

# 异槲皮苷对 $\text{A}\beta_{25-35}$ 导致的 PC12 细胞损伤的保护作用及机制研究

郑传痴<sup>1</sup>, 周旭美<sup>2</sup>, 高健美<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>遵义医科大学第二附属医院药剂科; <sup>2</sup>遵义医科大学药学院, 遵义 563000

**摘要:**探讨异槲皮苷对  $\beta$ -淀粉样蛋白 ( $\text{A}\beta_{25-35}$ ) 导致的 PC12 细胞氧化损伤的保护作用。首先通过分子对接技术分析异槲皮苷与 AMPK 的结合情况。采用  $\text{A}\beta_{25-35}$  ( $20 \mu\text{mol/L}$ ) 损伤 PC12 细胞建立细胞氧化损伤模型, 采用甲基噻唑蓝 (MTT) 法检测细胞活力, 通过试剂盒检测乳酸脱氢酶 (LDH) 漏出量、活性氧 (ROS) 含量、丙二醛 (MDA) 含量以及抗氧化物酶超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活力, 采用 Western blot 法检测磷酸化腺苷活化蛋白激酶 (p-AMPK)、过氧化物增殖体受体辅激活子-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ )、沉默信息调节因子 3 (Sirt3) 和异柠檬酸脱氢酶 (IDH2) 的蛋白表达。结果显示异槲皮苷与 AMPK 的结合力为  $-9.48 \text{ kJ/mol}$ , 提示 AMPK 可能为异槲皮苷的潜在作用靶点。异槲皮苷 ( $1, 10$  和  $100 \mu\text{mol/L}$ ) 能够浓度依赖性的显著抑制  $\text{A}\beta_{25-35}$  导致的 PC12 细胞死亡, 减少 ROS 和 MDA 含量, 升高 SOD 和 GSH-Px 活力。异槲皮苷抑制  $\text{A}\beta_{25-35}$  导致的细胞氧化损伤并上调 p-AMPK、PGC-1 $\alpha$ 、Sirt3 和 IDH2 的蛋白表达。以上结果表明异槲皮苷可能通过调控 AMPK/Sirt3 信号通路发挥抗  $\text{A}\beta_{25-35}$  导致的 PC12 细胞氧化损伤作用。

**关键词:**异槲皮苷;  $\beta$ -淀粉样蛋白 25-35; PC12 细胞; 氧化应激; 沉默信息调节因子 3

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021)1-0073-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.1.010

## Protective effect and mechanism of isoquercitrin on $\text{A}\beta_{25-35}$ -induced PC12 cell injury

ZHENG Chuan-chi<sup>1</sup>, ZHOU Xu-mei<sup>2</sup>, GAO Jian-mei<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Pharmacy Department, the Second Affiliated Hospital of Zunyi Medical University;

<sup>2</sup>School of Pharmacy, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China

**Abstract:** To explore protective effect of isoquercitrin on  $\text{A}\beta_{25-35}$ -induced injury in PC12 cells. The interaction of isoquercitrin with AMPK was determined by molecular docking.  $\text{A}\beta_{25-35}$  ( $20 \mu\text{mol/L}$ ) -induced PC12 cells injury was accepted as an model of oxidative stress *in vitro*. Cell viability was detected using MTT assay, LDH release, ROS content, MDA content and antioxidant enzymes including SOD and GSH-Px activities were measured by corresponding kits. Expressions of p-AMPK, PGC-1 $\alpha$ , Sirt3 and IDH2 proteins were determined using Western blot analysis. The results showed that the binding energy between isoquercitrin and AMPK was  $-9.48 \text{ kJ/mol}$ . Pre-treatment with isoquercitrin ( $1, 10, 100 \mu\text{mol/L}$ ) concentration-dependent suppressed PC12 cell death-induced by  $\text{A}\beta_{25-35}$ . Isoquercitrin not only decreased ROS and MDA contents, but also elevated SOD and GSH-Px activities. Furthermore, isoquercitrin also up-regulated p-AMPK, PGC-1 $\alpha$ , Sirt3 and IDH2 protein expressions. These findings indicated that isoquercitrin protected against  $\text{A}\beta_{25-35}$ -induced oxidative injury in PC12 via AMPK/Sirt3 signaling pathway.

**Key words:** isoquercitrin;  $\text{A}\beta_{25-35}$ ; PC12 cells; oxidative stress; sirtuin 3

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一

种常见于老年期的以进行性认知能力下降和社会功能障碍为临床表现的神经系统退行性疾病。据报道, 预计到 2050 年 AD 患者总数预计达 1 亿 3 150 万, 不仅严重影响中老年人身体健康和生活质量, 而

收稿日期: 2020-08-31 接受日期: 2020-11-16

基金项目: 贵州省科技厅与遵义医科大学附属医院联合基金 (黔科合 LH 字[2015]7484 号)

\*通信作者 Tel: 86-851-28642736; E-mail: gaojianmei@zmu.edu.cn

且给患者和家庭带来了沉重的精神负担和经济负担<sup>[1]</sup>。而随着我国人口老龄化加速,AD 在老年人疾病谱中的地位日益突显。因此,对 AD 的防治研究是全球关注的重点。AD 的典型病理特征为  $\beta$ -淀粉样蛋白 (amyloid  $\beta$ -protein, A $\beta$ ) 沉积形成的老年斑,细胞内 Tau 蛋白异常磷酸化引起的神经纤维缠结和神经元缺失<sup>[2]</sup>。但是其作用机制复杂,目前尚不清楚。其中,A $\beta$  导致的神经元氧化应激损伤被认为是导致 AD 的重要因素之一<sup>[3]</sup>。因此,研发抗 A $\beta$  导致的神经元氧化应激损伤的药物意义重大。但目前尚无理想的防治 AD 的药物。

我国中草药资源十分丰富,某些记载的具有抗衰老和促智的传统中药已被证明可以改善 AD 动物模型的学习和记忆能力<sup>[4]</sup>。因此,从中草药及其活性成分等天然产物中寻找有效的防治 AD 的药物具有重要的现实意义。异槲皮苷是多种中药(例如多穗石柯、红景天、桑叶、白花蛇舌草)的黄酮醇苷类活性成分之一,具有抗人肝癌细胞 HepG2 增殖作用<sup>[5]</sup>、抑制脂多糖诱导的 RAW264.7 巨噬细胞炎症反应的作用<sup>[6]</sup>、保护叔丁基过氧化氢诱导的人肝细胞氧化损伤的作用<sup>[7]</sup>。最近研究发现,异槲皮苷能够抑制氧化应激发挥对链脲佐菌素诱导的神经毒性的保护作用<sup>[8]</sup>,但是,其对 AD 细胞模型是否具有保护作用尚不清楚。因此,本研究拟通过 A $\beta_{25-35}$  损伤 PC12 细胞建立体外 AD 模型,从氧化应激的角度探讨异槲皮苷的神经保护作用并初步分析其作用机制,为异槲皮苷临床用于防治 AD 提供药理学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验药物

异槲皮苷(成都普思生物科技股份有限公司,纯度 > 98%, 批号 PS000510)。试验药物用 DMSO 溶解,-20 ℃冻存,临用前用 DMEM 培养液稀释,采用 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤器过滤除菌,备用。

### 1.2 细胞

大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤细胞株 PC12 来源于 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)。接种于含 10% 胎牛血清,2% 谷氨酰胺的 DMEM 培养液中,在 37 ℃,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

### 1.3 试剂

DMEM 培养液(Hyclone 公司);A $\beta_{25-35}$ (Sigma 公司);甲基噻唑蓝(3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT)、乳酸脱氢酶(lac-

tate dehydrogenase, LDH)、活性氧 (reactive oxygen species, ROS)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px) 和丙二醛(malonaldehyde, MDA) 试剂盒(南京建成生物工程研究所);腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)、p-AMPK、过氧化物增殖体受体辅激活子-1 $\alpha$ (peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ )、沉默信息调节因子 3(sirtuin3, Sirt3) 和异柠檬酸脱氢酶(isocitrate dehydrogenase, IDH2)抗体(Abcam 公司)。

### 1.4 主要仪器

Forma™ Steri-Cycle™ i250 型二氧化碳培养箱(美国 Thermo Scientific);CX31 型倒置显微镜(日本 Olympus);IX73 型荧光显微镜(日本 Olympus);电泳仪(美国 Bio-Rad);全自动电泳凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad)。

### 1.5 方法

#### 1.5.1 成分-靶点分子对接

从 RSCB 数据库(<http://www.rcsb.org/>)中下载 AMPK 蛋白的晶体结构(PDB ID: 2UV5),使用 AutoDockTools 1.5.6 软件将晶体结构中的水分子删除,进行加氢处理后保存为 pdbqt 格式文件。从 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)中下载异槲皮苷化合物 2D 及 3D 结构的 SDF 格式文件。利用 PyMol 软件进行蛋白小分子结构处理,运用 AutoDock vina 软件进行分子对接。

#### 1.5.2 A $\beta_{25-35}$ 对 PC12 细胞毒性损伤的浓度选择

将浓度为  $1 \times 10^5$  个/mL 的处于对数生长期 PC12 细胞接种于 96 孔板,培养 12 h 后,分别加入终浓度为 5、10、20、40、80  $\mu\text{mol/L}$  A $\beta_{25-35}$  溶液,分别作用培养 12、24、48、72 h 后,每孔加入 25  $\mu\text{L}$  MTT (5 mg/mL) 继续作用 4 h 后,弃上清,每孔加入 150  $\mu\text{L}$  二甲基亚砜,震摇 10 min 后,于酶标仪 492 nm 波长处检测吸光度值。

#### 1.5.3 实验分组及药物处理

将对数生长期的 PC12 细胞以  $1 \times 10^5$  个/mL 细胞密度接种于 96 孔板中,培养 24 h 后,随机分为正常对照组、模型组(A $\beta_{25-35}$ )、异槲皮苷给药组(1、10 和 100  $\mu\text{mol/L}$ )。不同浓度 1、10 和 100  $\mu\text{mol/L}$  异槲皮苷预处理 1 h 后,再加入 A $\beta_{25-35}$  继续作用 48 h。

#### 1.5.4 MTT 法检测异槲皮苷对 A $\beta_{25-35}$ 损伤 PC12 细胞存活率的影响

PC12 细胞按照“1.5.3”项方法经药物处理后,

每孔加入 25  $\mu\text{L}$  MTT(5 g/L),继续培养 4 h 后,弃上清,每孔加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO 溶解,振摇 10 min 后,于酶标仪 492 nm 波长处检测吸光度值。

### 1.5.5 LDH 释放率检测异槲皮苷对 $\text{A}\beta_{25-35}$ 损伤 PC12 细胞细胞毒性的影响

PC12 细胞按照“1.5.3”项方法经药物处理后,以 4 000 rpm 在 4 ℃ 条件下离心 10 min 后,取上清,严格按照 LDH 测试盒说明书操作测定 LDH 释放率。

### 1.5.6 形态学观察

PC12 细胞按照“1.5.3”项方法接种于 6 孔板,经药物处理后,于倒置显微镜下观察细胞形态变化并拍照记录。

### 1.5.7 异槲皮苷对 ROS、MDA 含量、SOD 和 GSH-Px 活力的影响

PC12 细胞按照“1.5.3”项方法经药物作用 48 h 后,3 000 rpm 在 4 ℃ 条件下离心 10 min 后,取上清,严格按照试剂盒操作测定 ROS 和 MDA 含量以及 SOD 和 GSH-Px 活力。

### 1.5.8 Western blot 法检测 AMPK、PGC-1 $\alpha$ 、Sirt3、IDH2 蛋白表达

PC12 细胞按照“1.5.3”项方法经药物处理后,提取 PC12 细胞总蛋白后,采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度,加热使之变性后,每孔上样 30  $\mu\text{g}$ ,经 12%

十二烷基磺酸钠凝胶电泳后,将蛋白采用半干法转印至硝酸纤维素膜上,封闭 2 h 后,加入相应一抗:p-AMPK(1:1 000)、AMPK(1:1 000)、PGC-1 $\alpha$ (1:1 000)、Sirt 3(1:1 000)、IDH2(1:1 000),于 4 ℃ 孵育过夜,TBST 洗膜后 3 次后,以辣根过氧化酶标记的二抗封闭孵育 1 h 后,采用 ECL 发光法经凝胶成像系统曝光显影,条带灰度值分析采用 Image J 软件。

### 1.5.9 数据分析

实验数据均采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析,每次实验至少重复 3 次,数据采用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。 $\text{A}\beta_{25-35}$  对 PC12 细胞毒性损伤的浓度选择采用重复测量的方差分析,其他指标组间的两两比较采用单因素方差分析,方差齐用 Bonferroni 检验,方差不齐用 Dunnett's T3 检验, $P < 0.05$  有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 异槲皮苷作用于 AMPK 蛋白的分子对接结果

通过分子对接技术分析异槲皮苷与 AMPK 结合情况的研究结果显示:异槲皮苷与 AMPK 蛋白的结合能为 -9.48 kJ/mol,其结合能  $\leqslant$  -5 kJ/mol 说明异槲皮苷能够与 AMPK 蛋白结合。其氨基酸结合位点主要包括:ASN256、LEU249 和 LYS253(图 1)。以上结果提示 AMPK 可能为异槲皮苷对  $\text{A}\beta_{25-35}$  导致的 PC12 细胞损伤的保护作用的潜在靶点。

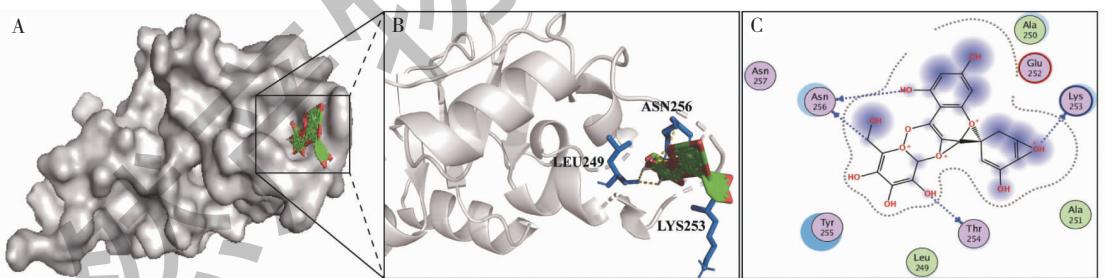


图 1 异槲皮苷与 AMPK 对接模式图

Fig. 1 The molecular docking pattern diagram of isoquercitrin with AMPK

注:A:异槲皮苷与 AMPK 结合表面 3D 可视化图;B:异槲皮苷与 AMPK 结合位点的 3D 可视化结果;C:异槲皮苷与 AMPK 结合位点的 2D 模式图。Note: A; 3D visualization binding surface of isoquercitrin with AMPK; B; 3D visualization binding sites of isoquercitrin with AMPK; C; 2D visualization binding sites of isoquercitrin with AMPK.

### 2.2 $\text{A}\beta_{25-35}$ 对 PC12 细胞损伤的浓度选择

通过 MTT 法检测  $\text{A}\beta_{25-35}$  对 PC12 细胞的损伤。结果发现与空白对照组比较,5、10、20、40、80  $\mu\text{mol}/\text{L}$   $\text{A}\beta_{25-35}$  能够显著抑制 PC12 细胞的活力( $P < 0.05$ )。由于 20  $\mu\text{mol}/\text{L}$   $\text{A}\beta_{25-35}$  作用 48 h 存活率接近 50%,因此确定 20  $\mu\text{mol}/\text{L}$   $\text{A}\beta_{25-35}$  作用 48 h 为最

佳作用浓度和时间用于后续实验(图 2)。

### 2.3 异槲皮苷对 $\text{A}\beta_{25-35}$ 损伤的 PC12 细胞存活率和 LDH 含量的影响

模型组( $\text{A}\beta_{25-35}$ )细胞活力较空白对照组显著降低,LDH 含量明显升高( $P < 0.01$ ),与模型组比较,异槲皮苷(1、10 和 100  $\mu\text{mol}/\text{L}$ )作用 48 h 能够浓度

依赖性的增加细胞存活率,降低 LDH 含量( $P < 0.05, P < 0.01$ ) (图 3、图 4)。

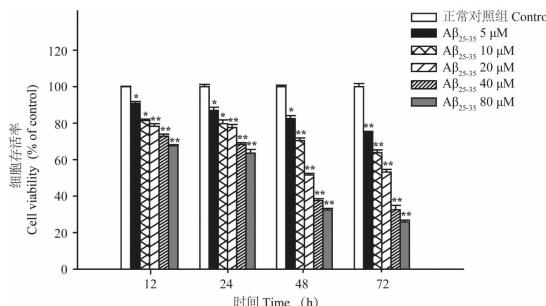


图 2  $\text{A}\beta_{25-35}$  对 PC12 细胞损伤的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 2 The effect of  $\text{A}\beta_{25-35}$  on PC12 cell injury ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

注:与正常对照组比较, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ 。Note: Compared with control, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

## 2.4 异槲皮苷对 $\text{A}\beta_{25-35}$ 损伤的 PC12 细胞形态的影响

模型组 ( $\text{A}\beta_{25-35}$ ) 细胞较正常对照组细胞数量减少, 细胞形态出现皱缩、变圆且部分漂浮在培养液中; 异槲皮苷 (1、10 和 100  $\mu\text{mol/L}$ ) 作用后较模型组细胞数量和形态均有所改善(图 5)。

## 2.5 异槲皮苷对 ROS、MDA 含量和 GSH-Px、SOD 活性的影响

结果显示,  $\text{A}\beta_{25-35}$  模型组较正常对照组 ROS 和 MDA 含量显著增加; 而异槲皮苷 (1、10 和 100  $\mu\text{mol/L}$ ) 组较模型组 ROS 和 MDA 含量明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。同时,  $\text{A}\beta_{25-35}$  模型组较正常对照组 SOD 和 GSH-Px 活力显著降低; 异槲皮苷 (1、10 和 100  $\mu\text{mol/L}$ ) 组较  $\text{A}\beta_{25-35}$  模型组 SOD 和 GSH-Px 的活性明显增加 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ) (表 1)。

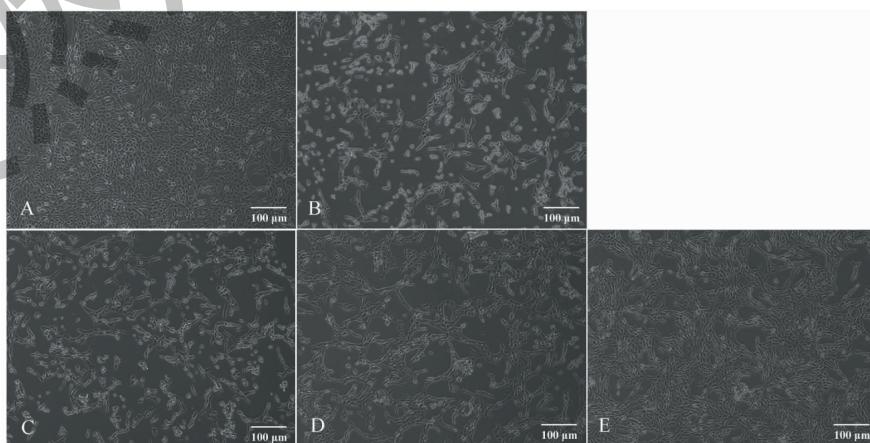


图 5 异槲皮苷对  $\text{A}\beta_{25-35}$  导致损伤的 PC12 细胞形态的影响 (200 ×)

Fig. 5 The effect of isoquercitrin on cell morphology of  $\text{A}\beta_{25-35}$ -induced PC12 cell injury (200 ×)

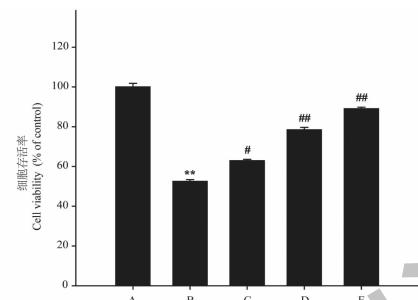


图 3 异槲皮苷对  $\text{A}\beta_{25-35}$  损伤的 PC12 细胞存活率和 LDH 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 3 The effect of isoquercitrin on cell viability of  $\text{A}\beta_{25-35}$ -induced PC12 cell injury ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

注: A: 正常对照; B: 模型; C: 异槲皮苷 1  $\mu\text{mol/L}$ ; D: 异槲皮苷 10  $\mu\text{mol/L}$ ; E: 异槲皮苷 100  $\mu\text{mol/L}$ 。与正常对照组比较, \*\*  $P < 0.01$ ; 与模型组比较, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , 下同。Note: A: Control; B: Model; C: Isoquercitrin 1  $\mu\text{mol/L}$ ; D: Isoquercitrin 10  $\mu\text{mol/L}$ ; E: Isoquercitrin 100  $\mu\text{mol/L}$ 。Compared with normal group, \*\*  $P < 0.01$ ; Compared with model group, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , the same below.

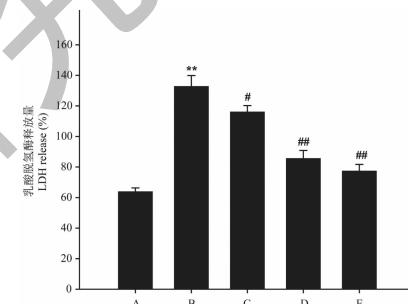


图 4 异槲皮苷对  $\text{A}\beta_{25-35}$  损伤的 PC12 细胞 LDH 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 4 The effect of isoquercitrin on LDH level of  $\text{A}\beta_{25-35}$ -induced PC12 cell injury ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

## 2.6 异槲皮苷对 AMPK、PGC-1 $\alpha$ 、Sirt3、IDH2 蛋白表达的影响

$A\beta_{25-35}$  模型组较正常对照组 p-AMPK 水平、PGC-1 $\alpha$ 、Sirt3 和 IDH2 蛋白表达明显降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) (图 6、图 7)。

表 1 异槲皮苷对 ROS、MDA 含量和 GSH-Px、SOD 活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Effect of isoquercitrin on contents of ROS, MDA and activities of GSH-Px and SOD ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别 Group	浓度 Concentration ( $\mu\text{mol/L}$ )	ROS 含量 ROS content (IU/mL)	MDA 含量 MDA content (nmol/mg)	SOD 活力 SOD activity (U/mg)	GSH-Px 活力 GSH-Px activity (U/mg)
正常对照 Control	0	$14.55 \pm 1.76$	$3.12 \pm 1.03$	$95.31 \pm 6.16$	$86.06 \pm 3.78$
模型组 Model	20	$55.30 \pm 3.36^{**}$	$17.68 \pm 1.41^{**}$	$46.35 \pm 1.57^{**}$	$44.25 \pm 1.27^{**}$
异槲皮苷 Isoquer- citrin	1	$45.93 \pm 1.45^{\#}$	$12.63 \pm 1.03^{\#}$	$57.32 \pm 2.42^{\#}$	$55.21 \pm 2.38^{\#}$
异槲皮苷 Isoquer- citrin	10	$28.53 \pm 1.91^{##}$	$8.03 \pm 0.72^{##}$	$71.97 \pm 5.28^{##}$	$68.33 \pm 2.50^{##}$
异槲皮苷 Isoquer- citrin	100	$23.85 \pm 1.59^{##}$	$6.88 \pm 0.37^{##}$	$80.54 \pm 6.86^{##}$	$77.01 \pm 1.66^{##}$

注:与正常对照组相比, \*\*  $P < 0.01$ ; 与模型组比较, ##  $P < 0.01$ , #  $P < 0.05$ 。

Note: Compared with normal group, \*\*  $P < 0.01$ ; Compared with model group, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ .

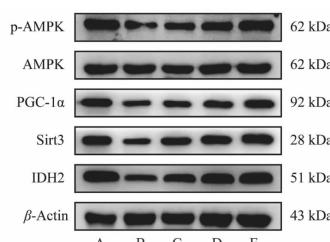


图 6 异槲皮苷对 AMPK、PGC-1 $\alpha$ 、Sirt3、IDH2 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 6 The effect of isoquercitrin on AMPK, PGC-1 $\alpha$ , Sirt3 and IDH2 protein expression ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

0.01);而异槲皮苷较  $A\beta_{25-35}$  模型组 p-AMPK 水平、PGC-1 $\alpha$ 、Sirt3 和 IDH2 蛋白表达明显增加 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ) (图 6、图 7)。

表 1 异槲皮苷对 ROS、MDA 含量和 GSH-Px、SOD 活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Effect of isoquercitrin on contents of ROS, MDA and activities of GSH-Px and SOD ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

确<sup>[9]</sup>。值得注意的是,异槲皮苷能够通过激活调节体内能量代谢的重要激酶 AMPK 发挥抗脂质代谢紊乱的作用。因此,我们推测 AMPK 可能为异槲皮苷防治 AD 的作用靶点。分子对接是一种通过模拟配体和受体相互作用来筛选小分子化合物的药物设计方法。可通过构建关键靶点的分子对接模型,分析小分子化合物与关键靶点的相互作用<sup>[10]</sup>。因此,本研究首先采用分子对接技术分析异槲皮苷与 AMPK 的结合情况。研究结果显示,异槲皮苷能够与 AMPK 结合,提示 AMPK 可能为异槲皮苷防治 AD 的作用靶点。

目前,  $A\beta$  沉积被认为是 AD 发病的始动因素和病理改变的重要因素,因此,本研究采用了公认的  $A\beta_{25-35}$  导致神经元损伤模型建立体外 AD 模型进一步观察异槲皮苷的神经保护作用<sup>[11]</sup>。本研究结果显示,  $A\beta_{25-35}$  明显减低细胞活力,增加细胞 LDH 含量,提示  $A\beta_{25-35}$  损伤细胞严重,与文献报道一致<sup>[12]</sup>。而异槲皮苷能够浓度依赖性的增加  $A\beta_{25-35}$  损伤的细胞活力并降低其 LDH 含量,表明异槲皮苷具有保护  $A\beta_{25-35}$  导致的细胞损伤作用,但是其作用机制有待于进一步探索。有研究发现,  $A\beta$  导致的氧化应激损伤是导致 AD 发生发展的关键因素。氧化应激损伤是指体内的 ROS(主要包括羟自由基、过氧化氢、超氧阴离子等)与体内抗氧化系统(主要包括 SOD、GSH-Px)失平衡导致的细胞损伤。本研究结果显示,  $A\beta_{25-35}$  可导致细胞内 ROS 和脂质过氧化物 MDA 明显增加,同时降低抗氧化物酶 SOD 和 GSH-Px 的

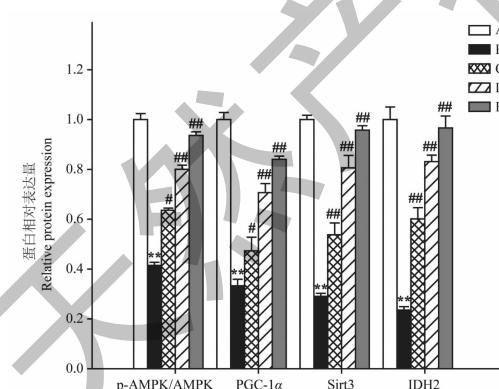


图 7 异槲皮苷对 AMPK、PGC-1 $\alpha$ 、Sirt3、IDH2 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 7 The effect of isoquercitrin on AMPK, PGC-1 $\alpha$ , Sirt3 and IDH2 protein expressions ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

## 3 讨论

最近文献报道,异槲皮苷能够减少  $A\beta$  诱导的小鼠大脑淀粉样变性,但是其作用机制尚不明

活力,表明 $\text{A}\beta_{25-35}$ 可导致神经元氧化损伤,与文献报道一致<sup>[13,14]</sup>。而异槲皮苷能够浓度依赖性的减少ROS和MDA含量并提高抗氧化物酶活力,提示异槲皮苷对 $\text{A}\beta_{25-35}$ 导致的细胞损伤作用与其提高抗氧化物酶活力而清除 $\text{A}\beta_{25-35}$ 产生的过多ROS有关。

近年来研究发现,AMPK/Sirt3信号通路与 $\text{A}\beta$ 导致的氧化应激损伤进而引发AD的发生关系密切<sup>[15]</sup>。其中AMPK的活化可减少脑内 $\text{A}\beta$ 的沉积<sup>[12]</sup>。Sirt3是Sirtuin家族在进化上高度保守的成员之一,在氧化应激导致的AD发生发展过程中发挥重要的作用。值得注意的是,AMPK能够通过磷酸化激活其下游的PGC-1 $\alpha$ 进而活化Sirt3,Sirt3可进一步激活其下游的IDH2发挥抗氧化应激损伤作用<sup>[16,17]</sup>。本研究结果显示, $\text{A}\beta_{25-35}$ 明显降低AMPK的磷酸化水平及其下游PGC-1 $\alpha$ 的表达,同时下调Sirt3及其下游IDH2的表达,表明AMPK/Sirt3信号通路在 $\text{A}\beta$ 导致的AD中发挥重要作用,与文献报道一致<sup>[18,19]</sup>。而异槲皮苷可显著增加AMPK的磷酸化水平及其下游PGC-1 $\alpha$ 的表达,同时上调Sirt3及其下游IDH2的表达,表明异槲皮苷通过调控AMPK磷酸化进而激活Sirt3发挥抗 $\text{A}\beta$ 导致的神经细胞氧化应激损伤作用。尽管本研究初步明确了异槲皮苷对 $\text{A}\beta_{25-35}$ 导致的PC12细胞氧化损伤的保护作用,但是其具体作用机制仍需深入研究。在进一步的研究中将采用AMPK的抑制剂或其他信号通路相关siRNA干扰手段,验证该信号通路是否参与其中并在体内动物模型中进一步确定其药效及其可能的作用靶点。

综上所述,异槲皮苷能够抑制 $\text{A}\beta_{25-35}$ 导致的神经细胞氧化损伤,其作用与激活AMPK/Sirt3信号通路有关,但是仍需通过体内实验进一步确定其药效及其作用机制。

## 参考文献

- Sang XX, Yang Y, Tang XL, et al. Effects of oligosaccharide esters of *Polygala tenuifolia* on the injury of human neuroblastoma SH-SY5Y cells induced by  $\text{A}\beta_{25-35}$  fragment [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2018, 53: 876-881.
- Wang L, Jin GF, Yu HH, et al. Effects of tenuifolin against oxidative damage induced by  $\text{A}\beta_{25-35}$  in SH-SY5Y cells and underlying mechanisms[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2019, 31: 1537-1542.
- Kowalska M, Wize K, Prendecki M, et al. Genetic variants and oxidative stress in Alzheimer's disease[J]. Curr Alzheimer Res, 2020, 17: 208-223.
- Guo YY, Zheng Q, Wu L, et al. Effect of Sijunzi decoction on regulation of  $\text{A}\beta$ -related proteins across blood-brain barrier [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2019, 31: 1537-1542.
- Jiang GJ, Liu CJ, Liu TX, et al. The inhibitory effect of isoquercitrin on Raf/MEK/ERK signaling pathway in HepG2 cells[J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2017, 33: 1382-1387.
- Liu TX, Li J, Jiang GJ, et al. Regulation effects of isoquercitrin on inflammatory in LPS-induced RAW264.7 cell [J]. Herald Med(医药导报), 2017, 36: 601-605.
- Lei M, Xu YS, Sun JB, et al. Protective effect of isoquercitrin on t-BHP-induced oxidative damage of L-02 cells [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2017, 29: 563-568.
- Lei C, Peimin F, Anjiao P, et al. Protective effects of isoquercitrin on streptozotocin-induced neurotoxicity[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24: 10458-10467.
- Kim JH, Lee S, Cho EJ. The protective effects of acer okamotoanum and isoquercitrin on obesity and amyloidosis in a mouse model[J]. Nutrients, 2020, 12(5): 1353.
- Huang SJ, Mu F, Li F, et al. Potential mechanism study of herbal pair Schizonepetae Herba and Saposhnikoviae Radix against coronavirus pneumonia via network pharmacology and molecular docking[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2020, 32: 1087-1098.
- Wang S, Yao H, Xu Y, et al. Therapeutic potential of a TrkB agonistic antibody for Alzheimer's disease[J]. Theranostics, 2020, 10: 6854-6874.
- Cao JY, Han RL, Guo JY, et al. The effect of cynomorium ethyl acetate extract containing serum on the injured PC12 cells induced by  $\text{A}\beta_{25-35}$  [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med(中医药理与临床), 2018, 34: 88-91.
- Wang J, Yang Y, Wang D, et al. Protective effect of procyandins on PC12 cells exposed to  $\text{A}\beta_{25-35}$  [J]. Chin J Pathophysiol(中国病理生理杂志), 2018, 34: 294-299.
- He W, Yuan K, Ji B, et al. Protective effects of curcumin against neuroinflammation induced by  $\text{A}\beta_{25-35}$  in primary rat microglia: modulation of high-mobility group box 1, toll-like receptor 4 and receptor for advanced glycation end products expression[J]. Ann Transl Med, 2020, 8(4): 88.

(下转第136页)