

基于 PI3K/Akt 信号通路研究积雪草中 微量皂苷 (CA-1) 的神经保护作用

谢元^{1,2}, 胡焯焯², 李甫³, 胡卫成^{1,2}, 张迹^{1,2}, 杨晓君^{1*}, 杨猛^{4*}

(1. 新疆农业大学食品科学与药学学院, 新疆乌鲁木齐 830052) (2. 淮阴师范学院生命科学学院, 江苏淮安 223300) (3. 中国科学院成都生物研究所天然产物研究中心, 四川成都 610041)
(4. 江苏食品药品职业技术学院, 江苏淮安 223300)

摘要: 利用 6-羟基多巴胺 (6-Hydroxydopamine, 6-OHDA) 诱导分化型 PC12 细胞构建的帕金森病 (Parkinson's Disease, PD) 体外细胞模型, 研究了从积雪草中提取的微量皂苷 (Centella Asiatica Saponins-1, CA-1) 的神经保护作用。通过高分辨二级质谱鉴定化学结构、分析了积雪草中常用皂苷和 CA-1 对 PC12 细胞存活率的影响, 进一步通过半定量和实时定量聚合酶链式反应、蛋白印迹等技术检测 PC12 细胞中相关基因和蛋白表达。结果表明在该模型中 100 $\mu\text{mol/L}$ CA-1、积雪草苷 (Asiaticoside, AS)、羟基积雪草苷 (Madecassoside, MA) 分别将细胞存活率提高了 28.63%、16.69%、17.54%, CA-1 的神经保护作用强于 AS 和 MA ($p < 0.05$)。与模型组相比, CA-1 剂量依赖性地提高了 6-OHDA 诱导 PC12 细胞的存活率且在 CA-1 浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$ 与模型组有显著差异 ($p < 0.05$), 降低了细胞内活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 的水平, 上调了 *Sod1*、*Cat*、*Bcl2* 基因表达。蛋白印迹法 (Western Blot, WB) 显示, CA-1 提高了 p85、PDK1、Akt 的蛋白表达水平。在该研究中明确了 CA-1 的神经保护作用揭示了其作用可能通过 PI3K/Akt 信号通路。

关键词: 积雪草; 皂苷; 神经保护; PI3K/Akt 信号通路

文章编号: 1673-9078(2022)10-62-70

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.10.1266

Neuroprotective Effects of A Minor Saponin from *Centella asiatica* (CA-1) Based on PI3K/Akt Signaling Pathway

XIE Yuan^{1,2}, HU Yeye², LI Fu³, HU Weicheng^{1,2}, ZHANG Ji^{1,2}, YANG Xiaojun^{1*}, YANG Meng^{4*}

(1. College of Food Science and Pharmacology, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

(2. School of Life Sciences, Huaiyin Normal University, Huaian 223300, China)

(3. Natural Products Research Center, Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China) (4. Jiangsu Food and Drug Vocational and Technical College, Huaian 223300, China)

Abstract: The neuroprotective effects of a minor saponin extracted from *Centella asiatica* (CA-1) was investigated using the 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced differentiated PC12 cells as the *in vitro* Parkinson's disease (PD) cell model. The chemical structure was identified by high-resolution secondary mass spectrometry, and the effects of common saponins and CA-1 in *Centella asiatica* on the cell viability of PC12 cells were examined. Further, the expressions of related genes and proteins in PC12 cells were detected by techniques such as semi-quantitative or real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) and western blot. The results showed that in this model, 100 $\mu\text{mol/L}$ CA-1, asiaticoside (AS) and madecassoside (MA) increased cell viability by 28.63%, 16.69% and 17.54%, respectively. The neuroprotective

引文格式:

谢元, 胡焯焯, 李甫, 等. 基于 PI3K/Akt 信号通路研究积雪草中微量皂苷 (CA-1) 的神经保护作用[J]. 现代食品科技, 2022, 38(10): 62-70

XIE Yuan, HU Yeye, LI Fu, et al. Neuroprotective effects of a minor saponin from *Centella asiatica* (CA-1) based on PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2022, 38(10): 62-70

收稿日期: 2021-11-11

基金项目: 新疆维吾尔自治区研究生创新项目 (XJ2021G176); 江苏省自然科学基金项目 (BK20201480)

作者简介: 谢元 (1997-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品营养与功能性, E-mail: 1132172415@qq.com

通讯作者: 杨晓君 (1971-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 天然产物功能性评价, E-mail: xjxiaojuny@163.com; 共同通讯作者: 杨猛 (1980-), 男, 副教授,

硕士, 研究方向: 生物制药, E-mail: 44328226@qq.com

effect of CA-1 was stronger than those of AS and MA ($p < 0.05$). Compared with the model group, CA-1 increased the survival rate of 6-OHDA-treated PC12 cells in a dose-dependent manner (which differed significantly from the model group at a CA-1 concentration of 25 $\mu\text{mol/L}$ $p < 0.05$), decreased the intracellular reactive oxygen species (ROS) level, and up-regulated the gene expressions of *Sod1*, *Cat* and *Bcl2*. Western blot showed that CA-1 increased the protein expression levels of P85, PDK1 and Akt. In this study, the neuroprotective effect of CA-1 was confirmed, revealing that this effect may be through the PI3K/Akt signaling pathway.

Key words: Centella asiatica; triterpenoid saponin; neuroprotective effect; PI3K/PDK1/Akt signaling pathway

帕金森病 (Parkinsons Disease, PD) 是一种常见于老年人的神经退行性疾病, 主要病理特征是中枢黑质区多巴胺能 (Dopaminergic, DA) 神经元的退化及病理性死亡^[1,2]。迄今为止, 帕金森病仍然是世界上第二大的神经退行性疾病, 其发病率在 60 岁以上的人群中呈上升趋势, 随着世界人口老龄化状况日趋严重, PD 发病率的增加, 已严重威胁人类健康与生活质量^[3]。目前对于 PD 的治疗多集中于药物治疗上, 如: 左旋多巴、多巴胺受体激动剂和单胺氧化酶 B (MAO-B) 抑制剂等, 但这类药物的毒副作用尚未得到解决^[4]。天然植物有效成分具有结构和生物活性多样性等优点, 为设计理想的新药或功能因子提供了独特的化学结构和药理活性。

积雪草 (*Centella asiatica* (L.) Urban) 为伞形科 (Apiaceae) 多年生匍匐植物, 广泛分布于全球热带和亚热带的沼泽地区, 在我国则主要分布于华东、华南、中南及西南等地^[5]。积雪草具有清热利湿、解毒消肿的功效, 临床上多用于治疗跌打损伤、皮肤病等^[6]。这种药用植物的制剂传统上用于治疗各种皮肤疾病或加速皮肤伤口愈合。因其安全性和有效性, 积雪草被广泛用于制作蔬菜沙拉、香料和饮料^[7]。在一些国家, 积雪草经常被用作一种商业膳食补充剂^[8]。除了其传统作用之外, 近些年的研究发现积雪草具有抗抑郁、神经保护、促进神经元的生长、抗肿瘤、抗菌、抗炎等多种作用。研究表明积雪草的主要活性成分为三萜皂苷类, 目前在积雪草的众多药理活性中, 其神经保护作用颇为引人注目^[9]。如: Xu^[10]发现积雪草苷可以维持多巴胺代谢平衡、提高 Bcl-2/Bax 比值起到神经保护作用, 可有效逆转 MPTP 诱导小鼠的帕金森病; 羟基积雪草苷对脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 刺激的小胶质细胞的增殖和炎症因子的生成具有抑制作用, 其作用机制与抑制 TLR-4 和 NF- κ B 表达、改变细胞周期并诱导细胞凋亡有关^[11]; 并有学者进一步证实了积雪草苷的高跨血脑屏障能力^[12], 揭示了积雪草有一定的神经保护作用。但大多研究局限于积雪草苷、羟基积雪草苷、积雪草酸、羟基积雪草酸和积雪草提取物等, 积雪草中其它微量成分的神经保护作用鲜见报道^[13]。本研究从积雪草中发现一种含量

很低的积雪草三萜皂苷 (CA-1), 并对其化学结构和神经保护作用进行了初步研究, 丰富了积雪草的活性化合物资源库, 可为全面理解积雪草生物活性和相关药物的开发提供有效的理论和数据支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

CA-1 为本课题组从积雪草中分离获得, 积雪草苷和羟基积雪草苷为成都至纯本草生物科技有限公司提供; 神经元分化型大鼠嗜铬细胞瘤 (PC12) 细胞 PC12, 美国菌种保藏中心 ATCC; DMEM 培养基、青-链霉素, 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; 0.25% 胰酶-EDTA、二甲亚砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO), 美国 Gibco 公司; p-Akt、Akt、PDK1、p-PDK1、GSK-3 β 、p-GSK-3 β 等相关蛋白抗体, 美国 Cell Signaling Technolog 公司; 脱脂奶粉, 美国 BD 公司; 细胞全蛋白提取试剂盒、微量蛋白 BCA 定量试剂盒、ECL 化学发光检测试剂盒, 康为世纪生物科技有限公司; SYBR Green (ROX), 瑞士 Roche 公司; 6-羟基多巴胺 (6-Hydroxydopamine Hydrobromide, 6-OHDA)、台盼蓝、反转录试剂盒、甲氮甲唑蓝 (3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazolyl)-2,5-diphenyl Tetrazolium Bromide, MTT)、Trizol Reagent, 美国 Sigma-Aldrich 公司; 甲醇、乙醇、甲醛、十二烷基硫酸钠、三羟甲基氨基甲烷、氯化钠、三氯甲烷、异丙醇等, 国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

HERACELL I50i CO₂ 培养箱, 美国 Thermo Fisher 公司; M200 Pro 酶标仪, 瑞士 Tecan 公司; IX71 倒置显微镜, 日本 Olympus 公司; T100 Thermal Cycle PCR 仪、CPX connect 实时荧光定量 PCR 仪、PowerPacTMHC 电泳槽, 美国 Bio-Rad 公司; 5200multi 化学发光凝胶成像系统, 上海天能科技公司; 5414R 低温高速离心机, 德国 Eppendorf 公司; Vion IMS Qtof 高分辨质谱仪, 英国 Waters 公司; LC6000N 型制备液相色谱仪, 北京创新通恒科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 积雪草次生代谢产物 CA-1 的分离

干燥的积雪草 (5.0 kg) 粉碎后置于 50 L 圆底烧瓶中, 加入 20 L $\varphi=80\%$ 乙醇水溶液 ($m/V, 1:4$) 在 60 °C 水浴锅中提取 3 次, 每次提取 24 h, 合并提取液, 在 60 °C 下减压浓缩至浓缩液无醇味, 浓缩液中添加 5 L 纯水, 充分混合搅拌得悬浮液。该悬浮液以二氯甲烷萃取 3 次, 每次 5 L, 除去脂溶性成分; 再以正丁醇萃取 3 次, 每次 5 L, 合并正丁醇萃取液, 在 60 °C 下减压浓缩至干得正丁醇萃取物 (172.6 g)。将正丁醇萃取物进行硅胶柱层析, 以甲醇-二氯甲烷 (1:8→1:3, V/V) 的水饱和溶液进行梯度洗脱, 通过薄层色谱合并得 8 个组分。组分 7 先以 $\varphi=55\%$ 甲醇水溶液反相制备得组分 7-1, 7-2 和 7-3, 其中组分 7-2 继续以 $\varphi=25\%$ 乙腈水溶液制备得 CA-1 (2.3 mg) [14]。

1.3.2 CA-1 的高分辨质谱分析条件

电喷雾离子源 (ESI), 四级杆飞行时间质量分析器 (Qtof), 毛细管电压 3 000 V (正、负离子模式), 锥孔电压 80 V, 脱溶剂气体温度 500 °C, 脱溶剂气体流速 800 L/h, 数据采集范围 m/z 200~2 000。

1.3.3 分化型 PC12 细胞培养和细胞存活率测定

分化型 PC12 细胞 [15] 用高糖 DMEM 培养基 (含 10% 胎牛血清、1% 青-链霉素), 无菌条件下, 于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养, 待细胞生长至对数期时, 以每孔 3×10^4 个细胞的密度接种于 96 孔板, 待细胞生长 16~24 h, 约贴壁 80% 时, 不同样品以不同浓度预处理细胞 30 min, 然后暴露于 250 $\mu\text{mol/L}$ 6-OHDA 中 24 h 后用传统 MTT 法 [16] 测定细胞存活率: 吸走细胞培养基后, 加入终浓度为 0.5 mg/mL 的 MTT 工作液 100 μL , 放入培养箱中孵育 4 h 后, 加入等体积的 MTT 终止液过夜后在 550 nm 处测定吸光值, 按下式计算。

$$C = \frac{A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}}{A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

C ——细胞存活率, %;

$A_{\text{实验组}}$ ——实验组吸光值;

$A_{\text{空白组}}$ ——空白组吸光值;

$A_{\text{对照组}}$ ——对照组吸光值。

1.3.4 CA-1、积雪草苷和羟基积雪草苷对 6-OHDA 损伤 PC12 细胞的保护作用

细胞以每孔 3×10^4 个接种于 96 孔板, 培养 16~24 h, 分别用终浓度为 6.25、12.5、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 的 CA-1 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 积雪草苷、羟基积雪草苷先预处理 30 min 后加入 250 $\mu\text{mol/L}$ 的 6-OHDA 共同处理 24 h, MTT 法测定其细胞存活率 [17]。

1.3.5 细胞形态观察

细胞以每孔 6×10^5 个接种于 6 孔板, CO₂ 培养箱中培养 16~24 h 后加入终浓度 50、100 $\mu\text{mol/L}$ 的 CA-1 预处理 30 min 后, 加入 250 $\mu\text{mol/L}$ 的 6-OHDA 继续培养 24 h, PBS 漂洗后加入 4% 的多聚甲醛固定细胞, IX71 倒置显微镜 [18] 观察细胞形态及数量变化。

1.3.6 细胞内活性氧 (ROS) 检测

采用 DCFH-DA 荧光染色法 [19] 检测细胞内活性氧。经不同药物处理和 4% 多聚甲醛的细胞用 PBS 洗两遍后, 加入最终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 DCFH 的染料避光染色 20 min, 用无血清培养基洗 3 次后在荧光显微镜下观察分析。

1.3.7 半定量 PCR 和 RT-qPCR

细胞以每孔 6×10^5 个接种于 6 孔板, 培养 16~24 h 后, 用终浓度为 50、100 $\mu\text{mol/L}$ 的 CA-1 预处理 30 min, 然后加入 250 $\mu\text{mol/L}$ 的 6-OHDA, 6 h 后, 加入 PBS 清洗, 然后加入 1 mL Trizol 试剂将细胞从培养皿中吹下, 移入离心管中进行总 RNA 的提取 [20]。反转录 PCR 合成 cDNA, 以 GAPDH 内参基因, 实时荧光定量 PCR 检测各个目的基因的 mRNA 表达量。半定量 PCR 使用 2 \times Taq Master Mix 通过 PCR 扩增后在 2% 的琼脂糖胶电泳检测基因表达水平。本文所用引物均由生工生物工程 (上海) 有限公司合成, 相关序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因	正向引物 (5'-3')	反向引物 (5'-3')
Gapdh	CACTCACGGCAAATTC AACGGCA	GACTCCACGACATACTCAGCAC
Sod1	CCATCAATATGGGGACAATACAC	ACACGATCTTCAATGGACAC
Sod2	TGACCTGCCTTACGACTATG	CGACCTTGCTCCTTATTGAA
Cat	CAAGCTGGTTAATGCGAATGG	TTGAAAAGATCTCGGAGGCC
Bcl2	TTCTTTGAGTTTCGGTGGGGTIC	TGCATATTTGTTTGGGGCAGG

1.3.8 细胞全蛋白提取与蛋白印迹

按上述方法 [20] 处理细胞, 经 PBS 清洗后, 用细胞

刮刮下细胞, 根据细胞全蛋白提取试剂盒说明书, 提取 PC12 细胞全蛋白, 用于蛋白印迹分析。采用 BCA

定量试剂盒进行蛋白定量后,取蛋白样品 30 μg ,进行 SDS-PAGE 电泳分离,随后转到 PVDF 膜上,加 $w=5\%$ 的 BSA 室温封闭 2 h,清洗三遍后加入 1:1 000 稀释的一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,清洗三遍,加入 1:2 000 稀释的二抗孵育后通过 Tannon 5200 凝胶成像系统进行曝光和拍照分析。

1.4 数据处理

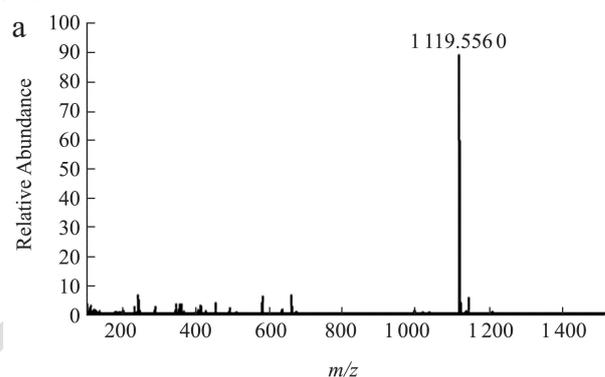
数据用至少 3 次独立实验的平均值 \pm 标准差表示,采用 SPSS 20.0 软件进行 t 检验、单因素方差分析, $p<0.05$ 表示存在显著性差异。其中#表示模型组与对照组存在显著性差异,*表示模型组与药物处理组存在显著性差异。

2 结果与讨论

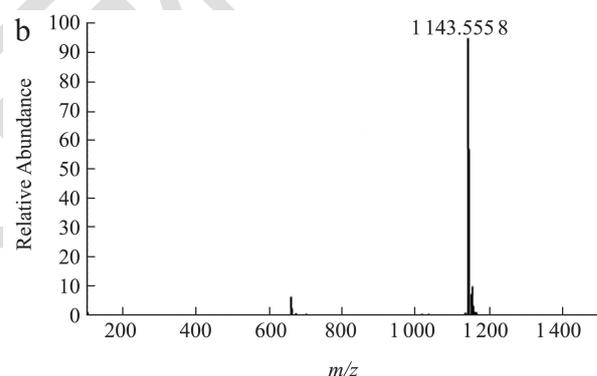
2.1 CA-1 的结构鉴定

采用高分辨质谱对 CA-1 的结构进行了分析鉴定。CA-1 的高分辨质谱图如图 1 所示,其中图 1a 和图 1b 分别为 CA-1 在负离子和正离子模式下的高分辨质谱图,综合分析可知该化合物在负离子模式下显示了 $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ 准分子离子峰 $m/z=1\ 119.556\ 0$,在正离子模式下显示了 $[\text{M}+\text{Na}]^{+}$ 准分子离子峰 $m/z=1\ 143.555\ 8$,推测其分子式为 $\text{C}_{54}\text{H}_{88}\text{O}_{24}$ 。CA-1 的分子量比积雪草中 2 个主要成分积雪草苷和羟基积雪草苷的分子量分别大 162 和 146,提示 CA-1 的结构可能是在积雪草苷结构的基础上多了一个葡萄糖残基,或是在羟基积雪草苷结构的基础上多了一个鼠李糖残基。积雪草中皂苷的一个结构特点是苷元的 28 位碳原子普遍通过酯苷键连接一个“葡萄糖-葡萄糖-鼠李糖”结构单元,而以前的研究发现该类皂苷在二级质谱中极易发生特征性的酯苷键裂解,生成一对互补离子,有助于通过多级质谱技术解析其化学结构^[4]。图 1c 为 CA-1 在负离子模式下的二级质谱图,其中碎片离子峰 $m/z=649.394\ 9$ 和碎片离子峰 $m/z=469.155\ 9$ 为互补离子。碎片离子峰 $m/z=469.155\ 9$ 的出现说明 CA-1 的 28 位也是通过酯苷键链接了一个“葡萄糖-葡萄糖-鼠李糖”结构单元;碎片离子峰 $m/z=487.341\ 8$ 对应皂苷元碎片离子,其与碎片离子峰 $m/z=649.394\ 9$ 数值相差 162,提示皂苷元的某个羟基可能连接了一个葡萄糖分子。积雪草中皂苷的另一个结构特点是 2、3 和 23 位碳原子分别连接羟基,区别在于 6 位碳原子是否连接羟基,考虑 CA-1

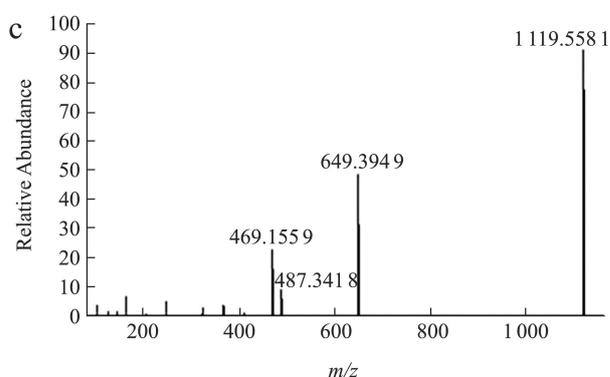
苷元的分子量为 488,提示其 6 位碳原子未连接羟基。到目前为止,仅报道了 2 个积雪草皂苷(Centellasaponin G 和 Centellasaponin H)含有 4 个糖基,均有一个葡萄糖残基连接于苷元的 23 位碳原子^[21]。因此,推测 CA-1 中一个葡萄糖残基可能也是连接于苷元的 23 位碳原子。考虑到积雪草中普遍存在乌苏烷型和齐墩果烷型皂苷同分异构体,而电喷雾质谱暂时不能有效地区分这 2 种异构体,CA-1 的结构就存在 2 种可能性。CA-1 的结构和质谱裂解途径如图 2 所示。



(a) 负离子模式下的高分辨质谱图



(b) 正离子模式下的高分辨质谱图



(c) 负离子模式下的二级质谱图

图 1 CA-1 的一级和二级高分辨质谱图

Fig.1 The HR-ESI-MS and MS/MS spectra of CA-1

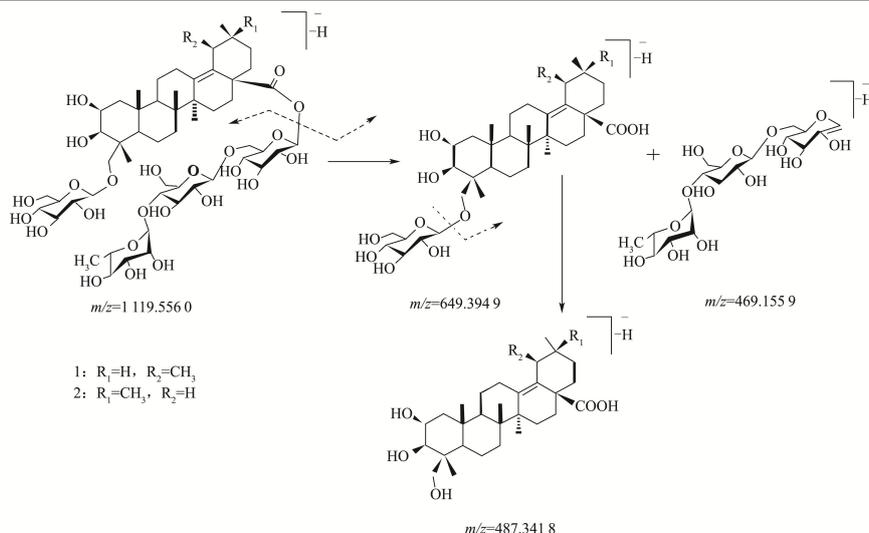


图2 CA-1 的结构及其质谱裂解途径

Fig.2 The chemical structure of CA-1 and its proposed fragmentation pathway

2.2 CA-1 对 PC12 细胞活力的影响和神经保护作用

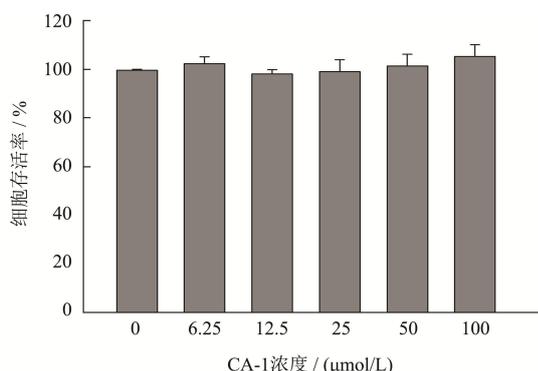


图3 CA-1 的对 PC12 细胞存活率的影响

Fig.3 Effect of CA-1 on cell viability PC12

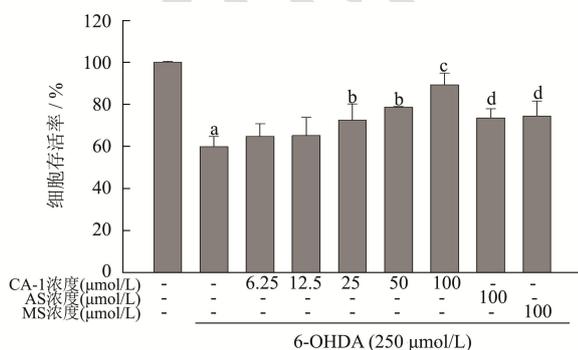


图4 CA-1、AS、MS 对 6-OHDA 诱导的 PC12 细胞存活率的影响

Fig.4 Effect of CA-1 on 6-OHDA-induced PC12 cell viability

注:a 表示与对照组差异显著,相同字母之间没有显著差异。

积雪草苷和羟基积雪草苷是积雪草中有神经保护作用的皂苷,也是积雪草中大多数学者研究的主要化合物。已有明确证据表明积雪草中三萜皂苷类化合物

可用于多种神经系统疾病,目前研究最多的是改善阿尔兹海默症^[22](AD)和帕金森病^[23](PD)。为研究 CA-1 的神经保护作用,本文首先评价了 CA-1 对 PC12 细胞的毒性,结果如图 3 所示,浓度在 6.25 μmol/L~100 μmol/L 之间时,CA-1 对 PC12 细胞没有毒性,也没有明显的促进细胞增殖的作用。本文对比了 AS、MS 和 CA-1 抵御 6-OHDA 损伤,保护 PC12 细胞的作用,结果如图 4 所示,250 μmol/L 6-OHDA 诱导 PC12 细胞的存活率为 56.83%,加入 AS、MS 和 CA-1 处理后存活率显著提升($p < 0.05$),分别为 74.37%、73.52% 和 85.46%,且 CA-1 组存活率与 AS、MS 也有显著性差异($p < 0.05$)。表明在此模型中 CA-1 的神经保护作用强于 AS、MS。为进一步研究 CA-1 神经保护作用的剂量效应,本文也考察了一系列浓度 CA-1 预处理对 PC12 细胞的保护作用,如图 4 所示,随着浓度的提高,CA-1 的神经保护作用呈现显著的上升趋势,表明 CA-1 的神经保护作用具有剂量依赖性,在预处理浓度超过 25 μmol/L 时,CA-1 即具有显著的神经保护效果($p < 0.05$)。

2.3 CA-1 对 6-OHDA 损伤 PC12 细胞形态的保护作用

为从细胞形态学上研究 CA-1 对 6-OHDA 损伤 PC12 细胞的保护作用,本文在显微镜下观察分析经不同浓度 CA-1 预处理的 6-OHDA 损伤 PC12 细胞的形态。结果显示对照组可以明显看到细胞数量多,分化型 PC12 细胞突触相互交集,连接紧密(图 5a);模型组细胞数目少,细胞突触并无交集,不连接(图 5b);使用 50 μmol/L 的 CA-1 预处理 30 min 后细胞数目明

显变多, 细胞突触之间有一定交集 (图 5c); 使用 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 CA-1 预处理 30 min 后恢复效果明显, 细胞形态几乎接近于正常细胞 (图 5d)。该细胞形态学观察结果表明 CA-1 处理对 6-OHDA 损伤 PC12 细胞具有显著的保护作用, 能保护细胞维持正常形态和突触交联。印度学者 Margabandhu 等^[24]报道 10 $\mu\text{mol/L}$ AS 能够显著抵御鱼藤酮诱导的经过药物分化的 PC12 细胞的损伤, 提高细胞存活率和改善细胞形态, 其结果与本研究不谋而合。更加充分的说明了积雪草的药用价值, 揭示了积雪草皂苷对不同药物损伤细胞都有一定保护作用。

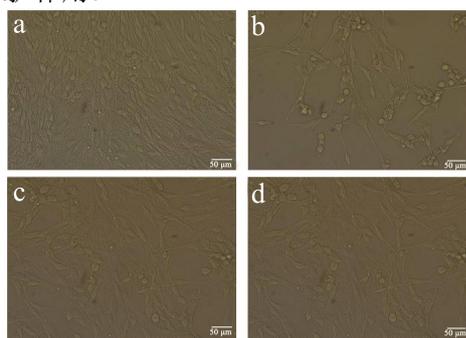


图 5 CA-1 对 6-OHDA 诱导的 PC12 细胞形态的影响 ($\times 200$)

Fig.5 Effects of CA-1 on the morphology of 6-OHDA-induced PC12 cells ($\times 200$)

注: a~d 分别为: 对照组、模型组、50 $\mu\text{mol/L}$ CA-1、100 $\mu\text{mol/L}$ CA-1。

2.4 CA-1 缓解 ROS 的产生

6-OHDA 能够引起 PC12 细胞体内产生大量 ROS 即氧化应激使细胞损伤甚至凋亡^[14], 在 CA-1 没有细胞增殖的作用情况下, CA-1 可能通过减轻细胞体内的 ROS, 从而减轻 6-OHDA 对 PC12 细胞的损伤和凋亡。DCFH-DA 探针能被细胞内的酯酶水解为 DCFH, 而没有荧光的 DCFH 能被活性氧氧化成含有与 FITC 类似荧光的 DCF, 因而能通过检测荧光强度反映细胞内 ROS 的含量。为验证上述猜测, 本文使用该荧光探针进行了活性氧检测。如图 6 所示, 在模型组 (图 6b) 中检测到较强的荧光信号, 说明细胞内有大量的活性氧产生; 在 CA-1 终浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ (图 6c) 和 100 $\mu\text{mol/L}$ (图 6d) 的预处理中, 荧光信号明显减少, 表明细胞内活性氧减少, Image J 分析相对荧光强度可知, 根据对照组归一后, 细胞内 ROS 水平显著增加至对照组的 12.4 倍, 50 $\mu\text{mol/L}$ 处理后降低至 4.5 倍, 100 $\mu\text{mol/L}$ 处理后接近对照组。揭示了 CA-1 能够显著减少受损细胞内活性氧的产生, 起到神经保护的作用。一定程度上说明 CA-1 通过降低细胞内 ROS 表达水平, 起到抑制 6-OHDA 损伤的作用。

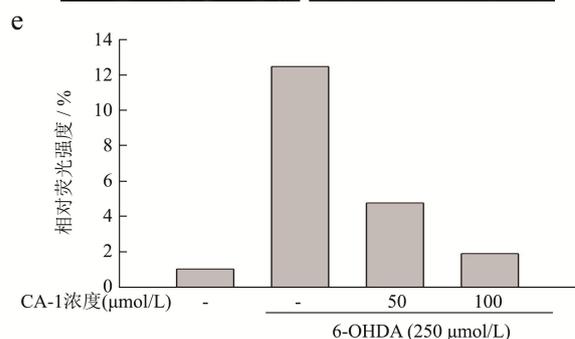
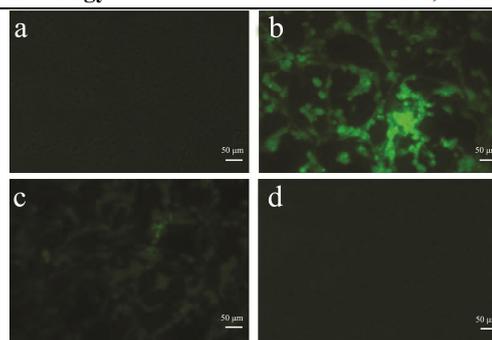


图 6 DCFH-DA 荧光探针检测 PC12 细胞内 ROS 水平 ($\times 200$)

Fig.6 ROS levels in PC12 cells were detected by DCFH-DA fluorescent probe ($\times 200$)

注: a~d 分别为: 对照组、模型组、50 $\mu\text{mol/L}$ CA-1、100 $\mu\text{mol/L}$ CA-1, e: Image J 定量分析相对荧光强度。

2.5 CA-1 对氧化应激相关基因及凋亡因子表达水平的影响

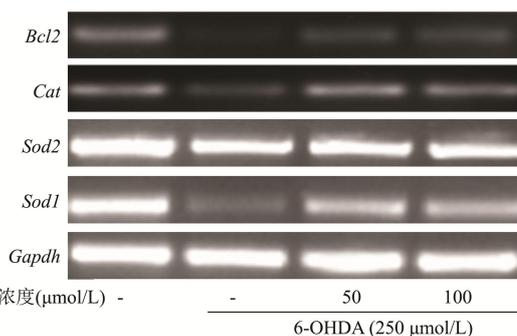


图 7 半定量 PCR 测定 CA-1 对 *Sod1*、*Sod2*、*Cat*、*Bcl2* 基因相对表达量的影响

Fig.7 Effects of CA-1 on the relative expression levels of *Sod1*, *Sod2*, *Cat*, *Bcl2* genes by Semi-Quantitative RT-PCR

本文分别采用半定量 PCR (图 7) 和实时荧光定量 PCR (图 8) 法检测了 PC12 细胞中 *Cat*、*Sod1* 和 *Bcl2* 的 mRNA 表达水平。6-OHDA 使细胞产生大量 ROS, 致使细胞损伤甚至死亡。使得转录水平中抗氧化相关酶系和凋亡相关酶系异常表达^[25]。在用 CA-1 处理后显著提高了受损 PC12 细胞抗氧化酶及抗凋亡相关因子的相对表达水平, 在 CA-1 浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$

时 *Sod1*、*Cat*、*Bcl2* 均提高到与正常组一致。*Cat* 和 *Sod1* 的上调说明了 PC12 细胞内 ROS 的减少是通过抗氧化酶的表达增多从而减少氧化应激来实现的, *Bcl2* 上调说明可能通过促进抗凋亡因子的表达使得细胞凋亡减少。结果与其它有抗 PD 活性的天然化合物类似, 如黄芩素、茛菪碱、人参皂苷 Rg1、姜黄素等^[1,26,27]。

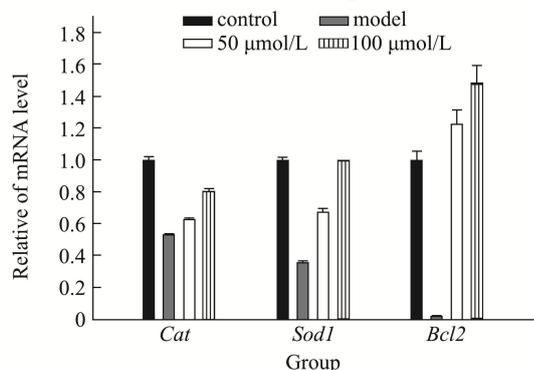


图8 QPCR 测定 CA-1 对 *Sod1*、*Cat*、*Bcl2* 基因相对表达量的影响

Fig.8 Effects of CA-1 on the relative expression levels of *Sod1*, *Cat* and *Bcl2* genes were determined by qPCR

2.6 CA-1 的对 PI3K、PDK1、Akt 和 GSK3-β

等蛋白表达及活化的影响

既往研究表明细胞的增殖、生长、凋亡与 PI3K/Akt 通路相关^[28]。PI3K/Akt 通路能够调控凋亡基因 Bax、NF-κB 等下游基因, 调控细胞凋亡从而达到神经保护作用^[29]。PI3K 是一种胞内磷脂酰肌醇激酶能够催化脂质第二信使的生成^[30]。磷脂酰肌醇二磷酸 (Phosphyl-diphosphate Inositol, PIP2) 是一种多肽激素和膜受体的第二信使, 活化后可磷酸化为肌醇三磷酸 (Inositol Triphosphate, PIP3), PIP3 与细胞内含有 PH 结构域 (Pleckstrin Homolgy Domain) 的信号蛋白 Akt 和 PDK1 结合^[31]。一旦 Akt473 磷酸化位点被激活, 会将下游基因环磷腺苷效应元件结合蛋白 (cAMP-response Element Binding Protein, CREB) 转换为磷酸化的 CREB, 而磷酸化的 CREB 参与细胞分化、增殖、存活和凋亡^[32]。越来越多的证据表明 PI3K/Akt 信号通路对细胞变性的预防和治疗的主导作用^[33,34]。

使用 Image J 分析了蛋白印迹调条带磷酸化/非零酸化比值结果显示 6-OHDA 处理 12 h 后模型组相比于对照组 P85、Akt 表达明显减少、PDK1 表达增多, CA-1 预处理 30 min 后增加了磷酸化的 P85 和磷酸化的 Akt 的表达, 磷酸化的 PDK1 略有增加但 PDK1 表达减少。表明 CA-1 的神经保护作用可能是基于 PI3K/Akt 通路。PI3K/PDK1/Akt 通路可以调控下游

Bcl2 的表达, 因此 *Bcl2* 在转录水平的变化可能是由该通路引起。

综上所述, CA-1 相比其他积雪草皂苷具有更好的神经保护作用, 在功能性食品或药品开发中有重要潜力。然而, CA-1 在川产积雪草中含量太低, 限制了对其进一步开发利用。可以通过以下两种途径解决 CA-1 的来源问题: 1) 以 CA-1 为标准物质, 对全国不同产地的积雪草进行皂苷含量分析, 筛选 CA-1 含量较高的积雪草资源; 2) 采用生物合成的方法选择性对积雪草中主要成分积雪草苷的 23 位羟基葡萄糖基化, 实现 CA-1 的量产。

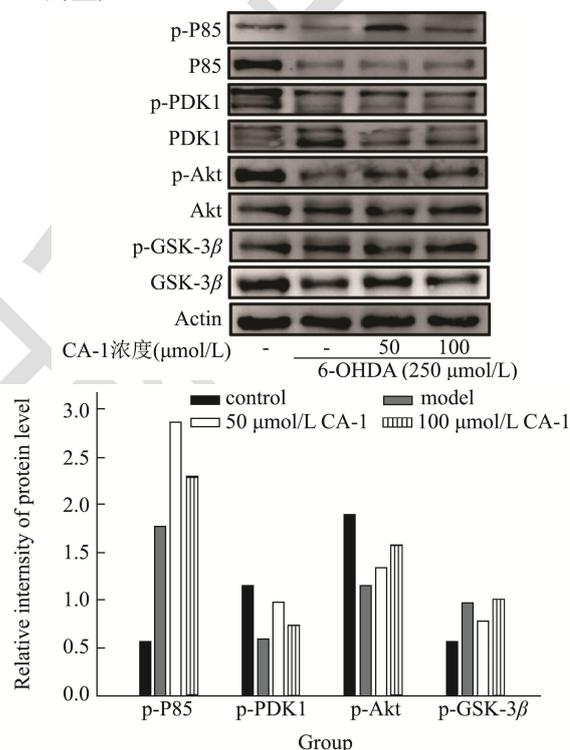


图9 CA-1 对 6-OHDA 诱导的 PC12 细胞 PI3K/PDK1/Akt/GSK-3β 通路的影响

Fig.9 Effects of CA-1 on PI3K/PDK1/Akt/GSK-3β pathway in 6-OHDA-induced PC12 cells

3 结论

本文的研究对四川产积雪草的总皂苷进行了硅胶柱层析分离和反相制备色谱分离, 并采用高分辨质谱鉴定出了一个微量稀有皂苷 CA-1 (收率为 0.001 15%)。25 μmol/L 的 CA-1 能对细胞起到显著性的保护作用。相对于同浓度的积雪草苷和羟基积雪草苷, CA-1 对 6-OHDA 损伤的分化型 PC12 细胞有更强的保护作用, 100 μmol/L 时 CA-1 能提高 28.63% 的细胞存活率, 而积雪草苷和羟基积雪草苷分别只能提高 16.69%、17.54%。100 μmol/L 的 CA-1 预处理后细胞 ROS 水平能恢复到与对照组相同并且 *Sod1*、*Cat*、*Bcl2*

基因的表达也能恢复到正常组水平, 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 CA-1 预处理后, 仍能够有效改善 6-OHDA 对细胞的损伤。CA-1 的神经保护作用可能是基于 PI3K/Akt 通路。未来将进一步验证一系列凋亡有关蛋白的表达如 Caspase 家族等; 还将进一步验证细胞核内氧化应激相关蛋白如 NRF2/OH-1 和 p65 的表达以及体内动物实验验证。

参考文献

- [1] Hasmet A H, Zeynep T, Murat E. Dementia in Parkinson's disease [J]. Journal of the Neurological Sciences, 2017, 374: 26-31
- [2] Takahashi J. Clinical trial for Parkinson's disease gets a green light in the US [J]. Cell Stem Cell, 2021, 28(2): 182-183
- [3] Watanabe R, Buschauer R, Böhning J, et al. The in situ structure of Parkinson's disease-linked LRRK2 [J]. Cell, 2020, 182(6): 1508-1518
- [4] Zhu Q, Zhuang X, Lu J. Neuroprotective effects of baicalein in animal models of Parkinson's disease: a systematic review of experimental studies [J]. Phytomedicine, 2019, 55: 302-309
- [5] 凌雨婷, 龚晴丽, 熊喜喜, 等. 羟基积雪草苷对氧化应激条件下黑素细胞的保护作用及其诱导自噬机制的研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2017, 37(5): 569-574
- [6] 项佳媚, 肖伟, 许利嘉, 等. 积雪草的研究进展[J]. 中国现代中药, 2016, 18(2): 233-238
- [7] Sun B, Wu L, Wu Y, et al. Therapeutic potential of *Centella asiatica* and its triterpenes: a review [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 568032
- [8] Gray N E, Alcazar M A, Lak P, et al. *Centella asiatica*: phytochemistry and mechanisms of neuroprotection and cognitive enhancement [J]. Phytochemistry Reviews, 2018, 17(1): 161-194
- [9] Lokanathan Y, Omar N, Ahmad Puzi, et al. Recent updates in neuroprotective and neuroregenerative potential of *Centella asiatica* [J]. Malaysian Journal of Medical Sciences, 2016, 23(1): 4-14
- [10] Xu C L, Wang Q Z, Sun L M, et al. Asiaticoside: attenuation of neurotoxicity induced by MPTP in a rat model of Parkinsonism via maintaining redox balance and up-regulating the ratio of Bcl-2/Bax [J]. Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 2012, 100(3): 413-421
- [11] 张思思, 蔡江晖, 万敬员, 等. 羟基积雪草苷对 LPS 诱导小胶质细胞增殖的抑制作用及机制研究[J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31(3): 428-434
- [12] Hanapi N A, Mohamad A A S, Abdullah J M, et al. Blood-brain barrier permeability of asiaticoside, madecassoside and asiatic acid in porcine brain endothelial cell model [J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2021, 110(2): 698-706
- [13] 李季, 崔兵兵, 曲远均. 积雪草药理活性及新制剂研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(12): 200-204
- [14] Li F, Liu X, Tang M, et al. Structure revision of hupehensis saponin F and G and characterization of new trace triterpenoid saponins from *Anemone hupehensis* by tandem electrospray ionization mass spectrometry [J]. Carbohydrate Research, 2012, 353: 49-56
- [15] Luo Y Y, Jiang Y Y, He Y, et al. Vigna-ginsenoside R4 from *Panax ginseng* leaves alleviates 6-OHDA-induced neurotoxicity in PC12 cells via the PI3K/Akt/GSK-3 β signaling pathway [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(51): 15239-15248
- [16] Hu W C, Wang X F, Wu L, et al. Apigenin-7-O- β -D-glucuronide inhibits LPS-induced inflammation through the inactivation of AP-1 and MAPK signaling pathways in RAW 264.7 macrophages and protects mice against endotoxin shock [J]. Food & Function, 2016, 7(2): 1002-1013
- [17] 刘英娟. 两类海藻寡糖对帕金森病模型的神经保护作用机制研究[D]. 青岛: 中国科学院大学(中国科学院海洋研究所)
- [18] 程云辉, 吕兆良, 孙威, 等. 麦胚肽(RVF)对人神经瘤细胞 SH-SY5Y 损伤模型的保护作用[J]. 现代食品科技, 2016, 32(1): 13-21
- [19] Wang D D, Zhu H Z, Li S W, et al. Crude saponins of *Panax notoginseng* have neuroprotective effects to inhibit palmitate-triggered endoplasmic reticulum stress-associated apoptosis and loss of postsynaptic proteins in staurosporine differentiated RGC-5 retinal ganglion cells [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(7): 1528-1535
- [20] Wu Z W, Li W B, Hu W C, et al. Oleanane-and ursane-type triterpene saponins from *Centella asiatica* exhibit neuroprotective effects [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(26): 6977-6986
- [21] Shao Y, Wei D, Yang O, et al. New pentacyclic triterpenoids from *Centella asiatica* [J]. Helvetica Chimica Acta, 2015, 98(5): 683-690
- [22] Song D Q, Xian J, Liu Y L, et al. Asiaticoside attenuates cell growth inhibition and apoptosis induced by A β 1-42 via inhibiting the TLR4/NF- κ B signaling pathway in human brain microvascular endothelial cells [J]. Frontiers in Pharmacology, 2018, 9: 28

- [23] Wei Y, Lu M, Mei M, et al. Pyridoxine induces glutathione synthesis via PKM2-mediated Nrf2 transactivation and confers neuroprotection [J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 941
- [24] Margabandhu G, Vanisree A J. Dopamine, a key factor of mitochondrial damage and neuronal toxicity on rotenone exposure and also parkinsonic motor dysfunction-Impact of asiaticoside with a probable vesicular involvement [J]. *J Chem Neuroanat*, 2020, 106: 101788
- [25] Zhu L, Li D, Chen C, et al. Activation of Nrf2 signaling by icariin protects against 6-OHDA-induced neurotoxicity [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2019, 66(3): 465-471
- [26] Darvesh A S, Carroll R T, Bishayee A, et al. Curcumin and neurodegenerative diseases: a perspective [J]. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 2012, 21(8): 1123-1132
- [27] Liang S, Xu M B, Zhou X L, et al. A preclinical systematic review of ginsenoside-Rg1 in experimental Parkinson's disease [J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 2017: 2163053
- [28] Kim C, Park S. IGF-1 protects SH-SY5Y cells against MPP⁺-induced apoptosis via PI3K/PDK-1/Akt pathway [J]. *Endocr Connect*, 2018, 7(3): 443-455
- [29] Yan T X, Sun Y Y, Gong G W, et al. The neuroprotective effect of schisandrol A on 6-OHDA-induced PD mice may be related to PI3K/Akt and IKK/I κ B α /NF- κ B pathway [J]. *Experimental Gerontology*, 2019, 128: 110743
- [30] Rai S N, Dilnashin H, Birla H, et al. The role of PI3K/Akt and ERK in neurodegenerative disorders [J]. *Neurotoxicity Research*, 2019, 35(3): 775-795
- [31] Luo J, Manning B D, Cantley L C. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer [J]. *Cancer Cell*, 2003, 4(4): 257-262
- [32] Jin X, Di X, Wang R, et al. RBM10 inhibits cell proliferation of lung adenocarcinoma via RAP1/Akt/CREB signalling pathway [J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2019, 23(6): 3897-3904
- [33] Xia W, Liang Y R, Jing X N, et al. Rifampicin prevents SH-SY5Y cells from rotenone-induced apoptosis via the PI3K/Akt/GSK-3 β /CREB signaling pathway [J]. *Neurochemical Research*, 2018, 43(4): 886-893
- [34] Dalmagro A P, Camargo A, Rodrigues A L S, et al. Involvement of PI3K/Akt/GSK-3 β signaling pathway in the antidepressant-like and neuroprotective effects of *Morus nigra* and its major phenolic, syringic acid [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2019, 314: 108843