

美藤果油对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的SH-SY5Y 阿尔兹海默症细胞的保护作用

曾文燊, 刘冰, 张桓, 彭卢炜, 赖岚玉, 杜冰, 黎攀*

(华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

摘要: 该研究以人神经母细胞瘤细胞 (SH-SY5Y) 探讨美藤果油对 $A\beta_{25-35}$ 诱导阿尔兹海默症模型细胞的潜在保护作用。经 $A\beta_{25-35}$ 和不同剂量的美藤果油干预后, 测定美藤果油对 AD 模型细胞的抗氧化、抗凋亡等指标的变化。结果显示, 在 0~40 $\mu\text{g/mL}$ 的剂量下, 美藤果油对细胞活力不会产生影响, 在 0~100 $\mu\text{g/L}$ 的剂量下, $A\beta_{25-35}$ 对细胞损伤程度上升, 选用 25 $\mu\text{g/L}$ 的剂量诱导 AD 细胞模型。培养完成后, 测定美藤果油对细胞的 SOD、MDA 水平, 同时利用流式细胞术分析细胞凋亡程度、测定线粒体膜电位以及 ROS 水平, 并采用 western blot 技术研究细胞 Nrf-2、HO-1、Bcl-2、Bax 蛋白表达水平。结果显示, 20、40 $\mu\text{g/mL}$ 剂量组细胞 MDA 含量水平分别降低了 24.24%、42.73%, ROS 含量水平分别降低了 15.34%、25.53%, SOD 的含量分别提高了 20.81%、27.27% ($P < 0.005$)。此外, 美藤果油能够回调细胞线粒体膜电位, 改善细胞凋亡, 同时上调 Nrf-2/HO-1 抗氧化通路表达, 增加抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达, 下调促凋亡蛋白 Bax 的表达。综上所述, 美藤果油能够通过改善氧化应激损伤, 逆转细胞凋亡来达到保护细胞的作用, 其机制可能与增强 Nrf-2/HO-1 抗氧化通路, 调节凋亡相关蛋白表达有关。

关键词: 美藤果油; 阿尔兹海默症; 抗氧化; 抗凋亡

文章编号: 1673-9078(2024)06-12-19

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.6.0586

Protective Effect of Sacha Inchi Oil on $A\beta_{25-35}$ -induced SH-SY5Y Alzheimer's Disease Cells

ZENG Wenshen, LIU Bing, ZHANG Huan, PENG Luwei, LAI Lanyu, DU Bing, LI Pan*

(College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Human neuroblastoma cells (SH-SY5Y) were utilized to investigate the potential protective effects of sacha inchi oil against $A\beta_{25-35}$ -induced Alzheimer's disease (AD) cells. Following exposure with $A\beta_{25-35}$ and varying doses of sacha inchi oil, changes in antioxidant and anti-apoptotic indexes of the AD cell model caused by sacha inchi oil were measured. Results showed that sacha inchi oil, at doses ranging from 0 to 40 $\mu\text{g/mL}$, did not affect cell viability. However, doses ranging from 0 to 100 $\mu\text{g/L}$ exacerbated $A\beta_{25-35}$ -induced cell damage, with a 25 $\mu\text{g/L}$ dose selected to induce the AD cell model. Post-cultivation, the effects of sacha inchi oil on the superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA)

引文格式:

曾文燊,刘冰,张桓,等.美藤果油对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的SH-SY5Y阿尔兹海默症细胞的保护作用[J].现代食品科技,2024,40(6):12-19.

ZENG Wenshen, LIU Bing, ZHANG Huan, et al. Protective effect of sacha inchi oil on $A\beta_{25-35}$ -induced SH-SY5Y alzheimer's disease cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(6): 12-19.

收稿日期: 2023-05-16

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (32202058)

作者简介: 曾文燊 (1999-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 新资源食品功效评价, E-mail: zeng13923880266@163.com

通讯作者: 黎攀 (1990-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 新资源食品原料有效成分评价, E-mail: lp19900815@scau.edu.cn

levels were measured. Flow cytometry was employed to assess the degree of apoptosis, mitochondrial membrane potential, and reactive oxygen species (ROS) levels. Western blot analysis was performed to measure Nrf-2, HO-1, Bcl-2, and Bax protein expression levels. Results showed that supplementation with 20 $\mu\text{g/mL}$ and 40 $\mu\text{g/mL}$ of sacha inchi oil decreased MDA levels by 24.24% and 42.73% ($P < 0.005$) and the levels of ROS by 15.34% and 25.53% ($P < 0.005$), and increased levels of SOD by 20.81% and 27.27% ($P < 0.005$), respectively. Furthermore, sacha inchi oil modulated mitochondrial membrane potential, attenuated apoptosis, upregulated Nrf-2/HO-1 antioxidant pathway expression, increased Bcl-2 anti-apoptotic protein expression, and down-regulated Bax pro-apoptotic protein expression. In conclusion, sacha inchi oil demonstrates cell protection by mitigating oxidative stress damage and reversing apoptosis. Its mechanism may involve enhancing the Nrf-2/HO-1 antioxidant pathway and regulating apoptosis-related protein expression.

Key words: sacha inchi oil; Alzheimer's disease; antioxidant; anti-apoptotic

阿尔兹海默症 (Alzheimer's Disease, AD) 是一种常见于中老年人的神经退行性疾病, 目前随着社会的发展, AD 的发病率不断上升。由于其不可逆转的原因, AD 已经成为世界上最严重的疾病之一。据统计, 全世界目前有近 3 000 万人罹患 AD, 在未来 20 年这个数字可能会再翻一倍^[1]。AD 发病通常会导致患者的认知和空间记忆能力下降、脑部炎症以及睡眠障碍等多方面的疾病, 这涉及到神经细胞损伤、线粒体和糖脂代谢等功能障碍, 最终导致神经系统的不可逆损伤^[2]。目前对于 AD 的发病机制仍然没有确切的定论, 较为流行的几种假说包括淀粉样前体蛋白 (Amyloid Precursor Protein, APP) 异常水解形成的 β -淀粉样蛋白 (β -amyloid, $A\beta$) 导致的神经毒性, tau 微管蛋白的过度磷酸化引起的神经纤维缠结 (Neurofibrillary Tangles, NFT), 以及胆碱能神经递质假说等^[3,4]。氧化应激损伤是导致神经元凋亡的重要原因, 这是因为 $A\beta$ 沉积所形成的不溶性斑块会导致自由基的大量生成, 引起线粒体功能、糖脂代谢以及其他关键的生化反应障碍^[5-7], 最终导致神经元因供能不足等原因凋亡。因此, 改善氧化应激损伤可能是改善 AD 的重要研究方向。

越来越多的证据显示, 多不饱和脂肪酸 (Polyunsaturated Fatty Acids, PUFAs) 与大脑部分功能有着密切联系, 如突触间神经递质的传递, 作为细胞膜的组成成分等^[8]。一些研究表明, 诸如二十二碳六烯酸为代表的 PUFAs 能够很好的缓解 AD 动物模型的症状, 这可能与 PUFAs 优良的抗氧化能力有关^[9]。另外, 在一些队列研究中也显示, 中老年人群食用富含 PUFAs 的食品能够显著降低认知障碍风险, 体现了 PUFAs 潜在的神经保护功效^[10]。这些研究说明开发富含 PUFAs 相关的产品可能是未来治疗 AD 的重要研究方向。

美藤果 (*Plukenetia volubilis*) 是一种原产于秘鲁的大戟科植物, 在 2013 年被批准为新资源食品^[11]。作为一种油料作物, 美藤果种子中富含油脂、蛋白质等多种对人体有益的成分。美藤果油是从美藤果仁中提取出的食用油, 其组成多为 ω -3、 ω -6 和 ω -9 多不饱和脂肪酸, 以及维生素 E 等多种抗氧化营养成分^[12]。前期研究显示, 美藤果油能够改善大鼠的氧化应激反应标志物, 改善小鼠肠道菌群紊乱等^[13], 但目前对美藤果油治疗 AD 的研究仍然较少。本研究旨在探讨美藤果油对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 AD 模型细胞 SH-SY5Y 的保护作用, 以期开发新型缓解 AD 的产品, 并为其他相关的研究提供理论支持。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

美藤果油, 普洱联众生物技术有限公司惠赠; 人神经母细胞瘤细胞株 (SH-SY5Y), 武汉华尔纳生物科技有限公司 (货号: SAC0350); $A\beta_{25-35}$, 上海麦克林生化科技有限公司 (货号: A800621, 纯度: $\geq 97\%$); MEM/F12 基础培养基、非必需氨基酸 (Nonessential Amino Acid, NEAA)、磷酸缓冲盐溶液 (Phosphate Buffered Saline, PBS), 武汉普诺赛生命科技有限公司; 胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS)、青链霉素 (Penicillin-Streptomycin, P/S), 赛默飞世尔科技有限公司; 活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 检测试剂盒、丙二醛 (Malonic Dialdehyde, MDA) 检测试剂盒、超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD) 检测试剂盒, 南京建成生物工程研究所; 线粒体膜电位 (Mitochondrial Membrane Potential, MMP) 水平检测试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒, 上海碧云天生物技术研究所;

CCK-8 细胞增殖检测试剂盒, 白鲨生物公司。

Varioskan TM LUX 多功能酶标仪, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; TCS SP8 激光共聚焦荧光显微镜, 德国 Leica 公司; 分析天平, 上海精天电子仪器厂; 细胞恒温培养箱, 北京市永光明医疗仪器厂; BD FACSCalibur 流式细胞仪, 碧迪医疗器械有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

SH-SY5Y 细胞培养于特定完全培养基中, 培养箱条件为 37 °C、5% CO₂。每天更换培养液直至细胞密度达到 70%~80%, 进行传代培养, 选取处于对数生长期的细胞进行实验。

A β ₂₅₋₃₅ 寡聚体制备参照文献^[14]的方法进行, 稍作修改。精确称取 1 mg A β ₂₅₋₃₅, 加入 1 mL 的超纯水, 配制成 1 mg/mL 的质量浓度, 置于细胞培养箱中培养 72 h, 聚集老化形成 A β ₂₅₋₃₅ 寡聚体, 并储存于 -80 °C 冰箱中备用。分别称取对应质量的美藤果油, 加入 150 μ L 细胞级二甲基亚砷 (Dimethyl Sulfoxide, DMSO), 以完全培养基配制成 0、5、10、20、40 μ g/mL 的质量浓度, 现配现用。参照表 1 分组方案, 每组设置六个复孔。

表 1 分组方案与实验流程

Table 1 Grouping scheme and experimental procedure

组名	缩写	给药剂量及时间
对照组	NC	—
模型组	AD	25 μ g/L A β , 培养时间 1 d
美藤果油 10 μ g/mL	10	25 μ g/L A β +10 μ g/mL 美藤果油, 培养时间 1 d
美藤果油 20 μ g/mL	20	25 μ g/L A β +20 μ g/mL 美藤果油, 培养时间 1 d
美藤果油 40 μ g/mL	40	25 μ g/L A β +40 μ g/mL 美藤果油, 培养时间 1 d
DMSO 组	DMSO	150 μ L DMSO, 培养时间 1 d

注: 一为正常培养。

1.2.2 CCK-8法测定细胞增殖率

A β ₂₅₋₃₅ 寡聚体用完全培养基稀释至 0、20、40、60、80、100 μ g/L 的质量浓度, 美藤果油依照 1.2.1 的方法配制, 将处于对数生长期的细胞接种于 96 孔板中培养过夜, 参照表 1 分别加入 100 μ L 上述溶液, 孵育 24 h。按照试剂说明书配制 CCK-8 工作液。孵育结束后, 每孔吸去培养基并用预热的 PBS 清洗

两次, 随后加入 100 μ L CCK-8 工作液, 在细胞培养箱中孵育 4 h 后, 在 450 nm 处测定各孔吸光度值。细胞增殖率参照如下公式计算:

$$D = \frac{A_1 - A_0}{A_2 - A_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

D—细胞增殖率, %;

A₀—只含有完全培养基和 CCK-8 工作液的吸光度;

A₁—含有药物溶液、细胞和 CCK-8 工作液的吸光度;

A₂—不含药物溶液, 含有细胞和 CCK-8 工作液的吸光度。

1.2.3 细胞ROS测定

按照 ROS 试剂盒说明书, 用 MEM/F12 培养基稀释荧光探针 DCFH-DA 工作液。孵育结束后, 收集细胞沉淀, 加入 2 mL 稀释好的 DCFH-DA 工作液, 在细胞培养箱内孵育 20 min。孵育结束后, 加入 MEM/F12 培养基洗涤三次, 采用流式细胞术在激发波长 488 nm, 发射波长为 525 nm 处测定荧光强度。

1.2.4 细胞氧化应激及蛋白含量测定

孵育结束后, 吸去上清液, 在每孔加入 1 mL 裂解液, 裂解 40 min, 将所有液体用移液器吸出, 得到细胞破碎液。依据试剂盒说明书测定细胞破碎液中 MDA、SOD 含量。

1.2.5 细胞线粒体膜电位水平测定

细胞培养结束后, 收集细胞悬液。依照试剂盒说明书, 用 JC-1 法测定细胞线粒体膜电位。采用流式细胞术在激发波长 490 nm, 发射波长为 530 nm 处检测 JC-1 单体; 在激发波长 525 nm, 发射波长 590 nm 处检测 JC-1 聚合物。

1.2.6 Western blot

依照试剂盒说明书进行蛋白浓度测定以及蛋白提取, 用 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白后将其转移至 PVDF 膜上, 并加入 $\varphi=5\%$ 的脱脂牛奶封闭处理 1 h。用 PBST 稀释一抗后, 在 4 °C 下孵育过夜。孵育结束后, 用 PBST 洗净并加入 PBST 稀释的二抗, 在室温下共同孵育 90 min。孵育结束后用 PBST 缓冲液洗净, 用 ECL 化学发光液与膜孵育 1 min, 在凝胶成像系统中成像。以 β -actin 为内参, 用 Image J 软件对各个条带灰度值进行数值分析。

1.2.7 流式细胞术测定细胞凋亡率

使用 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒

进行检测。在细胞沉淀中加入 500 μL 1X Annexin V buffer 重悬细胞, 随后加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL 碘化丙啶染色液, 轻轻混匀, 在室温下避光孵育 15 min, 使用流式细胞术进行检测。

1.3 数据处理

使用 Image J 软件对图片中荧光强度及条带灰度值进行分析, 使用 GraphPad Prism 8.0.2 进行统计分析, 用单因素方差分析与 Tukey 检验法进行组间比较。实验数据以平均值 \pm 标准差表示。与模型组比较: * $P < 0.05$, 有差异; ** $P < 0.01$, 差异显著; *** $P < 0.001$, 差异极显著, 与空白组比较: # $P < 0.05$, 有差异, ## $P < 0.01$, 差异显著, ### $P < 0.001$, 差异极显著, 所有实验均重复三次。

2 结果与分析

2.1 CCK-8测定各药物质量浓度对SH-SY5Y活力影响

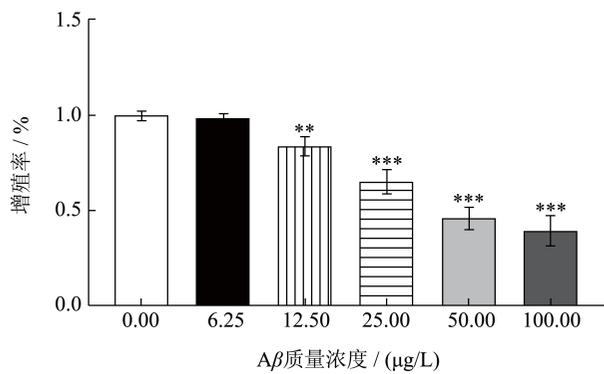


图 1 不同质量浓度 $A\beta_{25-35}$ 对 SH-SY5Y 细胞活力的影响
Fig.1 Effect of different concentrations of $A\beta_{25-35}$ on the viability of SH-SY5Y cells

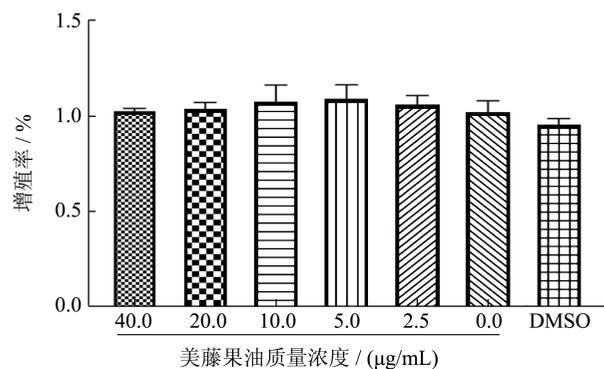


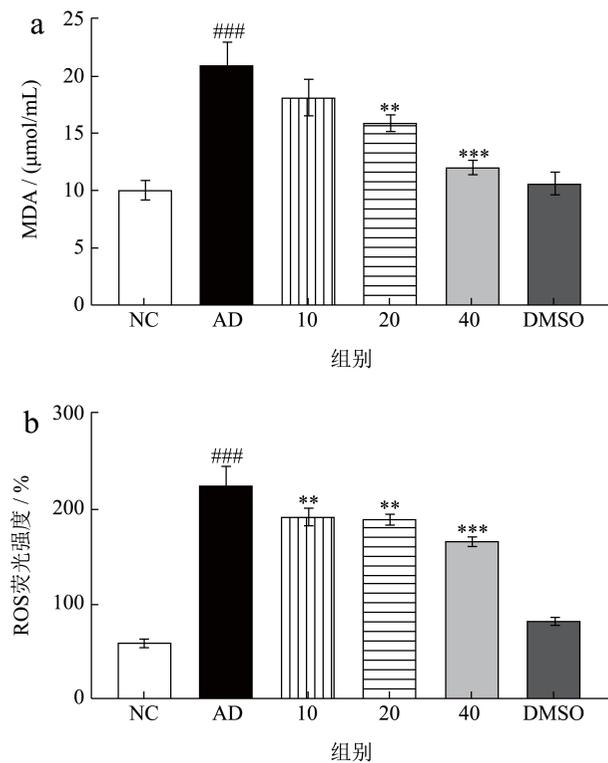
图 2 不同质量浓度美藤果油和 DMSO 对 SH-SY5Y 细胞活力的影响

Fig.2 Effect of different concentrations of Sacha inchi oil and DMSO on the viability of SH-SY5Y cells

采用 CCK-8 法分别测定 $A\beta_{25-35}$ 的造模质量浓度以及美藤果油的毒性评价。结果如图 1 所示: 在给予 $A\beta_{25-35}$ 后, 各组细胞活力均有一定程度的下降, 其中在 25 $\mu\text{g/L}$ 的质量浓度下, 细胞活力降至 64.62% ($P < 0.005$), 因此本研究采用 25 $\mu\text{g/L}$ 的质量浓度处理构建 AD 细胞模型。图 2 显示, 各剂量组美藤果油以及 DMSO 均不会对细胞活力产生不利影响 ($P > 0.05$)。因此, 本实验采用 10、20、40 $\mu\text{g/mL}$ 的美藤果油处理细胞, 研究美藤果油对 AD 细胞的保护作用并分析是否具有质量浓度依赖性。

2.2 美藤果油缓解SH-SY5Y氧化应激损伤

对各组细胞内 ROS 含量采用流式细胞术分析, 由图 3 可知, 与 AD 组相比, 各剂量组的 ROS 荧光强度显著下降, 并呈剂量依赖性。MDA 与脂质过氧化程度相关, 而 SOD 是重要的抗氧化酶, 因此采用上述指标来共同反映细胞氧化应激损伤程度。结果显示, AD 组的 MDA 含量显著上升, SOD 酶活力下降, 说明存在严重的氧化应激损伤, 而经过美藤果油治疗后, 20、40 $\mu\text{g/mL}$ 剂量组 MDA 含量水平分别降低了 24.24%、42.73%, ROS 含量水平分别降低了 15.34%、25.53%, 同时 SOD 的含量分别提高了 20.81%、27.27%。上述结果说明美藤果油能够改善 $A\beta_{25-35}$ 所致的 SH-SY5Y 氧化应激损伤。



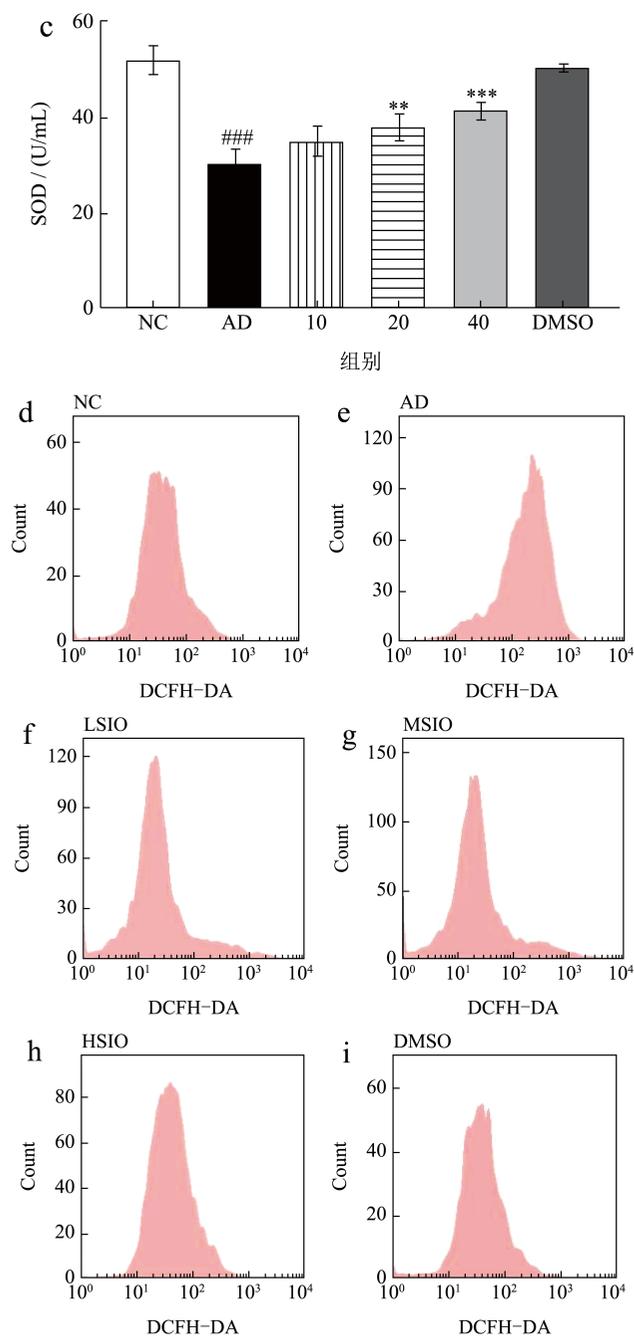


图3 不同质量浓度美藤果油对 SH-SY5Y 细胞氧化应激的影响

Fig.3 Effect of different concentrations of Sacha inchi oil on oxidative stress in SH-SY5Y cells

2.3 美藤果油改善SH-SY5Y细胞凋亡

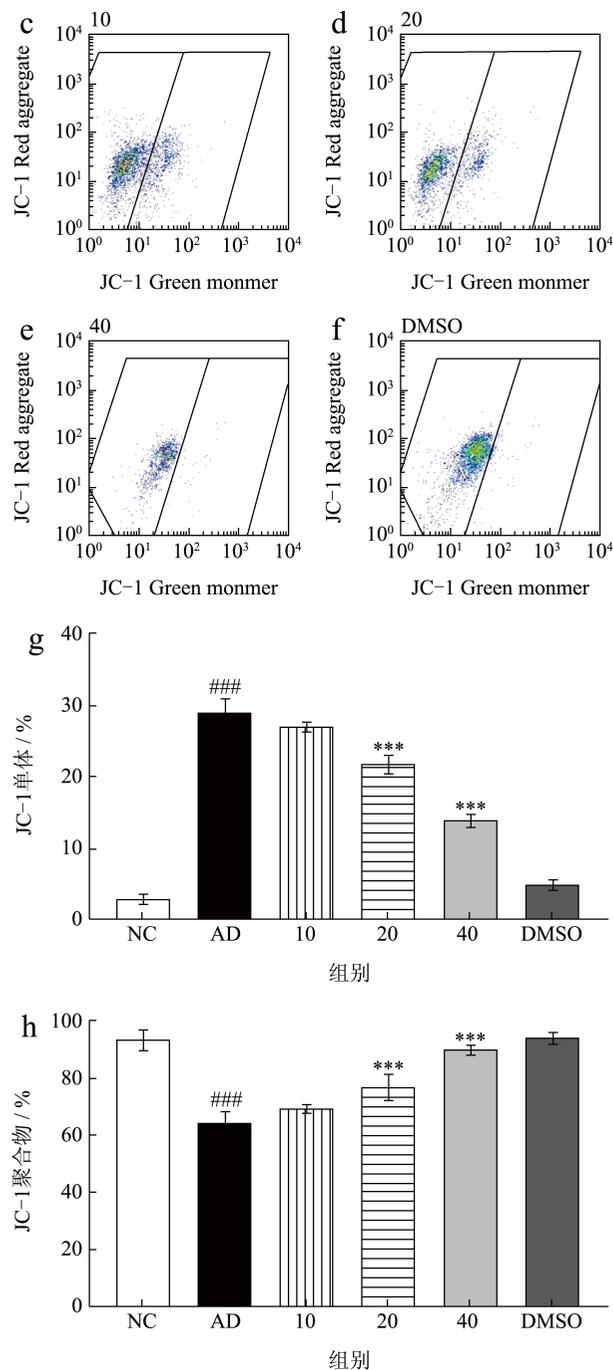
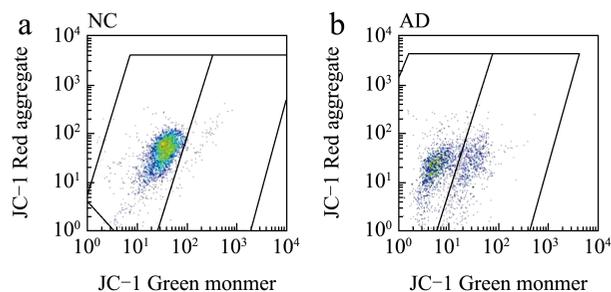


图4 不同质量浓度美藤果油对 $A\beta_{25-35}$ 诱导损伤 SH-SY5Y 细胞膜电位水平的影响

Fig.4 Effect of different concentrations of Sacha inchi oil on $A\beta_{25-35}$ -induced damage to SH-SY5Y cell membrane potential levels

经美藤果油处理后，采用 Annexin V-FITC/PI 法以及 JC-1 线粒体膜电位水平检测共同反映细胞凋亡情况。JC-1 荧光探针能够反映线粒体膜电位水平，当线粒体膜电位较高时，JC-1 进入线粒体基质形成 JC-1 聚合物，而线粒体膜电位降低时则形成 JC-1 单体，通过 JC-1 聚合物与 JC-1 单体含量来说明线粒体的去极化作用。各组线粒体膜电位水平如

图4所示, AD组的线粒体膜电位下降, JC-1 聚合物水平下降, JC-1 单体水平上升。经过美藤果油治疗后, 线粒体膜电位显著回升, 提高了JC-1 聚合物水平, 下调JC-1 单体水平, 并呈现一定的剂量关系, 这与细胞凋亡荧光强度(图5)结果相一致。结果显示, 美藤果油能够通过回调线粒体膜电位来改善细胞凋亡。

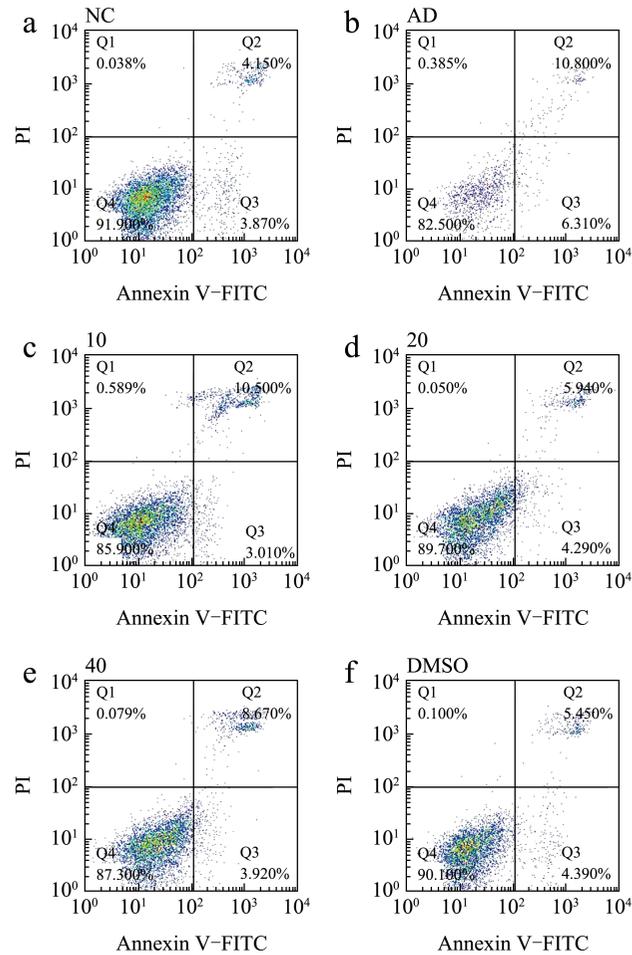


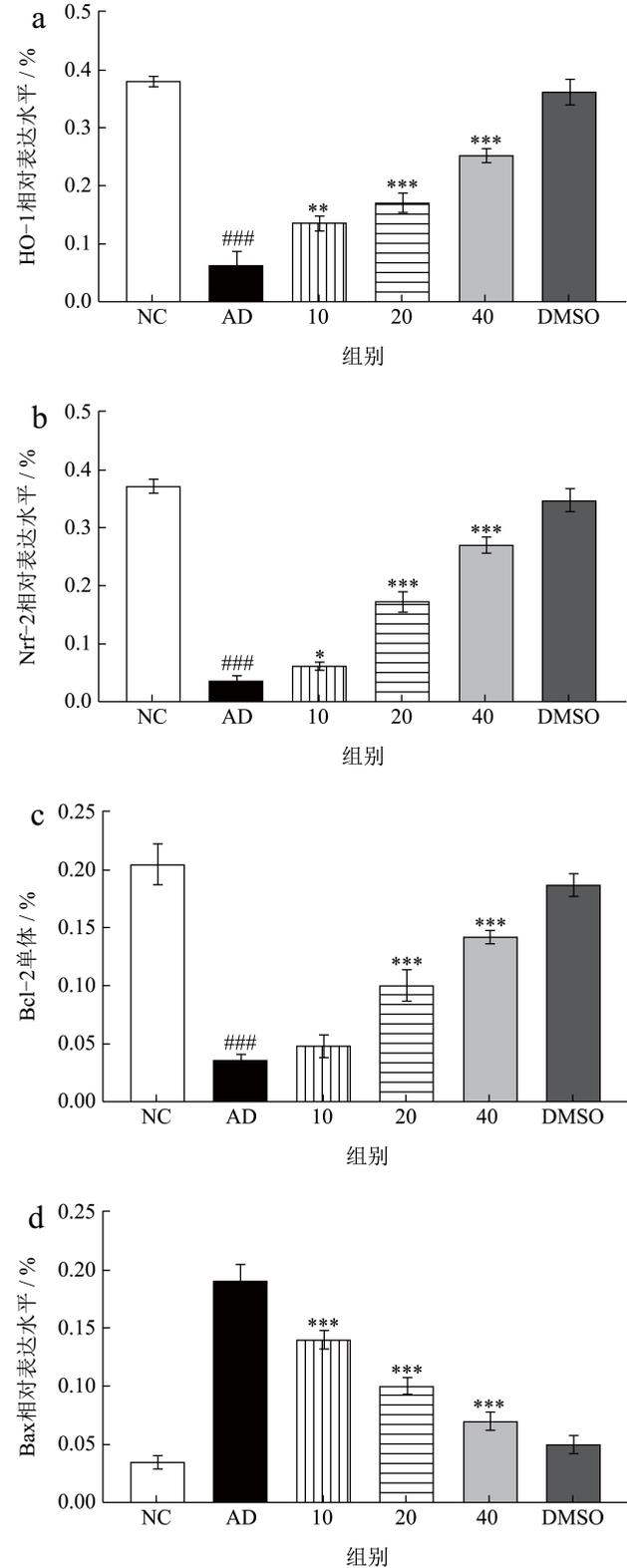
图5 不同质量浓度美藤果油对 $A\beta_{25-35}$ 诱导损伤 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响

Fig.5 Effect of different concentrations of Sacha inchi oil on $A\beta_{25-35}$ -induced apoptosis in damaged SH-SY5Y cells

2.4 美藤果油改善SH-SY5Y细胞氧化应激与凋亡蛋白表达水平

各剂量组细胞凋亡蛋白表达水平如图6所示。经过 25 $\mu\text{g/L}$ $A\beta_{25-35}$ 诱导后, 细胞内 Bax 蛋白表达显著上升, Nrf-2、HO-1、Bcl-2 蛋白表达显著下降, 这表明细胞氧化应激损伤严重, 凋亡蛋白大量表达。在经过 20、40 $\mu\text{g/mL}$ 美藤果油剂量组预处理后,

下调了 Bax 蛋白表达, 并显著提高了 Nrf-2、HO-1、Bcl-2 蛋白表达。这些结果说明, 美藤果油通过调节 Nrf-2/HO-1 抗氧化通路, 改善氧化应激损伤, 并调节凋亡相关蛋白表达来保护细胞。



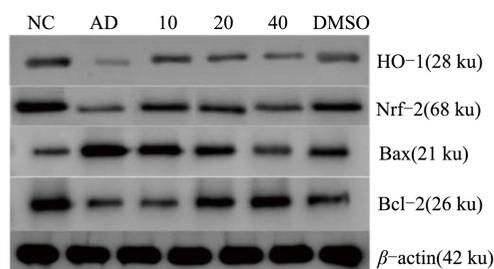


图6 不同质量浓度美藤果油对 $A\beta_{25-35}$ 诱导损伤 SH-SY5Y 细胞氧化应激与凋亡蛋白表达的影响

Fig.6 Effect of different concentrations of Sacha inchi oil on the expression of oxidative stress and apoptotic protein in SH-SY5Y cells induced by $A\beta_{25-35}$ damage

3 讨论

阿尔兹海默症已经成为全球最严峻的公共健康威胁之一，在用药上仍然缺乏特效药进行针对治疗。目前，临床上常用盐酸多奈哌齐片结合中草药复方来改善 AD 患者的乙酰胆碱浓度水平^[15,16]，但由于 AD 高发、致死且无法逆转的特性，这些治疗方案仅对早期 AD 患者改善相应的临床症状有一定的疗效。因此，从预防的角度来减缓 AD 发病的几率可能是重要的治疗方向。本研究通过证明美藤果油能够缓解氧化应激损伤来改善 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 AD 细胞模型 SH-SY5Y，其机制可能是通过提高 Nrf-2/HO-1 抗氧化通路、下调凋亡相关蛋白表达逆转细胞凋亡，从而改善 AD 症状。

大量研究表明，神经元的损伤与氧化应激有着密切联系，自由基通过能够诱导 $A\beta$ 的沉积并进一步促进自由基的生成，加速 AD 的发病病程^[17]。牛冬冬等^[18]研究发现少突胶质样细胞条件培养液能通过调节 Sirt1/PGC-1 α 通路来改善氧化应激，并显著提高 SH-SY5Y 细胞活力，降低氧化应激水平并提高线粒体膜电位。本研究分析了美藤果油对 $A\beta_{25-35}$ 诱导损伤的 SH-SY5Y 细胞的保护作用与抗氧化活性的关系。结果表明，采用 25 $\mu\text{g/L}$ 的 $A\beta_{25-35}$ 处理 SH-SY5Y 细胞 24 h 后，细胞内 MDA 含量水平提高，ROS 荧光强度上升，SOD 酶活力水平降低，而经过美藤果油预处理后，显著降低了细胞内 MDA 和 ROS 含量水平，并提高了 SOD 酶活力水平，这些结果说明美藤果油能够缓解 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞氧化应激损伤。

线粒体膜电位下降是细胞凋亡的早期症状之一^[19]。线粒体作为细胞能量的主要供应场所，线粒体膜电位不仅关系到 ATP 合成，而且在清除失活线

粒体、维持其余线粒体活力方面起着重要作用^[20]。凋亡相关蛋白 Bcl 家族与氧化还原调节因子 Nrf-2 通路已被证明同线粒体膜通透性密切相关^[21, 22]，当细胞受到刺激时，Bcl 家族蛋白结构被破坏，并大量分泌促凋亡蛋白 Bax 聚集到线粒体膜上，导致线粒体膜通透性转换孔通道过度开放引起氧化应激损伤，使得 Nrf-2/HO-1 通路促分泌抗氧化因子的水平下降，进一步导致细胞氧化应激损伤并最终诱导细胞凋亡。本研究结果显示，AD 组细胞中的线粒体膜电位显著下降，促凋亡蛋白 Bax 表达上升，抗凋亡蛋白 Bcl-2、抗氧化信号通路 Nrf-2/HO-1 表达下降，这与 Jo 等^[23]的研究结果相同。在给予美藤果油治疗后，各剂量组的线粒体膜电位显著上调，下调了促凋亡蛋白 Bax 表达，并提高了抗凋亡蛋白 Bcl-2、抗氧化信号通路 Nrf-2/HO-1 的表达。这些结果说明美藤果油可能通过调节 Bcl 家族蛋白表达，提高抗氧化信号通路 Nrf-2/HO-1 改善细胞凋亡，达到预防 AD 的目的。

近年来，膳食调节改善大脑健康已成为研究的热点，诸如地中海饮食等膳食模式已经证明对 AD 能够起到一定的改善作用，一项基于人群的大型研究证明了地中海饮食对大脑的长期益处，其中的重要原因则体现在所摄入的坚果、鱼类等食物中富含的 PUFAs^[24,25]。美藤果油作为一种优质的食用油原料，具有成熟周期短、单位面积产量高等优点^[26]，这使得美藤果油具有极大的开发潜力，在日常饮食中有更好的推广性。因此通过开发美藤果油，能够进一步拓展目前食用油市场，在保健食品和医药领域具有良好的应用和发展前景。

4 结论

本研究通过 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 AD 细胞模型，加入不同浓度的美藤果油来观察其对 AD 细胞模型损伤的缓解作用，通过 CCK-8 实验可知各剂量组美藤果油不会抑制细胞增殖，并采用 25 $\mu\text{g/L}$ 的质量浓度构建 AD 细胞模型。通过对比 AD 组，美藤果油各剂量组有效改善了细胞氧化应激损伤，并通过研究细胞凋亡情况、线粒体膜电位，发现美藤果油能够逆转 AD 细胞凋亡，这与改善凋亡相关蛋白表达情况相一致。本研究为美藤果油改善 AD 提供了可行性，后续结合改善氧化应激与凋亡这一研究方向，能够通过体内实验进一步深入研究美藤果油改善 AD 的机制，为发掘美藤果油产品功效开发提供理论基础。

参考文献

- [1] JAHN H. Memory loss in Alzheimer's disease [J]. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 2022, 15(4): 445-454.
- [2] HADIPOUR M, MEFTAHI G H, AFARINESH M R, et al. Crocin attenuates the granular cells damages on the dentate gyrus and pyramidal neurons in the CA3 regions of the hippocampus and frontal cortex in the rat model of Alzheimer's disease [J]. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 2021, 113: 101837.
- [3] BROSE R D, LEHRMANN E, ZHANG Y, et al. Hydroxyurea attenuates oxidative, metabolic, and excitotoxic stress in rat hippocampal neurons and improves spatial memory in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Neurobiology of Aging*, 2018, 72: 121-133.
- [4] STRANAHAN A M, MATTSON M P. Recruiting adaptive cellular stress responses for successful brain ageing [J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2012, 13(3): 209-216.
- [5] CADONIC C, SABBIR M G, ALBENSI B C. Mechanisms of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's Disease [J]. *Molecular Neurobiology*, 2016, 53(9): 6078-6090.
- [6] BELL S M, BARNES K, MARCO M D, et al. Mitochondrial dysfunction in Alzheimer's Disease: abiomarker of the future? [J]. *Biomedicines*, 2021, 9(1): 63.
- [7] CUNNANE S C, TRUSHINA E, MORLAND C, et al. Brain energy rescue: an emerging therapeutic concept for neurodegenerative disorders of ageing [J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2020, 19(9): 609-633.
- [8] CANHADA S, CASTRO K, PERRY I S, et al. Omega-3 fatty acids' supplementation in Alzheimer's disease: a systematic review [J]. *Nutritional Neuroscience*, 2018, 21(8): 529-538.
- [9] STAVRINOU P S, ANDREOU E, APHAMIS G, et al. The effects of a 6-month high dose omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids and antioxidant vitamins supplementation on cognitive function and functional capacity in older adults with mild cognitive impairment [J]. *Nutrients*, 2020, 12(2): 325.
- [10] PARK Y H, SHIN S J, KIM H S, et al. Omega-3 fatty acid-type docosahexaenoic acid protects against $A\beta$ -mediated mitochondrial deficits and pathomechanisms in Alzheimer's Disease-related animal model [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(11): 3879.
- [11] 谢蓝华,杨勇福,陈佳,等.美藤果油的营养特性及生理功能研究进展[J].*中国油脂*,2021,46(2):82-85.
- [12] 陆智.美藤果油多不饱和甘油三酯的解析及其微乳制备研究[D].广州:华南农业大学,2020.
- [13] LI P, HUANG J, XIAO N, et al. Sacha inchi oil alleviates gut microbiota dysbiosis and improves hepatic lipid dysmetabolism in high-fat diet-fed rats [J]. *Food & Function*, 2020, 11(7): 5827-5841.
- [14] 肖遥.解毒益智方对 $A\beta_{25-35}$ 致SHSY5Y细胞损伤的神经保护作用研究[D].长春:长春中医药大学,2021.
- [15] 吕馨,蒋蒙蒙,朱梦姚,等.人参养荣汤改善阿尔兹海默症小鼠学习记忆损伤的作用[J].*中成药*,2022,44(12):3823-3829.
- [16] 杨青.黄连解毒汤联合盐酸多奈哌齐治疗阿尔茨海默病(心肝火旺型)的临床疗效观察[D].武汉:湖北中医药大学,2020.
- [17] PANZA F, LOZUPONE M, BELLOMO A, et al. Do anti-amyloid- β drugs affect neuropsychiatric status in Alzheimer's Disease patients? [J]. *Ageing Research Reviews*, 2019, 55: 100948.
- [18] 牛冬冬,凌亚亭,吕孝瑞,等.少突胶质样细胞条件培养液通过调节Sirt1/PGC-1 α 通路改善SH-SY5Y细胞氧化应激损伤[J].*江苏大学学报(医学版)*,2023,33(5):412-419.
- [19] ZOROVA L D, POPKOV V A, PLOTNIKOV E Y, et al. Mitochondrial membrane potential [J]. *Analytical Biochemistry*, 2018, 552: 50-59.
- [20] CONNOLLY N M C, THEUREY P, ADAM-VIZI V, et al. Guidelines on experimental methods to assess mitochondrial dysfunction in cellular models of neurodegenerative diseases [J]. *Cell Death and Differentiation*, 2018, 25(3): 542-572.
- [21] DINKOVA-KOSTOVA A T, ABRAMOV A Y. The emerging role of Nrf2 in mitochondrial function [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2015, 88: 179-188.
- [22] ISLAM M T. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders [J]. *Neurological Research (New York)*, 2017, 39(1): 73-82.
- [23] JO C, GUNDEMIR S, PRITCHARD S, et al. Nrf2 reduces levels of phosphorylated tau protein by inducing autophagy adaptor protein NDP52 [J]. *Nature Communications*, 2014, 5(1): 3496.
- [24] PETERSSON S D, PHILIPPOU E. Mediterranean diet, cognitive function, and dementia: a systematic review of the evidence [J]. *Advances in Nutrition*, 2016, 7(5): 889-904.
- [25] 李嘉毓,张媛媛,郭琪,等.阿尔茨海默病的地中海饮食模式干预进展[J].*现代临床护理*,2021,20(7):76-81.
- [26] 司茹,郑梦思,邹莉波.美藤果油辅助改善小鼠记忆的功效[J].*食品科学*,2017,38(9):202-206.