

· 论著 ·

## 基于AMPK/SIRT1通路探究苦参碱对阿尔茨海默病A $\beta_{25-35}$ 诱导PC12细胞氧化损伤和凋亡的影响

刘景祎<sup>1</sup>, 李富慧<sup>1</sup>, 宋彦<sup>2</sup>

(1. 南阳市中心医院神经内科, 河南 南阳 473000; 2. 南阳市第二人民医院神经内科, 河南 南阳 473000)

**摘要** **目的** 探讨苦参碱对阿尔茨海默病 $\beta$ -淀粉样蛋白(A $\beta_{25-35}$ )诱导PC12细胞凋亡和氧化损伤的影响,并分析其与AMP活化蛋白激酶(AMPK)/沉默信息调节因子(SIRT1)通路的作用机制。**方法** 采用噻唑蓝(MTT)法检测不同浓度苦参碱对PC12细胞生长的影响,最终选择0.5、1.0和1.5 mmol/L苦参碱进行实验。将PC12细胞分为Con组(空白培养细胞),A $\beta_{25-35}$ 组(20  $\mu$ mol/L的A $\beta_{25-35}$ 处理细胞),A $\beta_{25-35}$ +Matrine-L组、A $\beta_{25-35}$ +Matrine-M组、A $\beta_{25-35}$ +Matrine-H组(20  $\mu$ mol/L的A $\beta_{25-35}$ 和0.5 mmol/L、1.0 mmol/L、2.0 mmol/L苦参碱处理细胞)。用MTT法检测细胞增殖,流式细胞术检测细胞凋亡和活性氧(ROS)含量,酶联免疫吸附法检测超氧化的物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )表达水平,Western blotting检测B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、剪切的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3(cleaved caspase-3)、AMPK/SIRT1通路相关蛋白表达。**结果** 与Con组相比,A $\beta_{25-35}$ 组24 h、48 h的吸光度(OD)值、Bcl-2蛋白表达、SOD和GSH-Px活性均降低,凋亡率、Bax、cleaved caspase-3蛋白表达、ROS含量、IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 表达增加,p-AMPK、SIRT1蛋白表达上调(均 $P < 0.05$ );与A $\beta_{25-35}$ 组相比,A $\beta_{25-35}$ +Matrine-L组、A $\beta_{25-35}$ +Matrine-M组、A $\beta_{25-35}$ +Matrine-H组24 h、48 h的OD值、Bcl-2蛋白表达、SOD和GSH-Px活性增加( $P < 0.05$ ),凋亡率、Bax、cleaved caspase-3蛋白表达、ROS含量、IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 表达降低,p-AMPK、SIRT1蛋白表达下调( $P < 0.05$ )。**结论** 苦参碱可能通过抑制AMPK/SIRT1通路激活,减轻A $\beta_{25-35}$ 诱导的PC12细胞凋亡和氧化损伤。

**关键词** 苦参碱; 阿尔茨海默病; 细胞凋亡; 氧化应激; 炎症反应

中图分类号 R749.16 文献标志码 A 文章编号 0258-4646(2024)08-0741-06

网络出版地址 <https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20240722.1245.008>

DOI:10.12007/j.issn.0258-4646.2024.08.012

### Effect of matrine on oxidative damage and apoptosis of PC12 cells via AMPE/SIRT1 pathway in Alzheimer disease induced by A $\beta_{25-35}$

LIU Jingyi<sup>1</sup>, LI Fuhui<sup>1</sup>, SONG Yan<sup>2</sup>

(1. Neurology Department, Nanyang Central Hospital, Nanyang 473000, China; 2. Neurology Department, Nanyang Second People's Hospital, Nanyang 473000, China)

**Abstract** **Objective** To investigate the effect of matrine on apoptosis and oxidative damage of PC12 cells induced by  $\beta$ -amyloid protein (A $\beta_{25-35}$ ) in Alzheimer disease and to analyze the mechanism of its interaction with the AMP-activated protein kinase (AMPK)/silenced information regulator (SIRT1) pathway. **Methods** The effect of matrine on the growth of PC12 cells was determined using MTT. Matrine concentrations of 0.5, 1.0, and 1.5 mmol/L were selected for the experiment. PC12 cells were divided into the Con group (blank culture cells), the A $\beta_{25-35}$  group (20  $\mu$ mol/L A $\beta_{25-35}$  treated cells), the A $\beta_{25-35}$ +Matrine-L group, the A $\beta_{25-35}$ +Matrine-M group, and the A $\beta_{25-35}$ +Matrine-H group (20  $\mu$ mol/L A $\beta_{25-35}$  were treated with 0.5 mmol/L, 1.0 mmol/L, and 2.0 mmol/L matrine). Cell proliferation was detected using MTT. The detection of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) using enzyme-linked immunosorbent assay, expression of B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), cleaved caspase-3 containing cysteine, and AMPK/SIRT1 pathway-associated proteins were detected using Western blotting. **Results** Compared to the Con group, OD value, Bcl-2 protein expression, SOD, and GSH-Px activity decreased at 24 h and 48 h; the apoptosis rate, Bax, cleaved caspase-3 protein expression, ROS content, IL-6, IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$  expression increased, and P-AMPK and SIRT1 protein expression were up-regulated in the A $\beta_{25-35}$  group (all  $P < 0.05$ ). Compared to the A $\beta_{25-35}$  group, OD value, Bcl-2 protein expression, SOD, and GSH-Px activities in the A $\beta_{25-35}$ +Matrine-L group, the A $\beta_{25-35}$ +Matrine-M group, and the

基金项目: 河南省医学科技攻关计划(联合共建)项目(LHGJ20191467)

作者简介: 刘景祎(1987-),女,主治医师,硕士.

通信作者: 刘景祎, E-mail: liujingyi5540@163.com

收稿日期: 2023-07-17

网络出版时间: 2024-07-23 10:17:50

A $\beta_{25-35}$ +Matrine-H group increased at 24 h and 48 h. Apoptosis rate, Bax, cleaved caspase-3 protein expression, and ROS content decreased. IL-6, IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$  expression decreased, and p-AMPK, and SIRT1 protein expression were down-regulated (all  $P < 0.05$ ).

**Conclusion** Matrine may reduce the apoptosis and oxidative damage of PC12 cells induced by A $\beta_{25-35}$  by inhibiting the AMPK/SIRT1 pathway.

**Keywords** matrine; Alzheimer disease; cell apoptosis; oxidative stress; inflammatory response

阿尔茨海默病是常见的中枢神经系统疾病,也是导致老年群体认知功能障碍的主要诱因<sup>[1]</sup>。 $\beta$ -淀粉样蛋白(amyloid  $\beta$ -protein, A $\beta$ )沉积是阿尔茨海默病主要的发病基础,A $\beta$ 假说认为A $\beta$ 通过漏掉神经细胞,造成周围神经细胞和神经胶质细胞线粒体损伤,进一步诱导机体氧化损伤和炎症反应,促进神经纤维缠结,从而引发阿尔茨海默病<sup>[2]</sup>。A $\beta$ 主要是由淀粉样前体蛋白分解产生,包括无毒A $\beta$ 单体、神经毒性A $\beta$ 纤维和A $\beta$ 寡聚体<sup>[3]</sup>。研究<sup>[4]</sup>发现A $\beta_{25-35}$ 可刺激PC12细胞损伤,病理表现为凋亡、氧化应激和炎症反应等。

苦参碱是从植物苦参、苦豆子等中药材中分离出的一种生物碱,化学结构属于喹诺啉类,具有抗心律失常、抗炎、抗病毒、保护神经等药理活性<sup>[5]</sup>。李运华等<sup>[6]</sup>研究显示,苦参碱可改善A $\beta_{25-35}$ 诱导认知功能障碍小鼠空间记忆能力,还可改善海马神经再生能力,但有关苦参碱对A $\beta_{25-35}$ 诱导PC12细胞的影响尚未见报道。AMP活化蛋白激酶(adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, AMPK)/沉默信息调节因子(silent mating type information regulation 2 homolog1, SIRT1)通路与神经损伤的保护作用密切相关,已有研究<sup>[7]</sup>显示,该通路可减轻神经凋亡。本研究基于AMPK/SIRT1通路探究苦参碱对阿尔茨海默病A $\beta_{25-35}$ 诱导PC12细胞凋亡和氧化损伤的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞和主要试剂

PC12细胞购自中国科学院上海细胞库;苦参碱(货号519-02-8)购自上海广锐生物;胎牛血清、杜氏改良依格尔培养基(dulbecco's modified Eagle medium, DMEM)培养液购自美国Gibco公司;噻唑蓝(methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT)试剂盒、凋亡试剂盒购自艾美捷科技;A $\beta_{25-35}$ 购自上海源叶生物公司;活性氧(reactive oxygen species, ROS)试剂

盒购自北京百奥莱博;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)试剂盒购自上海梵态生物;白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)试剂盒、白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )试剂盒、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor -  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )试剂盒、二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)试剂盒、化学发光试剂购自北京索莱宝;AMPK抗体、p-AMPK抗体、SIRT1抗体、B细胞淋巴瘤/白血病-2(B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)抗体、Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)抗体、剪切的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3(cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase 3, cleaved caspase-3)抗体、 $\beta$ -actin抗体购自英国Abcam公司。

### 1.2 细胞培养

PC12细胞接种于培养瓶中,培养基含有10%胎牛血清的DMEM培养液,置于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养瓶中进行培养。每2~3 d换1次细胞液,细胞生长汇合至75%~85%时,加胰酶消化培养。

### 1.3 MTT法检测细胞增殖

取对数生长期PC12细胞,以 $1 \times 10^5$ /mL接种于96孔板中,培养12 h后加入浓度为0、0.25、0.5、1.0、1.5、2.0 mmol/L苦参碱,继续培养24 h、48 h,加入20  $\mu$ L MTT试剂孵育4 h,然后每孔内添加150  $\mu$ L二甲基亚砷试剂,轻轻震荡至溶解,置于酶标仪490 nm处检测细胞吸光度(optical density, OD)。

### 1.4 细胞分组

将生长良好的PC12细胞分为Con组、A $\beta_{25-35}$ 组、A $\beta_{25-35}$ +Matrine-L组、A $\beta_{25-35}$ +Matrine-M组、A $\beta_{25-35}$ +Matrine-H组。Con组正常培养细胞,不作任何处理;A $\beta_{25-35}$ 组采用20  $\mu$ mol/L的A $\beta_{25-35}$ 处理细胞24 h;A $\beta_{25-35}$ +Matrine-L组、A $\beta_{25-35}$ +Matrine-M组、A $\beta_{25-35}$ +Matrine-H组先分别给予苦参碱0.5、1.0、1.5 mmol/L处理2 h,再给予20  $\mu$ mol/L A $\beta_{25-35}$ 处理细胞24 h。采用MTT法检测细胞增殖。

## 1.5 流式细胞术检测细胞凋亡和ROS含量

1.5.1 细胞凋亡:收集各组细胞,调整密度为 $6 \times 10^5$ /mL,1 000 r/min离心10 min取细胞沉淀,加入500  $\mu$ L Binding Buffer制备细胞悬液,按照凋亡试剂盒操作,依次加入5  $\mu$ L Annexin V-FITC和PI,避光反应15 min,采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.5.2 ROS含量检测:收集各组PC12细胞,倒出培养液,每孔加入1 mL DCFH-DA试剂,培养箱中静置20 min,待细胞与探针充分接触,用不含血清培养液冲洗3次,收集细胞,加入1 mL不含血清培养液,采用流式细胞仪进行检测。

## 1.6 酶联免疫吸附法检测SOD、GSH-Px、IL-6、IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 表达水平

各组PC12细胞以3 000 r/min离心5 min后取上清液,按照相关试剂盒说明书,采用酶联免疫吸附法检测SOD、GSH-Px、IL-6、IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 的表达水平。

## 1.7 Western blotting检测AMPK/SIRT1通路相关蛋白表达

取各组PC12细胞,加裂解液置于冰上裂解30 min,4  $^{\circ}$ C 12 000 r/min离心10 min,BCA法测定蛋白

浓度。取适量蛋白与 $2 \times$ 上样缓冲液混合,置于水浴锅高温煮沸5 min,经12%凝胶电泳处理50  $\mu$ g蛋白样品,80 V、30 min,120 V、90 min,转膜、封闭培养2 h,加入AMPK、p-AMPK、SIRT1及 $\beta$ -actin在4  $^{\circ}$ C孵育24 h,室温二抗稀释液孵育1 h,滴加化学发光试剂,暗室曝光、显影,Image J分析各蛋白条带灰度值。

## 1.8 统计学分析

采用SPSS 21.0软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD-*t*检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同浓度苦参碱对PC12细胞生长的影响

0 mmol/L组与0.25 mmol/L组24 h、48 h OD值比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ );与0 mmol/L组相比,0.5 mmol/L组、1.0 mmol/L组、1.5 mmol/L组、2.0 mmol/L组24 h、48 h的OD值显著增加( $P < 0.05$ ),但1.5 mmol/L组与2.0 mmol/L组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。故本研究以0.5、1.0、1.5 mmol/L苦参碱用于后续实验。见表1。

表1 苦参碱对PC12细胞生长的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 9$ )

Tab.1 Effects of matrine on the growth of PC12 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 9$ )

Group	24 h	48 h
0 mmol/L	0.66 $\pm$ 0.05	0.83 $\pm$ 0.06
0.25 mmol/L	0.69 $\pm$ 0.04	0.80 $\pm$ 0.05
0.5 mmol/L	0.85 $\pm$ 0.06 <sup>1)</sup>	1.12 $\pm$ 0.07 <sup>1)</sup>
1.0 mmol/L	0.99 $\pm$ 0.06 <sup>1)</sup>	1.38 $\pm$ 0.11 <sup>1)</sup>
1.5 mmol/L	1.25 $\pm$ 0.12 <sup>1)</sup>	1.62 $\pm$ 0.15 <sup>1)</sup>
2.0 mmol/L	1.01 $\pm$ 0.14 <sup>1)</sup>	1.47 $\pm$ 0.15 <sup>1)</sup>
<i>F</i>	58.767	92.765
<i>P</i>	<0.001	<0.001

1)  $P < 0.05$  vs. 0 mmol/L group at the same time point.

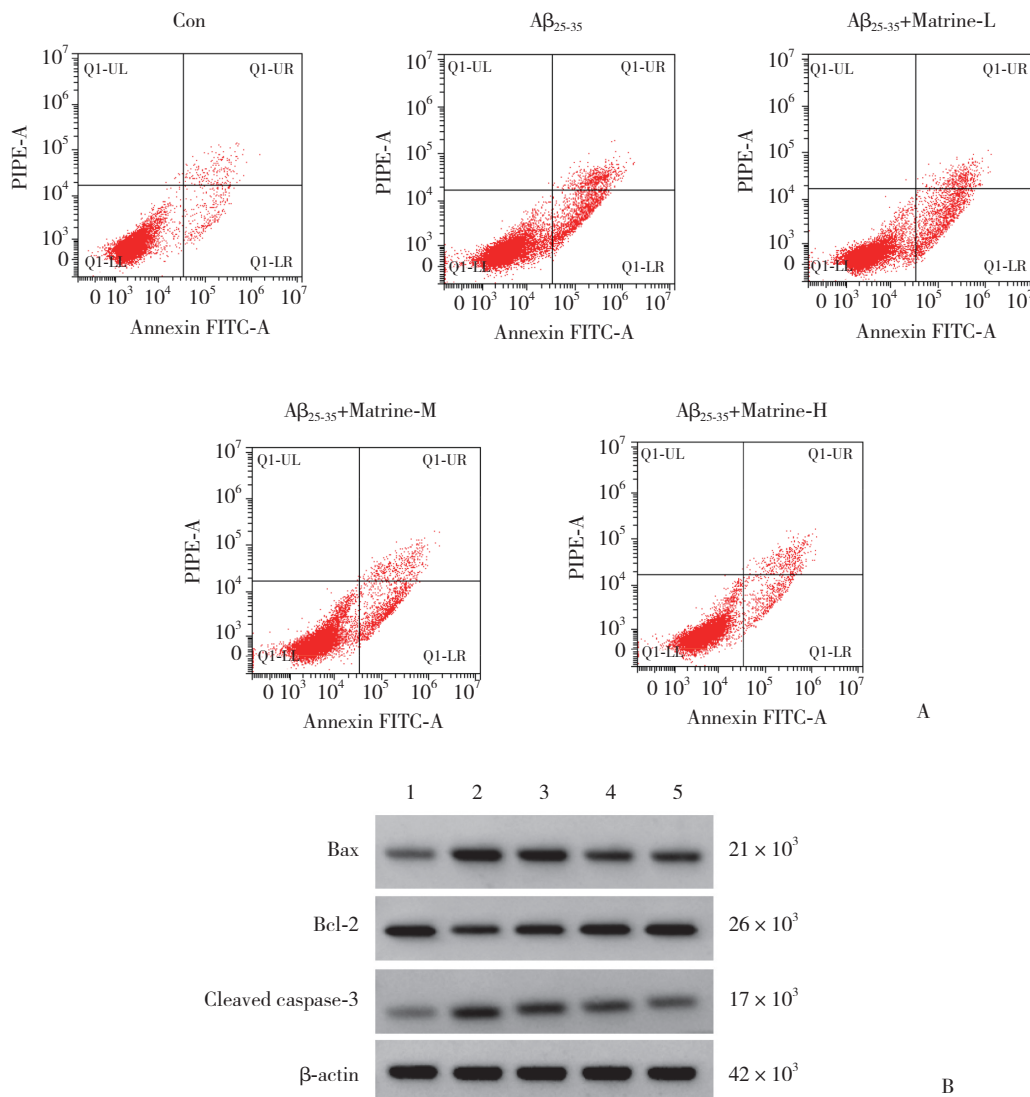
### 2.2 不同浓度苦参碱对A $\beta_{25-35}$ 诱导PC12细胞生长和凋亡的影响

与Con组相比,A $\beta_{25-35}$ 组24 h、48 h的OD值、Bcl-2蛋白表达显著降低( $P < 0.05$ ),凋亡率、Bax、cleaved caspase-3蛋白表达显著增加( $P < 0.05$ );与A $\beta_{25-35}$ 组相比,A $\beta_{25-35}$ +Matrine-L组、A $\beta_{25-35}$ +Matrine-M组、A $\beta_{25-35}$ +Matrine-H组24 h、48 h的OD值、Bcl-2蛋白表达显著增加( $P < 0.05$ ),凋亡率、Bax、cleaved caspase-3蛋白表

达显著降低( $P < 0.05$ )。见图1、表2。

### 2.3 不同浓度苦参碱对A $\beta_{25-35}$ 诱导PC12细胞氧化损伤的影响

与Con组相比,A $\beta_{25-35}$ 组SOD、GSH-Px活性显著降低( $P < 0.05$ ),ROS的含量显著增加( $P < 0.05$ );与A $\beta_{25-35}$ 组相比,A $\beta_{25-35}$ +Matrine-L组、A $\beta_{25-35}$ +Matrine-M组、A $\beta_{25-35}$ +Matrine-H组SOD、GSH-Px活性显著增加( $P < 0.05$ ),ROS含量显著降低( $P < 0.05$ )。见表3。



A, apoptosis diagram; B, apoptosis-related protein. 1, Con group; 2, Aβ<sub>25-35</sub> group; 3, Aβ<sub>25-35</sub>+Matrine-L group; 4, Aβ<sub>25-35</sub>+Matrine-M group; 5, Aβ<sub>25-35</sub>+Matrine-H group.

图1 苦参碱对Aβ<sub>25-35</sub>诱导PC12细胞凋亡的影响

Fig.1 Effect of matrine on apoptosis of PC12 cells induced by Aβ<sub>25-35</sub>

表2 苦参碱对Aβ<sub>25-35</sub>诱导PC12细胞生长和凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

Tab.2 Effects of matrine on the growth and apoptosis of PC12 cells induced by Aβ<sub>25-35</sub> ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

Group	OD		Apoptosis rate (%)	Bax	Bcl-2	Cleaved caspase-3
	24 h	48 h				
Con	0.62 ± 0.04	0.87 ± 0.06	4.52 ± 0.62	0.25 ± 0.04	0.85 ± 0.11	0.38 ± 0.04
Aβ <sub>25-35</sub>	0.16 ± 0.02 <sup>1)</sup>	0.32 ± 0.04 <sup>1)</sup>	21.96 ± 2.42 <sup>1)</sup>	0.78 ± 0.06 <sup>1)</sup>	0.35 ± 0.06 <sup>1)</sup>	1.12 ± 0.14 <sup>1)</sup>
Aβ <sub>25-35</sub> +Matrine-L	0.25 ± 0.04 <sup>2)</sup>	0.46 ± 0.04 <sup>2)</sup>	19.45 ± 1.94 <sup>2)</sup>	0.64 ± 0.05 <sup>2)</sup>	0.44 ± 0.04 <sup>2)</sup>	0.96 ± 0.11 <sup>2)</sup>
Aβ <sub>25-35</sub> +Matrine-M	0.40 ± 0.06 <sup>2)</sup>	0.57 ± 0.05 <sup>2)</sup>	15.63 ± 1.59 <sup>2)</sup>	0.52 ± 0.04 <sup>2)</sup>	0.59 ± 0.05 <sup>2)</sup>	0.75 ± 0.09 <sup>2)</sup>
Aβ <sub>25-35</sub> +Matrine-H	0.58 ± 0.04 <sup>2)</sup>	0.74 ± 0.06 <sup>2)</sup>	9.32 ± 1.15 <sup>2)</sup>	0.34 ± 0.05 <sup>2)</sup>	0.75 ± 0.06 <sup>2)</sup>	0.52 ± 0.07 <sup>2)</sup>
F	205.670	166.640	168.335	175.636	83.231	90.078
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

1) P < 0.05 vs. Con group; 2) P < 0.05 vs. Aβ<sub>25-35</sub> group.

表3 苦参碱对A $\beta_{25-35}$ 诱导PC12细胞氧化应激的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )  
Tab.3 Effects of matrine on oxidative stress in PC12 cells induced by A $\beta_{25-35}$  ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

Group	SOD (U/mg)	GSH-Px (U/mg)	ROS content (%)
Con	56.88 $\pm$ 5.41	68.57 $\pm$ 6.39	100.35 $\pm$ 2.69
A $\beta_{25-35}$	16.14 $\pm$ 2.45 <sup>1)</sup>	22.67 $\pm$ 3.59 <sup>1)</sup>	163.45 $\pm$ 15.43 <sup>1)</sup>
A $\beta_{25-35}$ +Matrine-L	23.15 $\pm$ 3.12 <sup>2)</sup>	31.42 $\pm$ 4.57 <sup>2)</sup>	149.42 $\pm$ 11.45 <sup>2)</sup>
A $\beta_{25-35}$ +Matrine-M	32.44 $\pm$ 4.52 <sup>2)</sup>	46.74 $\pm$ 5.18 <sup>2)</sup>	130.43 $\pm$ 9.48 <sup>2)</sup>
A $\beta_{25-35}$ +Matrine-H	47.62 $\pm$ 4.36 <sup>2)</sup>	62.54 $\pm$ 6.98 <sup>2)</sup>	113.15 $\pm$ 8.75 <sup>2)</sup>
F	151.924	115.351	54.918
P	<0.001	<0.001	<0.001

1)  $P < 0.05$  vs. Con group; 2)  $P < 0.05$  vs. A $\beta_{25-35}$  group.

#### 2.4 不同浓度苦参碱对A $\beta_{25-35}$ 诱导PC12细胞炎症因子的影响

与Con组相比, A $\beta_{25-35}$ 组IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 表达显

著增加 ( $P < 0.05$ ); 与A $\beta_{25-35}$ 组相比, A $\beta_{25-35}$ +Matrine-L组、A $\beta_{25-35}$ +Matrine-M组、A $\beta_{25-35}$ +Matrine-H组IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 表达显著降低 ( $P < 0.05$ )。见表4。

表4 苦参碱对A $\beta_{25-35}$ 诱导PC12细胞炎症细胞因子的影响 ( $\bar{x} \pm s, \text{pg/mL}, n = 9$ )  
Tab.4 Effects of matrine on inflammatory factors induced by A $\beta_{25-35}$  in PC12 cells ( $\bar{x} \pm s, \text{pg/mL}, n = 9$ )

Group	IL-6	IL-1 $\beta$	TNF- $\alpha$
Con	27.85 $\pm$ 4.13	32.41 $\pm$ 6.88	65.42 $\pm$ 7.85
A $\beta_{25-35}$	146.87 $\pm$ 16.97 <sup>1)</sup>	185.64 $\pm$ 20.62 <sup>1)</sup>	243.68 $\pm$ 35.69 <sup>1)</sup>
A $\beta_{25-35}$ +Matrine-L	113.15 $\pm$ 14.21 <sup>2)</sup>	143.14 $\pm$ 11.52 <sup>2)</sup>	203.42 $\pm$ 21.87 <sup>2)</sup>
A $\beta_{25-35}$ +Matrine-M	87.64 $\pm$ 10.30 <sup>2)</sup>	92.62 $\pm$ 10.58 <sup>2)</sup>	152.69 $\pm$ 15.48 <sup>2)</sup>
A $\beta_{25-35}$ +Matrine-H	43.52 $\pm$ 6.52 <sup>2)</sup>	57.89 $\pm$ 6.74 <sup>2)</sup>	86.72 $\pm$ 11.42 <sup>2)</sup>
F	164.862	229.605	117.429
P	<0.001	<0.001	<0.001

1)  $P < 0.05$  vs. Con group; 2)  $P < 0.05$  vs. A $\beta_{25-35}$  group.

#### 2.5 不同浓度的苦参碱对A $\beta_{25-35}$ 诱导PC12细胞中AMPK/SIRT1通路相关蛋白的影响

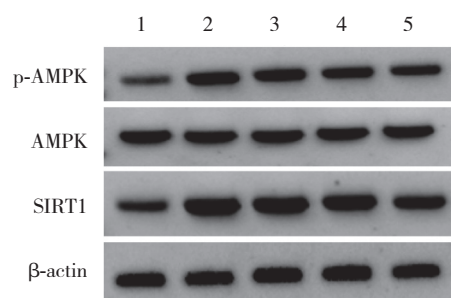
与Con组相比, A $\beta_{25-35}$ 组p-AMPK、SIRT1蛋白表达显著增加 ( $P < 0.05$ ); 与A $\beta_{25-35}$ 组相比, A $\beta_{25-35}$ +Matrine-L组、A $\beta_{25-35}$ +Matrine-M组、A $\beta_{25-35}$ +Matrine-H组p-AMPK、SIRT1蛋白表达显著降低 ( $P < 0.05$ )。见图2、表5。

### 3 讨论

研究<sup>[8-9]</sup>发现, A $\beta_{25-35}$ 是保留全长A $\beta$ 毒性的最短片段, 且A $\beta_{25-35}$ 所致的细胞毒性是诱导神经元损伤和阿尔茨海默病主要根源。本研结果显示, A $\beta_{25-35}$ 可刺激PC细胞异常凋亡和生长, 并加速细胞氧化损伤和炎症反应。

近年来研究<sup>[10]</sup>发现, 中药材、针灸等传统方法可有效治疗阿尔茨海默病。许多纯天然药物可有效

改善学习和记忆功能, 还可抑制A $\beta$ 寡聚体毒性以保护神经元<sup>[11]</sup>, 药理研究<sup>[12]</sup>也证实, 从中药材内分离出的一些活性单体, 如丹参酮、人参皂苷等对阿尔茨海默病神经元具有保护作用。



1, control group; 2, A $\beta_{25-35}$  group; 3, A $\beta_{25-35}$ +Matrine-L group; 4, A $\beta_{25-35}$ +Matrine-M group; 5, A $\beta_{25-35}$ +Matrine-H group.

图2 AMPK、p-AMPK和SIRT1蛋白表达

Fig.2 Expression of AMPK, p-AMPK, and SIRT1 proteins

表5 不同浓度苦参碱对Aβ<sub>25-35</sub>诱导PC12细胞中AMPK、p-AMPK和SIRT1蛋白的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

Tab.5 Effects of matrine concentrations on AMPK, p-AMPK, and SIRT1 proteins induced by Aβ<sub>25-35</sub> in PC12 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

Group	p-AMPK	AMPK	SIRT1
Con	0.18 ± 0.05	0.80 ± 0.10	0.27 ± 0.06
Aβ <sub>25-35</sub>	0.87 ± 0.06 <sup>1)</sup>	0.82 ± 0.09	0.90 ± 0.10 <sup>1)</sup>
Aβ <sub>25-35</sub> +Matrine-L	0.74 ± 0.07 <sup>2)</sup>	0.84 ± 0.11	0.78 ± 0.06 <sup>2)</sup>
Aβ <sub>25-35</sub> +Matrine-M	0.56 ± 0.05 <sup>2)</sup>	0.82 ± 0.12	0.65 ± 0.07 <sup>2)</sup>
Aβ <sub>25-35</sub> +Matrine-H	0.35 ± 0.04 <sup>2)</sup>	0.81 ± 0.08	0.43 ± 0.06 <sup>2)</sup>
F	234.685	0.194	114.916
P	<0.001	0.940	<0.001

1) P < 0.05 vs. Con group; 2) P < 0.05 vs. Aβ<sub>25-35</sub> group.

苦参碱是从中药材中提出而来的一种生物碱,具有较高的水溶性、但脂溶性较差,研究学者通常在13-位修饰以提供脂溶性<sup>[13]</sup>。ZHU等<sup>[14]</sup>研究结果显示,苦参碱通过抑制ProNGF和NGF通路激活可有效改善神经胶质细胞死亡和轴突变性。李娟等<sup>[15]</sup>认为,苦参碱可减轻脂多糖诱导的阿尔茨海默病小鼠学习记忆能力,并减轻脑组织神经炎性损伤。姚遥等<sup>[16]</sup>研究结果也显示,苦参碱可减轻阿尔茨海默病小鼠学习记忆功能,并减轻脑内氧化损伤。以上结论说明苦参碱对脑神经有保护作用,但也有研究<sup>[17]</sup>认为,苦参碱浓度超过2 mmol/L对神经细胞具有一定抑制作用,可能与诱导线粒体途径损伤有关。本研究通过MTT实验检测不同浓度苦参碱对PC12细胞生长的影响,发现浓度超过2 mmol/L对PC12细胞具有抑制作用,这与上述结果一致,本研究选择0.5、1.0、1.5 mmol/L苦参碱进行后续实验。结果显示,低、中、高剂量苦参碱可促进细胞增殖活性,并抑制细胞凋亡率,下调Bax、cleaved caspase-3蛋白表达,上调Bcl-2蛋白表达,并减少氧化应激、炎性细胞因子表达,提示苦参碱可抑制Aβ<sub>25-35</sub>诱导PC12细胞凋亡、氧化应激和炎症损伤。

AMPK/SIRT1通路是与细胞代谢、凋亡和氧化应激等有关信号通路,AMPK具有高度保守特性,可被体内多种激酶激活,进而发挥不同生物学效应<sup>[18]</sup>。SIRT1是哺乳动物NAD<sup>+</sup>依赖的组蛋白脱乙酰化酶,广泛表达于细胞核中,与细胞增殖、衰老和调节新陈代谢等过程关系密切<sup>[19]</sup>。研究<sup>[20]</sup>发现,SIRT1对脑神经具有保护作用,可参与阿尔茨海默病的病理进展。ZHAO等<sup>[21]</sup>研究发现,AMPK与SIRT1具有相互调节作用,AMPK与SIRT1可相互调

节,形成正反馈,进而调节机体生理病理过程。虾青素可通过抑制AMPK-SIRT1通路激活减轻七氟醚所致海马神经元细胞氧化损伤和凋亡<sup>[22]</sup>。本研究结果显示,Aβ<sub>25-35</sub>组p-AMPK、SIRT1蛋白表达上调,不同浓度苦参碱可下调p-AMPK、SIRT1蛋白表达,提示苦参碱对Aβ<sub>25-35</sub>诱导的PC12细胞有保护作用,可能与AMPK/SIRT1通路有关,但具体作用机制有待进一步研究。

综上所述,苦参碱可减轻Aβ<sub>25-35</sub>诱导PC12细胞氧化损伤和炎症反应,并抑制细胞凋亡,其作用机制可能与抑制AMPK/SIRT1通路的激活有关。

参考文献:

- [1] FERRARI C, SORBI S. The complexity of Alzheimer's disease: an evolving puzzle [J]. *Physiol Rev*, 2021, 101 (3) : 1047-1081. DOI: 10.1152/physrev.00015.2020.
- [2] SERRANO-POZO A, DAS S, HYMAN BT. APOE and Alzheimer's disease: advances in genetics, pathophysiology, and therapeutic approaches [J]. *Lancet Neurol*, 2021, 20 (1) : 68-80. DOI: 10.1016/S1474-4422(20)30412-9.
- [3] TATULIAN SA. Challenges and hopes for Alzheimer's disease [J]. *Drug Discov Today*, 2022, 27 (4) : 1027-1043. DOI: 10.1016/j.drudis.2022.01.016.
- [4] TANG L, XIANG Q, XIANG J, et al. Tripterygium glycoside ameliorates neuroinflammation in a mouse model of Aβ<sub>25-35</sub>-induced Alzheimer's disease by inhibiting the phosphorylation of IκBα and p38 [J]. *Bioengineered*, 2021, 12 (1) : 8540-8554. DOI: 10.1080/21655979.2021.1987082.
- [5] CHHABRA S, MEHAN S. Matrine exerts its neuroprotective effects by modulating multiple neuronal pathways [J]. *Metab Brain Dis*, 2023, 38 (5) : 1471-1499. DOI: 10.1007/s11011-023-01214-6.
- [6] 李运华, 邬远林, 黄红芬, 等. 苦参碱对Aβ<sub>25-35</sub>诱导认知功能障碍小鼠空间记忆和海马神经再生能力的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35 (24) : 7030-7033. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2015.24.028.
- [7] XU WL, YAN J, OCAK U, et al. Melanocortin 1 receptor attenuates

- independent cytotoxicity of sodium hypochlorite, ethylenediamine-tetraacetic acid and chlorhexidine [J]. *Int Endod J*, 2016, 49 (8) : 764-773. DOI: 10.1111/iej.12517.
- [10] SHARMA G, KAKKAR P, VATS A. A comparative SEM investigation of smear layer remaining on dentinal walls by three rotary NiTi files with different cross sectional designs in moderately curved canals [J]. *J Clin Diagn Res*, 2015, 9 (3) : ZC43-ZC47. DOI: 10.7860/JCDR/2015/11569.5710.
- [11] DA SILVA LAB, SANGUINO ACM, ROCHA CT, et al. Scanning electron microscopic preliminary study of the efficacy of SmearClear and EDTA for smear layer removal after root canal instrumentation in permanent teeth [J]. *J Endod*, 2008, 34 (12) : 1541-1544. DOI: 10.1016/j.joen.2008.08.007.
- [12] GUNDAPPA M, BANSAL R, KHORIYA S, et al. Root canal centering ability of rotary cutting nickel titanium instruments: a meta-analysis [J]. *J Conserv Dent*, 2014, 17 (6) : 504-509. DOI: 10.4103/0972-0707.144567.
- [13] TOPÇUOĞLU G, TOPÇUOĞLU HS, AKPEK F. Evaluation of apically extruded debris during root canal preparation in primary molar teeth using three different rotary systems and hand files [J]. *Int J Paediatr Dent*, 2016, 26 (5) : 357-363. DOI: 10.1111/ipd.12208.
- [14] ELNAGHY AM, ELSAKA SE. Mechanical properties of ProTaper Gold nickel-titanium rotary instruments [J]. *Int Endod J*, 2016, 49 (11) : 1073-1078. DOI: 10.1111/iej.12557.
- [15] HIEAWY A, HAAPASALO M, ZHOU HM, et al. Phase transformation behavior and resistance to bending and cyclic fatigue of ProTaper gold and ProTaper universal instruments [J]. *J Endod*, 2015, 41 (7) : 1134-1138. DOI: 10.1016/j.joen.2015.02.030.
- [16] GAMBARINI G, GERGI R, NAAMAN A, et al. Cyclic fatigue analysis of twisted file rotary NiTi instruments used in reciprocating motion [J]. *Int Endod J*, 2012, 45 (9) : 802-806. DOI: 10.1111/j.1365-2591.2012.02036.x.
- [17] BAUGH D, WALLACE J. The role of apical instrumentation in root canal treatment: a review of the literature [J]. *J Endod*, 2005, 31 (5) : 333-340. DOI: 10.1097/01.don.0000145422.94578.e6.
- [18] KHEDMAT S, SHOKOUHINEJAD N. Comparison of the efficacy of three chelating agents in smear layer removal [J]. *J Endod*, 2008, 34 (5) : 599-602. DOI: 10.1016/j.joen.2008.02.023.
- [19] DE VASCONCELOS RA, DE VASCONCELOS RA, ARIAS A, et al. Lateral and axial cutting efficiency of instruments manufactured with conventional nickel-titanium and novel gold metallurgy [J]. *Int Endod J*, 2018, 51 : 577-583. DOI: 10.1111/iej.12822.
- [20] GAMBARINI G, MICCOLI G, ZANZA A, et al. How to improve properties of nickel-titanium rotary instruments [J]. *J Contemp Dent Pract*, 2020, 21 (4) : 351-352.
- [21] ZAN RC, TUNÇ T, HUBBEZOĞLU İ, et al. Apical extrusion of intracanal biofilm using ProTaper Gold, WaveOne Gold, Twisted File Adaptive, OneShape New Generation and K3XF [J]. *Eur Endod J*, 2016, 1 (1) : 1-6. DOI: 10.5152/eej.2016.16017.

(编辑 王又冬)

(上接第746页)

- early brain injury following subarachnoid hemorrhage by controlling mitochondrial metabolism via AMPK/SIRT1/PGC-1 $\alpha$  pathway in rats [J]. *Theranostics*, 2021, 11 (2) : 522-539. DOI: 10.7150/thno.49426.
- [8] ZHANG W, ZHANG MH, WU Q, et al. Dendrobium nobile lindl. alkaloids ameliorate A $\beta$ <sub>25-35</sub>-induced synaptic deficits by targeting Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in Alzheimer's disease models [J]. *J Alzheimers Dis*, 2022, 86 (1) : 297-313. DOI: 10.3233/jad-215433.
- [9] 汪瑞茹, 李茂全. 单味中药及中药复方治疗阿尔茨海默病的研究进展 [J]. *河北中医*, 2023, 45 (4) : 699-704. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2619.2023.04.038.
- [10] 刘辉, 李佩芳. 针灸治疗阿尔茨海默病研究进展 [J]. *实用中医药杂志*, 2023, 39 (4) : 843-846.
- [11] 张宇洁, 赵佳佳, 木尼热·艾海提, 等. 阿尔茨海默病差异表达基因生物信息学分析及潜在治疗中药的预测 [J]. *中国老年学杂志*, 2023, 43 (7) : 1596-1602. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2023.07.017.
- [12] 李陶然, 周小青, 刘宏栋, 等. 治疗阿尔茨海默病的皂苷类成分及其作用机制研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28 (14) : 216-225. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20221338.
- [13] 郭健, 曾华婷, 陈彦. 氧化苦参碱药理作用及其新型给药系统的研究进展 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2022, 24 (12) : 4633-4643.
- [14] ZHU L, PAN QX, ZHANG XJ, et al. Protective effects of matrine on experimental autoimmune encephalomyelitis via regulation of ProNGF and NGF signaling [J]. *Exp Mol Pathol*, 2016, 100 (2) : 337-343. DOI: 10.1016/j.yexmp.2015.12.006.
- [15] 李娟, 姚遥, 韩怀钦, 等. 苦参碱对LPS诱导的阿尔茨海默病小鼠模型学习记忆功能和脑内神经炎症的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24 (24) : 134-139. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20182430.
- [16] 姚遥, 孙娜, 郑萍, 等. 苦参碱对阿尔茨海默症小鼠学习记忆功能和脑内氧化应激的影响 [J]. *宁夏医科大学学报*, 2016, 38 (9) : 985-988. DOI: 10.16050/j.cnki.issn1674-6309.2016.09.003.
- [17] 沈芳, 梁培, 陆红. 苦参碱对PC12细胞的毒性及线粒体损伤机制 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2017, 31 (9) : 873-879. DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2017.09.003.
- [18] XU YX, YU TH, MA GJ, et al. Berberine modulates deacetylation of PPAR $\gamma$  to promote adipose tissue remodeling and thermogenesis via AMPK/SIRT1 pathway [J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17 (12) : 3173-3187. DOI: 10.7150/ijbs.62556.
- [19] DINICOLANTONIO JJ, MCCARTY MF, O'KEEFE JH. Nutra-ceutical activation of Sirt1: a review [J]. *Open Heart*, 2022, 9 (2) : e002171. DOI: 10.1136/openhrt-2022-002171.
- [20] YE F, WU AS. The protective mechanism of SIRT1 in the regulation of mitochondrial biogenesis and mitochondrial autophagy in Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2021, 82 (1) : 149-157. DOI: 10.3233/JAD-210132.
- [21] ZHAO ZJ, LIU Y, LU YJ, et al. Ginkgo biloba-inspired lactone prevents osteoarthritis by activating the AMPK-SIRT1 signaling pathway [J]. *Arthritis Res Ther*, 2022, 24 (1) : 197. DOI: 10.1186/s13075-022-02890-y.
- [22] 李瑜, 胡莹, 于映映, 等. 虾青素调控AMPK-SIRT1通路对七氟醚诱导HT22神经细胞损伤的影响 [J]. *现代药物与临床*, 2021, 36 (4) : 645-651. DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.04.002.

(编辑 于溪)