

细叶远志皂苷在 $A\beta_{23-35}$ 诱导 SH-SY5Y 细胞氧化损伤中的作用及机制研究

王琳, 金桂芳, 余河汉, 李巧, 杨红*

广东药科大学生命科学与生物制药学院, 广州 510006

摘要:为研究细叶远志皂苷(tenuifolin, TEN)在 $A\beta_{25-35}$ 诱导 SH-SY5Y 细胞氧化损伤中的作用,并探讨其作用机制。建立 $A\beta_{25-35}$ 诱导的细胞损伤模型,细叶远志皂苷以及自噬抑制剂 3-MA 进行干预,显微镜观察细胞形态变化,试剂盒检测细胞氧化应激水平,RT-qPCR 和 Western blot 检测细叶远志皂苷以及自噬抑制剂干预前后 Beclin-1、LC3、mTOR、AMPK 和 ULK1 mRNA 及蛋白水平变化。结果发现,TEN 改善 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞形态损伤和细胞活力下降;降低 ROS 和 MDA 浓度,并提高 SOD、GSH-Px 及过氧化氢酶的活性;增加 AMPK 和 ULK1 的表达,减少 mTOR 的表达及增加 Beclin-1 和 LC3-II/I 的表达水平。而加入 3-MA 会拮抗 TEN 的作用。总之,TEN 可能通过调控 AMPK/mTOR/ULK1 通路,增加 Beclin-1 及 LC3-II/I 蛋白水平激活自噬,进而改善 $A\beta_{25-35}$ 诱导的细胞形态损伤和细胞活力下降,提高细胞抗氧化应激能力,发挥神经保护作用。

关键词:细叶远志皂苷;阿尔兹海默症; β -淀粉样蛋白 25-35;细胞自噬;氧化应激

中图分类号:R285

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)9-1537-06

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.9.008

Effects of tenuifolin against oxidative damage induced by $A\beta_{25-35}$ in SH-SY5Y cells and underlying mechanisms

WANG Lin, JIN Gui-fang, YU He-han, LI Qiao, YANG Hong*

College of Life Sciences and Biopharmaceuticals of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

Abstract:In order to investigate the effects of tenuifolin (TEN) in the induction of SH-SY5Y cell oxidative damage induced by $A\beta_{25-35}$ and the underlying mechanisms. $A\beta_{25-35}$ -induced cell injury models were established. Interferon TEN and autophagy inhibitor 3-MA were intervened. The morphological changes were observed by microscopy. The oxidative stress levels were detected by kits. RT-PCR and Western blot were used to detect the changes in Beclin-1, LC3, mTOR, AMPK and ULK1 mRNA and protein levels before and after TEN and 3-MA. It was found that TEN improved the morphological damage and cell viability of SH-SY5Y cells induced by $A\beta_{25-35}$. Compared with $A\beta_{25-35}$ group, TEN decreased the concentration of ROS and MDA, and increased the activity of SOD, GSH-Px and CAT. The expression levels of LC3-II/I and Beclin-1 increased in $A\beta_{25-35}$ group, and it's further increased in TEN group. And TEN increased the expression of AMPK and ULK1, decreased the expression of mTOR. The addition of 3-MA antagonizes the action of TEN. However, 3-MA reversed the effects of TEN. In conclusion, it can be proved that TEN may activate autophagy by regulating AMPK/mTOR/ULK1 pathway to inhibit the cell oxidative damage induced by $A\beta_{25-35}$, and play a neuroprotective role.

Key words:tenuifolin; Alzheimer's disease; β -amyloid protein 25-35; autophagy; oxidative stress

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种以认知和记忆损害为特征的神经退行性疾病,以细胞外 β -淀粉样蛋白(β -amyloid protein, $A\beta$)在脑内异

常沉积为主要病理特征^[1]。 $A\beta$ 在脑内沉积会引起 ROS 过量产生,造成脂质、蛋白质和核酸等生物大分子过氧化,从而引起细胞和机体损伤,最终导致神经系统损伤^[2,3]。在 AD 研究中,常使用 $A\beta$ 片段如 $A\beta_{25-35}$ 及 $A\beta_{1-42}$ 在细胞上造 AD 模型进行体外研究,该类模型具有与 AD 患者相似的生物学特性,如原纤维形成,诱导自由基生成,神经毒性等^[4]。自噬

收稿日期:2019-03-26 接受日期:2019-06-25

基金项目:广州市科技计划(201707010409);广州市特色创新类项目(2017KTSX105)

* 通信作者 E-mail: yanghong2329@163.com

起到消除异常聚集蛋白和受损细胞器的关键作用,对维持细胞内稳态非常重要^[5]。自噬功能会随着年龄增长而减退,导致细胞内毒性蛋白的异常聚集,从而增加 AD 发生的风险^[6]。研究发现,自噬诱导剂能通过激活自噬,减少线粒体 ROS 释放,减轻 $A\beta_{1-42}$ 诱导的 PC-12 细胞损伤,而自噬抑制剂会加剧 $A\beta_{1-42}$ 引起的细胞损伤^[7,8]。

中药远志具有安神益智的功效,常用于心肾不交导致的失眠多梦、健忘惊悸,神志恍惚等症。细叶远志皂苷是远志的主要活性成分,能够显著抑制 $A\beta_{25-35}$ 引起的 PC12 细胞凋亡和小鼠认知功能障碍,并显著改善海马注射 $A\beta_{25-35}$ 后小鼠的认知缺陷^[9]。TEN 化学性质稳定,且其在脑脊液中的消除半衰期长^[10],这些发现提示了 TEN 在临床上防治 AD 的潜力。最近研究发现,远志可通过诱导自噬减少 $A\beta$ 的分泌起神经保护作用^[11]。因此,本研究讨论 TEN 通过调控细胞自噬,减少人神经母细胞瘤细胞株 (SH-SY5Y) 细胞 $A\beta_{25-35}$ 诱导的氧化反应,并探讨 TEN 抑制 $A\beta_{25-35}$ 毒性的作用和机制,为 TEN 防治 AD 提供基础研究依据。

1 材料与方法

1.1 材料

TEN 购自成都普菲德生物技术有限公司,纯度为 99.8%; $A\beta_{25-35}$ 购自美国 Sigma 公司; MTT 购自广州翔博生物科技有限公司; 3-MA 购自美国 Selleck Chemicals 公司; ROS、SOD、过氧化氢酶检测试剂盒购自碧云天生物技术有限公司; MDA、GSH-Px 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 引物由华大基因设计; PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time)、SYBR® Premix Ex Taq™ (TliRNaseH Plus) 购自日本 TaKaRa 公司; Rabbit anti- β -actin、Goat anti-Rabbit 二抗购自北京博奥森生物技术有限公司; Rabbit anti-Becn1-1、Rabbit anti-LC3、Rabbit anti-mTOR、Rabbit anti-AMPK、Rabbit anti-ULK1 (Abcam 公司)。

1.2 SH-SY5Y 细胞培养

SH-SY5Y 细胞接种于含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基中,于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。当细胞密度达到 70% ~ 80% 时,可进行细胞传代,取对数生长期的细胞进行实验。

1.3 MTT 检测细胞活力

SH-SY5Y 细胞生长至对数期,以 5×10^3 个/孔随机接种于 96 孔板中,每组 5 个复孔。分组如下:

Control; $A\beta_{25-35}$ (20 $\mu\text{mol/L}$); TEN (50 $\mu\text{mol/L}$); 3-MA (10 mmol/L); $A\beta_{25-35}$ (20 $\mu\text{mol/L}$) + TEN (50 $\mu\text{mol/L}$); 3-MA (10 mmol/L) + $A\beta_{25-35}$ (20 $\mu\text{mol/L}$); 3-MA (10 mmol/L) + TEN (50 $\mu\text{mol/L}$) + $A\beta_{25-35}$ (20 $\mu\text{mol/L}$)。先加入 TEN 或 3-MA 预处理 2 h,再加入 $A\beta_{25-35}$ 共同处理 24 h。每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 试剂 10 μL , 37 °C 孵育 4 h 后避光吸弃孔内液体,每孔加入 DMSO 150 μL , 于摇床上低速震荡 10 min,充分溶解结晶,用酶标仪在 490nm 波长处测定 A 值。实验重复 3 次,细胞存活率% = $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{调零组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{调零组}}) \times 100\%$ 。

1.4 观察细胞形态

取对数生长期的 SH-SY5Y 细胞,以 3×10^4 个/孔接种于 6 孔板中。分组如 1.3。37 °C 孵育 24 h 后,倒置显微镜下观察细胞形态并拍照。

1.5 DCFH-DA 荧光探针检测 ROS 水平

SH-SY5Y 细胞生长至对数期,以 3×10^4 个/孔接种于 6 孔板中。分组如下: Control; $A\beta_{25-35}$ (20 $\mu\text{mol/L}$); $A\beta_{25-35}$ (20 $\mu\text{mol/L}$) + TEN (50 $\mu\text{mol/L}$); 3-MA (10 mmol/L) + TEN (50 $\mu\text{mol/L}$) + $A\beta_{25-35}$ (20 $\mu\text{mol/L}$)。先加入 TEN 和 3-MA 预处理 2 h,再加入 $A\beta_{25-35}$ 共同处理 24 h。收集细胞,将细胞重悬吸至 1.5 mL EP 管中,每管加入 10 μM 的 DCFH-DA 200 μL , 37 °C 孵育 30 min。每隔 3 ~ 5 min 颠倒混匀一下,使探针和细胞充分接触。用 DMEM 培养基洗涤细胞 3 次,充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。使用荧光酶标仪对各组细胞荧光值进行检测。实验重复 3 次。

1.6 试剂盒检测 MDA、SOD、GSH-Px 和过氧化氢酶 (CAT) 含量

按 1.5 培养细胞,收集细胞上清液及裂解液,按说明书进行操作,测定 SH-SY5Y 细胞内 MDA、SOD、GSH-Px 和过氧化氢酶含量,实验重复 3 次。

1.7 RT-qPCR 分析

按 1.5 培养细胞,用 Trizol 提取细胞总 RNA,并用微量紫外/可见分光光度计测 OD_{260/280} 值及 RNA 浓度。按照 TaKaRa 的 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 试剂盒说明书进行逆转录反应。将得到的 cDNA 按 TaKaRa 的 SYBR® Premix Ex Taq™ (TliRNaseH Plus) 试剂盒说明书用 CFX96 Real-Time PCR Detection System 进行荧光定量 PCR 反应。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因 Gene	引物序列 Sequence (5'-3')
Beclin-1	Forward: CCATGCAGGTGAGCTTCGT
	Reverse: GAATCTCGGAGAGACACCATC
LC3	Forward: AACATGAGCGAGTTGGTCAAG
	Reverse: GCTCGTAGATGTCCGGAT
ULK1	Forward: CCAGAGCAACATGATGGCC
	Reverse: CCTTCCCGTCTAGTGCTG
mTOR	Forward: ATGCTTGAACCGGACCTG
	Reverse: TCTTGACTCATCTCTCGGAGTT
AMPK	Forward: GTGAAGATCGGACACTACGTG
	Reverse: CTGCCACTTTATGGCCTGTTA
β -actin	Forward: CATGTACGTTGCTATCCAGGC
	Reverse: CTCCTTAATGTCACGCACGAT

1.8 Western blot 分析

按 1.5 培养细胞, 用含有 PMSF 的 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白, 以 12 000 g、4 °C 离心 5 min, BCA 法测定蛋白浓度。根据蛋白分子量, 配制 12% 和 6% 的分离胶及 5% 的浓缩胶, 设置 80 V、30 min 和 120 V、60 min 进行 SDS-PAGE 电泳, 设置 200 mA、90 min 进行湿转, 5% 脱脂奶粉封闭, 一抗 4 °C 孵育过夜, 二抗室温孵育 1 h。TBST 洗膜后用 ECL 显色液激发化学发光, 曝光, β -actin 作为内参。应用 Image J 软件对条带进行灰度值比较。

1.9 统计学分析

用统计软件 SPSS 21.0 进行分析, 当 $P < 0.05$ 时有统计学意义。各组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 两组间比较采用 t 检验, 实验数据以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 的方式表示, 所有实验均重复 3 次。

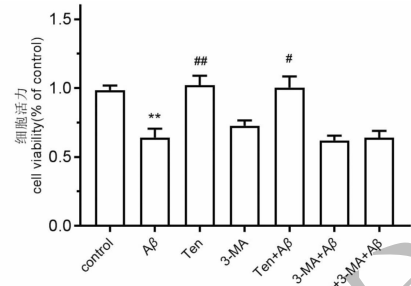
2 结果

2.1 TEN 对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的细胞活力的影响

如 Fig. 1 所示, MTT 结果显示, $A\beta_{25-35}$ 组细胞活力显著降低 ($P < 0.01$), TEN 组细胞活力基本无变化, 3-MA 组细胞活力下降, 但与对照组比无显著性差异, TEN + $A\beta_{25-35}$ 组细胞活力显著高于 $A\beta_{25-35}$ 组, 含有 3-MA 的实验组细胞活力都显著下降 ($P < 0.05$)。结果表明, TEN 对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞活力损伤具有保护作用, 其作用可被 3-MA 抑制。

2.2 TEN 对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的细胞形态的影响

如 Fig. 2 所示, Control 组细胞密度大, 贴壁能力

图 1 $A\beta_{25-35}$ 和 TEN 对 SH-SY5Y 细胞活力的影响Fig. 1 The effects of $A\beta_{25-35}$

and TEN on the viability of the SH-SY5Y cells

注: 与正常组相比, ** $P < 0.01$; 与 $A\beta_{25-35}$ 组比较, ## $P < 0.01$, # $P < 0.05$ 。Notes: ** $P < 0.01$ vs control; # $P < 0.05$ vs $A\beta_{25-35}$; ## $P < 0.01$ vs $A\beta_{25-35}$.

强, 生长状态好 (图 2A), $A\beta_{25-35}$ 组细胞数量明显减少, 贴壁性变差, 折光性减弱, 形态变差 (图 2B)。TEN 组细胞生长状态好 (图 2C), 3-MA 组细胞胞体出现明显皱缩, 胞体边缘模糊 (图 2D), $A\beta_{25-35}$ + TEN 组细胞折光性变强, 细胞状态良好 (图 2E), $A\beta_{25-35}$ + 3-MA 组细胞出现明显聚集状态, 折光性变差 (图 2F), TEN + 3-MA + $A\beta_{25-35}$ 组, 细胞数比 TEN + $A\beta_{25-35}$ 组少, 但细胞生长状态基本正常 (图 2G)。结果表明, TEN 能改善 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞形态损伤, 其作用可被 3-MA 抑制。

2.3 TEN 对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的氧化应激的影响

如 Fig. 3 所示, $A\beta_{25-35}$ 组 SH-SY5Y 细胞的 ROS、MDA 水平显著增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 而 SOD、GSH-Px 和过氧化氢酶的活性显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与 $A\beta_{25-35}$ 组相比, TEN 能显著减少 ROS、MDA 的产生而增加 GSH-Px 和 CAT 酶的活性 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 同时 3-MA 会拮抗 TEN 的作用。结果表明, TEN 显著提高 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞氧化应激水平, 其作用部分可被 3-MA 拮抗。

2.4 TEN 对自噬标志蛋白 Beclin-1 和 LC3 表达水平的影响

如 Fig. 4A RT-PCR 结果显示, $A\beta_{25-35}$ 显著增加 Beclin-1 ($P < 0.01$) 和 LC3 ($P < 0.05$) 的 mRNA 水平, 与 $A\beta_{25-35}$ 组相比, TEN 进一步增加了 Beclin-1 和 LC3 mRNA 的表达 ($P < 0.05$), 而 3-MA 减少 TEN 诱导的 Beclin-1 和 LC3 mRNA 的表达。Fig. 4BC Western blot 结果显示, $A\beta_{25-35}$ 显著增加了 Beclin-1 蛋白表达水平 ($P < 0.01$), 但对 LC3-II/I 蛋白表达

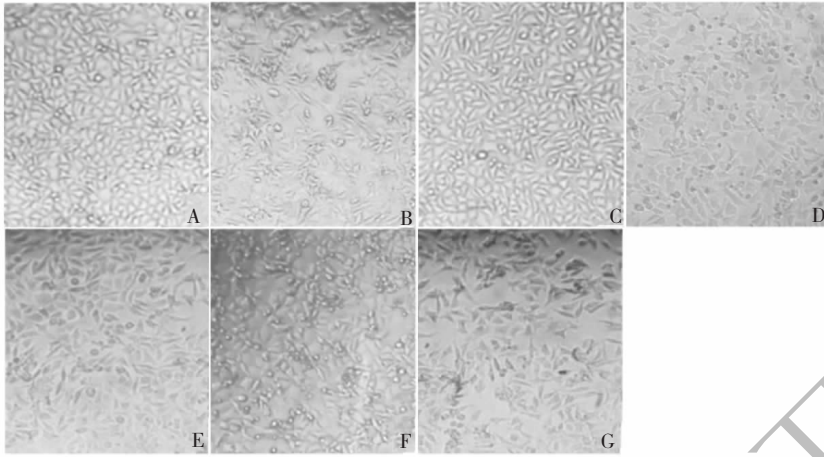


图2 $A\beta_{25-35}$ 和 TEN 对 SH-SY5Y 细胞的形态学的影响 ($\times 200$)

Fig. 2 Morphological changes of SH-SY5Y cells by $A\beta_{25-35}$ and TEN treatment ($\times 200$)

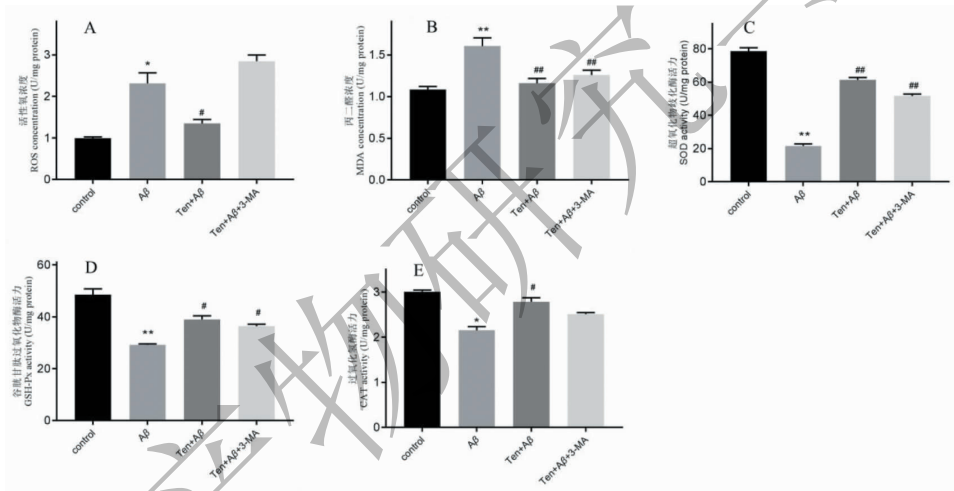


图3 TEN 对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的氧化应激的影响

Fig. 3 The effects of TEN on the oxidative stress induced by $A\beta_{25-35}$

注:与正常组相比,** $P < 0.01$, * $P < 0.05$;与 $A\beta_{25-35}$ 组比较,## $P < 0.01$,# $P < 0.05$ 。Notes: * $P < 0.05$ vs control; ** $P < 0.01$ vs control; # $P < 0.05$ vs $A\beta_{25-35}$; ## $P < 0.01$ vs $A\beta_{25-35}$ 。

水平影响没有显著性差异,与 $A\beta_{25-35}$ 组相比,TEN 进一步增加了 Beclin-1 和 LC3-II/I 蛋白表达水平 ($P < 0.01$),而 3-MA 减少 TEN 诱导的 Beclin-1 和 LC3-II/I 蛋白表达。以上结果表明 $A\beta_{25-35}$ 诱导增加 SH-SY5Y 细胞内自噬的发生,而 TEN 作用进一步增加自噬的发生。

2.5 TEN 对 SH-SY5Y 细胞中的 mTOR、AMPK 和 ULK1 表达水平的影响

如 Fig 5. A RT-PCR 结果显示, $A\beta_{25-35}$ 显著增加了 mTOR mRNA 表达水平 ($P < 0.01$),并显著降低了 AMPK 和 ULK1 mRNA 水平 ($P < 0.01$),与 $A\beta_{25-35}$

组相比,TEN 显著降低了 mTOR mRNA 表达水平 ($P < 0.01$),并显著升高了 AMPK 和 ULK1 mRNA 水平 ($P < 0.01$),而 3-MA 增加 TEN 诱导的 mTOR 和 ULK1 mRNA 的表达,减少 TEN 诱导的 AMPK mRNA 的表达。图 5. BC Western blot 结果显示, $A\beta_{25-35}$ 显著增加了 mTOR 蛋白表达水平 ($P < 0.01$),并显著降低了 AMPK 和 ULK1 蛋白表达水平 ($P < 0.01$),与 $A\beta_{25-35}$ 组相比,TEN 显著降低了 mTOR 蛋白表达水平 ($P < 0.01$),并显著升高了 AMPK 和 ULK1 蛋白表达水平 ($P < 0.01$),而 3-MA 增加 TEN 诱导的 mTOR 和 ULK1 蛋白表达,减少 TEN 诱导的

AMPK mRNA 的蛋白表达。结果表明, TEN 可能通过调控 AMPK/mTOR/ULK1 通路激活细胞自噬, 起到神经保护作用。

3 结论

AD 是常见的神经退行性疾病, 其病理特征主要包括脑内 $A\beta$ 异常沉积, Tau 蛋白过度磷酸化所致神经元纤维缠结, 神经元死亡等^[1]。 $A\beta_{25-35}$ 是 $A\beta$ 的毒性片段, 可导致神经元纤维形成, 诱导自由基生成, 产生神经毒性等^[12], 广泛用于 AD 动物模型和细胞模型的建立。远志是中草药中记载的药用植物, 长期用于治疗记忆丧失和改善认知功能^[13]。TEN 是一种提取自远志的活性成分, 其极易进入大脑并显著改善老年小鼠的记忆和学习能力^[9,10], 此外, TEN 被证明可以保护 PC12 细胞免受 $A\beta_{25-35}$ 诱导的细胞凋亡^[9]。通过建立 $A\beta_{25-35}$ 诱导的细胞模型,

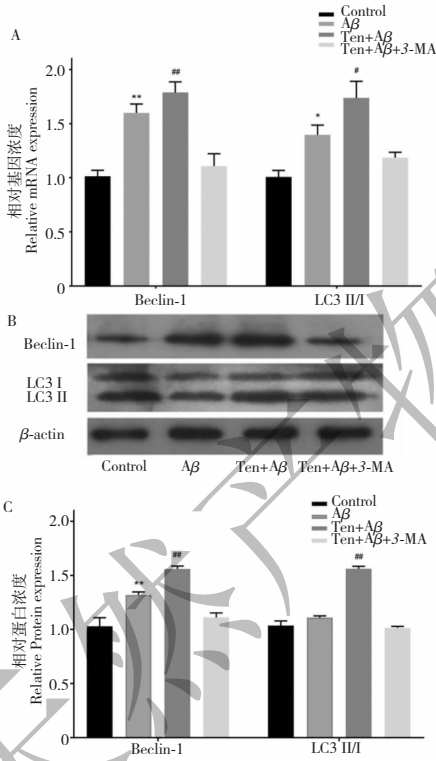


图4 TEN对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 SY5Y 细胞中 LC3-II 和 Beclin-1 表达的影响 RT-PCR (A), Western blot (B) 和定量分析 (C)

Fig. 4 Effects of TEN on expression of LC3-II and Beclin-1 in SY5Y cells induced by $A\beta_{25-35}$ detected by RT-PCR (A), Western blot (B) and confocal microscope (C)
注: 与正常组相比, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$; 与 $A\beta_{25-35}$ 组比较, ### $P < 0.01$, # $P < 0.05$ 。Notes: * $P < 0.05$ vs control; ** $P < 0.01$ vs control; # $P < 0.05$ vs $A\beta_{25-35}$; ### $P < 0.01$ vs $A\beta_{25-35}$.

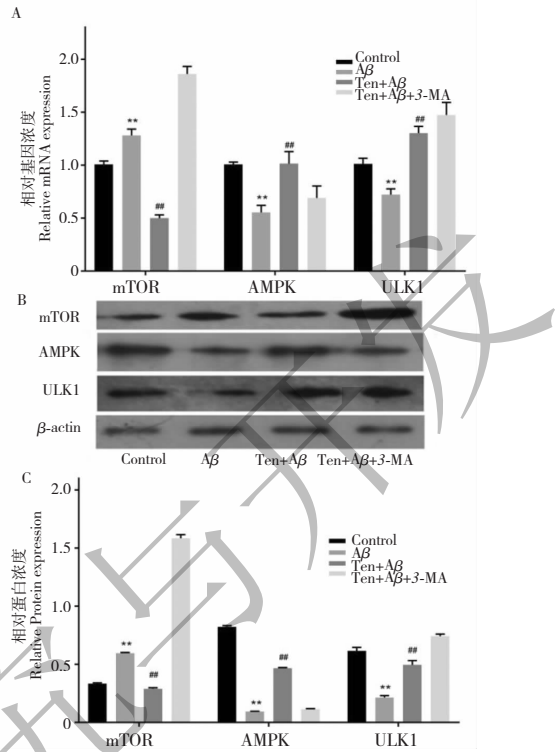


图5 TEN对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞中 mTOR, AMPK 和 ULK1 表达的影响 RT-PCR (A), Western blot (B) 和定量分析 (C)

Fig. 5 Effects of TEN co-treatment on expression of mTOR, AMPK and ULK1 in SY5Y cells induced by $A\beta_{25-35}$ detected by RT-PCR (A), Western blot (B) and confocal microscope (C)
注: 与正常组相比, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$; 与 $A\beta_{25-35}$ 组比较, ### $P < 0.01$, # $P < 0.05$ 。Notes: * $P < 0.05$ vs control; ** $P < 0.01$ vs control; # $P < 0.05$ vs $A\beta_{25-35}$; ### $P < 0.01$ vs $A\beta_{25-35}$.

我们发现 TEN 可以改善 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞形态变异和活力下降, 而自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤 (3-Methyladenine, 3-MA) 能拮抗 TEN 的作用。

氧化还原平衡是细胞生存的必要条件^[14]。 $A\beta$ 在脑内沉积能引起氧化应激, 而氧化应激也能反过来促进 $A\beta$ 在脑内的聚集, 导致 DNA 受损、线粒体功能紊乱、膜稳定性降低和细胞凋亡等神经毒性, 进一步加快 AD 发展^[15]。Song Y 等^[8] 发现雷帕霉素通过上调自噬, 增强 PC12 细胞对损伤线粒体的清除能力, 继而减少了 H_2O_2 诱导的 ROS 释放, 降低细胞死亡率。相反, 3-MA 下调自噬, 抑制线粒体自噬过程, 导致损伤线粒体在细胞中累积, 并释放大量的 ROS 进入细胞质导致细胞死亡, 提示激活自噬能拮抗氧化应激损伤。张晶等^[16] 发现远志皂苷元能减少 H_2O_2 模型鼠海马神经元的 MDA 含量, 升高 SOD 活性, 从而提高海马神经元的抗氧化能力。本研究

结果表明, TEN 能减轻 $A\beta_{25-35}$ 对 SH-SY5Y 细胞的氧化应激作用, 其作用可被而 3-MA 逆转。

细胞通过自噬-溶酶体降解机制, 对异常蛋白质和受损细胞器进行分解, 维持细胞内稳态, 增强细胞的活力^[17]。Beclin-1 是调节自噬体起始物质组装的分子平台, 其激活可以上调自噬。有研究表明, Beclin-1 基因敲除的小鼠会因缺乏自噬活性而导致神经退行病变^[18]。此外, 当自噬发生时, LC3-I 会脂化为 LC3-II 定位于自噬体上, 因此 LC3-II/I 常作为自噬的标志蛋白来检测自噬水平。研究发现, 远志能通过 mTOR/AMPK 通路加速异常蛋白的清除以及减少 APP/BACE1 细胞中 $A\beta$ 的产生^[19]。哺乳动物雷帕霉素靶酶 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 是一种蛋白激酶, 是自噬的负调控因子, 对维持神经细胞正常功能起重要作用。腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine 5'-monophosphate AMP-activated protein kinase, AMPK) 可在细胞内缺乏能量时被激活, 被活化的 AMPK 会抑制 mTOR, 从而促进自噬体形成。ULK1 是 Atg1 的同源物, 激活 mTOR 能够抑制 ULK1 活性而抑制自噬, 而 AMPK 能诱导 ULK1 的磷酸化而激活自噬^[19]。本研究结果显示, TEN 增加 $A\beta_{25-35}$ 诱导的细胞内 Beclin-1 和 LC3-II/I 水平, 其激活细胞自噬的过程可能与 mTOR/AMPK/ULK1 信号通路有关。

总之, 我们的研究结果表明 TEN 可通过调控 mTOR/AMPK/ULK1 通路增强细胞自噬, 降低 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞氧化应激损伤, 增强细胞活力和改善细胞形态, 发挥抑制毒性的神经保护作用。调节细胞自噬是治疗 AD 的潜在策略之一, 而 TEN 可能是一种涉及到多机制的药物, 其调控细胞自噬机制还需进一步的研究。

参考文献

- 1 Yu Y, Yu G, He W. Effects of imperatorin on oxidative stress response in the hippocampus of the mouse model of Alzheimer's disease induced by $A\beta_{1-42}$ [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2018, 30:141-144.
- 2 Butterfield DA, Drake J, Pocernich C, et al. Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain; central role for amyloid β -peptide [J]. Trends Mol Med, 2001, 7:548-554.
- 3 Yatina SM, Varadarajana S, Linkb CD, et al. *In vitro* and *in vivo* oxidative stress associated with Alzheimer's amyloid beta-peptide (1-42) [J]. Neurobiol Aging, 1999, 20:325-330.
- 4 Yankner B, Duffy L, Kirschner D. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein; Reversal by tachykinin neuropeptides [J]. Science, 1990, 250:279-282.

- 5 Kenific CM, Debnath J. Cellular and metabolic functions for autophagy in cancer cells [J]. Trends Cell Bio, 2015, 25 (1):37-45.
- 6 Dibble CC, Cantley LC. Regulation of mTORC1 by PI3K signaling [J]. Trends Cell Bio, 2015, 25:545-555.
- 7 Xue Z, Guo Y, Fang Y. Moderate activation of autophagy regulates the intracellular calcium ion concentration and mitochondrial membrane potential in beta-amyloid-treated PC12 cells [J]. Neurosci Lett, 2016, 618:50-57.
- 8 Song Y, Xue H, Liu T, et al. Rapamycin plays a neuroprotective effect after spinal cord injury via anti-inflammatory effects [J]. J Biochem Mol Toxic, 2015, 29 (1):29.
- 9 Liu YM, Li ZY, Hu H, et al. Tenuifolin, a secondary saponin from hydrolysates of polygalasaponins, counteracts the neurotoxicity induced by $A\beta_{25-35}$ peptides *in vitro* and *in vivo* [J]. Pharmacol Biochem Be, 2015, 128:14-22.
- 10 Reeru M, Chiranjivi T, Wang N, et al. Identification of polygalasaponins and their metabolites *in vivo* from ethanol extract of Kaixinsan [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2017, 23:118-123.
- 11 Zhao H, Wang ZC, Wang KF, et al. $A\beta$ peptide secretion is reduced by radix polygalae-induced autophagy via activation of the AMPK/mTOR pathway [J]. Mol Med Rep, 2015, 12:2771-2776.
- 12 Gou X, Huang SY, Yao XM, et al. Effects of total flavone in *Portulacaoleracea* L. on learning and memory of Alzheimer's disease mice caused by $A\beta_{25-35}$ [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2017, 29:1846-1850.
- 13 Park CH, Choi SH, Koo JW, et al. Novel cognitive improving and neuroprotective activities of polygala tenuifolia willdenow extract [J]. J Neurosci Res, 2002, 70:484-492.
- 14 Liu XJ, Yang W, Qi JS. Oxidative stress and Alzheimer's disease [J]. Acta Physiologica Sinica (生理学报), 2012, 64 (1):87-95.
- 15 Zhou Y, Yan LR, Yuan SF, et al. Oxidative stress in Alzheimer disease [J]. Life Sci Res (生命科学研究), 2015, 19:265-275.
- 16 Zhang J, Qi RW, Wang ZG, et al. Effect of senegenin on H_2O_2 -induced damage in hippocampal neurons of SD rats [J]. Chin J Pathophysiol (中国病理生理杂志), 2011, 27:1059-1065.
- 17 Kenific CM, Debnath J. Cellular and metabolic functions for autophagy in cancer cells [J]. Trends in Cell Bio, 2015, 25 (1):37-45.
- 18 Li Q, Liu Y, Sun M. Autophagy and Alzheimer's disease [J]. Cell Mol Neurobiol, 2017, 37 (3):1-12.
- 19 Zhao H, Wang ZC, Wang KF, et al. $A\beta$ peptide secretion is reduced by Radix Polygalae-induced autophagy via activation of the AMPK/mTOR pathway [J]. Mol Med Rep, 2015, 12:2771-2776.