

[文章编号] 1671-587X(2025)01-0085-11

DOI:10.13481/j.1671-587X.20250111

积雪草酸通过Nrf2/HO-1信号通路对脂多糖诱导大鼠海马神经元损伤的改善作用

白燕燕, 周禹彤, 隋海娟, 刘卓

(锦州医科大学基础医学院药理学教研室, 辽宁 锦州 121000)

[摘要] **目的:** 探讨积雪草酸(AA)对脂多糖(LPS)诱导大鼠原代海马神经元炎症和氧化应激损伤的作用, 并阐明其作用机制。**方法:** 原代培养大鼠海马神经元(免疫荧光染色法鉴定细胞纯度)分为对照组、LPS组($10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS)、LPS+AA组($10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS+10、20和 $40\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA)、AA组($20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA)、ML385组 [$10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 核因子E2相关因子2(Nrf2)抑制剂]和LPS+ML385+AA组($10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS+ $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ML385+ $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA); 给药处理后, 噻唑蓝(MTT)法检测各组大鼠海马神经元的存活率, 乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒检测各组大鼠海马神经元LDH漏出率, 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒检测各组大鼠海马神经元上清液中炎症因子[白细胞介素(IL)-1 β 和肿瘤坏死因子(TNF)- α]水平以及各组大鼠海马神经元中超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)水平, Griess法测定各组大鼠海马神经元上清液中一氧化氮(NO)水平, 免疫荧光法检测各组大鼠海马神经元中Nrf2和血红素氧合酶1(HO-1)蛋白表达情况; Western blotting法检测各组大鼠海马神经元中Nrf2、HO-1、核因子 κ B(NF- κ B)和B细胞淋巴瘤2(Bcl-2)蛋白表达水平。**结果:** 与对照组比较, LPS组大鼠海马神经元中的海马神经元存活率、SOD活性和Bcl-2表达水平明显降低($P<0.01$), LDH漏出率、IL-1 β 和TNF- α 水平、MDA水平、NO水平以及NF- κ B蛋白表达水平均明显升高($P<0.01$), Nrf2和HO-1的荧光强度明显减弱, Nrf2和HO-1蛋白表达水平明显降低($P<0.01$); 与LPS组比较, LPS+ $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA组和LPS+ $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA组大鼠海马神经元存活率、SOD活性和Bcl-2表达水平明显升高($P<0.01$), LDH漏出率、IL-1 β 和TNF- α 水平、MDA水平、NO水平以及NF- κ B蛋白表达水平明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$), Nrf2和HO-1的荧光强度明显升高($P<0.01$), Nrf2和HO-1蛋白表达水平明显升高($P<0.01$); 与LPS+ $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA组比较, LPS+ML385+AA组海马神经元中Nrf2和HO-1荧光强度明显减弱($P<0.01$), 细胞核和细胞质中Nrf2、细胞中HO-1和Bcl-2蛋白表达水平明显降低($P<0.01$), NF- κ B蛋白表达水平明显升高($P<0.01$)。**结论:** AA可改善LPS诱导的原代培养大鼠海马神经元炎症和氧化应激损伤, 其机制可能与激活Nrf2/HO-1信号通路有关。

[关键词] 阿尔茨海默病; 积雪草酸; 海马神经元; 炎症; 氧化应激; 核因子E2相关因子2; 血红素氧合酶1

[中图分类号] R742; R285.5 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2024-03-25 **[录用日期]** 2024-05-14

[基金项目] 辽宁省科技厅自然科学基金指导项目(2019-ZD-0818); 锦州市科技局指导性科技计划项目(JZ2023B055); 辽宁省教育厅大学生创新创业训练计划项目(20201016029)

[作者简介] 白燕燕(1996—), 女, 甘肃省平凉市人, 医学硕士, 主要从事神经药理学方面的研究。

[通信作者] 刘卓, 副教授, 硕士研究生导师(E-mail: liuz@jzmu.edu.cn)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

Improvement effect of asiatic acid on damage of lipopolysaccharide-induced hippocampus neuron in rats through Nrf2/HO-1 signaling pathway

BAI Yanyan, ZHOU Yutong, SUI Haijuan, LIU Zhuo

(Department of Pharmacology, School of Basic Medical Sciences, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the effect of asiatic acid (AA) on the inflammation and oxidative stress damage induced by lipopolysaccharide (LPS) in the primary cultured hippocampus neurons, and to clarify its mechanism. **Methods:** The primary cultured rat hippocampus neurons (cell purity identified by immunofluorescence staining) were divided into control group, LPS ($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) group, and LPS+AA group ($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS+10, 20, and $40 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AA), AA group ($20 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AA), ML385 group [$10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ nuclear factor erythroid 2-related factor (Nrf2) inhibitor], and LPS+ML385+AA group ($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS+ $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ML385+ $20 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AA). After drug treatment, methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) method was used to detect the survival rates of the hippocampus neurons in various groups; lactate dehydrogenase (LDH) kit was used to detect the LDH leakage rates of the hippocampus neurons in various groups; enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit was used to detect the expression levels of inflammatory factors [interleukin (IL)- 1β and tumor necrosis factor (TNF)- α] and the activities of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) levels in the hippocampus neurons in various groups; Griess method was used to detect the nitric oxide (NO) levels in supernatant of the hippocampus neurons in various groups; immunofluorescence staining was used to detect the expressions of Nrf2 and heme oxygenase-1 (HO-1) proteins in the hippocampus neurons in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of Nrf2, HO-1, nuclear factor-kappa B (NF- κ B), and B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) proteins in the hippocampus neurons in various groups. **Results:** Compared with control group, the survival rate of the hippocampus neurons, SOD activity, and Bcl-2 expression level in the cells in LPS group were significantly decreased ($P < 0.01$), while the LDH leakage rate, expression levels of IL- 1β and TNF- α , MDA level, and NO level, as well as the expression level of NF- κ B protein, were significantly increased ($P < 0.01$); the fluorescence intensities and expression levels of Nrf2 and HO-1 proteins in hippocampus neurons were significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with LPS group, the survival rates of hippocampus neurons, SOD activities, and expression levels of Bcl-2 in the cells in LPS+ $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AA group and $20 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AA group were significantly increased ($P < 0.01$), while the LDH leakage rates, expression levels of IL- 1β and TNF- α , MDA levels, and NO levels, as well as expression levels of NF- κ B protein, were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the fluorescence intensities and protein expression levels of Nrf2 and HO-1 in the cells were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with LPS+ $20 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AA group, the fluorescence intensities of Nrf2 and HO-1 in the cells in LPS+ML385+AA group were significantly decreased ($P < 0.01$), and the expression levels of Nrf2 protein in the nucleus and cytoplasm, the expression levels of HO-1 and Bcl-2 proteins in the cells were significantly decreased ($P < 0.01$), while the expression level of NF- κ B protein was significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion:** AA can improve LPS-induced inflammation and oxidative stress damage in the primary cultured rat hippocampus neurons, and its mechanism may be related to the activation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway.

KEYWORDS Alzheimer's disease; Asiatic acid; Hippocampus neuron; Inflammation; Oxidative stress; Nuclear factor erythroid 2-related factor; Heme oxygenase-1

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种以老年患者为主的慢性、隐性和进展性的中枢神经系统退行性疾病^[1]。AD的病理特征是神经纤维缠结和淀粉样斑块, 可导致神经变性、神经炎症、氧化应激和胆碱能神经元损伤^[2]。研究^[2]表明: 神经炎症和氧化应激反应在AD的发展中起到至关重要的作用, 因此研究抗炎和抗氧化药物对治疗AD具有一定的现实意义。积雪草酸 (asiatic acid, AA) 是中药积雪草的三萜类衍生物之一, 具有解毒消炎和清热利湿的功效^[3-4]。先前研究^[5]表明: AA具有抗炎、抗细胞凋亡和抗氧化作用, 可以防止神经毒性和神经退行性变。最新研究^[6-7]表明: AA能改善痴呆小鼠的学习记忆功能, 并减轻 β 淀粉样蛋白 (β -amyloid peptide, A β)₁₋₄₂诱导的海马区炎症损伤。核因子E2相关因子2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 是细胞氧化应激后反应的一个关键因素, 也是维持细胞氧化还原稳态的重要信号通路^[8], 该信号通路的激活促进了下游分子的表达, 如还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) [醌氧化还原酶1 (NADPH: quinone oxidoreductase 1, NOQ1)、血红素氧合酶1 (heme oxygenase-1, HO-1) 和谷胱甘肽 (glutathione, GSH)] 的表达, 其可以通过抗氧化应激、抗凋亡和抗炎作用^[9]等多种途径发挥神经保护作用。脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 是革兰阳性菌的外膜, 通过抑制Nrf2/HO-1信号通路和激活转录因子 (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) 通路刺激细胞内氧化应激的增加和炎症因子的产生^[10]。利用LPS刺激可以发生氧化损伤, 同时也能启动炎症因子的释放并诱导细胞凋亡^[11-13]。因此, 本研究探讨AA对LPS引起海马神经元炎症和氧化应激损伤的作用, 阐明其作用机制是否与激活神经元Nrf2/HO-1信号通路有关, 为AD开发有效的治疗药物奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂和仪器 60只新生24 h以内SD大鼠乳鼠由锦州医科大学实验动物中心提供, 动物生产许可证号: SCXK(辽)2020-0004; AA (纯度 $\geq 98\%$, 货号: 18449-41-7) 购自成都

普思生物科技股份有限公司, F12培养基和DMEM培养基购自美国Invitrogen公司, 胰蛋白酶 (Trypsin, 1: 250)、二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 和L-多聚赖氨酸 (poly-L-lysine) 均购自美国Sigma-Aldrich公司, 阿糖胞苷购自意大利Actavis Italy S. p. A公司, 胎牛血清和马血清购自美国Gibco公司, 山羊抗兔的荧光二抗购自美国Santa Cruz公司, 神经核抗原 (neuronal nuclei, NeuN) 和胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 抗体购自英国Abcam公司, Nrf2和HO-1抗体购自武汉ABclonal生物科技有限公司, 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 试剂盒购自美国Promegen公司, 丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 和SOD检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所, Nrf2抑制剂ML385购自美国Med Chem Express公司, ECL化学发光试剂盒、噻唑蓝 (methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT) 试剂、 β 肌动蛋白 (β -actin) 抗体和含DAPI抗荧光淬灭封片剂购自上海碧云天生物技术有限公司; CKX41型倒置相差显微镜购自美国Olympus公司, Elx800TM型酶标仪购自美国伯腾仪器有限公司, 4000B型正置荧光显微镜购自德国Leica公司, Mini-REPOTAN II型电泳槽、电泳仪、小型转印槽和Thans-Blot半干转印系统购自美国Bio-Rad公司, 其他实验相关试剂由锦州医科大学基础医学院药理学教研室提供。

1.2 大鼠原代海马神经元分离、培养及鉴定 取新生24 h的乳鼠经酒精消毒后断头, 取出大脑, 于解剖显微镜下分离出左右海马, 整个过程置于冰磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 中进行; 将海马组织剪成约1 cm³的小块; 加入0.125%胰酶37℃消化5 min; 终止消化后经筛网过滤, 1 000 g离心5 min, 弃上清, 加入含有10%胎牛血清和10%马血清的培养基制成细胞悬液, 调整细胞密度为1 $\times 10^8$ L⁻¹, 接种于铺有L多聚赖氨酸24孔或6孔细胞培养板中, 置于37℃、5% CO₂培养箱中培养; 48 h后更换新的培养基并加入10 μ mol \cdot L⁻¹阿糖胞苷继续培养; 24 h后换成新的完全培养基继续培养, 以后每3 d换液1次; 采用倒置相差显微镜观察培养7 d的海马神经元形态表

现。培养7 d的海马神经元(24孔细胞培养板细胞爬片3个)取出, PBS缓冲液清洗, 4%多聚甲醛固定30 min; PBS缓冲液清洗3次, 每次5 min; 弃去PBS缓冲液, 加入0.1% Triton X-100(含有5%山羊血清)打孔封闭作用60 min; 将细胞爬片(正面向上)放于载玻片上, 滴加NeuN抗体(1:200)或GFAP(1:450)抗体, 4℃过夜; 第2天取出PBS缓冲液冲洗, 滴加荧光二抗(1:1000), 37℃孵育避光1 h; PBS缓冲液清洗3次; 滴加抗荧光淬灭封片剂; 荧光显微镜进行拍照观察, 每张玻片在荧光显微镜下随机摄取4个高倍(×400)视野, 计算海马神经元纯度。海马神经元的纯度=NeuN阳性细胞数/总细胞数×100%。

1.3 细胞分组及处理 将培养成熟的海马神经元分为对照组、LPS组、LPS+(10、20和40 μmol·L⁻¹)AA组、AA组(20 μmol·L⁻¹ AA)、ML385组和LPS+ML385+AA组。对照组: 加入等体积的DMEM培养基; LPS组: 加入终浓度10 mg·L⁻¹ LPS作用24 h; LPS+AA组: 加入10 mg·L⁻¹ LPS前, 分别加入10、20和40 μmol·L⁻¹ AA预处理细胞6 h; AA组: 加入终浓度20 μmol·L⁻¹ AA; ML385抑制剂组: 加入终浓度10 μmol·L⁻¹ ML385; LPS+ML385+AA组: 先加入10 μmol·L⁻¹ ML385作用2 h, 再加入终浓度20 μmol·L⁻¹ AA作用6 h, 最后加入10 mg·L⁻¹ LPS作用24 h。

1.4 MTT法检测各组大鼠海马神经元存活率 将大鼠海马神经元以每孔5×10³个的密度接种到96孔细胞培养板, 将其置于37℃、5% CO₂培养箱中7 d后, 按照“1.3”方法处理细胞, 另设不接种细胞仅加培养液的空白组, 每组设定6个复孔。实验结束后每孔加入10 μL MTT溶液(5 g·L⁻¹), 放入培养箱中继续培养4 h; 从CO₂孵箱中取出, 小心吸去孔内液体; 加入200 μL DMSO 37℃孵育10 min后, 应用酶标仪于波长560 nm处检测吸光度(A)值。细胞存活率=(实验组A值-空白组A值)/(对照组A值-空白组A值)×100%。

1.5 LDH试剂盒检测各组大鼠海马神经元LDH漏出率 将培养成熟的细胞按照“1.3”方法处理后, 收集各组培养液备用。各组的大鼠海马神经元用PBS缓冲液洗涤3次, 裂解细胞, 离心取细胞上清液备用, 按试剂盒说明书进行, 测得各组A值。

按公式计算LDH漏出率。LDH漏出率=培养液A值/(细胞匀浆液A值+培养液A值)×100%。

1.6 酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)法检测各组大鼠海马神经元上清液中白细胞介素(interleukin, IL)-1β和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)-α水平 培养成熟的细胞按照实验分组进行处理后, 收集细胞培养上清液, 按照ELISA试剂盒说明书检测各组大鼠海马神经元上清液中IL-1β和TNF-α的水平。

1.7 采用试剂盒检测各组大鼠海马神经元中SOD活性和MDA水平 将海马神经元以2×10⁶个的密度接种至6孔细胞培养板, 培养7 h后, 按照“1.3”方法处理后, 弃上清, 收集各组细胞后根据相应试剂盒说明书测定各组大鼠海马神经元中SOD活性和MDA水平。

1.8 Griess法检测各组大鼠海马神经元上清液中一氧化氮(nitric oxide, NO)水平 将细胞进行药物干预, 在细胞培养箱内孵育24 h后收集各组大鼠海马神经元上清液备用。按照试剂盒说明书操作, 检测各组大鼠海马神经元上清液中NO水平, 以1 μmol·L⁻¹亚硝酸钠溶液配制终浓度分别为0、1、2、5、10、20、40、60和100 μmol·L⁻¹的亚硝酸钠液, 按每孔50 μL, 于96孔细胞培养板中加入标准品和样品。按每孔50 μL, 各孔中分别加入室温Griess Reagent I和Griess Reagent II, 混匀后, 采用酶标仪于波长540 nm处检测各样品A值。以亚硝酸钠浓度(μmol·L⁻¹)为横坐标, A值为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算回归方程和相关系数, 根据标准曲线计算各组大鼠海马神经元上清液中NO水平。

1.9 免疫荧光法检测各组大鼠海马神经元Nrf2和HO-1蛋白表达情况 药物处理后取出24孔细胞培养板, 弃去细胞上清液, PBS缓冲液清洗2次; 4%多聚甲醛固定30 min; PBS缓冲液清洗3次, 每次5 min; 弃去PBS缓冲液, 加入0.1% Triton X-100(含有5%山羊血清)封闭60 min; 将细胞爬片(正面向上)放于载玻片上, 滴加兔抗HO-1(1:200)或Nrf2(1:200)抗体, 将载玻片放入湿盒中, 4℃过夜; 第2天从4℃冰箱中取出湿盒, 室温放置1 h后, PBS缓冲液清洗3次; 加入荧光二抗(1:1000), 37℃孵育避光1 h; PBS缓冲液清洗3次; 滴加抗荧光淬灭封片剂。荧光显

显微镜下拍照并观察蛋白表达情况。

1.10 Western blotting 法检测各组大鼠海马神经元中 Nrf2、HO-1、NF- κ B 和 B 细胞淋巴瘤 2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 蛋白表达水平 药物作用 24 h 后, 用 RIPA 裂解液或细胞核/浆蛋白抽提试剂盒提取蛋白, BCA 法进行蛋白定量。按照 Western blotting 法操作步骤依次进行蛋白变性、上样、SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜、抗原封闭, 一抗孵育 (4 °C 过夜), 二抗孵育 1 h, 洗膜, 避光显色, 实验重复 3 次, 将蛋白印迹显影图扫描。利用 Image J 软件对蛋白条带灰度值进行分析, 以 β -actin 为内参, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。

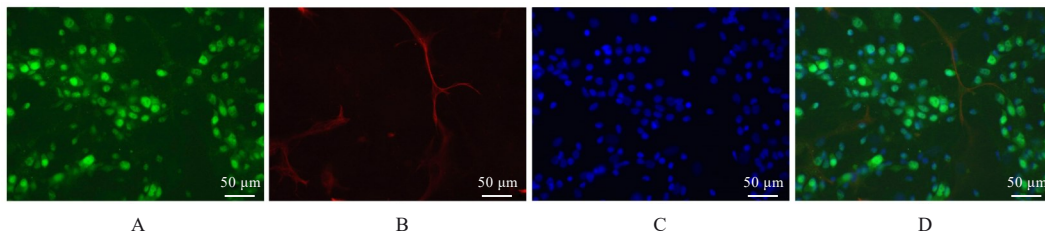
1.11 统计学分析 采用 SPSS 25.0 统计软件进行统计学分析。所有实验结果来自于单独培养的 3 个批次的细胞, 各组细胞存活率, LDH 漏出率, 炎症因子 (IL-1 β 和 TNF- α) 水平, SOD 活性, MDA 和 NO 水平, 细胞中 Nrf2、HO-1、NF- κ B 和 Bcl-2 蛋白表达水平均呈正态分布且方差齐性, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间样本均数比较采用单因素方差分析,

组间样本均数两两比较采用 SNK- q 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 原代海马神经元鉴定结果 将培养 7 d 大鼠海马神经元采用免疫荧光染色法与 NeuN、DAPI 和 GFAP 共染, 结果如图 1 所示, DAPI 细胞核染色几乎与神经元细胞核特异性标记物 NeuN 染色全部重合, 只有极少量的细胞与星形胶质细胞特异性蛋白 GFAP 染色重合, 表明大鼠海马神经元纯度较高。培养的大鼠原代海马神经元纯度达到 90% 以上, 可以用于后续实验。

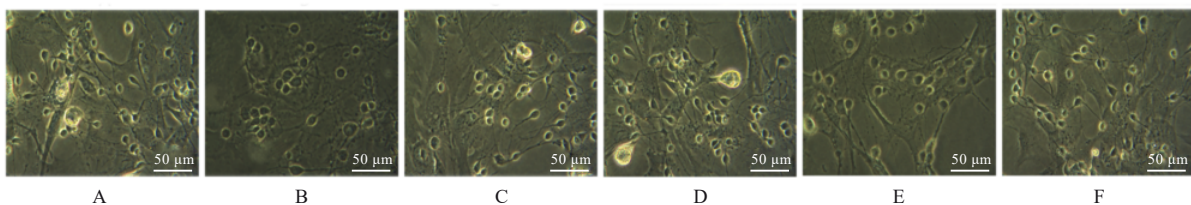
2.2 各组大鼠海马神经元形态表现 应用倒置相差显微镜观察, 结果显示: 培养 7 d 的大鼠原代海马神经元胞体大且饱满, 突起长, 分支较多, 形成网状结构。与对照组比较, LPS 组大鼠海马神经元突起明显减少、变短、变细, 胞体出现肿胀, AA 组细胞形态未见变化。LPS+10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA 组和 LPS+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA 组大鼠海马神经元突起受损明显减轻, 而 LPS+40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA 组大鼠海马神经元受损未见减轻。见图 2。



A: NeuN; B: GFAP; C: DAPI; D: Merge.

图 1 荧光显微镜观察原代海马神经元鉴定情况(免疫荧光)

Fig. 1 Identification of primary hippocampus neurons observed by fluorescence microscope(Immunofluorescence)



A: Control group; B: LPS group; C: LPS+10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA group; D: LPS+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA group; E: LPS+40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA group; F: AA group.

图 2 倒置相差显微镜观察各组大鼠海马神经元形态表现

Fig. 2 Morphology of hippocampus neurons of rats in various groups observed by inverted phase contrast microscope

2.3 各组大鼠海马神经元存活率和 LDH 漏出率 与对照组比较, LPS 组大鼠海马神经元存活率明显降低 ($P < 0.01$), LDH 漏出率明显增加 ($P <$

0.01), AA 组大鼠海马神经元存活率和 LDH 漏出率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与 LPS 组比较, LPS+10、20 和 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA 组大鼠海马神经

元存活率均明显升高 ($P<0.01$), LDH漏出率均明显降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。见表1。

表1 各组大鼠海马神经元存活率和LDH漏出率

Tab. 1 Survival rates and LDH leakage rates of hippocampus neurons of rats in various groups ($n=6, \bar{x}\pm s, \eta/\%$)

Group	Survival rate	LDH leakage rate
Control	100.00±4.82	14.41±0.70
LPS	31.39±2.65*	38.77±5.85*
LPS+10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA	73.27±5.39 $\Delta\Delta$	28.53±4.31 $\Delta\Delta$
LPS+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA	95.49±6.18 $\Delta\Delta$	19.57±5.36 $\Delta\Delta$
LPS+40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA	76.90±9.04 $\Delta\Delta$	30.02±6.30 Δ
AA	99.54±7.44	15.52±1.09

* $P<0.01$ vs control group; $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ vs LPS group.

2.4 各组大鼠海马神经元上清液中IL-1 β 和TNF- α 水平

与对照组比较, LPS组大鼠海马神经元上清液中IL-1 β 和TNF- α 水平明显升高 ($P<0.01$), AA组大鼠海马神经元上清液中IL-1 β 和TNF- α 水平差异无统计学意义 ($P>0.05$); 与LPS组比较, LPS+10、20和40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA组大鼠海马神经元上清液中IL-1 β 水平明显降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); LPS+10和20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA组大鼠海马神经元上清液中TNF- α 水平明显降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 而LPS+40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA组大鼠海马神经元上清液中TNF- α 水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表2。

表2 各组大鼠海马神经元上清液中IL-1 β 和TNF- α 水平
Tab. 2 Levels of IL-1 β and TNF- α in culture supernatant of hippocampus neurons of rats in various groups

$[n=6, \bar{x}\pm s, \rho_B/(\text{ng}\cdot\text{L}^{-1})]$

Group	IL-1 β	TNF- α
Control	10.25±1.35	2.93±0.16
LPS	125.15±19.98*	16.37±2.46*
LPS+10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA	99.98±15.44 Δ	13.59±1.48 Δ
LPS+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA	81.89±10.46 $\Delta\Delta$	8.42±0.60 $\Delta\Delta$
LPS+40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA	97.34±11.17 Δ	15.97±3.02
AA	11.75±0.31	3.81±0.75

* $P<0.01$ vs control group; $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ vs LPS group.

2.5 各组大鼠海马神经元中SOD活性和MDA水平

与对照组比较, LPS组大鼠海马神经元中SOD活性明显降低 ($P<0.01$), MDA水平明显升高 ($P<0.01$), AA组大鼠海马神经元中SOD活

性和MDA水平差异无统计学意义 ($P>0.05$); 与LPS组比较, LPS+10和20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA组大鼠海马神经元SOD活性明显升高 ($P<0.01$), MDA水平明显降低 ($P<0.01$), LPS+40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA组大鼠海马神经元中SOD活性和MDA水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表3。

表3 各组大鼠海马神经元中SOD活性和MDA水平

Tab. 3 SOD activities and MDA levels in hippocampus neurons of rats in various groups ($n=6, \bar{x}\pm s$)

Group	SOD	MDA
	$[\lambda_B/(\text{U}\cdot\text{mg}^{-1})]$	$[m_B/(\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1})]$
Control	147.17±19.96	6.94±0.26
LPS	86.45±5.67*	14.25±1.38*
LPS+10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA	101.92±14.93 Δ	10.59±0.74 Δ
LPS+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA	122.69±13.82 Δ	8.55±0.47 Δ
LPS+40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA	91.76±10.54	13.12±2.92
AA	138.24±16.61	6.77±0.64

* $P<0.01$ vs control group; $\Delta P<0.01$ vs LPS group.

2.6 各组大鼠海马神经元上清液中NO水平

与对照组比较, LPS组大鼠海马神经元上清液中NO水平明显升高 ($P<0.01$), AA组大鼠海马神经元上清液中NO水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与LPS组比较, LPS+10和20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA组大鼠海马神经元上清液中NO水平明显降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), LPS+40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA组大鼠海马神经元上清液中NO水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表4。

表4 各组大鼠海马神经元上清液中NO水平

Tab. 4 Levels of NO in supernatant of hippocampus neurons of rats in various groups ($[n=6, \bar{x}\pm s, c_B/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})]$)

Group	NO
Control	6.54±0.51
LPS	17.91±3.14*
LPS+10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA	15.37±3.68 Δ
LPS+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA	12.04±2.40 $\Delta\Delta$
LPS+40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA	16.71±2.88
AA	7.43±0.46

* $P<0.01$ vs control group; $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ vs LPS group.

综上所述, LPS+40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA组的实验结果表明该浓度AA对LPS诱导的神经损伤作用有一定的改善, 但较LPS+10和20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA组并未

提高, 因此后续实验取消 LPS+40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA 组的指标测定。

2.7 各组大鼠海马神经元 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平 免疫荧光法检测结果显示: 红色荧光代表 Nrf2 染色, 蓝色荧光代表核染色, 绿色荧光代表 HO-1 染色, 见图 3 和 4。与对照组比较, LPS 组大鼠海马神经元 Nrf2 和 HO-1 荧光强度明显减弱 ($P<0.01$), ML385 组大鼠海马神经元

Nrf2 和 HO-1 荧光强度差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与 LPS 组比较, LPS+10 和 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA 组大鼠海马神经元胞浆和胞核中 Nrf2 及细胞 HO-1 荧光强度明显增强 ($P<0.01$), 表明 AA 促进 Nrf2 向核内转移。与 LPS+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA 组比较, LPS+ML385+AA 组大鼠海马神经元中 Nrf2 和 HO-1 荧光强度明显减弱 ($P<0.01$)。见图 3 和 4。

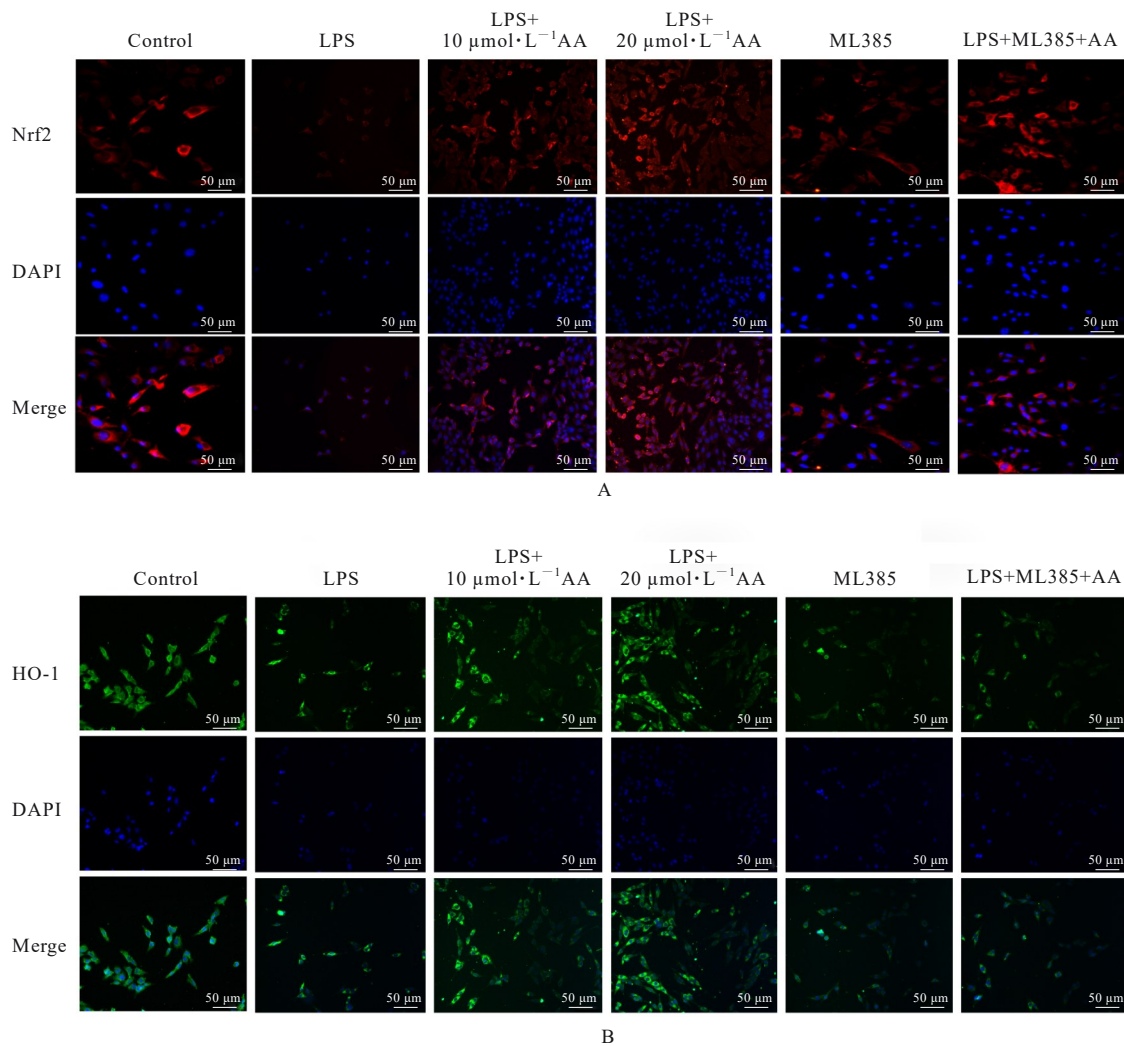
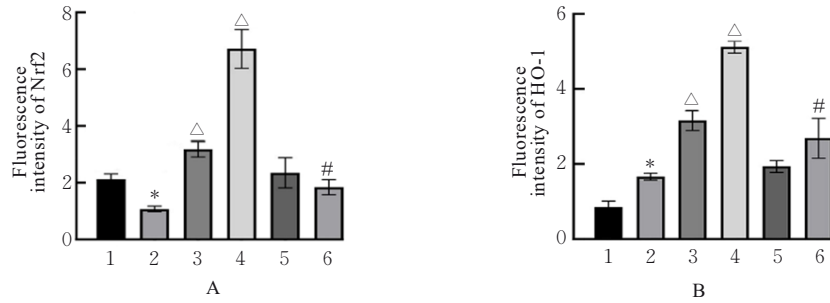


图3 免疫荧光法检测各组大鼠海马神经元中 Nrf2(A)和 HO-1(B)蛋白表达情况

Fig. 3 Expressions of Nrf2(A) and HO-1(B) proteins in hippocampus neurons of rats in various groups detected by immunofluorescence

Western blotting 实验检测结果显示: 与对照组比较, LPS 组大鼠海马神经元细胞核和细胞质中 Nrf2 及细胞中 HO-1 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.01$), ML385 组大鼠海马神经元中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与 LPS 组比较, LPS+10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA 组和 LPS+

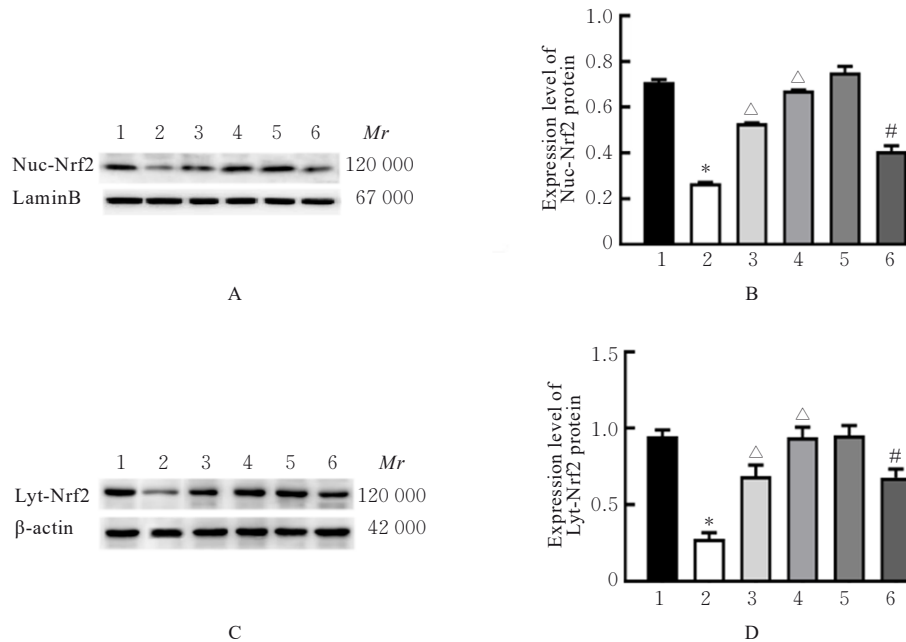
20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA 组大鼠海马神经元细胞核内 Nrf2 被激活后入核, 细胞核和细胞质中 Nrf2 及 HO-1 蛋白表达水平明显升高 ($P<0.01$)。与 LPS+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA 组比较, LPS+ML385+AA 组大鼠海马神经元细胞核和细胞质中 Nrf2 及细胞中 HO-1 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.01$)。见图 5 和 6。



A: Nrf2; B: HO-1. 1: Control group; 2: LPS group; 3: LPS+10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA group; 4: LPS+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA group; 5: ML385 group; 6: LPS+ML385+AA group. * $P<0.01$ vs control group; $\Delta P<0.01$ vs LPS group; # $P<0.01$ vs LPS+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA group.

图4 各组大鼠海马神经元中 Nrf2和 HO-1 蛋白荧光强度

Fig. 4 Fluorescence intensities of Nrf2 and HO-1 proteins in hippocampus neurons of rats in various groups



A, B: Nuc-Nrf2; C, D: Lyt-Nrf2; A, C: Electrophoregrams; B, D: Histograms. Lane 1: Control group; Lane 2: LPS group; Lane 3: LPS+10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA group; Lane 4: LPS+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA group; Lane 5: ML385 group; Lane 6: LPS+ML385+AA group.

1: Control group; 2: LPS group; 3: LPS+10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA group; 4: LPS+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA group; 5: ML385 group; 6: LPS+ML385+AA group. * $P<0.01$ vs control group; $\Delta P<0.01$ vs LPS group; # $P<0.01$ vs LPS+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA group.

图5 Western blotting法检测各组大鼠海马神经元中 Nrf2 蛋白表达电泳图和直条图

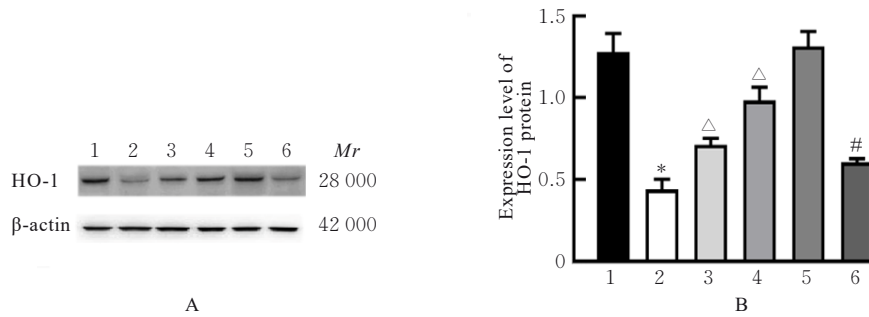
Fig. 5 Electrophoregrams and histograms of expressions of Nrf2 protein in hippocampus neurons of rats in various groups detected by Western blotting method

2.8 各组大鼠海马神经元中 NF- κ B 和 Bcl-2 蛋白表达水平 与对照组比较, LPS 组大鼠海马神经元中 NF- κ B 蛋白表达水平明显升高 ($P<0.01$), Bcl-2 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.01$); ML385 组大鼠海马神经元 NF- κ B 和 Bcl-2 蛋白表达水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与 LPS 组比较, LPS+10 和 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA 组大鼠海马神经元 NF- κ B 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.01$), Bcl-2 蛋白表达水平

明显升高 ($P<0.01$)。与 LPS+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA 组比较, LPS+ML385+AA 组大鼠海马神经元中 NF- κ B 蛋白表达水平明显升高 ($P<0.01$), Bcl-2 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.01$)。见图 7。

3 讨论

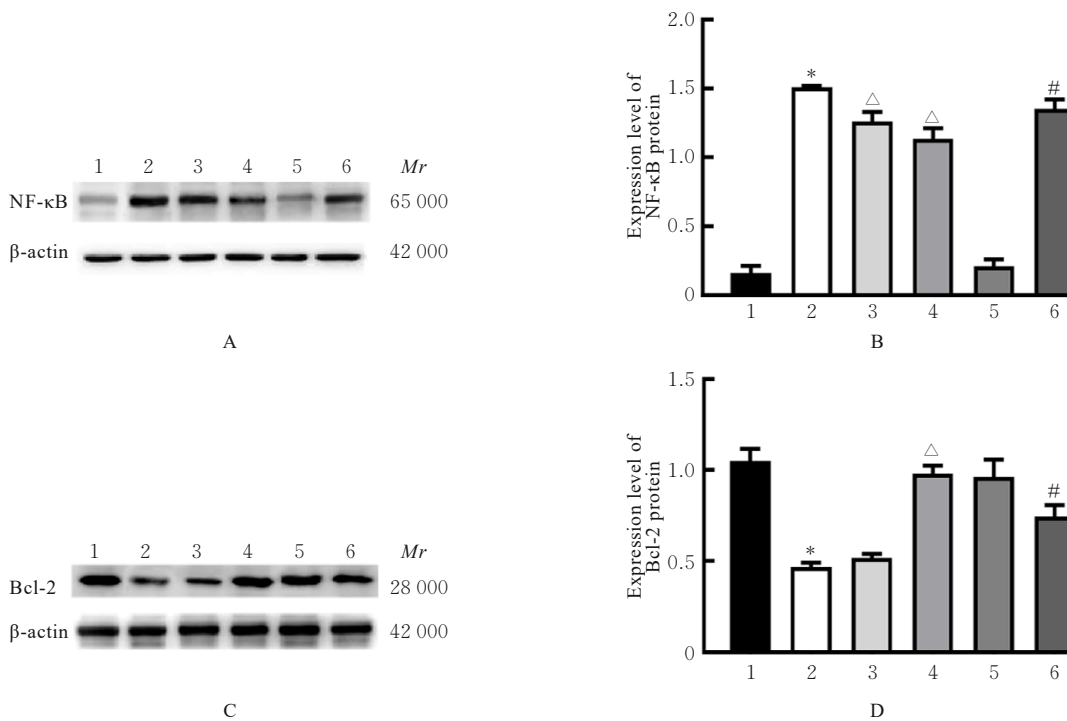
AD 患者以记忆力减退、语言迟缓、执行功能障碍和个性行为异常等为主要临床表现^[14-15]。海马体是学习和记忆的关键部位,也是 AD 病变最突出



Lane 1: Control group; Lane 2: LPS group; Lane 3: LPS+10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA group; Lane 4: LPS+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA group; Lane 5: ML385 group; Lane 6: LPS+ML385+AA group. 1: Control group; 2: LPS group; 3: LPS+10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA group; 4: LPS+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA group; 5: ML385 group; 6: LPS+ML385+AA group. * $P<0.01$ vs control group; $\Delta P<0.01$ vs LPS group; # $P<0.01$ vs LPS+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA group.

图6 Western blotting法检测各组大鼠海马神经元中HO-1蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 6 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expressions of HO-1 protein in hippocampus neurons of rats in various groups detected by Western blotting method



A, B: NF- κ B; C, D: Bcl-2; A, C: Electrophoregrams; B, D: Histograms. Lane 1: Control group; Lane 2: LPS 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ group; Lane 3: LPS+10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA group; Lane 4: LPS+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA group; Lane 5: ML385 group; Lane 6: LPS+ML385+AA group. 1: Control group; 2: LPS group; 3: LPS+10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA group; 4: LPS+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA group; 5: ML385 group; 6: LPS+ML385+AA group. * $P<0.01$ vs control group; $\Delta P<0.01$ vs LPS group; # $P<0.01$ vs LPS+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA group.

图7 Western blotting法检测各组大鼠海马神经元中NF- κ B和Bcl-2蛋白表达电泳图和直条图

Fig. 7 Electrophoregrams and histograms of expressions of NF- κ B and Bcl-2 proteins in hippocampus neurons of rats in various groups detected by Western blotting method

的区域, 表现为老年斑的出现、神经元纤维缠结的形成和大量神经元的丧失等。众多的AD发病机制中炎症和氧化机制假说是近年来讨论的热点^[16]; 一些研究者认为脑内在淀粉样蛋白沉积之前就存在

炎症^[17], 神经炎症反应导致Tau蛋白的过度磷酸化和聚集^[18], 大量炎症因子和细胞毒性物质释放, 神经元和突触结构损伤及细胞凋亡加速, 进一步加剧A β 清除障碍和A β 沉积, 同时A β 毒素加剧了颅

内炎症反应并形成恶性循环^[19]。本研究采用LPS诱导大鼠原代海马神经元发生炎症反应,结果显示:炎症因子TNF- α 和IL-1 β 释放增加,NO释放增加。而AA预处理后,神经炎症因子和NO的释放明显减少,表明AA具有减轻LPS诱导的大鼠海马神经元炎症反应的作用。

AD患者大脑会出现过氧化状态,氧化应激标志物异常升高。氧化应激反应的增加是引发淀粉样蛋白沉积和Tau蛋白磷酸化的主要原因之一,被认为是AD早期症状的一个先决条件^[20]。因此减少线粒体氧化应激压力,保护大脑神经元功能是预防和延缓AD发病及进展的关键。SOD是人体抗氧化系统的重要酶,可清除自由基,保护人体免受氧化应激损伤;MDA是自由基造成的脂质过氧化的最终产物,二者是氧化应激反应的重要指标。本研究结果表明:LPS使大鼠海马神经元SOD活性降低,MDA水平升高,而AA可以逆转LPS诱导氧化应激损伤。炎症的发生与氧化应激互相依赖存在,许多疾病同时伴随着炎症与氧化应激的发生。由此可以推断,AA通过减少神经炎症并降低氧化应激反应,减少LDH漏出,提高神经元存活率,改善LPS引起的海马神经元损伤。

研究^[8]表明:Nrf2是抗氧化反应的重要调节器,在正常情况下,其活性被抑制,细胞膜中的Nrf2会与胞浆蛋白伴侣分子(Kelch-like ech-associated protein 1, Keap1)结合。在应激条件下,Nrf2从Keap1中解离并转位至细胞核,转位的Nrf2具有转录活性,激活下游抗氧化基因HO-1的表达^[21]。HO-1是一种热休克蛋白,具有抗氧化和抗炎作用,提高HO-1活性可以改善炎症和氧化应激反应^[22]。因此,Nrf-2/HO-1信号通路是有效治疗炎症和氧化应激损伤引起的神经退行性疾病的重要治疗靶点。本研究结果表明:AA可明显激活Nrf2表达,并促进Nrf2向细胞核内转移,驱动下游的HO-1蛋白表达水平升高。敲除Nrf2基因可以增强NF- κ B的活性及其他相关炎症因子的表达^[23]。HO-1可以限制NF- κ B的活性,而上调抗凋亡因子Bcl-x1和Bcl-2的表达^[24]。本研究结果表明:AA可抑制LPS引起的NF- κ B蛋白的激活,上调抗凋亡因子Bcl-2的表达。应用Nrf2抑制剂ML385后,AA的这种作用被抑制,表明AA是通过激活Nrf2/HO-1信号通路来发挥其抗炎、抗氧化和抗细胞凋亡的作用。

近年来,中药因具有多靶点、多方式且不良反应少等特点,在AD的治疗上受到了广泛关注。本研究初步阐明了AA通过激活Nrf2/HO-1信号通路发挥抗炎和抗氧化作用,改善海马神经元的损伤。研究^[25]表明:AA可减轻谷氨酸诱导的小鼠认知障碍,并将皮质和海马区的脂质过氧化,SOD和谷胱甘肽活性恢复到正常水平,保护PC12细胞免受A β_{25-35} 诱导的细胞凋亡和Tau蛋白过度磷酸化^[26]。AA可通过多种机制发挥保护作用,但AA的保护作用机制还未完全阐明。AA激活Nrf2/HO-1信号通路是否在AD动物模型中具有保护作用,还需进一步的实验进行验证。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

刘卓参与实验的整体设计,白燕燕和周禹彤参与论文的撰写,隋海娟参与论文的统计学分析。

[参考文献]

- [1] TIWARI S, ATLURI V, KAUSHIK A, et al. Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics [J]. *Int J Nanomedicine*, 2019, 14: 5541-5554.
- [2] DENG M, YAN W L, GU Z C, et al. Anti-neuroinflammatory potential of natural products in the treatment of Alzheimer's disease [J]. *Molecules*, 2023, 28(3): 1486.
- [3] DEARDORFF W J, GROSSBERG G T. Targeting neuroinflammation in Alzheimer's disease: evidence for NSAIDs and novel therapeutics [J]. *Expert Rev Neurother*, 2017, 17(1): 17-32.
- [4] ZHOU X D, TANG L Y, XU Y L, et al. Towards a better understanding of medicinal uses of carthamus tinctorius L. in traditional Chinese medicine: a phytochemical and pharmacological review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 151(1): 27-43.
- [5] GUO T T, ZHANG D H, ZENG Y Z, et al. Molecular and cellular mechanisms underlying the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. *Mol Neurodegener*, 2020, 15(1): 40.
- [6] DING L Y, LIU T, MA J. Neuroprotective mechanisms of Asiatic acid [J]. *Heliyon*, 2023, 9(5): e15853.
- [7] ISLAMIE R, MYINT S L L, ROJANARATHA T, et al. Neuroprotective effect of nose-to-brain delivery of

- Asiatic acid in solid lipid nanoparticles and its mechanisms against memory dysfunction induced by Amyloid Beta₁₋₄₂ in mice [J]. BMC Complement Med Ther, 2023, 23(1): 294.
- [8] HALDER T, PATEL B, ACHARYA N. Asiatic acid fabricated nanoconstructs to mitigate amyloid Beta₁₋₄₂ induced injury in SH-SY5Y cells *in-vitro* and ameliorates cognitive impairment by dual cholinesterase inhibition and attenuation of oxidative stress *in-vivo* [J]. Pharm Res, 2023, 40(1): 197-213.
- [9] XU Y, YAO J, ZOU C, et al. Asiatic acid protects against hepatic ischemia/reperfusion injury by inactivation of Kupffer cells via PPAR γ /NLRP3 inflammasome signaling pathway [J]. Oncotarget, 2017, 8(49): 86339-86355.
- [10] 张亚苹, 隋海娟, 闫恩志. 迷迭香酸通过激活Nrf2/HO-1通路对A β_{1-42} 所致星形胶质细胞损伤的保护作用[J]. 吉林大学学报(医学版), 2023, 49(1): 22-30.
- [11] LEE W, LEE C H, LEE J, et al. Botanical formulation, TADIOS, alleviates lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury in mice via modulation of the Nrf2-HO-1 signaling pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 270: 113795.
- [12] BUENDIA I, MICHALSKA P, NAVARRO E, et al. Nrf2-ARE pathway: an emerging target against oxidative stress and neuroinflammation in neurodegenerative diseases [J]. Pharmacol Ther, 2016, 157: 84-104.
- [13] CAI Z Y, HUSSAIN M D, YAN L J. Microglia, neuroinflammation, and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease[J]. Int J Neurosci, 2014, 124(5): 307-321.
- [14] CALSOLARO V, EDISON P. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: current evidence and future directions[J]. Alzheimers Dement, 2016, 12(6): 719-732.
- [15] 王亚楠, 任凌, 韩伟, 等. 阿尔茨海默病病理生理机制及诊断研究进展[J/OL]. 解放军医学杂志, 1-13 [2025-03-01]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1056.R.20240912.1607.002.html>.
- [16] KESIKA P, SUGANTHY N, SIVAMARUTHI B S, et al. Role of gut-brain axis, gut microbial composition, and probiotic intervention in Alzheimer's disease [J]. Life Sci, 2021, 264: 118627.
- [17] KAMETANI F, HASEGAWA M. Reconsideration of amyloid hypothesis and tau hypothesis in Alzheimer's disease [J]. Front Neurosci, 2018, 12: 25.
- [18] AMINZADEH M, ROGHANI M, SARFALLAH A, et al. TRPM2 dependence of ROS-induced NLRP3 activation in Alzheimer's disease[J]. Int Immunopharmacol, 2018, 54: 78-85.
- [19] XIN Y W, TIAN M, DENG S X, et al. The key drivers of brain injury by systemic inflammatory responses after sepsis: microglia and neuroinflammation[J]. Mol Neurobiol, 2023, 60(3): 1369-1390.
- [20] 胡承平, 陶凤芝, 王灿, 等. 星形胶质细胞在阿尔茨海默病中的研究进展[J]. 同济大学学报(医学版), 2023, 44(5): 740-746.
- [21] BATEMAN R J, AISEN P S, DE STROOPER B, et al. Autosomal-dominant Alzheimer's disease: a review and proposal for the prevention of Alzheimer's disease [J]. Alzheimers Res Ther, 2011, 3(1): 1.
- [22] PARK Y J, YANG H J, LI W, et al. Menthae herba attenuates neuroinflammation by regulating CREB/Nrf2/HO-1 pathway in BV2 microglial cells [J]. Antioxidants, 2022, 11(4): 649.
- [23] WU Q, ZHANG X S, WANG H D, et al. Astaxanthin activates nuclear factor erythroid-related factor 2 and the antioxidant responsive element (Nrf2-ARE) pathway in the brain after subarachnoid hemorrhage in rats and attenuates early brain injury[J]. Mar Drugs, 2014, 12(12): 6125-6141.
- [24] WANG Y, PEI H Y, CHEN W J, et al. Palmatine protects PC12 cells and mice from A β_{25-35} -induced oxidative stress and neuroinflammation via the Nrf2/HO-1 pathway[J]. Molecules, 2023, 28(24): 7955.
- [25] XU M F, XIONG Y Y, LIU J K, et al. Asiatic acid, a pentacyclic triterpene in Centella asiatica, attenuates glutamate-induced cognitive deficits in mice and apoptosis in SH-SY5Y cells [J]. Acta Pharmacol Sin, 2012, 33(5): 578-587.
- [26] CHENG W J, CHEN W M, WANG P, et al. Asiatic acid protects differentiated PC12 cells from A β_{25-35} -induced apoptosis and tau hyperphosphorylation via regulating PI3K/Akt/GSK-3 β signaling [J]. Life Sci, 2018, 208: 96-101.