

# 哈蟆油酶解物激活MAPK/ERK信号凋亡途径修复皮质酮诱导HT-22细胞损伤作用

李唯嘉<sup>1</sup>, 马超<sup>1</sup>, 刘萌萌<sup>1</sup>, 裴科<sup>1</sup>, 林喆<sup>1</sup>, 律广富<sup>2\*</sup>

(1. 长春中医药大学药学院, 吉林长春 130117) (2. 长春中医药大学吉林省人参科学研究院, 吉林长春 130117)

**摘要:** 为研究哈蟆油(Oviductus Ranae, OR)对海马神经元细胞保护作用机制, 该研究通过皮质酮(Corticosterone, CORT)诱导 HT-22 细胞损伤模型探究哈蟆油酶解物对小鼠海马神经元细胞 (HT-22) 细胞损伤模型的保护作用及其作用机制。采用 CORT 与 HT-22 细胞共同培养建立 HT-22 细胞损伤模型, 给予哈蟆油酶解物再次孵育, 将 ERK 信号通路抑制剂 PD98059 加入 HT-22 细胞中。采用 MTT 法、Hoechst 33258 染色、流式细胞术、Western blot 技术检测 HT-22 细胞凋亡情况和相关蛋白表达以及 MAPK/ERK 信号通路蛋白表达。结果显示高水平 CORT 能够诱导 HT-22 细胞损伤, 哈蟆油酶解物能够使 CORT 诱导的 HT-22 细胞活力提升 62.5%~87.5%, 凋亡比例降低 50%~70%。哈蟆油酶解物能够上调 BCL-2、P-ERK1/2 蛋白表达, 同时下调 BAX、Caspase-3、Caspase-9 的蛋白表达。上述结果表明, 高水平 CORT 是通过抑制 MAPK/ERK 信号通路促进凋亡的发生从而诱导 HT-22 细胞损伤, 哈蟆油酶解物能够通过激活 MAPK/ERK 信号通路调节 BCL-2、BAX、Caspase-3、Caspase-9 凋亡相关蛋白的表达进而抑制凋亡的发生减轻神经元损伤, 该作用机制为哈蟆油发挥抗抑郁作用的关键途径之一。

**关键词:** 哈蟆油酶解物; MAPK/ERK; 凋亡; HT-22 细胞

文章编号: 1673-9078(2024)06-43-52

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.6.0705

## Hydrolysate of Oviductus Ranae Activates MAPK/ERK Signaling Apoptosis Pathway to Repair Corticosterone-induced Damage in HT-22 Cells

LI Weijia<sup>1</sup>, MA Chao<sup>1</sup>, LIU Mengmeng<sup>1</sup>, PEI Ke<sup>1</sup>, LIN Zhe<sup>1</sup>, LV Guangfu<sup>2\*</sup>

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

(2. Jilin Ginseng Academy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

**Abstract:** To examine the protective mechanism of oviductus ranae (OR) on hippocampal neuronal cells, this study explored the protective effect and mechanism of OR hydrolysate in a corticosterone (CORT)-induced mouse hippocampal neuron (HT-22) model of cell injury. HT-22 cells were co-cultured with CORT to establish an injury model, then further incubated with OR hydrolysate, followed by the addition of the ERK signaling pathway inhibitor PD98059. MTT assay, Hoechst 33258 staining, flow cytometry and Western blot were employed to assess cell apoptosis, protein expression, and

引文格式:

李唯嘉, 马超, 刘萌萌, 等. 哈蟆油酶解物激活MAPK/ERK信号凋亡途径修复皮质酮诱导HT-22细胞损伤作用[J]. 现代食品科技, 2024, 40(6): 43-52.

LI Weijia, MA Chao, LIU Mengmeng, et al. Hydrolysate of oviductus ranae activates mapk/erk signaling apoptosis pathway to repair corticosterone-induced damage in HT-22 cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(6): 43-52.

收稿日期: 2023-06-11

基金项目: 吉林省科技厅项目 (20220505038ZP; 20210401067YY)

作者简介: 李唯嘉 (1996-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药动物药药理学研究, E-mail: 251459548@qq.com

通讯作者: 律广富 (1984-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 中药药理学研究, E-mail: lvgf@ccucm.edu.cn

MAPK/ERK signaling pathway activity. Results demonstrated that elevated levels of CORT induced damage in HT-22 cells, while OR hydrolysate enhanced cell viability by 62.5%~87.5%, and reduced apoptosis rates by 50%~70%. Moreover, OR hydrolysate upregulated BCL-2 and P-ERK1/2 protein expression, and downregulated BAX, Caspase-3 and Caspase-9 protein expressions. These findings indicate that high CORT levels promote apoptosis by inhibiting the MAPK/ERK signaling pathway, leading to HT-22 cell damage. OR hydrolysate regulates the expression of apoptosis-related proteins, (BCL-2, BAX, Caspase-3 and Caspase-9) by activating the MAPK/ERK signaling pathway, thereby inhibiting apoptosis and reducing neuronal damage. This mechanism represents a key pathway through which OR exerts anti-depressive effects.

**Key words:** oviductus ranae hydrolysate; mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase; apoptosis; HT-22 cells

哈蟆油 (Oviductus Ranae, OR) 是中国林蛙雌蛙的干燥输卵管制品, 于 1985 年被《中国药典》所收录, 中医认为哈蟆油性平, 味甘、咸, 归肾、肺经, 具有补肾益精、养阴润肺的功效<sup>[1]</sup>。现代研究发现哈蟆油具有多种化学成分, 包括蛋白质、氨基酸、脂肪酸、磷脂、固醇以及矿物质元素, 同时哈蟆油也被报道具有多种药理活性, 其药理作用包括抗炎、抗氧化、抗疲劳、抗衰老、抗抑郁、抗骨质疏松、止咳、调节免疫、雌激素样作用等<sup>[2-5]</sup>。

抑郁症是一种心理障碍性疾病, 通常表现为情绪低落、快感缺乏、绝望, 且伴随着焦虑、失眠、反应迟缓、学习记忆能力下降, 在病情严重情况下患者常在自身的不良情绪状态下产生自残或自杀等负面想法<sup>[6-8]</sup>。近年来, 抑郁症发病率呈逐年上升趋势, 据统计全球抑郁症患者已超过 3 亿, 未来极有可能成为世界第二大类疾病<sup>[9]</sup>。

下丘脑-垂体-肾上腺 (HPA) 轴假说是目前较为公认的抑郁症发病机制, 该假说认为 HPA 轴能够调节人体压力反应, 但长期接受压力应激后会使得 HPA 轴出现过度激活显现, 致使体内糖皮质激素过度分泌<sup>[10]</sup>。研究证实糖皮质激素升高常常会伴随着大脑海马区域的结构变化及神经元损伤, 海马区是记忆、学习和情绪控制的重要区域, 海马区也作为应激反应的靶区, 常作为抑郁症和情绪应激研究中的研究对象<sup>[11,12]</sup>。Andiara 等<sup>[13]</sup>研究发现过量 CORT 能够诱发 HT-22 的凋亡, 并通过该细胞模型阐释了胍丁胺抗抑郁作用潜在的分子机制。

丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 是一类参与细胞生长、发育、增殖、分化、凋亡以及炎症反应的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 目前研究认为 MAPK 信号通路主要由细胞外信号调节激酶 1/2 (ERK1/2)、c-jun 氨基末端激酶 (JNK)、p38 MAPK 以及 ERK 5 途径组成<sup>[14-16]</sup>。有实验证实激活 MAPK/ERK 1/2

信号通路能够抑制由 1-甲基-4-苯基吡啶 (MPP+) 诱导的 PC12 细胞损伤, 因此 MAPK/ERK 信号通路的激活对神经细胞的保护有着重要的作用<sup>[17]</sup>。Ling 等<sup>[18]</sup>通过研究证实哈蟆油的大鼠含药血清能够通过调节 MAPK 信号通路抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的大鼠卵巢细胞凋亡, 因此认为哈蟆油具有一定的细胞保护作用并且该作用与 MAPK 凋亡通路密切相关。

目前研究中暂无关于哈蟆油对于 HT-22 细胞保护作用及作用机制的报道, 因此本研究采用高剂量 CORT 制备 HT-22 细胞损伤模型, 对哈蟆油酶解物的 HT-22 细胞保护作用进行探究, 并以 MAPK/ERK 信号通路为研究对象探究哈蟆油酶解物发挥神经保护作用机制, 进一步阐释哈蟆油抗抑郁作用的现代科学内涵。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

哈蟆油由通化鼎参药业提供; HT-22 细胞来源于中国细胞资源; DMEM 培养基、无菌 PBS 购自美国 Hyclone 公司; 胎牛血清购自以色列 BI; DMSO 购自天津津东天正精细化学试剂厂; 甲醇由北京化工厂提供; CORT 购自上海罗恩试剂公司; NaOH 购自国药集团化学试剂有限公司; 胃蛋白酶、胰蛋白酶、MTT、BCA 试剂盒、青霉素-链霉素双抗、Annexin V-FITC/PI 试剂盒、4×SDS-PAGE 浓缩胶缓冲液、4×SDS-PAGE 分离胶缓冲液、30% (29:1) 制胶液购买于北京索莱宝生物科技有限公司; 蛋白质常规分子量标记、GAPDH、Bcl2 抗体、BAX 抗体、Caspase3 抗体、Caspase9 抗体、ERK1/2 抗体、p-ERK1/2 抗体、JNK 抗体、p-JNK 抗体、p38 抗体购买于武汉三鹰生物技术有限公司; p-p38 抗体购自上海泊湾生物科技有限公司; RIPA 裂解液、蛋白

酶磷酸酶抑制剂混合物、超敏 ECL 化学发光试剂盒、一抗稀释液、二抗稀释液、Hoechst 33258 试剂购买于上海碧云天生物; PVDF 膜购买于美国伯乐公司。

JA2003B 电子天平, 上海越平科学仪器有限公司; DY89- II 匀浆机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 311 细胞培养箱, 美国赛默飞世尔公司; CKX41 倒置生物显微镜, 日本奥林巴斯; SW-CJ-2F 医用型超净工作台, 苏州苏静集团; U-LH100HG 荧光显微镜, 日本奥林巴斯; Gallios 双激光流式细胞仪, 美国贝克曼公司; SLI-700 恒温培养箱, 日本 EYELA; Epoch2 全波长酶标仪, 美国伯腾仪器有限公司; PowerPacTM Basic 电泳仪, 美国伯乐生命医学产品有限公司; Q9-Alliance 化学发光成像系统, 英国 UVItec 公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 哈蟆油酶解物的制备及检测

哈蟆油干粉按液比 1:100 加入 pH 值为 4.5 的柠檬酸, 浸泡 36 h 后匀浆, 匀浆后加入 2 000 mL 蒸馏水, 煎煮 2 h, 冷却, 用 10 mmol/L HCl 溶液调 pH 值至 3.0, 按酶与底物比 1:2 000 加入胃蛋白酶, 37 °C 酶解 2 h, 酶解后样品煮沸 15 min 将酶灭活, 调 pH 值至 10.0, 按酶与底物比 1:100 加入胰蛋白酶, 55 °C 酶解 6 h, 酶解后样品煮沸 15 min, 将酶灭活, 用 0.1 mol/L NaOH 调 pH 值到 7.0, 10 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液冻干得到哈蟆油蛋白酶解物<sup>[19]</sup>。

将哈蟆油酶解物中加入 2 wt.% 氢氧化钠甲醇溶液, 水浴上回流, 直至油滴消失。加入  $\varphi=15\%$  三氟化硼甲醇溶液, 在继续回流。加入 10 mL 正庚烷, 振摇, 再加入饱和氯化钠水溶液, 静置分层。吸取上层正庚烷提取溶液大约 5 mL 试管中, 加入大约 5 g 无水硫酸钠, 振摇后静置 5 min, 吸取上层溶液到进样瓶中待测定。毛细管色谱柱: 石英毛细管柱 (60.00 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.15  $\mu$ m)、进样器温度: 270 °C、检测器温度: 280 °C、程序升温: 初始温度 100 °C, 持续 13 min; 100~180 °C, 升温速率 10 °C/min, 保持 6 min; 180~200 °C, 升温速率 1 °C/min, 保持 20 min; 200~230 °C, 升温速率 4 °C/min, 保持 10.5 min、载气: 氮气、分流比: 100:1、进样体积: 1.0  $\mu$ L。

### 1.2.2 细胞培养和处理

HT-22 细胞在高葡萄糖 DMEM 和 10% 胎牛血清中培养, 补充有 100 U/mL 青霉素和 100 g/mL 链霉素在 37 °C 的  $\varphi=5\%$  CO<sub>2</sub> 中培养。选择处于指数生

长阶段的细胞进行实验。在实验过程中, 细胞在 96 孔板上密度为每孔  $2\times 10^4$  个的 0.2 mL DMEM 培养基中生长, 在 6 孔板上在密度为每孔  $1.5\times 10^5$  个的 2 mL DMEM 培养基中生长<sup>[20]</sup>。将接种的 HT-22 细胞与纯度为 92% 的 0.7  $\mu$ mol/mL CORT 孵育 24 h 以建立损伤模型。成型完成后弃去培养板中的原始培养基, 使用含有哈蟆油酶解物 (1.0、0.8、0.6 mg/mL) 的 DMEM 培养基置换原始培养基 24 h, 以此研究哈蟆油酶解物的神经保护作用。分为五个治疗组, 包括对照组, 0.7  $\mu$ mol/mL 的 CORT 的模型组和 0.7  $\mu$ mol/mL 的 CORT 加以 1.0、0.8、0.6 mg/mL 的哈蟆油酶解物。然后将细胞与 CORT 和哈蟆油酶解物共孵育 24 h<sup>[21]</sup>。

### 1.2.3 MTT法检测细胞活力

使用 MTT 测定进行细胞活力测定, HT-22 细胞在 96 孔板中培养, 细胞粘附生长后对 HT-22 细胞进行造模和给药。然后将 MTT 溶液加入到每个孔中并在 37 °C 下孵育 4 h, 然后吸出培养基, 向溶解到甲瓚的每个孔中加入 150  $\mu$ L DMSO。在 490 nm 的波长下测量吸光度 (OD)。空白组的细胞存活率设置为 100%, 并计算其他组的细胞存活率<sup>[22]</sup>。

$$M = \frac{A_1}{A_2} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

$M$ ——细胞存活率, %;

$A_1$ ——各实验组吸光度值;

$A_2$ ——空白组吸光度值。

### 1.2.4 细胞形态学观察

将 HT-22 细胞培养在 6 孔板中进行造模和给药。给药后在倒置显微镜下观察 HT-22 细胞的形态, 并通过拍照记录形态变化。

### 1.2.5 Hoechst 33258染色

将 HT-22 细胞接种于 6 孔板中进行造模和给药。细胞用 0.5 mL 固定液固定 10 min, 然后除去固定液, 用 PBS 洗涤两次, 向上述细胞中加入 1 mL Hoechst 33258 染色液, 在 37 °C 恒温培养箱中孵育 20 min, 然后除去染色液, 用 PBS 洗涤 2 次, 在荧光显微镜 200 $\times$  下观察染色结果<sup>[23]</sup>。

### 1.2.6 流式细胞术检测HT-22细胞凋亡情况

细胞培养方法如 1.2.5。用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化细胞, 收集到离心管中, 离心 (1 000 r/min, 5 min), 用预冷的 PBS 洗涤, 用结合缓冲液重悬细



胞,调节浓度至每毫升 $1 \times 10^6$ 个。根据 Annexin V-FITC/PI 试剂盒说明依次加入 Annexin V-FITC 和 PI, 并采用流式细胞术观察细胞凋亡情况<sup>[24]</sup>。

### 1.2.7 Western Blot法检测HT-22细胞凋亡相关蛋白及MAPK信号通路蛋白表达

收集 HT-22 细胞,用冷 PBS 洗涤两次,并置于 RIPA 裂解缓冲液中在冰上裂解。将裂解物在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $12\ 000\ \text{r/min}$ 条件下离心 $5\ \text{min}$ ,然后收集上清液。蛋白质浓度采用 BCA 法测定。将等量的蛋白质通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,然后转移到聚偏二氟乙烯膜(PVDF)上。将膜封闭在含有 $\varphi=5\%$ 脱脂奶粉的 TBST 溶液中,室温下封闭 $1\ \text{h}$ 。加入一抗并在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下过夜。用 TBST 清洗膜 $3$ 次,每次 $5\ \text{min}$ ,加入二抗并在室温下孵育 $2\ \text{h}$ 。使用化学发光检测试剂盒对信号进行可视化,用 Image J 软件量化蛋白质条带的灰度值。

### 1.3 数据分析

采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析,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,组间两两比较采用 LSD- $t$  检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果与讨论

### 2.1 哈蟆油酶解物脂肪酸成分检测

通过对哈蟆油酶解物中的脂肪酸成分进行分析,在 $570\ \text{nm}$ 条件下得到脂肪酸类成分 $7$ 种(图1)。分别为棕榈酸、棕榈油酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、亚麻酸、花生四烯酸。其中亚油酸、亚麻酸、花生四烯酸等多不饱和脂肪酸的缺乏是抑郁症的病理状态之一<sup>[25]</sup>。

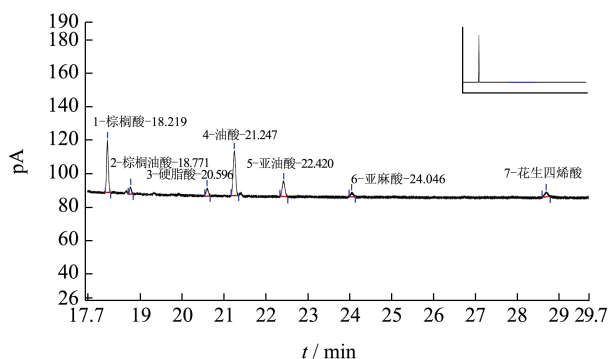


图1 哈蟆油酶解物的成分分析

Fig.1 Component analysis of OR hydrolysate

注:  $570\ \text{nm}$  波长下,在哈蟆油酶解物中检测到 $7$ 种脂肪酸成分。

### 2.2 哈蟆油酶解物能够提高HT-22细胞的细胞活力

为研究哈蟆油酶解物对 HT-22 细胞活性影响,采用不同浓度的哈蟆油酶解物分别处理细胞 $24$ 、 $48$ 、 $72\ \text{h}$ ,用 MTT 法测定细胞活力,经哈蟆油酶解物处理后在 $24$ 、 $48$ 、 $72\ \text{h}$ 三个时间段 HT-22 细胞的细胞活力均有所升高,并且能够发现给药 $24\ \text{h}$ 后在 $1.0$ 、 $0.8$ 、 $0.6\ \text{mg/mL}$ 三个质量浓度下细胞活力较其余各组升高更为明显(图2)。通过上述结果我们确定了哈蟆油酶解物的给药时间为 $24\ \text{h}$ ,给药质量浓度为 $1.0$ 、 $0.8$ 、 $0.6\ \text{mg/mL}$ 。

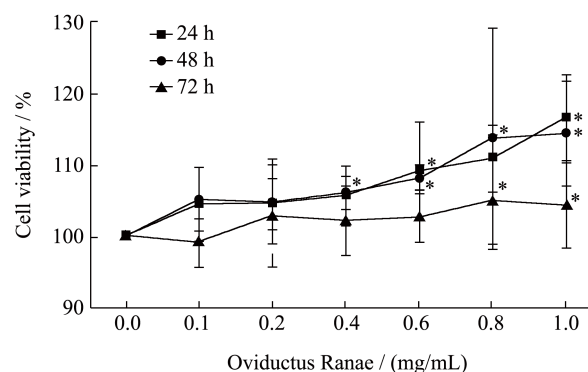


图2 各时间段下哈蟆油酶解物不同浓度对 HT-22 细胞活力的影响

Fig.2 Effects of different concentrations of OR hydrolysate on the viability of HT-22 cells at each time periods

注: 与空白对照组相比 \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

### 2.3 哈蟆油酶解物改善皮质酮诱导HT-22细胞形态改变及细胞活力下降

为了研究哈蟆油酶解物对 CORT 诱导的 HT-22 细胞损伤的治疗作用,采用 CORT 处理细胞 $24\ \text{h}$ ,随后给予哈蟆油酶解物后再次处理 $24\ \text{h}$ ,通过 MTT 法测定细胞活力。CORT 处理后的 HT-22 细胞细胞活力较对照组比较出现明显的下降,经哈蟆油酶解物给药后 HT-22 细胞的细胞活力出现明显提高(图3a)。随后通过倒置显微镜( $100\times$ )观察了哈蟆油对 CORT 处理后 HT-22 细胞的形态变化,对照组可见细胞呈长梭形、数量较多,HT-22 细胞经皮质酮诱导后表现为细胞数量明显减少、突触变短、胞体出现分界线不明显、粘附性差、出现大量漂浮等状态,哈蟆油酶解物给药后发现细胞数量明显增多,细胞突触较模型组更为明显,细胞分界线更为明显,该结果显示哈蟆油酶解物能够改善由 CORT 诱导的海马神经元细胞损伤(图3b)。

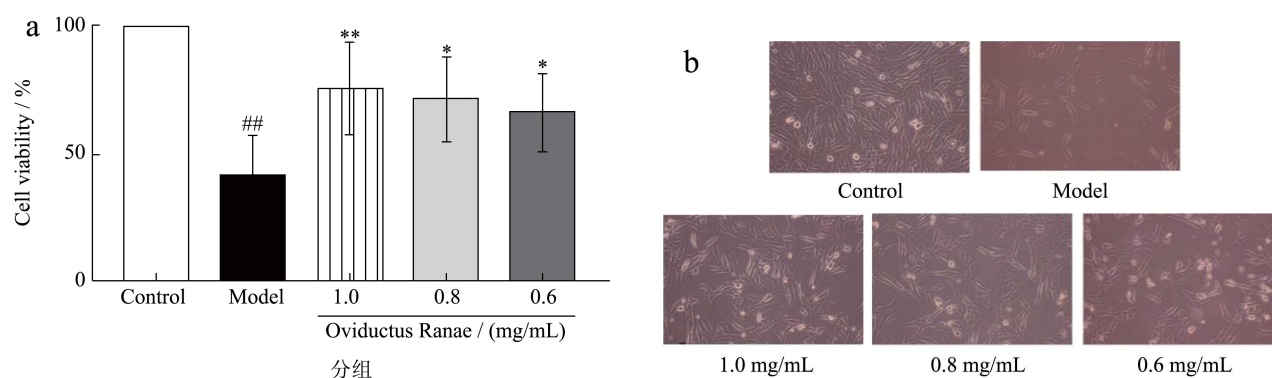


图3 哈蟆油酶解物对 CORT 诱导 HT-22 细胞损伤的保护作用

Fig.3 Protective effect of OR hydrolysate on CORT-induced HT-22 cell injury

注: a: 哈蟆油酶解物给药 24 h 对 CORT 诱导的 HT-22 细胞活力下降的治疗作用; b: 哈蟆油酶解物给药 24 h 对 CORT 诱导 HT-22 细胞损伤状态下细胞形态的影响, 观测倍数 (100×)。与空白对照组比较  $##P<0.01$ , 与模型组比较  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ 。

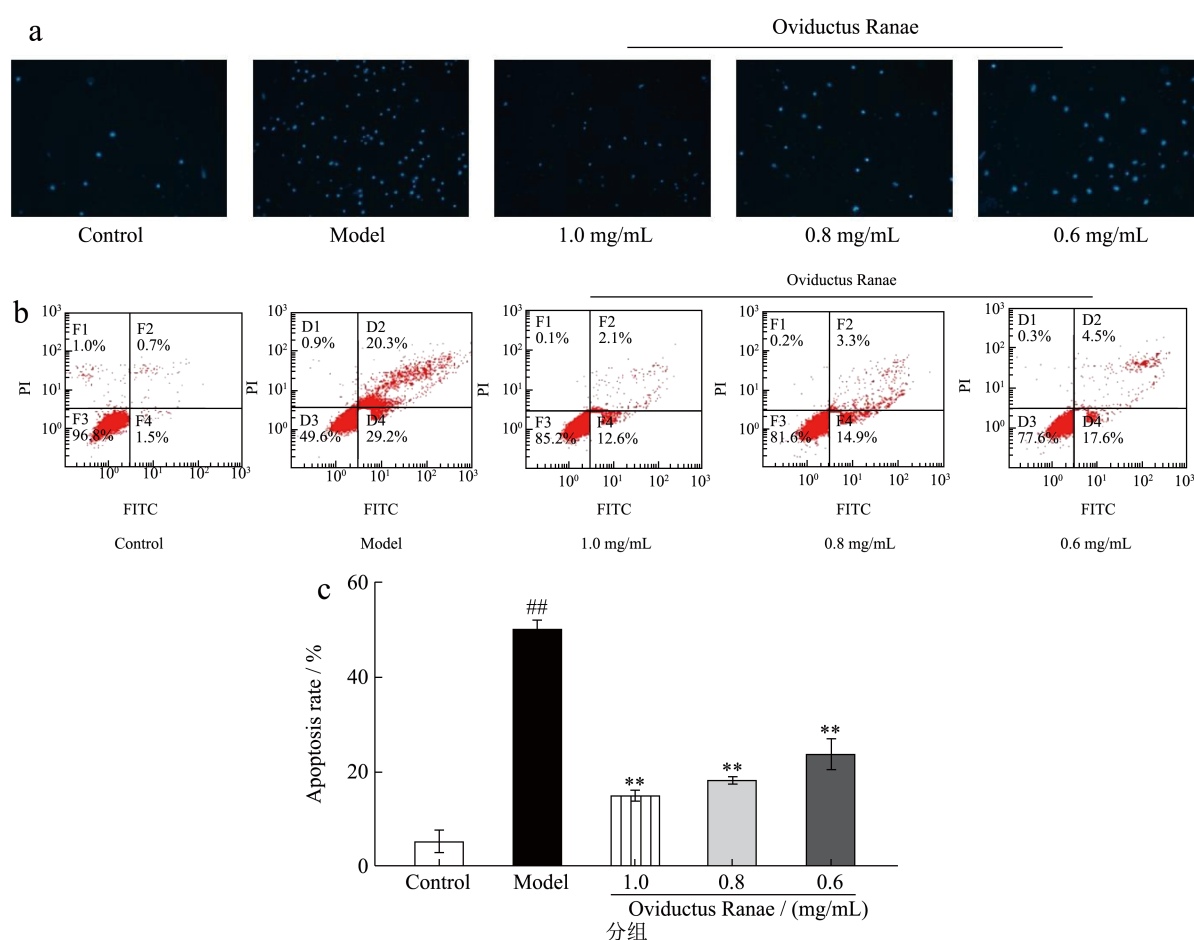


图4 哈蟆油酶解物对 CORT 诱导的 HT-22 细胞凋亡的抑制作用

Fig.4 Inhibition of CORT-induced apoptosis in HT-22 cells by OR hydrolysate

注: a: HT-22 细胞 Hoechst 33258 染色结果, 观测倍数 (200×); b、c: 为 Annexin V/PI 双染流式细胞术测定 HT-22 细胞凋亡率结果。

## 2.4 哈蟆油酶解物对CORT诱导的HT-22细胞凋亡的抑制作用

为了探究哈蟆油酶解物能否抑制 CORT 诱导的 HT-22 细胞凋亡, 采用 Hoechst 33258 染色与流

式细胞术对 HT-22 细胞凋亡情况进行检测, 凋亡细胞经 Hoechst 33258 染色后在荧光显微镜下表现为细胞核缩小、染色质浓缩、强烈荧光和核碎裂, 在 200× 荧光显微镜观察下发现 CORT 能够诱导 HT-22

细胞凋亡, 而经哈蟆油酶解物给药后发现能够抑制 HT-22 细胞凋亡 (图 4a)。随后采用 Annexin V-FITC/PI 双染通过流式细胞术对 HT-22 细胞凋亡情况进行进一步的检测, 发现哈蟆油酶解物能够抑制由 CORT 诱导的 HT-22 细胞凋亡, 与 Hoechst 33258 染色结果相符 (图 4b、4c)。

## 2.5 哈蟆油酶解物对CORT诱导的HT-22细胞凋亡相关蛋白的影响

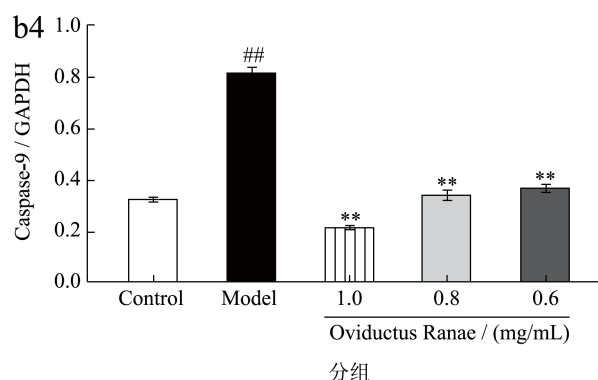
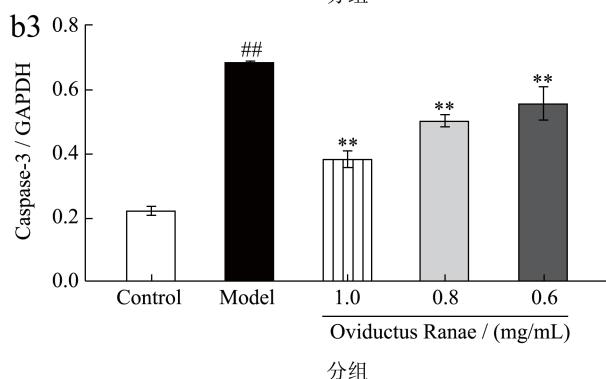
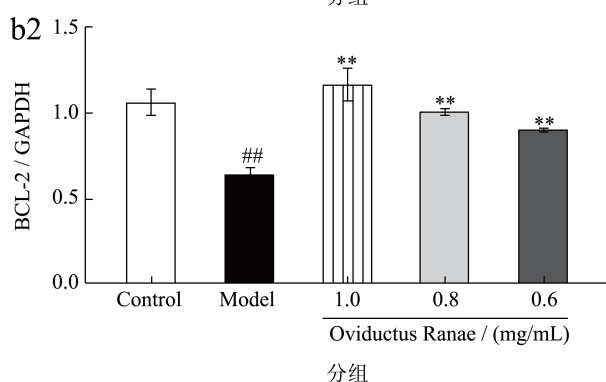
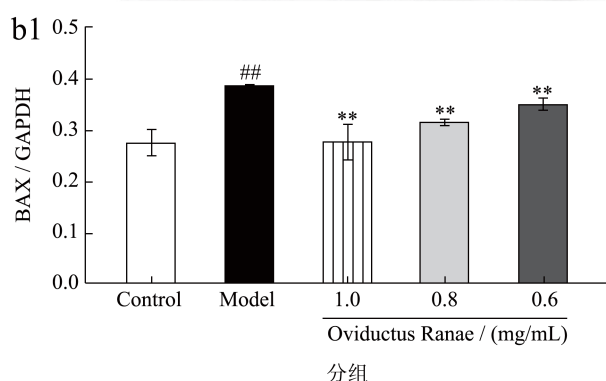
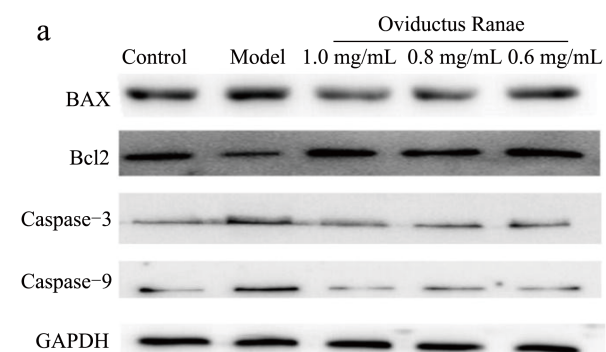


图 5 哈蟆油酶解物对 CORT 诱导的 HT-22 细胞凋亡相关蛋白的影响

Fig.5 Effect of OR hydrolysate on CORT-induced apoptosis-associated proteins in HT-22 cells

注: a: HT-22 细胞 BAX、Caspase-3、Caspase-9、BCL-2 免疫印迹条带; b: HT-22 细胞 BAX、Caspase-3、Caspase-9、BCL-2 蛋白相对表达量。与空白对照组比较 ## $P<0.01$ , 与模型组比较 \*\* $P<0.01$ 。

Kvansaku 等<sup>[26]</sup>研究发现 BCL-2 家族之间的相互作用启动了凋亡 Caspase 级联反应。为进一步探究哈蟆油酶解物对 CORT 诱导的 HT-22 细胞的凋亡作用, 采用 Western blot 法对 HT-22 细胞中凋亡蛋白进行了检测, 实验结果发现与空白对照组相比, 模型组细胞 BAX、Caspase-3、Caspase-9 表达升高以及 BCL-2 蛋白表达水平下降, 与模型组相比哈蟆油酶解物各给药组 Caspase-3、Caspase-9 表达降低以及 BCL-2 蛋白表达水平升高, 该结果表明哈蟆油酶解物能够通过抑制促凋亡蛋白 Caspase-3、Caspase-9 的表达和上调凋亡抑制蛋白 BCL-2 的表达从而抑制 HT-22 细胞凋亡 (图 5a、5b)。

## 2.6 哈蟆油酶解物通过调节HT-22细胞中ERK1/2信号通路抑制HT-22细胞凋亡

通过上述实验能够证明哈蟆油酶解物对 CORT 诱导的 HT-22 细胞损伤具有保护作用。Dwivedi 等<sup>[27]</sup>研究发现因抑郁症自杀患者脑内 ERK1 和 ERK2 的表达显著低于标准水平, 为了研究哈蟆油酶解物抑制 CORT 诱导 HT-22 细胞损伤的潜在分子机制, 检测了 HT-22 细胞中 p-ERK1/2 的水平, 以确定 MAPK/ERK 信号通路是否参与哈蟆油酶解物对 HT-22 细胞的保护作用, 实验结果发现经 CORT 诱导后的 HT-22 细胞 P-ERK1/2 表达水平显著降低, 经哈蟆油酶解物处理后 HT-22 细胞 P-ERK1/2 表达水平显著增加 (图 6a), 因此结果表明, 哈蟆油酶解物抑制 HT-22 细胞凋亡的作用可能通过 ERK1/2



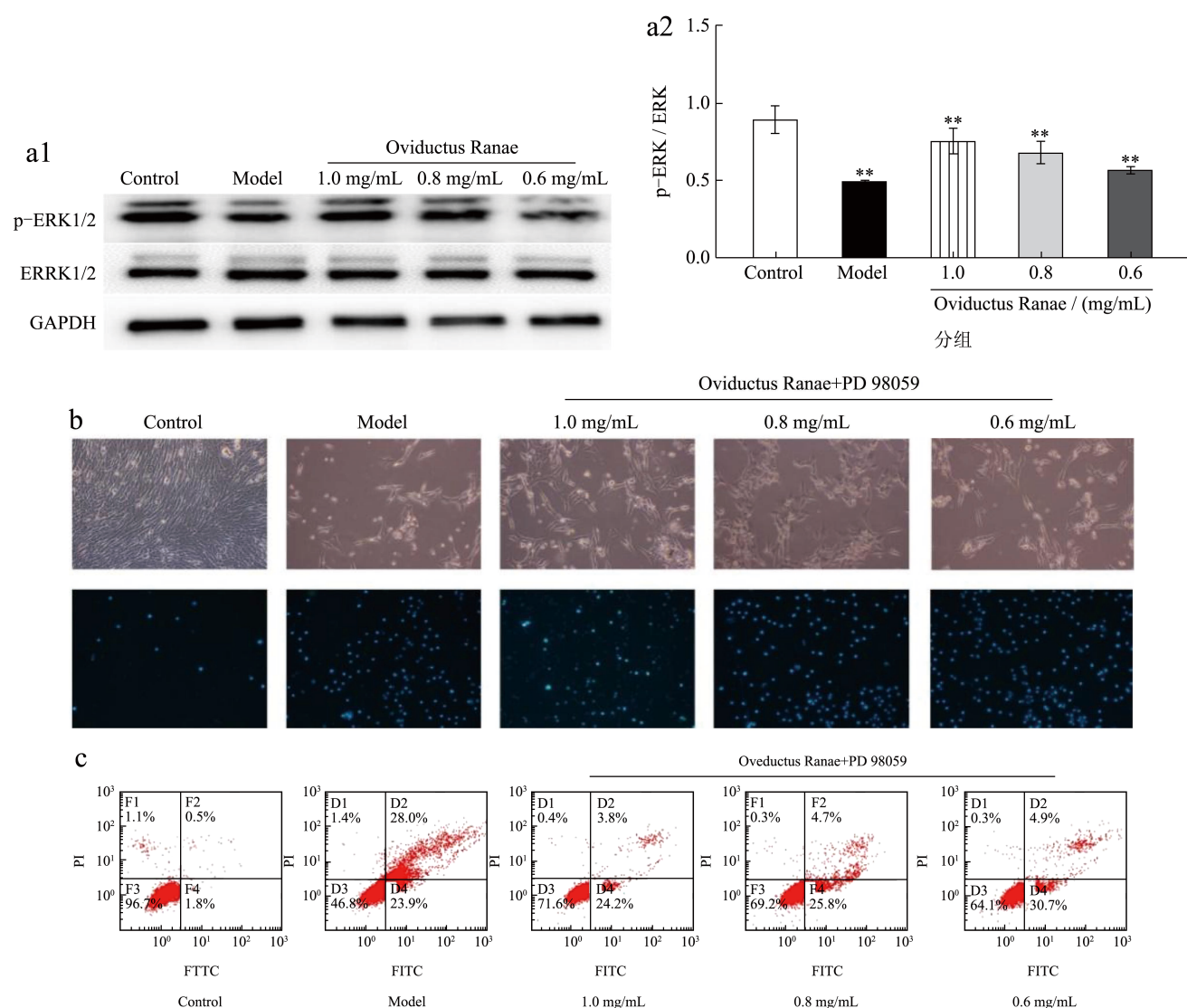
信号通路介导的。随后采用 ERK 信号通路抑制剂 PD98059 (20  $\mu\text{mol/L}$ ) 对 HT-22 细胞进行处理,发现哈蟆油酶解物对 HT-22 细胞的凋亡抑制作用减退 (图 6b、6c), 并且在 Western blot 实验中发现各给药组细胞中 p-EKR1/2 蛋白表达出现显著降低, 同时也伴随着细胞中 BAX、Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达升高以及 BCL-2 蛋白表达水平下降 (图 6d)。

## 2.7 讨论

有临床研究发现抑郁症患者的双侧海马体积明显小于健康人类<sup>[28]</sup>, 造成该结果的主要原因可能是因为抑郁症患者长期处于应激状态下, 机体 HPA 轴处于高度兴奋状态, 并分泌大量糖皮质激素, 而高浓度的糖皮质激素与海马糖皮质激素受体结合后能够刺激细胞  $\text{Ca}^{2+}$  通道以及谷氨酸 NMDA 受体, 导致海马细胞凋亡, 使海马神经元受损<sup>[29]</sup>。因此抑制

海马神经元细胞凋亡, 减轻海马神经元损伤也被认为是治疗抑郁症的有效手段。在本实验中哈蟆油酶解物的脂肪酸成分以多不饱和脂肪酸为主, 而适量地摄入多不饱和脂肪酸有利于抑郁症的治疗<sup>[30]</sup>。

ERK1/2 对细胞凋亡的调控主要通过调节 BCL-2 和 BAX 蛋白实现。有研究发现, ERK1/2 能够通过磷酸化的方式激活 cAMP 反应性元素结合蛋白 (CREB), 磷酸化的 CREB 入核后能够与 BCL-2 的启动子结合, 进一步促进 BCL-2 的表达<sup>[31]</sup>。在细胞中 BCL-2 与 BAX 相互结合形成一种异源二聚体, 当 BCL-2 表达量增多时, BAX 活性受到抑制, 此时细胞凋亡减缓; 当 BAX 表达增多时, BAX 自身会形成同源二聚体, 从包浆转入线粒体内膜, 进而诱导线粒体内膜的细胞色素 C 大量释放进入细胞质, 促使 Caspase-9 前体裂解为活化的 Caspase-9, 活化的 Caspase-9 再使 Caspase-3 前体裂解产生活化的 Caspase-3, 诱发细胞凋亡<sup>[32-34]</sup>。



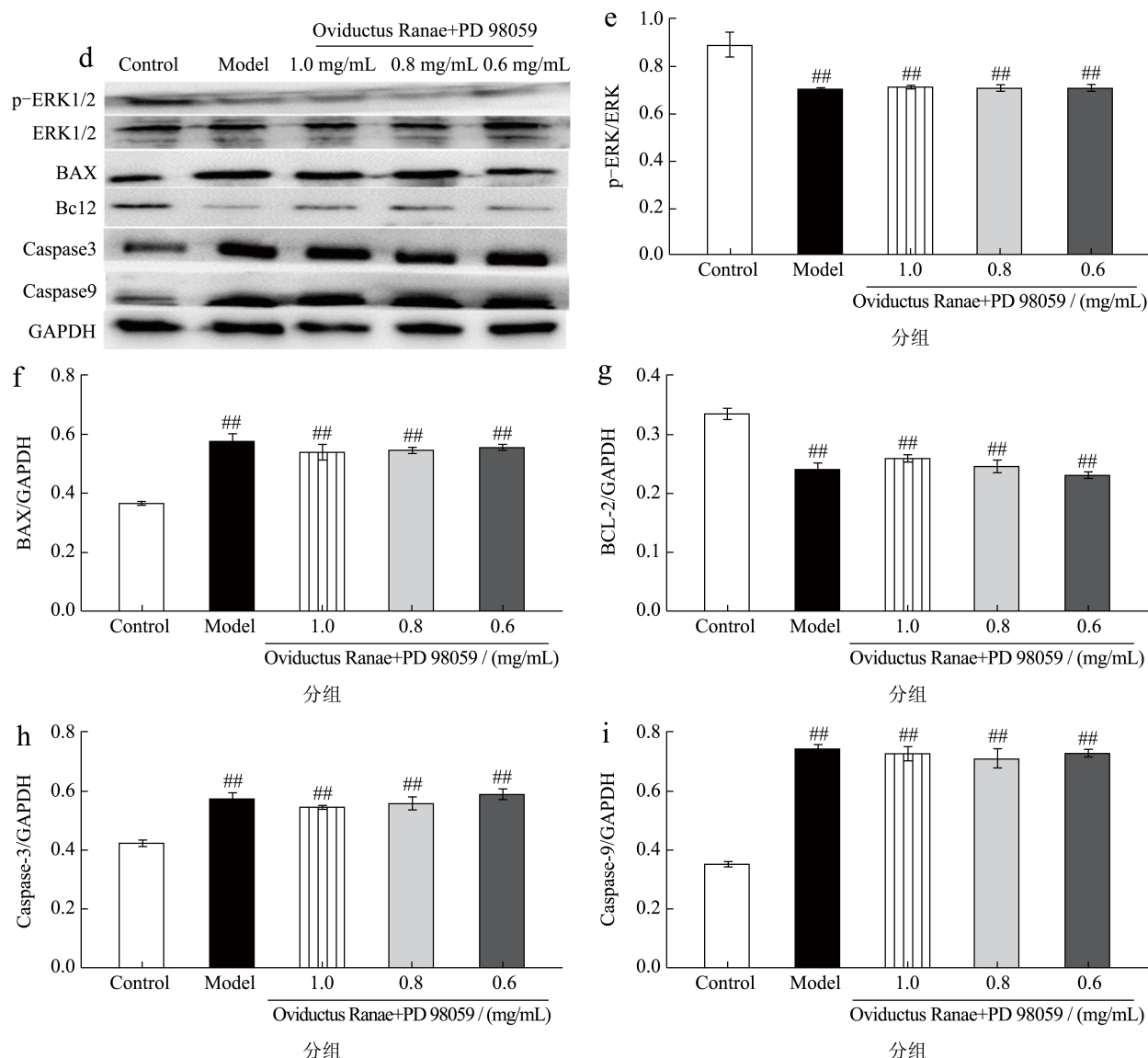


图 6 哈蟆油酶解物通过调节 HT-22 细胞中 ERK1/2 信号通路抑制 HT-22 细胞凋亡

**Fig.6 OR hydrolysate inhibit HT-22 cell apoptosis by regulating the ERK1/2 signaling pathway in HT-22 cells**

注: a: HT-22 细胞 ERK1/2 信号通路蛋白相对表达量; b: HT-22 细胞 Hoechst 33258 染色结果, 观测倍数 (200×); c: Annexin V/PI 双染流式细胞术测定 HT-22 细胞凋亡率结果; d: HT-22 细胞 ERK1/2 信号通路蛋白以及 BAX、Caspase-3、Caspase-9、BCL-2 蛋白相对表达量。与空白对照组比较 <sup>##</sup> $P < 0.01$ 。

通过实验发现, 在 CORT 诱导下 HT-22 细胞出明显的细胞活力降低, 显微观察发现细胞数量明显减少、突触变短、胞体出现分界线不明显、粘附性差、出现大量漂浮等一系列细胞受损状态, 经哈蟆油酶解物给药后发现相较于 CORT 组 HT-22 细胞活力出现明显升高, 显微观察发现细胞数量明显增多、漂浮细胞减少、突触增多; 在后续的流式细胞术检测结果中我们发现 CORT 组细胞凋亡率较对照组出现明显升高, 经哈蟆油酶解物给药后, 细胞凋亡率显著下降, 提示哈蟆油酶解物能够有效的逆转由 CORT 引起的 HT-22 细胞凋亡损伤。因此, 初

步认为哈蟆油酶解物对海马神经元细胞的保护作用可能是其抗抑郁作用的药效基础。随后, 对 MAPK/ERK 信号通路进行了进一步研究, 在实验结果中发现在 CORT 诱导的 HT-22 细胞中 p-ERK1/2 表达出现明显降低, BAX、Caspase-9、Caspase-3 表达增多, BCL-2 的表达降低, 表明 ERK1/2 信号通路在 CORT 的诱导下被抑制, 细胞出现凋亡现象, 而经哈蟆油酶解物给药后发现 p-ERK1/2 的表达出现明显升高, BAX、Caspase-9、Caspase-3 表达下降, BCL-2 的表达升高, 细胞凋亡情况受到有效的控制, 因此, 初步推测哈蟆油能够通过激活 MAPK/ERK 信



号通路发挥神经元保护作用。为了进一步证实哈蟆油的神经元保护作用与 MAPK/ERK 信号通路的关系,采用 PD98059 进行辅助研究,PD98059 是一类非底物依赖性竞争的蛋白激酶抑制物能够通过结合 MEK1 上的位点抑制其激活与磷酸化从而抑制 ERK1/2 的磷酸化<sup>[35,36]</sup>,在使用 PD98059 抑制 ERK1/2 的磷酸化的实验结果中发现哈蟆油酶解物所应具有细胞保护作用受到了抑制,细胞形态学、染色及流式细胞术结果显示各给药组凋亡比例与模型组无显著差异并且均显著低于空白对照组,同时 BAX、BCL-2、Caspase-9、Caspase-3 等蛋白表达与模型组相比也无显著差异。因此,从该实验结果可以得出结论哈蟆油酶解物对于 HT-22 细胞的保护作用是通过激活 MAPK/ERK1/2 信号通路实现的。

### 3 结论

本研究结果表明,哈蟆油酶解物对 CORT 诱导的 HT-22 细胞损伤具有保护作用。具体来讲,哈蟆油酶解物能够增强 HT-22 细胞的活力,抑制 CORT 诱导的 HT-22 细胞凋亡,调节 MAPK/ERK 信号通路相关蛋白的活性,增加凋亡抑制因子 BCL-2 的表达,抑制促凋亡因子 BAX、Caspase-3、Caspase-9 表达。因此,认为哈蟆油酶解物是通过激活 MAPK/ERK 信号通路抑制神经细胞凋亡,从而发挥保护神经元、抗抑郁作用。

### 参考文献

- [1] ZHANG Y, WANG Y, LI M, et al. Traditional uses, bioactive constituents, biological functions, and safety properties of *Oviductus Ranae* as functional foods in China [J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 2019: 4739450.
- [2] GUO H, GAN Y, LIU M, et al. Quality evaluation of *Oviductus Ranae* based on PUFAs using HPLC fingerprint techniques combined with chemometric methods [J]. *Foods*, 2019, 8(8): 322.
- [3] XU Q, DOU C, LIU X, et al. *Oviductus Ranae* protein hydrolysate (ORPH) inhibits the growth, metastasis and glycolysis of HCC by targeting miR-491-5p/PKM2 axis [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, 107: 1692-1704.
- [4] LI X, SUI X, YANG Q, et al. *Oviductus Ranae* protein hydrolysate prevents menopausal osteoporosis by regulating TGF  $\beta$ /BMP2 signaling [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2019, 299(3): 873-882.
- [5] XU Y, WANG F, GUO H, et al. Antitussive and anti-inflammatory dual-active agents developed from natural product lead compound 1-methylhydantoin [J]. *Molecules*, 2019, 24(13): 2355.
- [6] SUN W, QING Q, CHENG X, et al. Effects of chronic folate deficiency and sex differences on depressionlike behavior in mice [J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2022, 23(3): 1-9.
- [7] MCCARRON RM, SHARIRO B, RAWLES J, et al. Depression [J]. *Ann Intern Med*, 2021, 174(5): ITC65-ITC80.
- [8] MALSHI GS, MANN JJ. Depression [J]. *Lancet*, 2018, 392 (10161): 2299-2312.
- [9] MAJ M, STEIN D J, PARKER G, et al. The clinical characterization of the adult patient with depression aimed at personalization of management [J]. *World Psychiatry*, 2020, 19(3): 269-293.
- [10] WEI D, ZHAO Y, ZHANG M, et al. The volatile oil of *Zanthoxylum bungeanum* pericarp improved the hypothalamic-pituitary-adrenal Axis and gut microbiota to attenuate chronic unpredictable stress-induced anxiety behavior in rats [J]. *Drug Design, Development and Therapy*, 2021, 22(15): 769-786.
- [11] YE Y L, ZHONG K, LIU D D, et al. Huanglian-Jie-Du-Tang extract ameliorates depression-like behaviors through BDNF-TrkB-CREB pathway in rats with chronic unpredictable stress [J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 2017: 7903918.
- [12] XU W, YAO X, ZHAO F, et al. Changes in hippocampal plasticity in depression and therapeutic approaches influencing these changes [J]. *Neural Plasticity*, 2020, 2020: 8861903.
- [13] FREITAS A E, EGEA J, BUENDIA I, et al. Agmatine induces Nrf2 and protects against corticosterone effects in hippocampal neuronal cell line [J]. *Molecular Neurobiology*, 2015, 51: 1504-1519.
- [14] SUN Y, LIU W Z, LIU T, et al. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis [J]. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 2015, 35(6): 600-604.
- [15] KIM E K, CHOI E J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2010, 1802(4): 396-405.
- [16] LEE J K, KIM N J. Recent advances in the inhibition of p38 MAPK as a potential strategy for the treatment of Alzheimer's disease [J]. *Molecules*, 2017, 22(8): 1287.
- [17] HASHIMOTO R, YU J, KOIZUMI H, et al. Ginsenoside Rb1 prevents MPP+-induced apoptosis in PC12 cells by stimulating estrogen receptors with consequent activation of ERK1/2, Akt and inhibition of SAPK/JNK, p38 MAPK [J]. *Evidence-Based Complementary and*

- Alternative Medicine, 2012, 2012: 693717.
- [18] LING X M, ZHANG X H, TAN Y, et al. Protective effects of Oviductus Ranae-containing serum on oxidative stress-induced apoptosis in rat ovarian granulosa cells [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2017, 208: 138-148.
- [19] GE J, HUANG Y, ZHANG Y, et al. Metformin inhibits propofol-induced apoptosis of mouse hippocampal neurons HT-22 through downregulating Cav-1 [J]. Drug Design, Development and Therapy, 2020, 21(14): 1561-1569.
- [20] WANG S, GAN Y, MAO X, et al. Antioxidant activity evaluation of Oviductus Ranae protein hydrolyzed by different proteases [J]. Molecules, 2021, 26(6): 1625.
- [21] WANG Z, HAN L, SHANGTING H, et al. Effect of hesperidin on CORT-induced apoptosis and oxidative stress of mouse hippocampal nerve cells by up-regulating miR-146a-5p [J]. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 2020, 33(3 (Special)): 1383-1388.
- [22] GU M, WANG J, WANG Y, et al. MiR-147b inhibits cell viability and promotes apoptosis of rat H9c2 cardiomyocytes via down-regulating KLF13 expression [J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2018, 50(3): 288-297.
- [23] WANG J, WANG G, LI B, et al. miR-141-3p is a key negative regulator of the EGFR pathway in osteosarcoma [J]. Onco Targets and Therapy, 2018, 31(11): 4461-4478.
- [24] WANG X, LU X, ZHU R, et al. Betulinic acid induces apoptosis in differentiated PC12 cells via ROS-mediated mitochondrial pathway [J]. Neurochemical Research, 2017, 42: 1130-1140.
- [25] STACHOWICZ K. The role of polyunsaturated fatty acids in neuronal signaling in depression and cognitive processes [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2023, 15(737): 109555.
- [26] KVANSAKUL M, HINDS M G. The Bcl-2 family: structures, interactions and targets for drug discovery [J]. Apoptosis, 2015, 20: 136-150.
- [27] DWIVEDI Y, RIZAVI H S, ROBERTS R C, et al. Reduced activation and expression of ERK1/2 MAP kinase in the post-mortem brain of depressed suicide subjects [J]. Journal of Neurochemistry, 2001, 77(3): 916-928.
- [28] CHUNG J K, PLITMAN E, NAKAJIMA S, et al. Depressive symptoms and small hippocampal volume accelerate the progression to dementia from mild cognitive impairment [J]. Journal of Alzheimer's Disease, 2016, 49(3): 743-754.
- [29] MO F, TANG Y, DU P, et al. GPR39 protects against corticosterone-induced neuronal injury in hippocampal cells through the CREB-BDNF signaling pathway [J]. Journal of Affective Disorders, 2020, 272: 474-484.
- [30] CURRENTI W, GODOS J, ALANAZI A M, et al. Dietary fats and depressive symptoms in Italian adults [J]. Nutrients, 2023, 15(3): 675.
- [31] WILSON B E, MOCHON E, BOXER L M. Induction of bcl-2 expression by phosphorylated CREB proteins during B-cell activation and rescue from apoptosis [J]. Molecular and Cellular Biology, 1996, 16(10): 5546-5556.
- [32] CAMPBELL K J, TAIT S W G. Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer [J]. Open Biology, 2018, 8(5): 180002.
- [33] JIANG H, ZHAO P J, SU D, et al. Paris saponin I induces apoptosis via increasing the Bax/Bcl2 ratio and caspase3 expression in gefitinibresistant nonsmall cell lung cancer *in vitro* and *in vivo* [J]. Molecular Medicine Reports, 2014, 9(6): 2265-2272.
- [34] MENG L, MA H, MENG J, et al. Costunolide attenuates oxygenglucose deprivation/reperfusioninduced mitochondrialmediated apoptosis in PC12 cells [J]. Molecular Medicine Reports, 2021, 23(6): 1-10.
- [35] WANG X, SUN D F, LU R, et al. RAF may induce cell proliferation through hypermethylation of tumor suppressor gene promoter in gastric epithelial cells [J]. Cancer Science, 2009, 100(1): 117-125.
- [36] WU R, LI H, LI T, et al. Myostatin regulates miR-431 expression via the Ras-Mek-Erk signaling pathway [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2015, 461(2): 224-229.