

靶向探针追踪 $A\beta_{25-35}$ 的亚细胞定位并基于 Nrf2 通路探讨阿里红多糖对线粒体损伤的保护机制

阿依江·哈拜克, 王晓梅, 闫冬, 李敏, 帕丽达·阿不力孜*

新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011

摘要: 用靶向探针追踪淀粉样蛋白 ($A\beta_{25-35}$) 的亚细胞定位情况, 同时基于 Nrf2 信号通路探讨阿里红多糖组分 (FOAPs-a) 和 (FOAPs-b) 对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞线粒体损伤通路的保护作用机制。采用 40 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞建立阿尔茨海默病 (AD) 细胞模型, 将 PC12 细胞分为空白组、模型组 (加 40 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$)、阳性组 (加 50 $\mu\text{mol/L}$ 盐酸多奈哌齐)、不同浓度的 FOAPs-a 和 FOAPs-b 干预组 (各 50、100、200 $\mu\text{g/mL}$)。以靶向探针追踪 $A\beta_{25-35}$ 在各组 PC12 细胞中的亚细胞定位情况; 通过试剂盒检测 PC12 细胞中活性氧自由基 ROS 的变化情况; Western blotting 法测定细胞凋亡相关蛋白 Bax 及 Bcl-2 的表达量以及和 Nrf2 通路相关的 Nrf2、APK1 和磷酸化的 APK1 蛋白的表达情况。结果发现, $A\beta_{25-35}$ 处理 PC12 细胞会影响线粒体的完整性; 在 200 $\mu\text{g/mL}$ FOAPs-a/b 预处理 PC12 细胞后, 能够显著缓解 $A\beta_{25-35}$ 对线粒体的损伤, 同时使 $A\beta_{25-35}$ 的亚细胞共定位减弱; 与空白组比较, 模型组细胞中 ROS 含量增加, 与模型组比较, FOAPs-a 及 FOAPs-b 干预组均能降低 ROS 的沉积, 差异有统计学意义; Western blotting 结果显示: 与模型组比较 FOAPs-a 及 FOAPs-b 均能减少 APK1 的磷酸化水平, 上调 Nrf2 的蛋白表达水平。总之 $A\beta_{25-35}$ 可进入到 PC12 细胞的线粒体中引起其损伤, 阿里红多糖组分能够通过激活 Nrf2 信号通路显著缓解 $A\beta_{25-35}$ 对 PC12 细胞线粒体的损伤。

关键词: $A\beta_{25-35}$; 靶向探针; 阿里红多糖; 线粒体损伤; Nrf2 通路

中图分类号: R932

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2020)7-1213-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2020.7.017

Trace $A\beta_{25-35}$ subcellular localization by targeting probes and explore Nrf2 pathway-based protective mechanism of mitochondrial damage of *Fomes officinalis* Ames polysaccharides

AYIJIANG Ha-bai-ke, WANG Xiao-mei, YAN Dong, LI Min, PALIDA A-bu-li-zi*

Department of Natural Medicine, College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

Abstract: Targeting probes were used to track $A\beta_{25-35}$ subcellular localization, while Nrf2 signaling pathway were used to investigate the protective mechanism of *Fomes officinalis* Ames polysaccharides components (FOAPs-a) and (FOAPs-b) against β -amyloid ($A\beta_{25-35}$)-induced mitochondrial damage pathways in PC12 cells. The PC12 cells were cultured and activated by $A\beta_{25-35}$ in condensed state as Alzheimer's disease cell model in vitro and were randomly divided into nine groups: control group, $A\beta_{25-35}$ (40 $\mu\text{mol/L}$) induced group, $A\beta_{25-35}$ + FOAPs-a (50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$) groups and $A\beta_{25-35}$ + FOAPs-b (50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$) groups. Targeting probes were used to track $A\beta_{25-35}$ subcellular localization, The changes of the reactive oxygen species (ROS) in PC12 cells were detected by the kit. The expression of apoptosis-related proteins Bax and Bcl2 and the expression of Nrf2, ASK1 and phosphorylated ASK1 proteins related to the Nrf2-pathway were analyzed by Western blotting method. It was found that after stimulated by $A\beta_{25-35}$, the cells mitochondrial integrity were changed, after the addition of 200 $\mu\text{g/mL}$ FOAPs-a or b pretreated PC12 cells, it can significantly alleviate the mitochondria damage by $A\beta_{25-35}$, while reducing the co-localization of mitochondria. FOAPs-a and FOAPs-b could significantly inhibit the accumulation of ROS induced by

收稿日期: 2020-03-15 接受日期: 2020-06-17

基金项目: 新疆维吾尔自治区高校科研计划自然科学基金项目 (XJEDU2020Y025); 新疆维吾尔自治区自然科学基金联合基金 (2019D01C216); 国家自然科学基金 (81760755); 自治区“十三五”重点学科资助

* 通信作者 E-mail: palida3345@163.com

$A\beta_{25-35}$ in PC12 cells in a dose-dependent manner. They could also effectively prevent $A\beta_{25-35}$ -stimulated cytotoxicity, which involved in attenuating cell apoptosis, increasing Nrf2 expression and the ratio of Bcl-2/Bax, as well as inhibiting ASK1 and phosphorylated ASK1 proteins levels. In conclusion FOAPs-a and FOAPs-b played neuroprotective roles against $A\beta_{25-35}$ -induced cytotoxicity in PC12 cells through suppressing the mitochondria-mediated apoptotic pathway. The mechanism may be related to its suppression of the activation of Nrf2 signal pathway.

Key words: $A\beta_{25-35}$; targeting probe; *Fomes officinalis* Ames polysaccharides; mitochondrial dysfunction; Nrf2 signal pathway

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种神经退行性疾病, 以认知功能障碍为主要临床表现^[1]。对于 AD 的发病机制目前有诸如氧化应激假说^[2]、线粒体损伤学说^[3]、 $A\beta$ 毒性学说等等^[4], 并且发现 $A\beta$ 沉积, 神经炎症的发生, 氧化应激都会引起线粒体损伤, 最终导致神经元凋亡^[5,6], 因此, 线粒体损伤通路与多种学说交叉, 研究意义至关重要。

阿里红 (*Fomes officinalis* Ames, FOAPs) 为多孔菌科药用层孔菌的干燥子实体。阿里红多糖作为阿里红主要有效成分之一具有抗衰老、抗氧化、抗肿瘤、免疫调节等功效^[7,8]。课题组前期将阿里红多糖经 DEAE 纤维素-52, Sepharose CL-6B 和葡聚糖凝胶 Sephadex G-100 柱层析分离纯化得到两种多糖组分 FOAPs-a 与 FOAPs-b^[9]。本课题组一直着力于阿里红多糖对 AD 线粒体靶向性治疗的研究, 发现在 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞中, 阿里红多糖给药组相对于模型组具有显著改善线粒体损伤的作用, 包括 ATP 含量和线粒体膜电位 MMP 上升, ROS 含量下降, 线粒体内细胞色素含量 C 回升等, 表明, 阿里红多糖对 AD 模型中, 线粒体损伤通路和氧化应激损伤均具有一定程度的改善作用, 本实验拟从 $A\beta_{25-35}$ 与 PC12 细胞的线粒体荧光共定位角度出发^[10-12], 探讨阿里红多糖组分 FOAPs-a 和 FOAPs-b 可通过参与 Nrf2 氧化还原信号通路, 从而发挥对 PC12 细胞线粒体损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

小鼠瘤细胞 (PC12 细胞) 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心; 阿里红多糖组分 (新疆医科大学药学院天药生药教研室提取自用); $A\beta_{25-35}$ 蛋白 (Genscript, 南京); FBS 胎牛血清 (Hyclone 公司); DMEM 高糖培养基 (Hyclone, 公司); 双抗 (Hyclone 公司); 盐酸多奈哌齐 (Sigma 公司), FAM- $A\beta_{25-35}$ 荧光 (Genscript, 南京); Cy3 标记羊抗兔 IgG (武汉博士德生物工程有限公司); COXIV (Proteintech, 武汉); ROS 检测试剂盒 (碧云天公

司); 兔多抗 Bcl-2 抗体 (Genetex 公司)、兔多抗 Bax 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司)、兔多抗 Nrf2 (Absin, Abs130481)、兔多抗 P-ASK1 (Absin, Abs131102)、兔多抗 ASK1 (美国 Cell signaling, 批号 8662)、兔单克隆抗 GAPDH 抗体 (美国 Abcam 公司, Ab8245)。

1.2 实验仪器

CO_2 恒温培养箱 (美国 Thermo 公司); SWCJ2F 超净台 (AIRTECH 公司); IX71 ~ 12FL/PH 倒置荧光研究级三目显微镜 (日本 Olympus 公司); 721BR13868 凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司); 流式细胞仪 (FACSAriaII, 北京 Scotsman 公司); 激光共聚焦显微镜 (德国 ZEISS 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 药物处理

1.3.1.1 $A\beta_{25-35}$ 寡聚体的制备及实验条件的选择

称取药物 $A\beta_{25-35}$ 1 mg, 用 471.6 μ L 溶剂水溶解成浓度为 2 mM 的母液待用, 母液于 -20 $^{\circ}C$ 保存; 分装 $A\beta_{25-35}$ 母液, 在使用前取适量于 37 $^{\circ}C$ 震荡孵育 8 天, 使多肽聚集。

1.3.1.2 FOAPs-a 及 FOAPs-b 溶液的制备与实验条件的选择

采用水提醇沉法提取阿里红粗多糖, 经 DEAE 纤维素-52, Sepharose CL-6B 和葡聚糖凝胶 Sephadex G-100 柱层析对粗多糖进行纯化得到均一多糖组分 FOAPs-a, FOAPs-b^[9], 平均分子量分别为 199 和 87 kDa。用 DMEM 培养基充分溶解, PC12 细胞干预时用不含血清的培养基稀释到所需浓度。

1.3.2 PC12 细胞的培养和分组

按照预实验确定的给药及损伤的浓度和时间, 取对数生长期的 PC12 细胞以 1×10^4 个/孔接种至 96 孔板, 在培养箱孵育 24 h, 待细胞密度长到 75% 左右时, 分为空白组 (只加培养液)、模型组 (加入 40 μ mol/L $A\beta_{25-35}$)、阳性药物组 (50 μ mol/L 盐酸多奈哌齐)、高、中、低浓度的 FOAPs-a 及 FOAPs-b 干预组 (各 50、100、200 μ g/mL) 等。

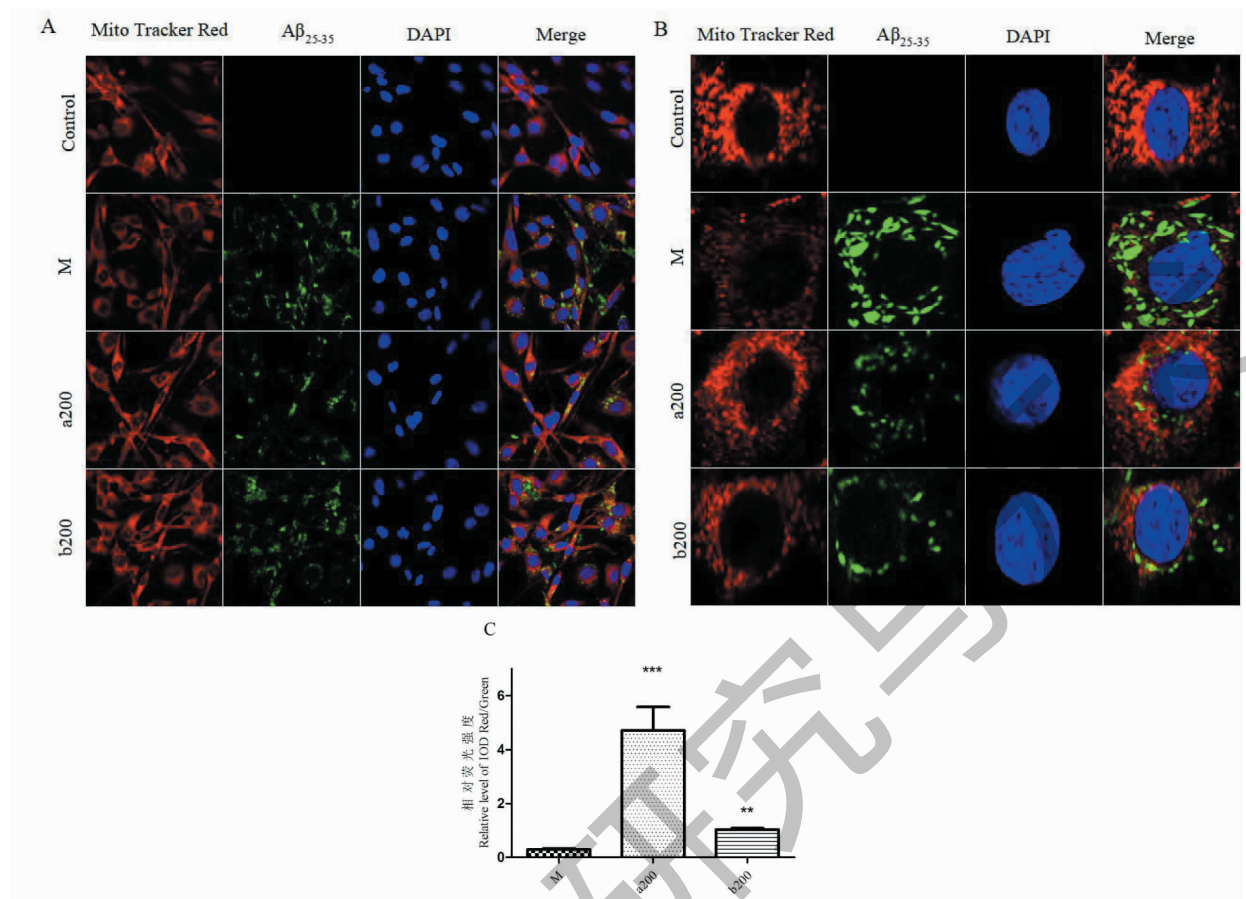


图1 激光共聚焦显微镜下的荧光共定位结果

Fig. 1 An ImageXpress confocal microscope was used to analyze co-localization.

注:(A)激光共聚焦显微镜拍摄 PC12 细胞中线粒体、细胞核和淀粉样蛋白($\times 600$);(B)激光共聚焦显微镜下单个 PC12 细胞的线粒体、细胞核和淀粉样蛋白($\times 1\ 000$);Mito:红色荧光标记线粒体; $A\beta_{25-35}$:绿色荧光标记淀粉样蛋白;Merge:共定位;(C)各组中单个 PC12 细胞中红色荧光强度与绿色荧光强度的比值。M:模型组;a/b 200:200 $\mu\text{g/mL}$ 阿里红多糖组分给药组。*与模型组相比,显著性差异, $P < 0.05$,***与模型组相比,极显著性差异, $P < 0.01$ 。Note:(A) Micro confocal ImageXpress of mitochondria, nucleus and $A\beta_{25-35}$ in PC12 cells ($\times 600$);(B) Micro confocal ImageXpress of mitochondria, nucleus and $A\beta_{25-35}$ in single PC12 cell ($\times 1\ 000$);Mito:Red marks mitochondria; $A\beta_{25-35}$: Green marks $A\beta_{25-35}$;Merge:Co-localization;(C) Relative level of IOD red/green in single PC12 cell. M:Model group;a/b 200:200 $\mu\text{g/mL}$

FOAPs-a or FOAPs-b group; ** Compared with model group, $P < 0.05$, *** Compared with model group, $P < 0.01$.

1.3.3 细胞爬片免疫荧光单标实验

1.3.3.1 细胞处理

取处于对数生长期的 PC-12 细胞,用 DMEM 培养基调整细胞密度到 10^5 个/mL,接入六孔板,每孔 2 mL 细胞悬液,同时设空白孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,弃上清,分正常组(加不含血清的培养基);模型组(40 $\mu\text{mol/L}$ FAM- $A\beta_{25-35}$);给药组(加入 DMEM 配置的 200 $\mu\text{g/mL}$ FOAPs-a/b 应用液处理 2 h,再加 FAM-40 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ 共同孵育培养 48 h。

1.3.3.2 免疫荧光

将细胞玻片用 PBS 浸洗 3 min $\times 3$ 次;用 4% 的多聚甲醛固定爬片 15 min, PBS 浸洗;0.5% Triton

X-100(PBS 配制)室温通透 20 min;PBS 浸洗,吸水纸吸干,在玻片上滴加正常山羊血清,室温封闭 30 min;吸水纸吸干,不洗,滴加足量一抗(稀释比 1:100),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;PBST 浸洗吸干,滴转移暗处,加荧光二抗(稀释比 1:100),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, PBST 浸洗 3 次。滴加 DAPI 避光孵育 5 min 进行染核, PBST 浸洗 5 min $\times 4$ 次,吸水纸吸干,抗荧光淬灭剂封片,荧光显微镜采集图像。

1.3.3 活性氧自由基 ROS 检测

收集细胞,按照 DCFH-DA 细胞 ROS 检测试剂盒操作:按照 1:1 000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA,使终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$,体积;弃 PBS 加入稀释

好的 DCFH 1 mL; 37°C 培养箱孵育 20 min, 每隔 3 min 混匀一次; 用无血清培养基体积洗涤细胞 3 次。1 500 rpm, 5 min 离心, 弃上清, 加 PBS 重悬; 流式细胞仪检测。

1.3.4 Western blotting 检测 Bcl-2、Bax、Nrf2、APK1 及 P-APK1 的蛋白表达量

将对数生长期的 PC12 细胞以 (2×10^5 个/孔) 接种到 6 孔板中, 分组方法同上。24 h 后用预冷的 PBS 洗三遍, 收集细胞离心, 并加入适当的 RIPA 裂解液吹打混匀, 在冰上静止 30 min 左右, 裂解完全后, 4 °C、12 000 rpm 离心 12 min, 取上清即为提总蛋白。用 BCA 蛋白定量试剂盒测定各组蛋白浓度, 经过煮蛋白、上样、电泳、转膜、封闭、孵育一抗: 兔多抗 Bcl-2 抗体 (1:1 000), 兔多抗 Bax 抗体 (1:1 000), 兔多抗 Nrf2 (1:1 000), 兔多抗 P-ASK1 (1:1 000), 兔多抗 ASK1 (1:1 000), 兔单克隆抗 GAPDH 抗体 (1:1 000) 过夜、用 $1 \times$ TBST 洗膜三次后, 室温孵育 AP 标记二抗 (1:1 000) 1 h、显色液显色, 条带出现后定影终止, 对目的蛋白和内参蛋白条带进行总灰质分析。

1.3.5 统计学处理

采用 SPSS19.0 统计软件, 实验数据采用单因素方差 (One-way ANOVA) 分析, 以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 荧光探针追踪 $A\beta_{25-35}$ 在线粒体中的表达结果

如图 1A 和 1B: 与空白组比较, 模型组细胞内红色荧光强度明显减弱, 且出现较强的绿色荧光, 绿色和红色荧光叠加出现黄色荧光, 表明 $A\beta_{25-35}$ 与线粒体共定位; 观察单个 PC12 细胞周边荧光强度, 发现红色荧光强度明显减弱, 表明线粒体的完整性受到影响, 细胞核形态畸形; 与模型组相比, 在 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FOAPs-a 和 FOAPs-b 预处理 PC12 细胞后, 细胞核形态趋于正常, $A\beta_{25-35}$ 的绿色荧光强度明显减弱, 红色荧光强度增强, 红色荧光强度与绿色荧光强度的比值 IOD 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 1C)。

2.2 活性氧自由基 ROS 含量检测结果

活性氧自由基 ROS 检测结果显示: 与空白组比较, 模型组细胞中 ROS 沉积量明显增加; 与模型组比较, 各浓度的 FOAPs-a 及 FOAPs-b 均能显著降低 ROS 的含量, 且具有浓度依赖性, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 阳性对照组显示盐酸多奈哌齐

(DHCL) 具有良好的抗 $A\beta_{25-35}$ 诱导的氧化应激的作用; FOAPs-a 和 FOAPs-b 在浓度 50、100 和 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 均具有良好的抗氧化应激的作用, 但仍未恢复到阳性对照盐酸多奈哌齐 (DHCL) 的影响水平 ($P < 0.05$, 图 2)。

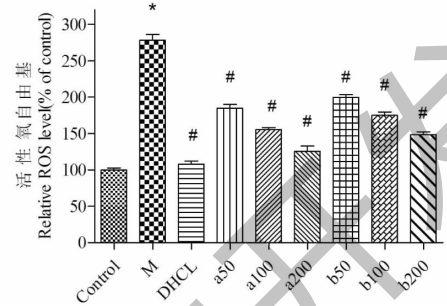


图 2 检测阿里红多糖组分对 PC12 细胞 ROS 的影响

Fig. 2 Oxidative stress was assessed by measuring intracellular ROS generation in PC12 cells

注: M, 模型组; DHCL: 盐酸多奈哌齐组; a/b50-100; 阿里红多糖组分处理组 FOAPs-a/b (50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$); * 与空白组相比, $P < 0.05$, # 与模型组相比, $P < 0.05$, 下同。Note: M: Model group; DHCL: Donepezil hydrochloride group; a/b50-100: FOAPs-a/b (50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$); * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group, the same below.

2.3 Western blotting 检测结果

2.3.1 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达结果

如图 3 Western blotting 结果显示: 与空白组比较, $A\beta_{25-35}$ 诱导的模型组细胞中, Bcl-2 蛋白的表达量显著性下降, 而 Bax 蛋白表达量则明显增加, 即 Bcl-2/Bax 的相对表达率下降 (如图 4 所示), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 不同浓度的 FOAPs-a 及 FOAPs-b 均能显著增加 Bcl-2 的表达量, 同时显著降低 Bax 蛋白的表达水平, 并具有浓度依赖性, 结果表明, FOAPs-a 及 FOAPs-b 可以通过调控细胞凋亡因子对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞发挥抗氧化应激作用, 从而起到神经保护作用, 且 FOAPs-a 比 FOAPs-b 的调控能力更好。

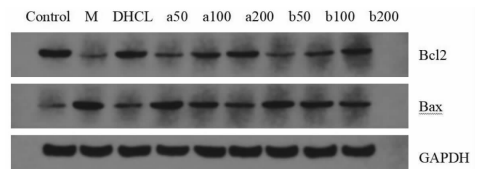


图 3 不同处理组 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达情况

Fig. 3 The expression of Bcl-2 and Bax protein in different treatments groups

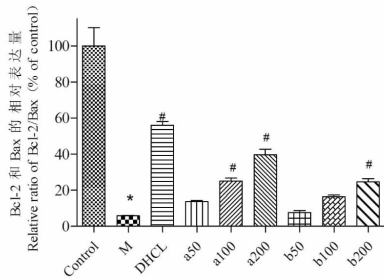


图4 不同处理组 Bcl-2 和 Bax 蛋白相对表达量 (Bcl-2/Bax) 统计柱状图

Fig. 4 Statistical histogram of the average optical density rate of Bcl-2 and Bax protein in different treatments groups

2.3.2 Nrf2、ASK1 和 P-ASK1 的表达

为了观察阿里红多糖组分保护 PC12 细胞对抗 $A\beta_{25-35}$ 引起的氧化应激和线粒体损伤的作用机制可能是 ASK1 凋亡途径激活 Nrf2 信号通路。以 50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 阿里红多糖组分 FOAPs-a 和 FOAPs-b 对 PC12 细胞进行干预处理 2 h 后,再加入 40 $\mu\text{mol}/\text{L}$ $A\beta_{25-35}$ 继续培养 48 h 后,用蛋白免疫印迹法检测细胞中 Nrf2 和 ASK1 的蛋白表达水平及 ASK1 蛋白的去磷酸化程度,结果显示(图 5):与空

白组比较,40 $\mu\text{mol}/\text{L}$ $A\beta_{25-35}$ 处理组中细胞凋亡信号调节激酶 1 (APK1) 蛋白表达量增加,APK1 的磷酸化水平升高,Nrf2 被激活;与模型组比较,50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 FOAPs-a 及 100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FOAPs-b 干预后,ASK1 蛋白含量显著下降,ASK1 的磷酸化水平也下降,差异具有统计学意义($P < 0.05$,图 6),50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FOAPs-b 干预后,蛋白表达量无统计学意义。与此同时,Nrf2 的蛋白表达量显著增加,且呈现浓度依赖性,表明阿里红多糖组分 FOAPs-a 和 FOAPs-b 可以通过 ASK1 凋亡途径激活 Nrf2 信号通路拮抗 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞的氧化应激和线粒体损伤,且高剂量 FOAPs-a 和 FOAPs-b 干预可以发挥更强的抗氧化和抗细胞凋亡作用。

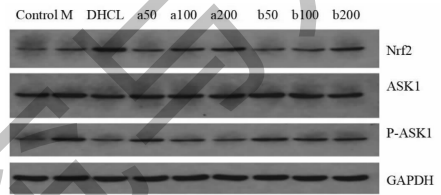


图5 不同处理组 Nrf2、ASK1 和 P-ASK1 蛋白表达情况
Fig. 5 The expression of Nrf2、ASK1 and P-ASK1 protein in different treatments groups

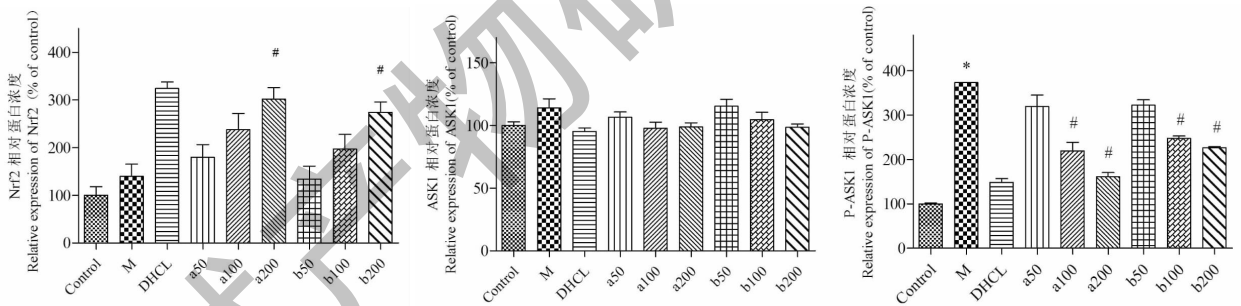


图6 不同处理组 Nrf2、ASK1 和 P-ASK1 蛋白平均光密度值比值(与 GAPDH)统计柱状图

Fig. 6 Statistical histogram of the average optical density rate of Nrf2、ASK1 and P-ASK1 protein(compared with GAPDH) in different treatments groups

3 讨论

在生理情况下,线粒体在人体功能正常状态下,其功能主要是维持 ROS 的生成和去除处于一个平衡状态。在病理情况下,ROS 不能够及时被清除,可能导致 ROS 沉积,这可能与线粒体受损有关^[13]。反过来 ROS 浓度过高,一方面影响了线粒体的正常运转,促使体内氧化应激反应的大量产生,进而造成神经元损伤,甚至导致患者死亡;另一方面,ROS 聚集还会造成 $A\beta$ 的超量。有学者研究证实 $A\beta$ 的沉积会直接导致神经元的损伤,而受损的线粒体中产

生大量氧化应激反应,促使淀粉样前体蛋白 APP 更易分解为不溶性的 $A\beta$ 。课题组前期研究体内实验发现,阿里红提取物对 $A\beta_{25-35}$ 致痴呆动物模型学习记忆障碍有一定的改善作用^[14],阿里红多糖组分对 APP/PS1 双转基因小鼠行为学有影响^[15]。本研究预实验结果显示,相比空白组,用 40 $\mu\text{mol}/\text{L}$ $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞中 ROS 大量聚集,数量显著性增多, $A\beta_{25-35}$ 打破了 ROS 的动态平衡,产生了氧化应激相关指标 SOD,MDA,LDH 的异常,进而出现一系列 AD 的症状,说明 $A\beta_{25-35}$ 造成 PC12 细胞的线粒体损

伤;然后在这个 AD 模型中用不同浓度的阿里红多糖组分 FOAPs-a 和 FOAPs-b 给药后,组内 ROS 聚集情况得到了显著的改善,且能显著增加 Bcl-2 的表达量,同时显著降低 Bax 蛋白的表达水平,各组内呈现浓度依赖性,组间比较后发现 FOAPs-a 对线粒体功能的改善作用要优于 FOAPs-b 的效果。同时,荧光探针共定位实验和 WB 检测凋亡蛋白结果进一步证实: $A\beta_{25-35}$ 的确可以进入到 PC12 细胞的线粒体当中,诱导其线粒体的形态和数量发现不同程度的改变,并加速细胞凋亡,而 FOAPs-a 和 FOAPs-b 给药组则可以改善线粒体的损伤程度和抑制细胞的凋亡。

文献报道,线粒体功能障碍和氧化应激是 AD 的重要病理特征,过度氧化应激反应会导致氧化还原通路 Nrf2 的激活。近年来研究发现 Nrf2 (nuclear related factor 2) 是一种重要的核转录因子,在细胞抗氧化应激反应中起着很重要的作用^[16]。在生理条件下,Nrf2 处于惰性状态,当机体在病理条件下,Nrf2 被激活与抗氧化反应元件 (antioxidant response element, ARE) 结合,从而启动一系列的抗氧化物质的合成来对抗氧化应激^[17];另外,Nrf2 诱导产生的血红素加氧酶 (HO-1) 具有神经保护作用,HO-1 催化血红素生成的产物亦是体内强有力的 ROS 清除剂,对 $A\beta$ 诱导的细胞毒性发挥重要的神经保护作用^[18],过表达 Nrf2 的神经元能够减轻 $A\beta$ 毒性损伤,上调 Nrf2 目标基因的表达从而减少氧化应激的发生^[19]。细胞凋亡信号调节激酶 1 (ASK1) 是高度保守的 MAP3Ks 家族成员之一,ASK1 被激活后能够将 MKK3/MKK6-p38 和 MKK4/MKK7-JNK 两大激酶通路激活,最终诱导细胞发生凋亡^[20]。研究发现很多调控因子与 ASK1 直接结合调控其活性,ASK1 去磷酸化则活化,从而导致细胞凋亡发生^[21]。本实验中 WB 结果显示:与模型组比较 FOAPs-a 及 FOAPs-b 均能减少 APK1 的磷酸化和上调 Nrf2 的蛋白表达,说明两种阿里红多糖组分 FOAPs-a 和 FOAPs-b 均能够激活 Nrf2 蛋白的表达,参与氧化还原信号通路,对抗 AD 中的氧化应激反应,在一定程度上改善线粒体损伤进而缓解氧化应激损伤,揭示阿里红多糖线粒体保护作用的分子机制。

综上所述,阿里红多糖组分可抑制 $A\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞的线粒体损伤和细胞凋亡的产生,对 AD 模型的线粒体损伤通路和氧化应激损伤均具有一定程度的改善作用,推测阿里红多糖可能参与氧化应激损伤通路,发挥对线粒体的保护作用,但其详细的

机制仍需深入研究。

参考文献

- 1 Yin H, Liu GZ. Research progress on the mechanism of *Ginkgo biloba* extract in the treatment of Alzheimer's disease [J]. Chin Med (中国医药), 2020, 15: 151-154.
- 2 Li SY, Qi Y, Hu SH, et al. Mesenchymal stem cells-conditioned medium protects PC12 cells against 2, 5-hexanedione-induced apoptosis via inhibiting mitochondria-dependent caspase 3 pathway [J]. Toxicol Ind Health, 2017, 33: 107-118.
- 3 Li HD, Meng LC, Bao W, et al. Protective effects of organic extracts of *Alpinia oxyphylla* against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in PC12 cells [J]. Neural Regen Res, 2020, 15: 682-689.
- 4 Zhao L, Zhu L, Guo X, et al. Valproic acid attenuates $A\beta_{25-35}$ -induced neurotoxicity in PC12 cells through suppression of mitochondria-mediated apoptotic pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 106: 77-82.
- 5 Kou L, Du M, Zhang C, et al. Polysaccharide purified from *Lycium barbarum* protects differentiated PC12 cells against L-Glu-induced toxicity via the mitochondria associated pathway [J]. Mol Med Rep, 2019, 16: 5533-5540.
- 6 Briston T, Hicks AR. Mitochondrial dysfunction and neurodegenerative proteinopathies: mechanisms and prospects for therapeutic intervention [J]. Biochem Soc Trans, 2018, 46: 829-842.
- 7 Zeng Z, Xu J, Zheng W. Artemisinin protects PC12 cells against beta-amyloid-induced apoptosis through activation of the ERK1/2 signaling pathway [J]. Redox Biol, 2017, 12: 625-633.
- 8 Sha AL, Hao HY. Effect of *Fomes officinalis* Ames polysaccharides on anti-fatigue and hypoxia tolerance in mice [J]. Chin J Appl Physiol (中国应用生理学杂志), 2019, 35: 418-421.
- 9 Yiliner A, Parida ABLZ, Zulihumaer A, et al. Isolation, purification and basic composition analysis of *Fomes officinalis* Ames polysaccharides [J]. Food Safe J Detec (食品安全质量检测学报), 2016, 7: 3992-4000.
- 10 Lin H, Zhang C, Zhang H, et al. Physakengose G induces apoptosis via EGFR/mTOR signaling and inhibits autophagic flux in human osteosarcoma cells [J]. Phytomedicine, 2018, 42: 190-198.
- 11 Li SY, Qi Y, Hu SH, et al. Mesenchymal stem cells-conditioned medium protects PC12 cells against 2, 5-hexanedione-induced apoptosis via inhibiting mitochondria-dependent caspase 3 pathway [J]. Toxicol Ind Health, 2017, 33: 107-118.