛋白表达水平(以对照组为“1”计算其余组相对值)。实验重复 3 次。

2.8 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件对数据进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 芥子酸对 PC12 细胞存活率及形态的影响

与对照组比较,模型组 PC12 细胞存活率显著降低($P<0.05$);与模型组比较,芥子酸组 PC12 细胞存活率显著升高($P<0.05$);与芥子酸组比较,PI3K 抑制剂组和 ERK 抑制剂组 PC12 细胞存活率均显著降低($P<0.05$)。结果见表 2。

表 2 各组 PC12 细胞存活率的检测结果($\bar{x} \pm s, n=8, \%$)

组别	细胞存活率	组别	细胞存活率
对照组	100.00 \pm 2.30	PI3K 抑制剂组	83.48 \pm 6.32 ^a
模型组	80.74 \pm 3.79 ^b	ERK 抑制剂组	81.70 \pm 5.54 ^c
芥子酸组	92.97 \pm 3.19 ^a		

a:与对照组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$;c:与芥子酸组比较, $P<0.05$

经显微镜观察后发现,对照组细胞贴壁良好,饱满且边缘清晰,可见长短不一的突触,细胞间连接紧密。模型组细胞数量较对照组明显减少,且细胞形态趋于圆形,突触变短、变少,并伴有大量碎片。芥子酸组细胞形态明显改善,突触增多,且与对照组形态相似。而与芥子酸组比较,PI3K 抑制剂组和 ERK 抑制剂组细胞形态不规则,碎片增多,且突触连接减少。结果见图 1。

3.2 芥子酸对 PC12 细胞中 A β_{42} 含量的影响

与对照组比较,模型组 PC12 细胞中 A β_{42} 含量显著升高($P<0.05$);与模型组比较,芥子酸组 PC12 细胞中 A β_{42} 含量显著降低($P<0.05$);与芥子酸组比较,PI3K 抑制剂组和 ERK 抑制剂组 PC12 细胞中 A β_{42} 含量均显著升高($P<0.05$)。结果见表 3。

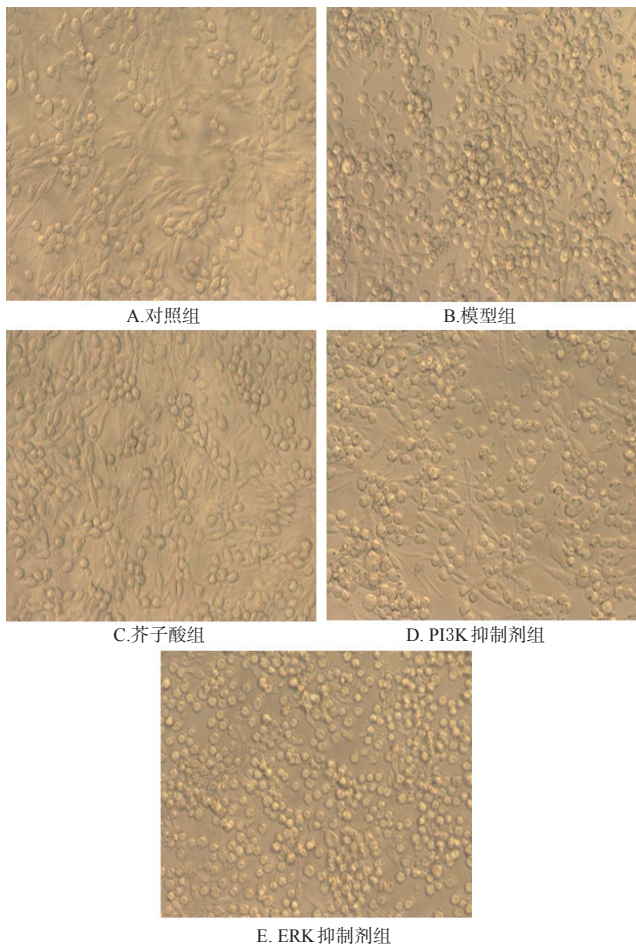


图1 各组PC12细胞形态的显微图($\times 200$)

表3 各组PC12细胞中 $A\beta_{42}$ 含量的检测结果($\bar{x} \pm s, n=3, \text{pg/mL}$)

组别	$A\beta_{42}$ 含量	组别	$A\beta_{42}$ 含量
对照组	123.45 \pm 13.40	PI3K抑制剂组	195.33 \pm 34.32 ^c
模型组	210.55 \pm 38.54 ^a	ERK抑制剂组	136.70 \pm 9.49 ^c
芥子酸组	113.88 \pm 5.98 ^b		

a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$; c: 与芥子酸组比较, $P < 0.05$

3.3 芥子酸对PC12细胞中CREB mRNA表达的影响

与对照组比较, 模型组PC12细胞中CREB mRNA表达水平显著降低($P < 0.05$); 与模型组比较, 芥子酸组PC12细胞中CREB mRNA表达水平显著升高($P < 0.05$); 与芥子酸组比较, PI3K抑制剂组和ERK抑制剂组PC12细胞中CREB mRNA表达水平均显著降低($P < 0.05$)。结果见表4。

表4 各组PC12细胞中CREB mRNA表达水平的检测结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	CREB mRNA	组别	CREB mRNA
对照组	1.00	PI3K抑制剂组	0.77 \pm 0.10 ^c
模型组	0.69 \pm 0.03 ^a	ERK抑制剂组	0.81 \pm 0.12 ^c
芥子酸组	0.95 \pm 0.03 ^b		

a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$; c: 与芥子酸组比较, $P < 0.05$

3.4 芥子酸对PC12细胞中cAMP、PKA、CREB、p-CREB蛋白表达的影响

各组PC12细胞中CREB蛋白表达水平均无显著差异($P > 0.05$)。与对照组比较, 模型组PC12细胞中cAMP、PKA、p-CREB蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$); 与模型组比较, 芥子酸组PC12细胞中cAMP、PKA、p-CREB蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$); 与芥子酸组比较, PI3K抑制剂组和ERK抑制剂组PC12细胞中cAMP、PKA、p-CREB蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果见表5、图2。

表5 各组PC12细胞中cAMP、PKA、CREB、p-CREB蛋白表达水平的检测结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	cAMP	PKA	CREB	p-CREB
对照组	1.00	1.00	1.00	1.00
模型组	0.51 \pm 0.06 ^a	0.42 \pm 0.09 ^a	1.08 \pm 0.13	0.45 \pm 0.13 ^a
芥子酸组	0.86 \pm 0.11 ^b	0.72 \pm 0.04 ^b	0.96 \pm 0.18	0.91 \pm 0.03 ^b
PI3K抑制剂组	0.50 \pm 0.07 ^{cd}	0.31 \pm 0.09 ^c	0.94 \pm 0.12	0.63 \pm 0.08 ^d
ERK抑制剂组	0.22 \pm 0.10 ^c	0.29 \pm 0.08 ^c	0.96 \pm 0.20	0.64 \pm 0.03 ^d

a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$; c: 与芥子酸组比较, $P < 0.01$; d: 与芥子酸组比较, $P < 0.05$

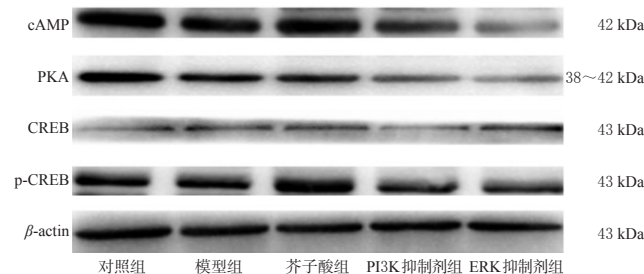


图2 各组PC12细胞中cAMP、PKA、CREB、p-CREB蛋白表达的电泳图

4 讨论

近年研究发现, 芥子酸可改善 $A\beta_{42}$ 或氰化钾诱导的小鼠认知障碍, 抑制 CO_2 或东莨菪碱引起的大鼠认知障碍, 减轻 $A\beta_{42}$ 或红藻氨酸造成的海马神经元损伤^[13-15]。细胞内 $A\beta$ 含量随着AD患者年龄的增长而增加, 其在体内累积可以导致AD患者神经元突触损伤^[16]。因此, 加速 $A\beta$ 降解、减少 $A\beta$ 沉积, 已成为防治AD的主要方法之一。

本研究结果显示, 芥子酸可显著提高 $A\beta_{42}$ 诱导的PC12细胞存活率, 改善细胞形态; 经PI3K抑制剂LY294002和ERK抑制剂U0126干预后, PC12细胞存活率下降, 细胞形态发生改变, 细胞碎片增多, 且突触连接减少。采用ELISA法检测PC12细胞中 $A\beta_{42}$ 含量发现, 芥子酸可显著降低PC12细胞中 $A\beta_{42}$ 含量; 而经PI3K抑制剂LY294002和ERK抑制剂U0126干预后, PC12细胞中 $A\beta_{42}$ 含量升高。这表明芥子酸能够降低PC12细胞中 $A\beta_{42}$ 的含量, 但当PI3K和ERK信号通路被阻断后, 芥子酸这一降低作用受到抑制。

研究指出, BDNF与TrkB结合后可介导丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinases, MAPK)/

ERK、PI3K/Akt、磷脂酶C等信号通路,这些信号通路与神经分化及神经营养密切相关,可直接调控细胞的增殖与分化,同时还能促进CREB蛋白的磷酸化,在神经系统相关疾病中具有重要作用^[10,17]。cAMP/PKA/CREB信号通路是脑内重要信号通路之一,对长时程记忆的形成起到关键作用:cAMP是一种核苷酸衍生物,为细胞的第二信使,具有促进突触传递、记忆形成及神经元存活的作用;PKA可参与神经递质的合成与释放,诱导CREB基因转录和蛋白合成,促进神经元存活、分化及生长发育^[18];CREB是PI3K/Akt和MAPK/ERK通路的下游信号分子,当其磷酸化后,可诱导BDNF的产生,激活PI3K/Akt信号通路,诱导cAMP反应序列基因表达,减少神经元凋亡,从而改善AD患者的认知障碍^[19-20]。另有文献报道,ERK的活化可诱导CREB发生磷酸化,磷酸化后的CREB又进一步诱导cAMP反应序列基因表达,从而改善AD患者的认知障碍^[21-22]。

本研究结果显示,模型组PC12细胞中CREB mRNA表达水平显著低于对照组,而经芥子酸作用后,细胞中CREB mRNA表达水平显著升高;但是经PI3K抑制剂LY294002和ERK抑制剂U0126干预后,细胞中CREB mRNA表达水平均显著降低。这表明芥子酸对PC12细胞损伤的改善作用与促进CREB mRNA转录有关。进一步研究发现,经芥子酸作用后,PC12细胞中cAMP、PKA、p-CREB蛋白表达水平均显著升高;但是经PI3K抑制剂LY294002和ERK抑制剂U0126干预后,细胞中上述蛋白表达水平则显著降低。这表明芥子酸对PC12细胞损伤的改善作用与升高cAMP、PKA蛋白的表达水平,促进CREB蛋白的磷酸化有关。

综上所述,芥子酸可升高 $A\beta_{1-42}$ 诱导损伤的PC12细胞存活率,改善细胞形态,降低细胞中 $A\beta_{1-42}$ 含量,其作用机制可能与促进细胞中CREB mRNA转录、激活cAMP/PKA/CREB信号通路有关。

参考文献

[1] PICKETT J, BIRD C, BALLARD C, et al. A roadmap to advance dementia research in prevention, diagnosis, intervention, and care by 2025[J]. *Int J Geriatr Psychiatry*, 2018, 33(7):900-906.

[2] FOLCH J, ETTCHETO M, PETROV D, et al. Review of the advances in treatment for Alzheimer disease: strategies for combating β -amyloid protein[J]. *Neurologia (Engl Ed)*, 2018, 33(1):47-58.

[3] SORIA LOPEZ J A, GONZÁLEZ H M, LÉGER G C. Alzheimer's disease[J]. *Handb Clin Neurol*, 2019, 167: 231-255.

[4] YAN Y L, WANG C Y. A β_{40} protects non-toxic A β_{42} monomer from aggregation[J]. *J Mol Biol*, 2007, 369(4): 909-916.

[5] THIEL A, MUFFLER K, TIPPKÖTTER N, et al. A novel

integrated downstream processing approach to recover synaptic acid, phytic acid and proteins from rapeseed meal[J]. *J Chem Technol Biotechnol*, 2015, 90(11):1999-2006.

[6] 汪娜, Hassan AHMAD, 贾永明, 等. UHPLC-MS法鉴定大鼠灌服开心散后血中远志糖酯类化合物及其代谢产物[J]. *药学报*, 2017, 52(10):1592-1598.

[7] 余冰颖. 开心散治疗CMS抑郁模型大鼠的作用机制及活性成分Tenuifoliside A基于ERK和PI3K通路介导的神经保护机制研究[D]. 张家口:河北北方学院, 2013.

[8] 薛迪, 刘宇超, 贾永明, 等. 基于PI3K/Akt/GSK3 β 信号通路的芥子酸抗 $A\beta_{1-42}$ 致PC12细胞损伤的机制研究[J]. *中国药房*, 2020, 31(20):2519-2523.

[9] 薛迪, 刘宇超, 汪娜, 等. 芥子酸对 $A\beta_{1-42}$ 致PC12细胞损伤的改善作用及对BDNF/TrkB/ERK信号通路的影响[J]. *中国药房*, 2021, 32(10):1181-1186.

[10] HUANG E J, REICHARDT L F. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction[J]. *Annu Rev Biochem*, 2003, 72:609-642.

[11] MACHAALANI R, CHEN H. Brain derived neurotrophic factor (BDNF), its tyrosine kinase receptor B (TrkB) and nicotine[J]. *Neurotoxicology*, 2018, 65:186-195.

[12] HU Y, LIU M Y, LIU P, et al. Neuroprotective effects of 3, 6'-disinapoyl sucrose through increased BDNF levels and CREB phosphorylation via the CaMK II and ERK1/2 pathway[J]. *J Mol Neurosci*, 2014, 53(4):600-607.

[13] KARAKIDA F, IKEYA Y, TSUNAKAWA M, et al. Cerebral protective and cognition-improving effects of synaptic acid in rodents[J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30(3):514-519.

[14] KIM D H, YOON B H, JUNG W Y, et al. Synaptic acid attenuates kainic acid-induced hippocampal neuronal damage in mice[J]. *Neuropharmacology*, 2010, 59(1/2): 20-30.

[15] LEE H E, KIM D H, PARK S J, et al. Neuroprotective effect of synaptic acid in a mouse model of amyloid β (1-42) protein-induced Alzheimer's disease[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2012, 103(2):260-266.

[16] JOHN A, REDDY P H. Synaptic basis of Alzheimer's disease: focus on synaptic amyloid beta, P-tau and mitochondria[J]. *Ageing Res Rev*, 2021, 65:101208.

[17] ADACHI N, NUMAKAWA T, RICHARDS M, et al. New insight in expression, transport, and secretion of brain-derived neurotrophic factor: implications in brain-related diseases[J]. *World J Biol Chem*, 2014, 5(4):409-428.

[18] ZOU Z L, CHEN Y, SHEN Q Q, et al. Neural plasticity associated with hippocampal PKA-CREB and NMDA signaling is involved in the antidepressant effect of repeated low dose of Yueju pill on chronic mouse model of learned helplessness[J]. *Neural Plast*, 2017, 2017:9160515.

(下转第616页)