

红花黄色素 B 对冈田酸致 SH-SY5Y 神经元损伤的保护作用

郝雪言, 李刚, 韦瑶, 刘敬, 张文彦, 李忌, 马成俊*

烟台大学生命科学学院线粒体与健康衰老研究中心, 烟台 264005

摘要: 本研究目的是考察红花黄色素 B(SYB)对冈田酸(OA)致 SH-SY5Y 神经元损伤的保护作用。采用全反式维甲酸(ATRA)诱导 SH-SY5Y 细胞分化为成熟神经元, OA 诱导神经元损伤, 建立 Tau 蛋白过度磷酸化的神经元突触萎缩模型; Giemsa 染色法观察 SH-SY5Y 细胞形态学变化; Western Blot 检测 Tau 蛋白 262 位点磷酸化水平; 流式细胞术检测细胞总活性氧(ROS)和线粒体源 ROS 水平, 以及线粒体膜电位的变化。结果表明, ATRA 可诱导 SH-SY5Y 细胞分化为成熟神经元; OA 可致神经元突触萎缩和 Tau 蛋白在 262 位点过度磷酸化; SYB 能够改善 OA 所致成熟神经元损伤, 降低 Tau 蛋白在 262 位点的磷酸化水平, 其保护作用机制可能与减少胞内及线粒体源 ROS 产生, 提高线粒体膜电位有关。

关键词: 红花黄色素 B; SH-SY5Y 人神经母细胞瘤细胞; 冈田酸; Tau 蛋白

中图分类号: R966

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.3.019

Protective Effects of Safflor Yellow B on Neuronal Damage Induced by Okadaic Acid in Differentiated SH-SY5Y Neuroblastoma Cells

HAO Xue-yan, LI Gang, WEI Yao, LIU Jing, ZHANG Wen-yan, LI Ji, MA Cheng-jun*

Center for Mitochondria and Healthy Aging, College of Life Science, Yantai University, Yantai 264005, China

Abstract: In this study, the protective effects and the mechanism of Safflor yellow B (SYB) on neuronal damage induced by okadaic acid (OA) in differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cells were investigated. SH-SY5Y cells were differentiated with all-trans retinoic acid (ATRA) and treated with OA to induce high phosphorylation of Tau, which could build up a model of Alzheimer's Disease (AD) in vitro. Giemsa staining was used to observe the change in morphology of SH-SY5Y cells. Western blotting was applied to detect the levels of phosphorylation of Tau protein at 262 site. Flow cytometry was used to assess the production of reactive oxygen species (ROS) in the cells and mitochondria, and the change of mitochondrial membrane potential. The experimental results showed that treatment of ATRA could induce SH-SY5Y neuroblastoma cells to differentiate into mature neurons. OA can obvious cause neuronal synapse atrophy and phosphorylation of Tau on site of Ser-262. SYB can improve the neuronal damage induced by OA, depress the phosphorylation of Tau protein at Ser 262, decrease the intracellular and mitochondrial ROS production, and increase the mitochondrial membrane potential.

Key words: Safflor yellow B; SH-SY5Y neuroblastoma cells; Okadaic acid; Tau protein

阿尔兹海默病 (Alzheimer Disease, AD), 又称老年痴呆, 是一种神经退行性疾病, 多发于老年阶段^[1]。其典型病理学特征包括 β -淀粉样蛋白 (Amyloid β -protein, A β) 聚积形成老年斑、Tau 蛋白过度磷酸化形成神经原纤维缠结 (Neurofibrillary tangles, NFTs)、中枢胆碱能损伤、氧化应激等^[1-3]。其中, Tau 蛋白是含量最高的微管相关蛋白, 对正常神经细胞内营养供应和能量传递有重要作用。Tau 蛋白

磷酸化受蛋白激酶和蛋白磷酸酶的调控, 蛋白磷酸酶 PP2A 的特异性抑制剂冈田酸 (Okadaic acid, OA) 可使神经元细胞 Tau 蛋白过度磷酸化。

红花 (*Carthamus tinctorius* L.) 是我国传统中药材, 红花黄色素 (Safflor yellow, SY) 为多种水溶性查尔酮化合物的混合物, 是其主要药理活性成分^[4,5]。研究发现 SY 中含有羟基红花黄色素 A (Hydroxysafflor yellow A, HSYA)、红花黄色素 A (Safflor yellow A, SYA)、红花黄色素 B (Safflor yellow B, SYB)^[6-8]。SY 主要药理作用有抗炎、抗氧化、保护心血管和神经系统等功能^[9-12]; 最近研究发现 SY、HSYA 能够改善小鼠认知功能, 提高小鼠记忆能力等神经保护作

收稿日期: 2017-09-07 接受日期: 2018-01-23

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (21372190); 山东省泰山学者建设工程专项 (tshw201502046); 烟台市双百人才计划; 烟台市科技计划 (2014LGS004)

* 通信作者 Tel: 86-013791177120; E-mail: chengjun-ma@163.com

用^[13-15];有研究表明红花黄色素提高痴呆小鼠的学习记忆能力可能与降低脑组织中的氧化应激有关^[16],Ma 等研究发现红花黄色素能够降低转基因小鼠中 Ser199, Thr205, Ser396, Ser404 位点的 Tau 磷酸化并改善认知缺陷提高学习和记忆能力^[15]。大量文献研究表明,SYB 对帕金森小鼠模型^[17]、血管紧张素 II 诱导的人脐静脉内皮细胞功能障碍^[18]、H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞损伤^[19]和脑缺血导致的脑损伤^[20]均具有显著的保护作用。

虽然细胞实验和动物实验研究均已证实了 SYB 的神经保护作用,但其在细胞水平的作用机制尚不明确。本实验采用 OA 处理分化成熟的 SH-SY5Y 细胞,建立突触萎缩、Tau 蛋白过度磷酸化的 AD 体外模型,研究不同浓度的 SYB 对突触萎缩的抑制、Tau 蛋白磷酸化的调控、活性氧产生及线粒体膜电位水平的影响,探索 SYB 对成熟神经元损伤的保护作用机制。

SYB 结构如图 1 所示:

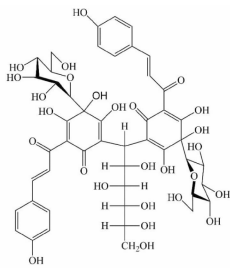


图 1 SYB 的化学结构

Fig. 1 The chemical structure of SYB

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

SYB 实验室自制;SH-SY5Y 细胞购自 ATCC;DMEM 培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS),美国 Corning 公司;全反式维甲酸 ATRA 购自美国 Aladdin 公司;Giemsa 干粉、LiCl、冈田酸(Okadaic acid, OA)、二甲基亚砜(DMSO)购自美国 Sigma 公司;兔抗 p-Tau(Ser 262)、鼠抗 Tau5 购自英国 Abcam 公司;兔抗 β -actin、辣根过氧化物酶标记二抗购自美国 Cell Signaling 公司;DCFH-DA(2,7-Dichloro-di-hydrofluorescein diacetate)荧光探针、Mito SOX 荧光探针、JC-1 荧光探针购自美国 Thermo 公司。

1.2 仪器与设备

CO₂ 培养箱,日本 SANYO 公司;SpectraMax Paradigm 酶标仪,美国 Molecular Devices 公司;垂直电泳系统,美国 Bio-Rad 公司;NovoCyte™ 流式细胞仪,

美国 ACEA 公司。

1.3 细胞培养

人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 在含 10% FBS, 100 U/mL 青霉素,100 μ g/mL 链霉素的 DMEM 培养基,于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 条件下培养传代。

1.4 MTT 法测定 SYB 对 SH-SY5Y 细胞存活率的影响

取对数生长期的 SH-SY5Y 细胞,胰酶消化后离心计数,调整细胞密度为 1×10^5 个/mL,接种于 96 孔培养板中,每孔接种量为 150 μ L。置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 12 h,贴壁后,将 96 孔板内细胞进行分组,分为对照组,实验组使药物终浓度为 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 μ mol/L,每组设置 5 个重复。在 5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h 后加入质量浓度为 5 mg/mL 的 MTT 20 μ L 继续培养 4 h 后,弃去上清液,每孔加入 150 μ L DMSO,震荡器震荡,使甲臜颗粒充分溶解。用酶标仪测各孔吸光值,测定波长为 490 nm。

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{药物组吸光度值}}{\text{对照组吸光度值}} \times 100\%$$

1.5 SH-SY5Y 细胞分化为成熟神经元及 OA 损伤模型的建立

根据已有的文献报道,并作适当调整^[21]。取对数生长期的 SH-SY5Y 细胞,以 1×10^4 个/mL 接种于 6 孔板,每孔加细胞悬液 3 mL,于培养箱培养 24 h,换终浓度为 5 μ mol/L 的 ATRA、1% FBS 的 DMEM 培养基继续培养,隔天换液,每天观察细胞形态,确定细胞分化程度及时间。将诱导分化成熟的细胞加入终浓度为 40 nmol/L 的 OA 处理不同时间,建立 OA 细胞损伤模型。

1.6 Giemsa 染色法观察细胞形态

将加药处理后的细胞用 PBS 洗 2 次,甲醇固定 10 min, PBS 洗 2 次,滴加 Giemsa 染液显色 10 min, PBS 洗 2 次后于显微镜下观察拍照。在显微镜下观察细胞,细胞核呈紫红色,胞浆呈粉红色。采用 Image pro-plus 软件进行图像分析,测量轴突长度与胞体长度,并计算其比值^[22]。

1.7 Western blot 检测 Tau 蛋白在 262 位点磷酸化的表达

取 ATRA 诱导分化后的 SH-SY5Y 细胞,加入终浓度为 40 nmol/L 的 OA 和不同浓度的 SYB 同时孵育后,弃培养基, PBS 洗 2 次,加入含 PMSF 的 RIPA 细胞裂解液提取蛋白,BCA 法检测蛋白浓度。配制

10%的 SDS-PAGE 胶进行电泳,将蛋白转到 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉封闭 1 h,分别用 1:1000 稀释的 p-Tau(Ser 262)抗体、Tau5 抗体和 β -actin 抗体 4 °C 孵育过夜,TBST 洗 3 次,每次 10 min,再用 1:2000 稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次后用 ECL 发光显影试剂盒显影,拍照后分析蛋白条带的相对光密度值。

1.8 流式细胞术检测活性氧变化

细胞诱导分化后,不同浓度的 SYB 和 OA 共同作用 6 h 后,吸弃原培养基,PBS 洗 1 次,加入胰酶消化后吸弃胰酶,用检测活性氧的荧光探针 DCFH-DA(终浓度 10 $\mu\text{mol/L}$,检测细胞内的 ROS,Ex/Em = 488/530 nm)或者 Mito SOX(终浓度 5 $\mu\text{mol/L}$,检测线粒体内的 ROS,Ex/Em = 510/580 nm)荧光探针混悬,培养箱避光孵育 20 min 后流式细胞仪检测荧光强度。

1.9 流式细胞术检测线粒体膜电位变化

细胞诱导分化后,不同浓度的 SYB 和 OA 共同作用 6 h 后,吸弃原培养基,PBS 清洗,胰酶消化后吸弃胰酶,加入终浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 JC-1 荧光探针混悬,培养箱避光孵育 30 min 后流式细胞仪检测各组荧光强度(Ex/Em = 530/560 nm)。结果以红色荧光强度与绿色荧光强度的比值反应线粒体膜电位的变化。

1.10 数据统计处理

所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 18.0 分析

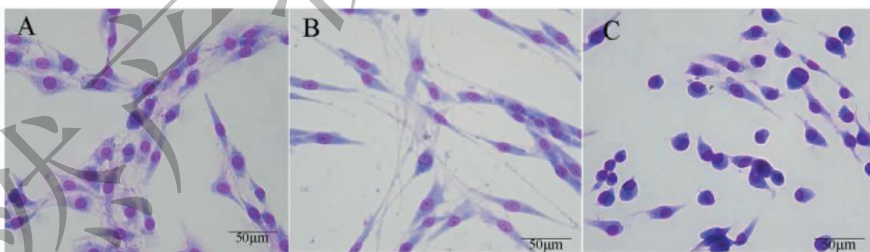


图 3 OA 对分化的 SH-SY5Y 细胞形态的影响(400 ×)

Fig. 3 Effects of OA on differentiated SH-SY5Y cells(400 ×)

注:A.未分化组;B.5 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 诱导分化 4 d 组;C.40 nmol/L OA 处理 6 h 组

Note:A.undifferentiated cells;B.5 $\mu\text{mol/L}$ ATRA for 4 days;C.40 nmol/L OA for 6 h

通过 Giemsa 染色发现,未分化 SH-SY5Y 细胞形态不规则,呈圆形、梭形等形态,有不长于胞体的短轴突,经过终浓度 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 ATRA 诱导分化 4 天后,几乎所有细胞两端都长出突起、呈纺锤体形态(图 3),轴突长度为胞体的 2.9 倍(图 4),说明细胞分化成神经元表型;分化成熟的细胞经 40 nmol/L OA 处理 6 h 后,细胞皱缩、胞体变圆,轴突消失(图

软件进行数据统计分析。比较独立样本 t 检验或者单因素方差分析,其中 $P < 0.05$ 为具有统计学差异, $P < 0.01$ 为统计学差异极显著。

2 实验结果

2.1 SYB 对 SH-SY5Y 细胞存活率的影响

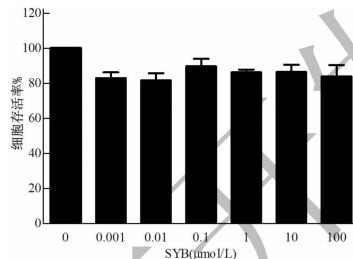


图 2 SYB 对 SH-SY5Y 细胞存活率的影响($n = 3, \bar{x} \pm s$)

Fig. 2 Effects of SYB on survival of SH-SY5Y cells($n = 3, \bar{x} \pm s$)

采用 MTT 法检测 SYB 对 SH-SY5Y 细胞存活率的影响。不同浓度的 SYB (0 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$) 处理 SH-SY5Y 细胞 24 h,并未发现 SYB 能够明显降低细胞存活率。如图 2 所示,随着 SYB 浓度的增大,细胞存活率都在 80% ~ 90% 之间,且无明显差异。实验结果表明,SYB 在 0 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$ 范围内对细胞存活率影响不大。

2.2 SH-SY5Y 细胞分化为成熟神经元及 OA 损伤模型的建立

3),轴突的长度变为胞体的 0.9 倍(图 4),这说明 40 nmol/L OA 处理 6 h 可造成细胞突触损伤。

2.3 SYB 对 OA 所致分化成熟神经元损伤的影响

2.3.1 SYB 抑制 OA 所致分化 SH-SY5Y 细胞突触萎缩

不同浓度的 SYB 与 40 nmol/L OA 同时作用于分化成熟的 SH-SY5Y 细胞 6 h,10 mmol/L LiCl 作

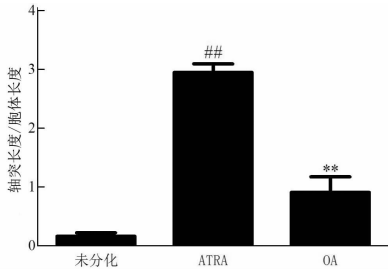


图4 OA对分化的SH-SY5Y细胞突触损伤的影响($n=3, \bar{x} \pm s$)

Fig. 4 Effect of OA on neurite damage in differentiated SH-SY5Y cells ($n=3, \bar{x} \pm s$)

注:与未分化组比较,## $P < 0.01$;与ATRA组比较,* $P < 0.01$

Note: Compared with undifferentiated group, ## $P < 0.01$; Compared with ATRA group, * $P < 0.01$.

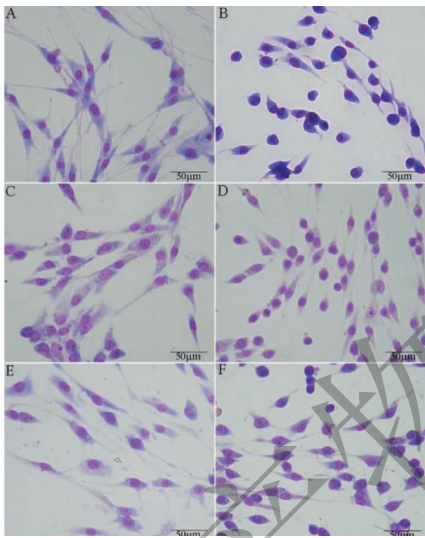


图5 SYB对OA所致分化的SH-SY5Y细胞形态损伤的影响(400×)

Fig. 5 Effects of SYB on cell damage induced by OA in differentiated SH-SY5Y cells (400×)

注:A. ATRA组(5 μmol/L); B. OA组(40 nmol/L); C. LiCl组(10 mmol/L); D~F. SYB组浓度分别为0.2、0.5、1 μmol/L

Note: A. ATRA (5 μmol/L); B. OA (40 nmol/L); C. LiCl (10 mmol/L); D~F. SYB with concentration of 0.2, 0.5, 1 μmol/L

为阳性对照,用Giemsa染色显微镜拍照和Image-plus软件进行图像分析。结果如图5、6所示,与OA组相比0.5 μmol/L SYB处理组的细胞形态变化不明显,突触萎缩明显抑制,轴突比胞体的比值由OA组的0.9倍变为2.0倍,具有极显著性差异($P < 0.01$),而0.2 μmol/L和1 μmol/L SYB组对突触萎缩的抑制作用较弱,轴突与胞体的比值由OA组的0.9倍变为1.4倍和1.7倍,具有显著性差异($P <$

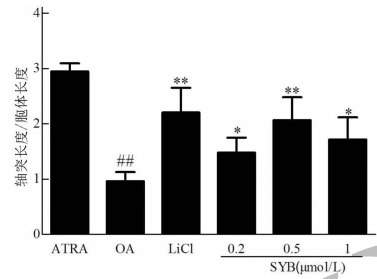


图6 SYB对OA所致分化的SH-SY5Y细胞突触损伤的影响($n=3, \bar{x} \pm s$)

Fig. 6 Effects of OA on neurite damage induced by OA in differentiated SH-SY5Y cells ($n=3, \bar{x} \pm s$)

注:与ATRA组比较,## $P < 0.01$;与OA组比较,* $P < 0.05$;** $P < 0.01$

Note: Compared with ATRA group, ## $P < 0.01$; Compared with OA group, * $P < 0.05$; * $P < 0.01$.

0.05)。说明SYB能减缓OA所致分化的SH-SY5Y细胞突触损伤,0.5 μmol/L的SYB效果较明显。

2.3.2 SYB降低OA所致Tau蛋白262位点磷酸化

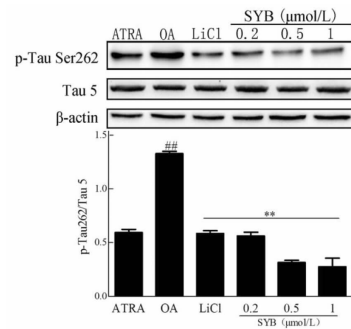


图7 SYB对OA所致分化的SH-SY5Y细胞Tau蛋白Ser262位点磷酸化的影响($n=3, \bar{x} \pm s$)

Fig. 7 Effect of SYB on the Ser 262 phosphorylation of Tau protein induced by OA in differentiated SH-SY5Y cells ($n=3, \bar{x} \pm s$)

注:与ATRA组比较,## $P < 0.01$;与OA组比较,** $P < 0.01$

Note: Compared with ATRA group, ## $P < 0.01$; Compared with OA group, * $P < 0.01$.

不同浓度的SYB与40 nmol/L OA同时作用于分化成熟的SH-SY5Y细胞6 h,10 mmol/L LiCl作为阳性对照,采用Western blot方法,检测SYB对OA所致分化SH-SY5Y细胞在Ser262位点Tau蛋白磷酸化的影响。如图7所示,40 nmol/L OA处理6 h后总Tau蛋白水平变化不大,Ser-262磷酸化水

平明显升高,与分化组比较有极显著性差异($P < 0.01$);不同浓度 SYB (0.2, 0.5, 1 $\mu\text{mol/L}$)与 40 nmol/L OA 同时作用 6 h 后, Ser-262 磷酸化水平明显降低,且呈现浓度依赖性($P < 0.01$)。

2.3.3 SYB 抑制 OA 所致胞内 ROS 产生

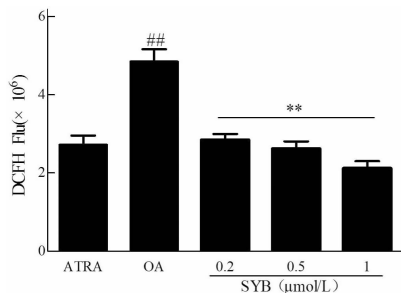


图 8 SYB 对 OA 所致分化的 SH-SY5Y 细胞胞内 ROS 的生成 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Fig. 8 SYB decrease the ROS induced by OA in differentiated SH-SY5Y cells ($n=3, \bar{x} \pm s$)

注:与 ATRA 组比较, ^{##} $P < 0.01$;与 OA 组比较, ^{**} $P < 0.01$

Note: Compared with ATRA group, ^{##} $P < 0.01$; Compared with OA group, ^{**} $P < 0.01$.

为检测 OA 对分化成熟神经元细胞胞内 ROS 的变化,采用非标记性氧化敏感的荧光探针 DCFH-DA。DCFH-DA 本身没有荧光,可自由穿过细胞膜,进入细胞后被胞内酯酶水解成不能透过细胞膜的 DCFH,胞内的 ROS 可氧化无荧光的 DCFH 生成有绿色荧光的 DCF,且荧光强度与 ROS 的水平成正比。

如图 8 所示,分化成熟的神经元细胞经 40 nmol/L 的 OA 处理 6 h 后,荧光强度明显升高($P <$

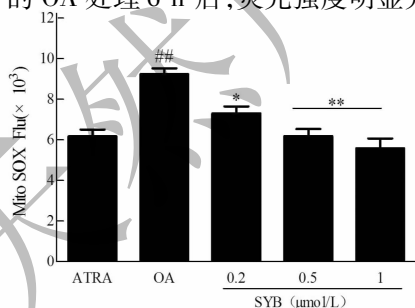


图 9 SYB 抑制 OA 所致分化的 SH-SY5Y 细胞胞内线粒体源 ROS 的产生 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Fig. 9 SYB decrease the mitochondrial ROS induced by OA in differentiated SH-SY5Y cells ($n=3, \bar{x} \pm s$)

注:与分化组比较, ^{##} $P < 0.01$;与 OA 组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$

Note: Compared with differentiated group, ^{##} $P < 0.01$; Compared with OA group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$.

0.01);不同浓度的 SYB 与 OA 同时作用可浓度依赖性抑制 OA 所致的荧光强度的升高,表明 SYB 可改善 OA 对成熟神经元的氧化胁迫。

2.3.4 SYB 抑制 OA 所致线粒体源 ROS 产生

与 ATRA 组相比,OA 处理 6 h 后线粒体源活性氧水平明显升高($P < 0.01$);不同浓度 SYB 处理后线粒体源 ROS 水平下降且呈浓度依赖性,其中 0.5 和 1 $\mu\text{mol/L}$ SYB 组与 OA 组比较有极显著性差异($P < 0.01$)。实验结果表明,SYB 可抑制 OA 所致的线粒体源活性氧水平的增加,降低对线粒体呼吸链的损伤。

2.3.5 SYB 抑制 OA 所致线粒体膜电位的降低

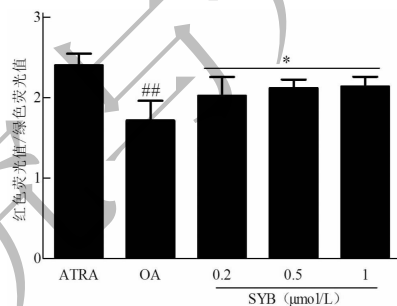


图 10 SYB 缓解 OA 所致分化的 SH-SY5Y 细胞线粒体膜电位的降低 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Fig. 10 SYB depress the decrease of mitochondrial membrane potential induced by OA in differentiated SH-SY5Y cells ($n=3, \bar{x} \pm s$)

注:与 ATRA 组比较, ^{##} $P < 0.01$;与 OA 组比较, ^{*} $P < 0.05$

Note: Compare with ATRA, ^{##} $P < 0.01$; Compare with OA, ^{*} $P < 0.05$.

JC-1 是一种广泛用于检测线粒体膜电位的阳离子脂质荧光染料。正常健康细胞线粒体膜电位较高,具有极性,JC-1 可迅速进入线粒体基质并形成多聚体,产生红色荧光(560 nm)。线粒体损伤膜电位下降,JC-1 为单体,产生绿色荧光(530 nm)。

由图 10 可知,与 ATRA 组相比,OA 组细胞线粒体膜电位水平极显著下降($P < 0.05$);与 OA 组比较,SYB 各浓度组线粒体膜电位水平明显高于 OA 组($P < 0.05$),随着 SYB 浓度升高,线粒体膜电位呈缓慢上升趋势。说明 OA 可明显损伤线粒体膜,导致线粒体膜电位降低,SYB 可抑制胞内和线粒体内 ROS 水平的升高从而降低 ROS 对线粒体膜的氧化损伤,有利于维持线粒体膜电位水平。

3 讨论

SH-SY5Y 细胞来源于不成熟肿瘤性神经脊细

胞,表达干细胞特性,可被 ATRA 和十四烷基酰佛波醇乙酸酯(TPA)等诱导分化成为具有功能的成熟神经元表型,因此可为体外神经学科学研究提供更好的细胞基础^[23]。我们之前的实验研究发现,可通过 ATRA 诱导 SH-SY5Y 细胞分化为成熟神经元细胞,经过 OA 处理可使突触萎缩,262 位点 tau 蛋白过度磷酸化建立体外 AD 模型^[21,24]。有文献报道,LiCl 为 GSK-3 β 的抑制剂,能够抑制分化神经元 tau 蛋白的磷酸化,缓解神经元突触损伤^[25],因此本实验采用 10 mmol/L LiCl 作为阳性对照。

Tau 蛋白的主要功能是结合微管,Tau 蛋白的结构域中含有带正电荷的氨基酸,因此可以与带负电荷的微管结合,人体内 Tau 有 6 种异构体,其差异由编码基因的选择性剪切造成^[26,27],此外,Tau 蛋白还可磷酸化和糖基化修饰,其中磷酸化是比较重要且复杂的过程。Tau 蛋白在磷酸化过程中是高度动态的,在胚胎中枢神经系统中 Tau 蛋白磷酸化水平比成人的中枢神经系统更高^[28]。在某些疾病条件下,Tau 蛋白磷酸化水平发生明显变化并聚集,例如阿尔兹海默,唐氏综合症等。在 AD 发生过程中,tau 蛋白过度磷酸化继而形成 NFTs,失去维持微管正常形态和功能的能力,造成神经元损伤^[29]。AD 动物或细胞模型中发现 Tau 蛋白多个位点的磷酸化如, Ser396、Ser262、Ser202、Thr205 等^[30]。之前研究表明,Ser262 位于微管结合区域,该位点的磷酸化会降低 tau 对微管的亲和力、引起微管的不稳定性^[31]并引起神经元损伤^[32],并且 tau 蛋白 Ser262 位点的磷酸化是 AD 发生过程中的早期事件,它的磷酸化会启动其他位点的磷酸化^[33]。OA 诱导神经元损伤可使 Ser262 位点磷酸化水平明显升高^[21,24]。本实验中 OA 处理(40 nmol/L,6 h)分化神经元,吉姆萨染色发现突触萎缩,从 Western Blot 结果可知 Tau 蛋白磷酸化水平显著升高($P < 0.01$)。

红花黄色素是我国批准并允许使用的天然色素,已列入我国国标 GB2760-1996 中,是国家级新药^[34]。近年来大量的实验研究发现,红花黄色素具有明显的神经保护功能,SYB 为红花黄色素主要有效成分之一,对鱼藤酮所致的帕金森小鼠有神经保护作用^[17]。同时,有体外细胞实验研究表明,SY 对 OA 损伤的未分化 SH-SY5Y 细胞具有保护作用^[35]。但是,对 SYB 在成熟神经元突触萎缩方面保护作用机制的体外研究较少。本研究先采用 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 ATRA 将 SH-SY5Y 细胞处理 4 d,分化为成熟的神

经元,再经 40 nmol/L OA 处理 6 h,建立突触萎缩、Tau 蛋白过度磷酸化的 AD 体外模型,并从 Tau 蛋白磷酸化的调控、活性氧产生及线粒体膜电位水平等方面的影响研究不同浓度的 SYB 对突触萎缩的保护作用及机制。

ROS 如过氧化氢、一氧化氮、羟自由基等,在正常情况下能够发挥细胞信使的作用,刺激细胞生长,但浓度过高时大量聚积引起脂质过氧化以及蛋白质变性,导致多种疾病的发生^[36]。研究表明,在 AD 患者及动物模型体内都发现 ROS 介导的氧化损伤^[37]。据文献报道,Tau 蛋白异常磷酸化过程中,线粒体功能受损导致大量的 ROS 生成并聚积,引起突触功能障碍;而氧化应激产生的 ROS 也会造成 Tau 蛋白过度磷酸化并聚积形成 NFTs,最终和老年斑一起导致 AD 形成^[38]。本研究发现,OA 致成熟神经元损伤后胞内和线粒体源 ROS 水平显著升高($P < 0.01$)。线粒体膜电位是线粒体通过呼吸链形成的电学梯度,为氧化磷酸化产生 ATP 提供基础,当细胞受损时,线粒体内膜通透性增加,膜电势降低^[39]。有研究表明,AD 患者脑细胞能量代谢异常,线粒体呼吸链受损、线粒体膜电位均发生变化^[36]。本研究发现,OA 损伤成熟神经元后,线粒体膜电位显著下降($P < 0.01$)。本实验利用 SH-SY5Y 细胞模型,研究 SYB 对 OA 所致成熟神经元突触萎缩的保护作用。结果表明,SYB(0.2 ~ 1 $\mu\text{mol/L}$)处理能浓度依赖性的减缓 OA 损伤的细胞突触萎缩程度,降低 Ser 262 位点 Tau 蛋白磷酸化水平,其保护作用机制可能与减少胞内及线粒体源 ROS 产生,提高线粒体膜电位有关。我们的研究为红花及其活性成分用于 AD 的治疗提供了一定的实验依据和支持。

参考文献

- 1 Selkoe D J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy [J]. *Physiological Reviews*, 2001, 81: 741-766.
- 2 Faivre E, Hölischer C. Neuroprotective effects of D-Ala 2 GIP on Alzheimer's disease biomarkers in an APP/PS1 mouse model [J]. *Alzheimers Res Ther*, 2013, 5(2): 20-31.
- 3 Zhang JS(张静爽), Wang R(王蓉). Research progress in the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. *J Capit Univ Med Sci(首都医科大学学报)*, 2014, 35: 721-724.
- 4 Huang MF(黄明发), Guo L(郭莉), Su XQ(苏学素), et al. Research advances of safflower yellow [J]. *China Condi-ment(中国调味品)*, 2008, 33(6): 24-28.

- 5 Chu Y(初阳), Song HT(宋洪涛), Chen DW(陈大为), *et al.* Extracting process for safflower yellow in carthamus tinctorius[J]. *China Tradit Herb Drugs* (中草药), 2006, 37(08):1161-1164.
- 6 Takahashi Y, Miyasaka N, Tasaka S, *et al.* Constitution of two coloring matters in the flower petals of carthamus tinctorius L [J]. *Tetrahedron Letters* 1982, 23:5163-5166.
- 7 Takahashi Y, Saito K, Yanagiya M, *et al.* Chemical constitution of safflor yellow B, a quinochalcone c-glycoside from the flower petals of carthamus tinctorius L. [J]. *Tetrahedron Letters*, 1984, 25:2471-2474.
- 8 Meselhy MR, Kadota S, Momose Y, *et al.* Two new quinochalcone yellow pigments from carthamus tinctorius and Ca²⁺ antagonistic activity of tinctormine [J]. *Chem Pharm Bull*, 1993, 41:1796-1802.
- 9 Wang J, Zhang Q, Mei X, *et al.* Hydroxysafflor yellow A attenuates left ventricular remodeling after pressure overload-induced cardiac hypertrophy in rats [J]. *Pharm Biol*, 2014, 52(1):31-35.
- 10 Wang CC, Choy CS, Liu YH, *et al.* Protective effect of dried safflower petal aqueous extract and its main constituent, carthamus yellow, against lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW264.7 macrophages [J]. *Sci Food Agr*, 2011, 91:218-225.
- 11 Zhang Y, Song L, Pan R, *et al.* Hydroxysafflor yellow A alleviates lipopolysaccharide-induced acute respiratory distress syndrome in mice [J]. *Biol Pharm Bull*, 2017, 40:135-144.
- 12 Dan H, Jie W, Rui Z, *et al.* Hydroxysafflor yellow A alleviates myocardial ischemia/reperfusion in hyperlipidemic animals through the suppression of TLR4 signaling [J]. *Sci Rep*, 2016, 6:35319-35332.
- 13 Kong SZ, Xian YF, Ip SP, *et al.* Protective effects of hydroxysafflor yellow A on β -amyloid-induced neurotoxicity in PC12 cells [J]. *Neurochem Res*, 2013, 38:951-960.
- 14 Ruan YY, Zhai W, Shi XM, *et al.* Safflower yellow ameliorates cognition deficits and reduces tau phosphorylation in APP/PS1 transgenic mice [J]. *Metab Brain Dis*, 2016, 31(5):1-10.
- 15 Ma Q, Ruan YY, Xu H, *et al.* Safflower yellow reduces lipid peroxidation, neuropathology, tau phosphorylation and ameliorates amyloid β -induced impairment of learning and memory in rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2015, 76:153-164.
- 16 Xu H(徐慧), Ma Q(马勤), Wang ZX(王志祥), *et al.* Effects of safflower yellow on D-galactose/sodium nitrite-induced learning and memory disorders in mice [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Clin Med* (中药药理与临床). 2013, 29(2):59-60.
- 17 Ablat N, Lv D, Ren R, *et al.* Neuroprotective effects of a standardized flavonoid extract from safflower against a rotenone-induced rat model of parkinson's disease [J]. *Molecules*, 2016, 21:1107.
- 18 Wang C, He Y, Yang M, *et al.* Safflor yellow B suppresses angiotensin II-mediated human umbilical vein cell injury via regulation of Bcl-2/p22(phox) expression [J]. *Toxicol Appl Pharm*, 2013, 273(1):59-67.
- 19 Wang C, Ma H, Zhang S, *et al.* Safflor yellow B suppresses pheochromocytoma cell (PC12) injury induced by oxidative stress via antioxidant system and Bcl-2/Bax pathway [J]. *N-S Arch Pharmacol*, 2009, 380:135-142.
- 20 Wang C, Zhang D, Li G, *et al.* Neuroprotective effects of safflor yellow B on brain ischemic injury [J]. *Exp Brain Res*, 2007, 177:533-539.
- 21 Si YY(侣营营), Yuan YF(袁玉婷), Qiu LH(邱理红), *et al.* Protective effect of methylene blue on neuronal damage induced by okadaic acid in differentiated SK-N-SH neuroblastoma cells [J]. *Food Science* (食品科学), 2016, 37:195-200.
- 22 Thiele CJ, Reynolds CP, Israel MA. Decreased expression of N-myc precedes retinoic acid-induced morphological differentiation of human neuroblastoma [J]. *Nature*, 1985, 313:404-406.
- 23 Singh J, Kaur G. Transcriptional regulation of polysialylated neural cell adhesion molecule expression by NMDA receptor activation in retinoic acid-differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cultures [J]. *Behav Brain Res*, 2007, 1154(1):8-21.
- 24 Yuan YT(袁玉婷), Si YY(侣营营), Wang ZY(王占洋), *et al.* Protective effect of lithium chloride on synaptic atrophy of SK-N-SH neurons induced by okadaic acid [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2016, 32:670-675.
- 25 Aghdam SY, Barger SW. Glycogen synthase kinase-3 in neurodegeneration and neuroprotection; lessons from lithium [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2007, 4(1):21-31.
- 26 Butner KA, Kirschner MW. Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites [J]. *J Cell Biol*, 1991, 115(3):17-30.
- 27 Levy SF, Leboeuf AC, Massie MR, *et al.* Three- and four-repeat tau regulate the dynamic instability of two distinct microtubule subpopulations in qualitatively different manners implications for neurodegeneration [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280:13520.
- 28 Huang Y, Wu Z, Zhou B. Behind the curtain of tauopathy: a show of multiple players orchestrating tau toxicity [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(1):1-21.
- 29 Cárdenasaguayo MDC, Gómezvirgilio L, Derosa S, *et al.* The

- role of tau oligomers in the onset of alzheimer's disease neuropathology[J]. *Acs Chem Neuro Sci*,2014,5(12):78-91.
- 30 Augustinack J C, Schneider A, Mandelkow E M, *et al.* Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease[J]. *Acta Neuropathol*, 2002,103(1):26-35.
- 31 Biernat J, Gustke N, Drewes G, *et al.* Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules; distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding[J]. *Neuron*,1993,11:153-163.
- 32 Qureshi H Y, Han D, Macdonald R, *et al.* Overexpression of 14-3-3z promotes tau phosphorylation at Ser262 and accelerates proteosomal degradation of synaptophysin in rat primary hippocampal neurons[J]. *PLoS One*,2013,8(12):e84615.
- 33 Van D T, Princen K, De W K, *et al.* Derailed intraneuronal signalling drives pathogenesis in sporadic and familial Alzheimer's disease [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014:167024.
- 34 Wan Q(万秋), Liu XM(刘秀明), Yang WT(杨文婷), *et al.* Advance in research of safflower yellow pigment [J]. *Chem Life(生命的化学)*,2013,33(2):54-58.
- 35 Ma Q(马勤), Ruan YY(阮影影), Shi XM(施晓萌), *et al.* Study on regulatory effects of safflower yellow on tau protein hyperphosphorylation in SH SY-5Y cell induced by okadaic acid[J]. *Chin Pharm J(中国药理学杂志)*,2016,51:213-217.
- 36 Bhat AH, Dar KB, Anees S, *et al.* Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight[J]. *Retour au numéro*,2015,74:101.
- 37 Lv JN(吕加恩). Advances in antioxidant approaches to AD treatment[J]. *Strait Pharm J(海峡药理学)*,2015,27(7):1-7.
- 38 Su B, Wang XH. Chronic oxidative stress causes increased tau phosphorylation in M17 neuroblastoma cells[J]. *Neurosci Lett*,2010,468:267-71.
- 39 Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death[J]. *Nat Med*,2000,6:513.

(上接第 389 页)

- 10 Lambert MP, Velasco PT, Chang L, *et al.* Monoclonal antibodies that target pathological assemblies of A β [J]. *J Neur*, 2007,100(1):23-35.
- 11 Akiyama H, Barger S, Barnum S, *et al.* Inflammation and Alzheimer's disease [J]. *Neurobiology of Aging*, 2000, 21:383-421.
- 12 Vehmas AK, Kawas CH, Stewart W, *et al.* Immune reactive cells in senile plaques and cognitive decline in Alzheimer's disease [J]. *Neurobiology of Aging*, 2003, 24:321-331.
- 13 Lubber-Narod J, Rogers J. Immune system associated antigens expressed by cells of the human central nervous system [J]. *Neuroscience Letters*, 1988, 94(1):17-22.
- 14 Dandrea MR, Reiser PA, Gumula NA, *et al.* Application of triple immunohistochemistry to characterize amyloid plaque-associated inflammation in brains with Alzheimer's disease [J]. *Biotechnic and Histochemistry*, 2001, 76:97-106.
- 15 McGeer EG, McGeer PL. Inflammatory processes in Alzheimer's disease [J]. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 2003, 27:741-749.
- 16 McGee PL, McGeel E. Is there a futufa for vaccination as a treatment for Alzhelmer's disease [J]. *Neurobiology of Ag-*
- ing*, 2003, 240:391-395.
- 17 Jana A, Pahan K. Fibrillar amyloid-beta-activated human astroglia kill primary human neurons via neutral sphingomyelinase; implications for Alzheimer's disease [J]. *Journal of Neuroscience*, 2010, 30:12676-12689.
- 18 Garwood CJ, Pooler AM, Atherton J, *et al.* Astrocytes are important mediators of A β -induced neurotoxicity and tau phosphorylation in primary culture [J]. *Cell Death and Disease*, 2011, 2:e167.
- 19 Anisman H. Cascading effects of stressors and inflammatory immune system activation; implications for major depressive disorder [J]. *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 2009, 34:4-20.
- 20 Cunningham C, Wilcockson DC, Boche D, *et al.* Comparison of inflammatory and acute-phase responses in the brain and peripheral organs of the ME7 model of prion disease [J]. *J Virology*, 2005, 79:5174-5184.
- 21 Piermartiri TC, Figueiredo CP, Rial D, *et al.* Atorvastatin prevents hippocampal cell death, neuroinflammation and oxidative stress following amyloid-beta (1-40) administration in mice; evidence for dissociation between cognitive deficits and neuronal damage [J]. *Exp Neur*, 2010, 226:274-284.