

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.04.001

## · 基础研究 ·

梓醇对 A $\beta$  损伤 SH-SY5Y 细胞 BDNF 表达的影响及机制研究\*黄婉莹 张永芳 王昊 赵兰雪 宋成寰 张瑞<sup>△</sup>

(上海交通大学医学院药理学与化学生物学系 上海 200025)

**摘要目的:**探讨梓醇对  $\beta$ -淀粉样肽( $\beta$ -amyloid, A $\beta$ )损伤 SH-SY5Y 细胞脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)表达的影响及调节 BDNF 表达的机制。**方法:**以全反式维甲酸诱导分化的神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 为研究对象,研究梓醇对 A $\beta$  损伤细胞的作用。采用 MTT 实验测定细胞存活率,ELISA 测定 BDNF 的含量,Western blot 检测转录因子 cAMP 反应元件结合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB)及其活化形式磷酸化 CREB(pCREB)表达量,RT-PCR 测定 BDNF mRNA 及转录子的表达水平;用 RNA 干扰的方法阻断 CREB 表达后,用 RT-PCR 测定 BDNF mRNA 表达量的变化。**结果:**梓醇预保护提高 A $\beta$  损伤 SH-SY5Y 细胞的存活率,显著增加细胞培养上清中 BDNF 含量和胞内 BDNF mRNA 水平,促进 BDNF 转录子 IV 及其关键调节转录因子 pCREB 的表达,干扰 CREB 表达后,梓醇上调 BDNF mRNA 表达的作用部分消失。**结论:**梓醇可能通过上调 CREB 磷酸化促进 BDNF 的表达,从而发挥神经保护作用。

**关键词:**梓醇;阿尔茨海默症;脑源性神经营养因子;cAMP 反应元件结合蛋白

**中图分类号:**R-33;R749.16 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2023)04-601-06

## The Effect of Catalpol on BDNF Expression in A $\beta$ Intoxicated SH-SY5Y Cells and Mechanism Research\*

HUANG Wan-ying, ZHANG Yong-fang, WANG Hao, ZHAO Lan-xue, SONG Cheng-huan, ZHANG Rui<sup>△</sup>

(Department of Pharmacology and Chemical Biology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200025, China)

**ABSTRACT Objective:** Discuss the effect of catalpol on brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in  $\beta$ -Amyloid peptide (A $\beta$ ) intoxicated SH-SY5Y cells and the mechanism of regulating BDNF expression. **Methods:** The SH-SY5Y neuroblastoma cells induced by all-trans retinoic acid were used as the research object, and the effect of catalpol on A $\beta$ -injured cells was studied. The cell survival rate was determined by MTT assay, and the content of BDNF was determined by ELISA. The Western blot was used to detect the expression levels of transcription factors cAMP response element binding protein (CREB) and phosphorylated CREB (pCREB, activated form of CREB). The mRNA expression levels of BDNF and its series of transcripts were determined by RT-PCR. CREB expression was blocked by RNA interference and the expression of BDNF mRNA was determined by RT-PCR. **Results:** Catalpol pre-protection increased the survival rate of SH-SY5Y cells after A $\beta$  injury, significantly increased the content of BDNF in cell culture supernatant and intracellular BDNF mRNA level, promoted the expression of BDNF transcription factor IV and its key regulatory transcription factor pCREB. After interfered with CREB expression, the upregulation effect of catalpol on BDNF mRNA expression partially disappeared. **Conclusion:** Catalpol may play a neuroprotective role by upregulating the phosphorylation of CREB and promoting the expression of BDNF.

**Key words:** Catalpol; Alzheimer's disease (AD); Brain-derived neurotrophic factor (BDNF); cAMP response element binding protein (CREB)

**Chinese Library Classification (CLC):** R-33; R749.16 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2023)04-601-06

### 前言

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种以记忆减退以及认知功能障碍为主要临床特征的神经退行性疾病<sup>[1]</sup>。脑

源性神经营养因子(Brain-derived neurotrophic factor, BDNF)能调节突触可塑性,在神经元的生长、分化中发挥重要功能<sup>[2]</sup>,促进 BDNF 的表达是 AD 药物开发的一个重要方向<sup>[3]</sup>。中药地黄是玄参科草本植物地黄的块根部分,是传统中医学中常用的一

\* 基金项目:国家自然科学基金项目(82003719;81973297;82073836;81872841);上海市科委重点项目(19JC1413100);上海交通大学"医学转化交叉基金"项目(ZH2018ZDA23)

作者简介:黄婉莹(1996-),女,硕士,主要研究方向:神经药理学,E-mail: 1027650859@qq.com

<sup>△</sup> 通讯作者:张瑞,博士,实验师,主要研究方向:神经药理学,E-mail: rzhang0621@163.com,电话:021-63846590 转 776940

(收稿日期:2022-07-13 接受日期:2022-08-10)

种滋阴中药<sup>[4]</sup>,环烯醚萜苷类物质是地黄发挥疗效的主要成分<sup>[5]</sup>,具有广泛的生物活性<sup>[6]</sup>。梓醇(Catalpol)是地黄中环烯醚萜苷类化合物中含量最高的一种,中国药典规定梓醇为地黄质量标准的指标成分<sup>[7]</sup>。药理研究显示梓醇具有抗炎、抗肿瘤及降血糖等多种作用<sup>[8-10]</sup>,近年梓醇在抗衰老和神经保护方面的作用逐渐被报道<sup>[11,12]</sup>。有研究显示,梓醇能保护脑缺血动物模型的学习能力,减少海马 CA1 区神经元的丢失<sup>[13]</sup>。课题组前期研究结果显示梓醇可改善痴呆模型小鼠学习记忆功能,上调脑内 M 胆碱受体密度<sup>[14]</sup>。在脑缺血动物模型和 A $\beta$  及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤 PC12 细胞上,梓醇均能发挥抗凋亡作用<sup>[15]</sup>。在离体实验中,梓醇对原代培养的皮层神经元具有神经保护作用,可抵抗 A $\beta$  损伤,增加 ChAT 阳性神经元数目及其轴突长度,提高 M 胆碱受体密度,上调 BDNF 表达<sup>[14]</sup>。有学者认为,在 A $\beta$  损伤的原代培养皮层神经元上,梓醇通过保护线粒体功能,抑制细胞凋亡<sup>[16]</sup>。本文以 BDNF 表达调控机制为切入点,深入探讨梓醇神经保护的可能作用靶点及作用机制,为其抗 AD 新药开发提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要实验试剂

梓醇由本课题组从鲜地黄中提取并鉴定,纯度 > 95%; A $\beta$ 、多聚赖氨酸、全反式维甲酸、四甲基偶氮唑蓝(Methyl thiazol tetrazolium, MTT)购自 Sigma 公司; DMEM/F12 培养基、胎牛血清和 B27 为 Gibco 公司产品; AMV 逆转录酶、oligo dT、随机引物、dNTP、rNTP、RNasin 和 BDNF ELISA 试剂盒为 Promega 公司产品; 引物由上海生工生物工程公司合成; SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒购自 ABI 公司; Lipofactamine 2000 购自 Invitrogen 公司; SYBR green 试剂是 Roche 公司产品; 小干扰 RNA(Small interfering RNA, siRNA)由上海吉玛制药技术有限公司合成; 鼠磷酸化 CREB 抗体(PhosphoCREB, pCREB)(Ser133)购自 Chemicon 公司; 兔 CREB 和  $\beta$ -actin 抗体是 Santa Cruz 公司产品; 羊抗兔辣根过氧化物酶标记的 IgG 二抗购自武汉博士德生物工程公司; 羊抗小鼠辣根过氧化物酶标记的 IgG 二抗购自 KPL 公司。

### 1.2 主要实验器材

恒温 CO<sub>2</sub> 培养箱购自美国 REVCO 公司; 超净工作台购自苏净集团安泰公司; SBD50 型水浴摇床购自美国 Heto 公司; UV2000 型分光光度计购自日本 HITACHI 公司; DXM1200 型倒置显微镜购自日本 Nikon 公司; 5430R 型台式冷冻离心机购自德国 Eppendorf 公司; AMPLITRON II 型基因扩增仪购自美国 Thermolyne 公司; 7000 型实时定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司; Western blot 电泳及转膜系统购自美国 Bio-Rad 公司; 凝胶成像系统购自美国 Bio-Rad 公司; 多功能酶标仪购自美国 BioTek 公司。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 细胞培养及处理** SH-SY5Y 细胞用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100  $\mu$ g/mL 链霉素的 DMEM/F12 培养液在 37  $^{\circ}$ C 和 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养,将细胞以 5 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/mL 的密度接种于多孔板,24 h 后换为含 0.5% B27、100 U/mL 青霉素、100  $\mu$ g/mL 链霉素和 10  $\mu$ M 全反式维甲酸的分化 DMEM/F12 培养基,隔天半量换液。细胞分化培养 7 天后加入 10  $\mu$ M 梓

醇,预保护 24 h 后,加入 10  $\mu$ M A $\beta$  继续作用 48 h 后进行各项实验。在 CREB 阻断实验中,在梓醇预保护前 5 h 加入含 CREB siRNA 的转染复合物。

**1.3.2 A $\beta$  制备** 将 A $\beta$  溶解在无菌超纯水中,配制成终浓度为 1 mM 的 A $\beta$  母液,分装后 -20  $^{\circ}$ C 保存。使用前将母液置于 37  $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 3-5 天,可得老化状态的 A $\beta$  溶液,立即使用或 4  $^{\circ}$ C 保存备用。

**1.3.3 细胞存活率测定(MTT)** 在 96 孔细胞培养板内加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 10  $\mu$ L(MTT 终浓度为 0.5 mg/mL)。37  $^{\circ}$ C 继续孵育 4 h 后取出培养板,小心去除孔内培养基,每孔加入 150  $\mu$ L DMSO 以溶解生成的甲瓚结晶,室温振荡 10 min,待蓝紫色甲瓚结晶充分溶解后,在酶标仪上测定各孔光吸收值。光吸收值与细胞的存活率成正比。

**1.3.4 BDNF ELISA** 在 96 孔高亲和力酶标板中加入抗 BDNF 单克隆抗体,4  $^{\circ}$ C 包被过夜。TBST 洗涤后加入封闭缓冲液,室温孵育 1 h 后用 TBST 洗涤 1 次。将梯度稀释的 BDNF 标准品或待测样品加入酶标板内,室温振荡 2 h。用 TBST 洗涤 5 次后加入抗 BDNF 多克隆抗体,室温孵育 2 h, TBST 洗涤 5 次。再加入连接过氧化物酶的二抗,室温振荡 1 h, TBST 洗涤 5 次。加入过氧化物酶底物四甲基联苯胺(TMB),室温孵育 10 min 显色,最后加入 1 N HCl 终止反应,30 min 后用酶标仪在 450 nm 波长测定光吸收值。再根据标准曲线计算样品每 mL 培养上清中 BDNF 的量,以 pg/mL 表示。

**1.3.5 实时荧光定量 RT-PCR** 使用 Trizol 法抽提细胞总 RNA,将 3  $\mu$ g RNA 逆转录成 cDNA,实时定量 PCR 仪进行 BDNF mRNA 含量的测定。每个反应含 1  $\mu$ L 的 cDNA、10  $\mu$ L 的 SYBR Green PCR Master mix 试剂和 250 nM 的引物, BDNF 及其外显子 I、II、IV 和 VI 引物序列见下表 1:

反应总体积为 20  $\mu$ L。用反应的 CT 值进行 BDNF 表达的数据分析,采用相对定量  $\Delta\Delta$  CT 法,以 GAPDH 为内参,校正后的数据以正常对照为 100% 进行统计。

**1.3.6 Western blot** 取 6 孔板内培养的细胞,使用 SDS 裂解液提取总蛋白,定量采用 Bradford 法,向胶板中每孔加入 40  $\mu$ g 蛋白质样品,100 V 电压电泳 2-3 h 后,冰浴条件下恒压 100 V 转膜 45 min。将转膜完成后的 PVDF 膜放入含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭液中室温封闭 2 h 或 4  $^{\circ}$ C 过夜,加入一抗稀释液(CREB 为 1:200 稀释, pCREB 和  $\beta$ -actin 均为 1:1000 稀释),4  $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜, TBST 漂洗 3 次; 加入相应的辣根过氧化物酶标记二抗稀释液(均为 1:5000 稀释),室温孵育 2 h, TBST 漂洗 3 次。显影后用 Quantity One 软件对蛋白条带进行灰度分析,以  $\beta$ -actin 为内参,各目的条带与对应  $\beta$ -actin 的灰度比值进行定量分析。

**1.3.7 RNAi 实验** 将 SH-SY5Y 细胞接种于 24 孔板,转染时将非特异 siRNA 或 CREB 特异性 siRNA(终浓度均为 80 nM)加入不含血清和青链霉素双抗的 50  $\mu$ L 培养液中, CREB RNAi 片段的设计序列为: CREB siRNA: 5'-UACAGCUGGCU AACAAUGG-3', Control siRNA: 5'-UUCUCCGAACGUGUCAC GU-3'。

将转染复合物加入培养板中,置于培养箱中转染 5 h 后,

表 1 Real-time PCR 中所用引物序列  
Table 1 Primer sequence used in Real-time PCR

Target gene	Primer sequence
BDNF	forward: 5'- AGCTGAGCGTGTGTGACAGTATTAG -3'
	reverse: 5'- ATTGCTTCAGTTGGCCTTTTGATAC -3'
Transcript I	forward:5'- CATTGGTAACCTCGCTCATTCA -3'
	reverse: 5'- TAGATTTACGCAAACGCCCTCA -3'
Transcript II	forward:5'- GTGTGTAATCCGGGCGATAGGA -3'
	reverse: 5'- GCCACCTCGGACAAATCCGT -3'
Transcript IV	forward:5'- GAGTACATACCGGGCACCAA -3'
	reverse: 5'- TTTCACGTTCCCTTCGCTTA -3'
Transcript VI	forward:5'- TACAAGTCCGAAGCCAATGTAGC -3'
	reverse: 5'- AGTGTGCGAGACCCTTTCAGTT -3'
GAPDH	forward:5'- GACCCCTTCATTGACCTCAACTACA -3'
	reverse: 5'- TCTCGTCTCCTGGAAG ATGGTGATG -3'

去除转染培养液，同时加入药物培养 24 h 后加入 Aβ 损伤，继续培养 48 h 后收集细胞，用 Western blot 的方法进行转染效果鉴定，以及用定量 PCR 的方法测定 BDNF mRNA 的表达。

#### 1.4 统计学分析

实验数据以均数 ± 标准误表示，采用 SAS 6.12 软件进行统计学处理。各组数据间比较用单因素方差分析，组间两两比较采用 SNK 法。P<0.05 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 梓醇对 Aβ 损伤的 SH-SY5Y 细胞存活率的影响

如图 1 所示，10 μM 的 Aβ 作用 48 h 显著降低 SH-SY5Y 细胞存活率至正常对照组的(63.0±3.6)%，与正常对照组相比差异显著(P<0.01)，梓醇能显著升高 Aβ 损伤细胞的存活率至(93.5±2.4)% (P<0.01 相对于 Aβ 损伤组)，但梓醇仅对 Aβ 损伤细胞发挥作用，与不给药组相比，梓醇对正常细胞的存活率无显著影响(P>0.05)。

### 2.2 梓醇对 Aβ 损伤 SH-SY5Y 细胞 BDNF 蛋白和 mRNA 表达

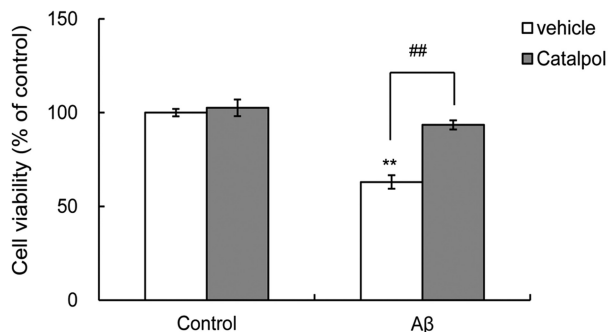


图 1 梓醇对 Aβ 损伤的 SH-SY5Y 细胞存活率的影响

Fig.1 Effect of catalpol on the cell viability of Aβ treated SH-SY5Y cells  
Note: The cell survival rate was determined by MTT assay. Compared with the control group, \*\*P<0.01. Compared between the two groups shown in the figure, ##P<0.01.

### 的影响

为研究梓醇对 Aβ 损伤 SH-SY5Y 细胞 BDNF 表达的影响，我们分别测定了培养上清中的 BDNF 蛋白含量和细胞中 mRNA 表达情况。ELISA 的结果如图 2A 所示，Aβ 作用后 BDNF 蛋白含量由对照组的 (2.5±0.1) pg/mL 降至 (2.0±0.1) pg/mL，差异有统计学意义(P<0.01)，梓醇预保护能显著升高 Aβ 损伤细胞培养上清中 BDNF 的量至 (2.4±0.1) pg/mL (P<0.01 相对于 Aβ 损伤组)。定量 RT-PCR 的结果如图 2B 所示，Aβ 作用 SH-SY5Y 细胞 48 h 后 BDNF mRNA 量显著下降，降低至正常对照组的(56.9±3.6)%，与正常对照组的差异有统计学意义(P<0.01)。如果加入梓醇预处理，则 BDNF mRNA 含量能上升至正常对照组的(113.2±2.1)% (P<0.01 相对于 Aβ 损伤组)。

### 2.3 梓醇对 Aβ 损伤 SH-SY5Y 细胞 BDNF 转录子 I、II、IV 和 VI 的影响

我们进一步观察梓醇对 BDNF 各个转录子表达的影响，结果如图 3 所示，Aβ 作用后转录子 I、II、IV 和 VI 的变化不尽相同。相对于各自的正常对照组，转录子 I 显著升高(P<0.01)，转录子 IV 和 VI 显著降低(P<0.01)，而转录子 II 的表达与其正常对照相比无统计学差异(P>0.05)。转录子 I、II 和 VI 的 Aβ+ 梓醇预保护组与 Aβ 组之间表达的差异均无统计学意义(P>0.05)。而梓醇预保护后，转录子 IV 的表达显著上升，其中 Aβ 组下降至正常对照组的 (60.2±0.6)%，Aβ+ 梓醇组上升至正常对照组的 (98.2±11.4)%，两组差异有显著统计学意义(P<0.01)。

### 2.4 梓醇对 Aβ 损伤 SH-SY5Y 细胞 CREB 和 pCREB 的影响

CREB 是调节 BDNF 外显子 IV 表达的重要转录因子。我们采用 Western blot 的方法检测梓醇作用后转录因子 CREB 以及 pCREB 表达含量的变化。Western blot 的结果如图 4 所示，Aβ 作用 48 h 后，pCREB 水平显著降低，而梓醇预保护能升高 pCREB 的表达。Aβ 和梓醇作用后，CREB 的表达均无显著变化。对 Western blot 条带灰度进行分析，以 β-actin 为内参照，以

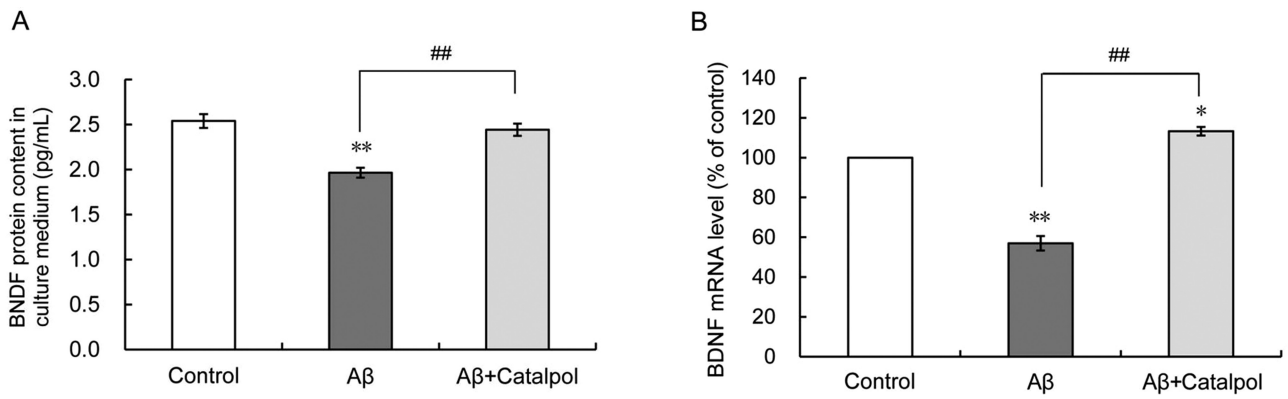


图2 梓醇对 Aβ 损伤 SH-SY5Y 细胞 BDNF 蛋白和 mRNA 表达的影响

Fig.2 Effect of catalpol on the expression of BDNF protein content and mRNA level in Aβ treated SH-SY5Y cells

Note: (A) Content of BDNF was determined by ELISA. (B) The mRNA expression levels of BDNF were determined by RT-PCR. Compared with the control group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . Compared between the two groups shown in the figure, # $P < 0.01$ .

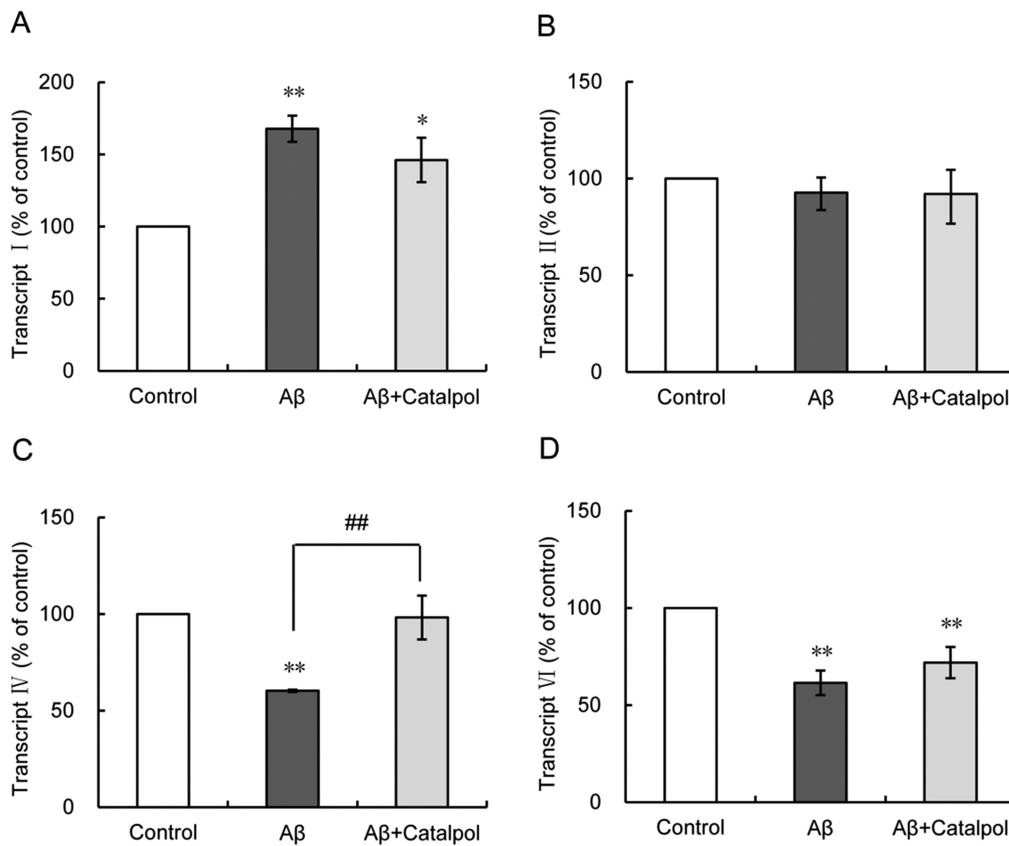


图3 梓醇对 Aβ 损伤 SH-SY5Y 细胞 BDNF 转录子 I、II、IV 和 VI 的影响

Fig.3 Effect of catalpol on BDNF transcripts I, II, IV and VI in Aβ treated SH-SY5Y cells

Note: (A-D) The mRNA expression levels of series of BDNF transcripts were determined by RT-PCR. Compared with the control group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . Compared between the two groups shown in the figure, # $P < 0.01$ .

正常对照组为 100%，统计后的数据如图 4B 所示，Aβ 损伤后，pCREB 的水平降低至对照组的(62.8±4.0)%，与正常对照组相比有显著统计学差异 ( $P < 0.01$ )。而梓醇预保护则能显著提高 pCREB 的水平至(84.3±3.3)%，和 Aβ 损伤组相比差异有显著统计学意义 ( $P < 0.05$ )。Aβ 及梓醇处理后，CREB 的表达和正常对照相比差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

### 2.5 CREB 在梓醇促进 BDNF mRNA 表达中作用

为研究 CREB 在梓醇促进 BDNF 转录中的作用，我们用 RNAi 的方法阻断 CREB 的作用，观察阻断后梓醇是否还能促

进 Aβ 损伤 SH-SY5Y 细胞 BDNF mRNA 表达的升高。结果如图 5 所示，在加入非特异 siRNA 为阴性对照的组中，Aβ 显著降低 BDNF 的表达，而梓醇预保护 24 h 能显著升高其表达。特异性 CREB siRNA 作用后，正常对照和 Aβ 损伤细胞的 BDNF mRNA 表达与各自的非特异 siRNA 对照组相比差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。但能显著抑制梓醇对 Aβ 损伤细胞 BDNF 水平的升高作用，Aβ+梓醇组 BDNF mRNA 水平是正常对照组的(89.7±5.8)%，Aβ+梓醇+CREB siRNA 组 BDNF mRNA 水平是正常对照组的(60.1±2.8)%，两组差异有显著统计学意义

( $P < 0.01$ )。但阻断后的梓醇预保护组与  $A\beta$  损伤组之间仍有显著差异( $P < 0.05$ )， $A\beta + CREB$  siRNA 组 BDNF mRNA 水平是正常对照组的 (44.5±3.8%)， $A\beta +$  梓醇 + CREB siRNA 组 BDNF mRNA 水平是正常对照组的 (60.1±2.8%)，说明 CREB 部分阻断了梓醇对 BDNF mRNA 表达的促进作用。

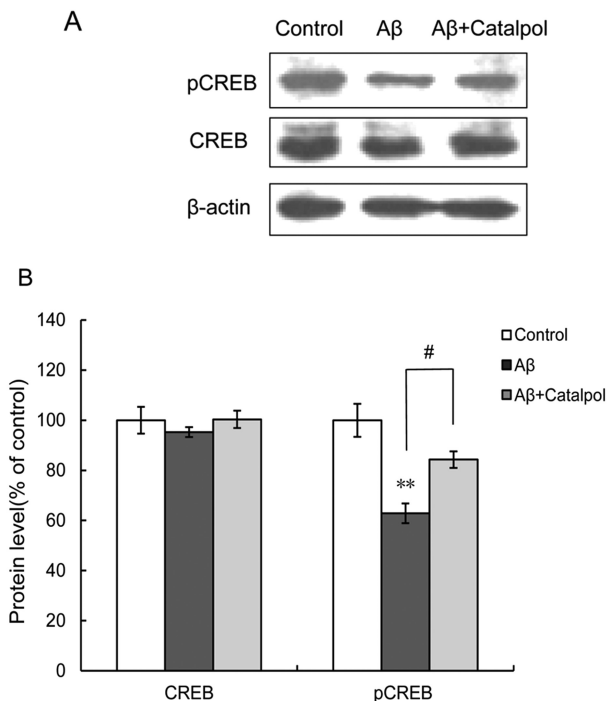


图4 梓醇对  $A\beta$  损伤 SH-SY5Y 细胞 CREB 和 pCREB 的影响  
Fig.4 Effect of catalpol on the expression of CREB and pCREB in  $A\beta$  treated SH-SY5Y cells

Note: (A) Representative immunoblot of phospho and total CREB. (B) Quantification of phospho and total CREB immunoblots. Compared with the control group,  $**P < 0.01$ . Compared between the two groups shown in the figure,  $\#P < 0.05$ .

### 3 讨论

梓醇是从滋阴药物中分离得到的单体成分，来自传统的滋阴中药地黄，是地黄中环烯醚萜类化合物中的重要活性成分，也是非常有潜力的抗神经退行性病候选药物<sup>[17,18]</sup>。为研究梓醇对 BDNF 表达的调控机制，本文选用全反式维甲酸诱导分化的人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 为研究对象，分化的 SH-SY5Y 细胞表现出人神经元的特性，经  $A\beta$  作用后 BDNF 的改变也与人皮层神经元类似<sup>[19]</sup>，相对于大鼠的原代培养皮层神经元，分化的 SH-SY5Y 细胞中各 BDNF 转录子的表达也与人皮层神经元更为类似<sup>[20]</sup>。本文结果显示梓醇显著上调  $A\beta$  损伤 SH-SY5Y 细胞存活率，这与梓醇在大鼠皮层神经元和胆碱能神经元中发挥的神经保护作用基本一致<sup>[14]</sup>。在 SH-SY5Y 细胞上， $A\beta$  作用后 BDNF 的蛋白量和 mRNA 表达水平显著下降，梓醇能升高因  $A\beta$  损伤而降低的 BDNF 蛋白和 mRNA 表达水平，这与相关文献报道的结果一致，即在  $A\beta$  损伤的胆碱能神经元上，梓醇可能通过促进 BDNF 的生成而发挥神经保护作用<sup>[14,21-23]</sup>。

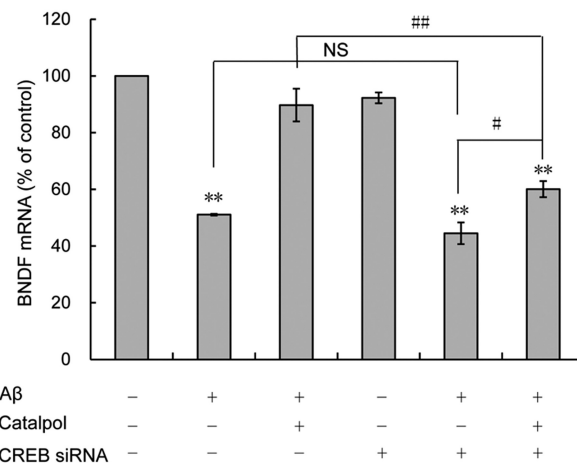


图5 CREB 在梓醇促进 BDNF mRNA 表达中作用

Fig.5 The action of CREB in the promotion effect of catalpol on BDNF mRNA expression

Note: CREB expression was blocked by RNA interference and the expression of BDNF mRNA was determined by RT-PCR. Compared with the control group,  $**P < 0.01$ . Compared between the two groups shown in the figure,  $\#P < 0.05$ ,  $\#\#P < 0.01$ . NS was indicated no significant difference.

为深入研究梓醇增加 BDNF mRNA 表达的机制，本文从 BDNF 转录子着手，选择表达量较高、研究相对清楚的四个 BDNF 转录子 I、II、IV 和 VI 作为研究对象，深入挖掘梓醇的调控位点。结果显示， $A\beta$  作用后转录子 I、II、IV 和 VI 的变化不尽相同。转录子 I 显著升高，转录子 IV 和 VI 显著降低，而转录子 II 的表达与其正常对照相比无统计学差异，Aliaga 等的研究显示，在原代皮层神经元细胞中，给予  $A\beta$  刺激后转录子 I、II、IV 和 VI mRNA 表达水平均显著性下降<sup>[24]</sup>，其原因可能是基础细胞系、 $A\beta$  浓度及作用时间不同导致。本文结果表明，梓醇主要促进 BDNF 转录子 IV 的表达，但对转录子 I、II 和 VI 的表达均无显著影响。BDNF 总 mRNA 水平的变化与 BDNF 转录子 IV 的变化一致，提示 BDNF 总 mRNA 的变化可能主要是由转录子 IV 的变化引起的。转录子 IV 是表达量最高的 BDNF 转录子，占总 BDNF mRNA 含量的一半以上<sup>[21]</sup>。因此，转录子 IV 的增加在梓醇减弱  $A\beta$  引起的神经退行性病中可能起着重要的作用。

据文献报道，梓醇促进慢性脑低灌注大鼠模型 pCREB 的表达<sup>[25]</sup>，梓醇可能通过 CREB 信号通路上调 Bcl-2 的表达进而改善该大鼠模型因脑低灌注引起的白质病变和认知障碍<sup>[26]</sup>。考虑到 CREB 是调节转录子 IV 表达的重要转录因子，故本文对 CREB 和 pCREB 的表达及其在梓醇促 BDNF 表达中的作用展开研究。Yunna 等的研究表明， $A\beta$  引起皮层神经元 pCREB 表达水平降低<sup>[27]</sup>，本文中在分化的 SH-SY5Y 细胞上， $A\beta$  作用 48 h 后 pCREB 量下降，这与文献报道的基本一致。相对于  $A\beta$  损伤组，梓醇预处理能显著上调 pCREB 的量，提示 pCREB 可能在梓醇促进 BDNF mRNA 转录增强过程中发挥一定的作用。阻断 CREB 后，梓醇促进 BDNF 基因表达的作用部分消失，提示梓醇通过 CREB 磷酸化促进 BDNF 的表达是其神经保护作用的潜在机制。但结果也显示阻断 CREB 后，梓醇仍有部分促 BDNF 转录的作用。梓醇主要影响的 BDNF 外显子 IV

启动子中,除 CREB 外还有多个转录因子如增强子 CaRF,USF 和沉默子 MeCP2 等参与了外显子 IV 的转录调控<sup>[28-31]</sup>。梓醇促进 BDNF 的表达是否有其他转录因子参与调控,有待我们进一步的实验深入探究。

综上所述,梓醇能显著提高 A $\beta$  损伤的 SH-SY5Y 细胞的存活率,促进 BDNF 的蛋白和 mRNA 表达,促进 BDNF 转录子 IV 的表达,对转录子 I、II 和 VI 的表达没有显著影响。进一步机制研究发现,梓醇可能通过上调 CREB 磷酸化促进 BDNF 的表达,从而发挥神经保护作用,这为梓醇改善 AD 神经退行性病变提供了理论依据,也可为开发 AD 治疗药物提供新的作用靶点。

#### 参考文献(References)

- [1] Atri A. The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum: Diagnosis and Management[J]. Med Clin North Am, 2019, 103(2): 263-93
- [2] Caffino L., Mottarlini F., Fumagalli F. Born to Protect: Leveraging BDNF Against Cognitive Deficit in Alzheimer's Disease [J]. CNS Drugs, 2020, 34(3): 281-297
- [3] Miranda M., Morici J. F., Zanoni M. B., et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor: A Key Molecule for Memory in the Healthy and the Pathological Brain[J]. Front Cell Neurosci, 2019, 13: 363
- [4] Gong W., Zhang N., Cheng G., et al. Rehmannia glutinosa Libosch Extracts Prevent Bone Loss and Architectural Deterioration and Enhance Osteoblastic Bone Formation by Regulating the IGF-1/PI3K/mTOR Pathway in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(16): 3964
- [5] Qin Z., Wang W., Liao D., et al. UPLC-Q/TOF-MS-Based Serum Metabolomics Reveals Hypoglycemic Effects of Rehmannia glutinosa, Coptis chinensis and Their Combination on High-Fat-Diet-Induced Diabetes in KK-Ay Mice [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(12): 3984
- [6] Yang Y. H., Yang H., Li R. F., et al. A Rehmannia glutinosa cinnamate 4-hydroxylase promotes phenolic accumulation and enhances tolerance to oxidative stress[J]. Plant Cell Rep, 2021, 40(2): 375-391
- [7] Bhattamisra S. K., Yap K. H., Rao V., et al. Multiple Biological Effects of an Iridoid Glucoside, Catalpol and Its Underlying Molecular Mechanisms[J]. Biomolecules, 2019, 10(1): 32
- [8] Qiao P. F., Yao L., Zeng Z. L. Catalpolmediated microRNA34a suppresses autophagy and malignancy by regulating SIRT1 in colorectal cancer[J]. Oncol Rep, 2020, 43(4): 1053-1066
- [9] Yan J., Wang C., Jin Y., et al. Catalpol ameliorates hepatic insulin resistance in type 2 diabetes through acting on AMPK/NOX4/PI3K/AKT pathway[J]. Pharmacol Res, 2018, 130: 466-480
- [10] Zhang H., Wu Z. M., Yang Y. P., et al. Catalpol ameliorates LPS-induced endometritis by inhibiting inflammation and TLR4/NF-kappaB signaling [J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2019, 20(10): 816-827
- [11] Yuan H., Ni X., Zheng M., et al. Effect of catalpol on behavior and neurodevelopment in an ADHD rat model [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 118: 109033
- [12] Zhang X., Liu K., Shi M., et al. Therapeutic potential of catalpol and geniposide in Alzheimer's and Parkinson's diseases: A snapshot of their underlying mechanisms[J]. Brain Res Bull, 2021, 174: 281-295
- [13] Liu C., Chen K., Lu Y., et al. Catalpol provides a protective effect on fibrillary Abeta1-42 -induced barrier disruption in an in vitro model of the blood-brain barrier[J]. Phytother Res, 2018, 32(6): 1047-1055
- [14] Wang Z., Liu Q., Zhang R., et al. Catalpol ameliorates beta amyloid-induced degeneration of cholinergic neurons by elevating brain-derived neurotrophic factors [J]. Neuroscience, 2009, 163 (4): 1363-1372
- [15] Chen W., Li X., Jia L. Q., et al. Neuroprotective activities of catalpol against CaMKII-dependent apoptosis induced by LPS in PC12 cells [J]. Br J Pharmacol, 2013, 169(5): 1140-1152
- [16] Liang J. H., Du J., Xu L. D., et al. Catalpol protects primary cultured cortical neurons induced by Abeta (1-42) through a mitochondrial-dependent caspase pathway[J]. Neurochem Int, 2009, 55(8): 741-746
- [17] Dinda B., Dinda M., Kulsi G., et al. Therapeutic potentials of plant iridoids in Alzheimer's and Parkinson's diseases: A review [J]. Eur J Med Chem, 2019, 169: 185-199
- [18] Wang L. Y., Yu X., Li X. X., et al. Catalpol Exerts a Neuroprotective Effect in the MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease [J]. Front Aging Neurosci, 2019, 11: 316
- [19] Huang C. C., Chang K. H., Chiu Y. J., et al. Multi-Target Effects of Novel Synthetic Coumarin Derivatives Protecting Abeta-GFP SH-SY5Y Cells against Abeta Toxicity[J]. Cells, 2021, 10(11): 3095
- [20] Jahed F. J., Rahbarghazi R., Shafaei H., et al. Application of neurotrophic factor-secreting cells (astrocyte - Like cells) in the in-vitro Alzheimer's disease-like pathology on the human neuroblastoma cells[J]. Brain Res Bull, 2021, 172: 180-189
- [21] Amidfar M., De Oliveira J., Kucharska E., et al. The role of CREB and BDNF in neurobiology and treatment of Alzheimer's disease[J]. Life Sci, 2020, 257: 118020
- [22] Zhu H., Wang Y., Yang X., et al. Catalpol improves axonal outgrowth and reinnervation of injured sciatic nerve by activating Akt/mTOR pathway and regulating BDNF and PTEN expression[J]. Am J Transl Res, 2019, 11(3): 1311-1326
- [23] Wang J. M., Yang L. H., Zhang Y. Y., et al. BDNF and COX-2 participate in anti-depressive mechanisms of catalpol in rats undergoing chronic unpredictable mild stress[J]. Physiol Behav, 2015, 151: 360-368
- [24] Aliaga E., Silhol M., Bonneau N., et al. Dual response of BDNF to sublethal concentrations of beta-amyloid peptides in cultured cortical neurons[J]. Neurobiol Dis, 2010, 37(1): 208-217
- [25] Cai Q. Y., Chen X. S., Zhan X. L., et al. Protective effects of catalpol on oligodendrocyte death and myelin breakdown in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion[J]. Neurosci Lett, 2011, 497(1): 22-26
- [26] Li D. Q., Bao Y. M., Li Y., et al. Catalpol modulates the expressions of Bcl-2 and Bax and attenuates apoptosis in gerbils after ischemic injury[J]. Brain Res, 2006, 1115(1): 179-185
- [27] Kim Y., Cho S. H. Linderia glauca Blume ameliorates amyloid-beta1-42-induced memory impairment in mice with neuroprotection and activation of the CREB-BDNF pathway [J]. Neurochem Int, 2021, 147: 105071
- [28] Lyons M. R., Chen L. F., Deng J. V., et al. The transcription factor calcium-response factor limits NMDA receptor-dependent transcription in the developing brain [J]. J Neurochem, 2016, 137(2): 164-176

- 学进展, 2021, 21(4): 706-709
- [4] Liu D, Liu L, Wang L, et al. Therapeutic effects of mesenchymal stem cells combined with short hairpin RNA on liver injury induced by hepatitis B virus infection[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(1): 1731-1741
- [5] Suhail M, Abdel-Hafiz H, Ali A, et al. Potential mechanisms of hepatitis B virus induced liver injury[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(35): 12462-12472
- [6] 李阳杰, 姜亚玲, 刘秋伟, 等. 槲皮素衍生物的生物活性研究进展[J]. *中国药理学杂志*, 2021, 56(3): 175-180
- [7] Cheng Z, Sun G, Guo W, et al. Inhibition of hepatitis B virus replication by quercetin in human hepatoma cell lines [J]. *Viroi Sin*, 2015, 30(4): 261-268
- [8] Li X, Jin Q, Yao Q, et al. The flavonoid quercetin ameliorates liver inflammation and fibrosis by regulating hepatic macrophages activation and polarization in mice [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9(9): 72-85
- [9] Zhao X, Wang J, Deng Y, et al. Quercetin as a protective agent for liver diseases: a comprehensive descriptive review of the molecular mechanism[J]. *Phytother Res*, 2021, 35(9): 4727-4747
- [10] de Gregorio E, Colell A, Morales A, et al. Relevance of SIRT1-NF- $\kappa$ B axis as therapeutic target to ameliorate inflammation in liver disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(11): 3858-3881
- [11] Zhou Y, Wang S, Wan T, et al. Cyanidin-3-O- $\beta$ -glucoside inactivates NLRP3 inflammasome and alleviates alcoholic steatohepatitis via Sirt1/NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 160(20): 334-341
- [12] Shin MR, Lee JA, Kim M, et al. Gardeniae Fructus Attenuates Thioacetamide-Induced Liver Fibrosis in Mice via Both AMPK/SIRT1/NF- $\kappa$ B Pathway and Nrf2 Signaling [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(11): 1837-1853
- [13] Zhao Y, Liu X, Zheng Y, et al. Aronia melanocarpa polysaccharide ameliorates inflammation and aging in mice by modulating the AMPK/SIRT1/NF- $\kappa$ B signaling pathway and gut microbiota [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 20558-20572
- [14] Zhang F, Feng J, Zhang J, et al. Quercetin modulates AMPK/SIRT1/NF- $\kappa$ B signaling to inhibit inflammatory/oxidative stress responses in diabetic high fat diet-induced atherosclerosis in the rat carotid artery[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(6): 280-287
- [15] 王燕, 罗丹, 雷敏, 等. 沉默 PD-1 基因对 AAV8 介导的 HBV 感染大鼠 T 细胞免疫应答的影响 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2021, 31(17): 2584-2588
- [16] 朱翔, 肖云斌, 易晓莲. 槲皮素对支气管哮喘小鼠气道炎症的作用及机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2020, 30(13): 19-22
- [17] 陈奕帆, 张李君, 刘清华, 等. 西格列汀对糖尿病小鼠心肌重构和自噬的影响及其机制 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2021, 37(5): 534-537
- [18] Alaama AS, Khattabi H, Mugisa B, et al. Progress towards elimination of viral hepatitis by 2030 in the WHO Eastern Mediterranean Region, 2019 [J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2022, 7(9): 862-870
- [19] Loggi E, Gitto S, Gabrielli F, et al. Virological Treatment Monitoring for Chronic Hepatitis B[J]. *Viruses*, 2022, 14(7): 1376
- [20] Popa GL, Popa MI. Oxidative Stress in Chronic Hepatitis B-An Update[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(7): 1265
- [21] Bhat SA, Kazim SN. HBV cccDNA-A Culprit and Stumbling Block for the Hepatitis B Virus Infection: Its Presence in Hepatocytes Perplexed the Possible Mission for a Functional Cure[J]. *ACS Omega*, 2022, 7(28): 24066-24081
- [22] Ye L, Chen T, Cao J, et al. Short hairpin RNA attenuates liver fibrosis by regulating the PPAR- $\gamma$  and NF- $\kappa$ B pathways in HBV induced liver fibrosis in mice[J]. *Int J Oncol*, 2020, 57(5): 1116-1128
- [23] Li Q, Tan Y, Chen S, et al. Irisin alleviates LPS-induced liver injury and inflammation through inhibition of NLRP3 inflammasome and NF- $\kappa$ B signaling[J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2021, 41(3): 294-303
- [24] Hesari A, Ghasemi F, Salarinia R, et al. Effects of curcumin on NF- $\kappa$ B, AP-1, and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in hepatitis B virus infection[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(10): 7898-7904
- [25] Li CX, Gao JG, Wan XY, et al. Allyl isothiocyanate ameliorates lipid accumulation and inflammation in nonalcoholic fatty liver disease via the Sirt1/AMPK and NF- $\kappa$ B signaling pathways [J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(34): 5120-5133
- [26] Abedimanesh N, Asghari S, Mohammadnejad K, et al. The anti-diabetic effects of betanin in streptozotocin-induced diabetic rats through modulating AMPK/SIRT1/NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. *Nutr Metab (Lond)*, 2021, 18(1): 92-104
- [27] 杨炯, 阮金兰. 鸡血莲黄酮通过调节 AMPK/Sirt1/NF- $\kappa$ B 信号通路改善小鼠非酒精性脂肪肝的实验研究[J]. *中医药导报*, 2021, 27(4): 10-14

(上接第 606 页)

- [29] McDowell K. A., Hutchinson A. N., Wong-Goodrich S. J., et al. Reduced cortical BDNF expression and aberrant memory in Carf knock-out mice [J]. *J Neurosci*, 2010, 30(22): 7453-7465
- [30] Giannotti G., Caffino L., Calabrese F., et al. Prolonged abstinence from developmental cocaine exposure dysregulates BDNF and its signaling network in the medial prefrontal cortex of adult rats [J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2014, 17(4): 625-634
- [31] Li H., Shang J., Zhang C., et al. Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation Alleviates Neurological Deficits After Cerebral Ischemia Through Interaction Between RACK1 and BDNF exon IV by the Phosphorylation-Dependent Factor MeCP2 [J]. *Neurotherapeutics*, 2020, 17(2): 651-663