

# 黑果腺肋花楸花色苷通过 Nrf2 机制对 $A\beta_{1-42}$ 诱导 SH-SY5Y 细胞产生氧化应激及细胞凋亡的保护作用

孟令帅<sup>1</sup>, 曹 森<sup>1</sup>, 彭 琳<sup>1</sup>, 马立志<sup>1</sup>, 孟宪军<sup>2</sup>, 周笑犁<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 贵阳学院食品与制药工程学院, 贵阳 550005; <sup>2</sup> 沈阳农业大学食品学院, 沈阳 110866

**摘要:** 为了研究黑果腺肋花楸花色苷对  $A\beta_{1-42}$  诱导的 SH-SY5Y 细胞产生氧化应激和细胞凋亡的影响。采用 MTT 比色法测定细胞活力, 分别用 ROS、 $H_2O_2$ 、SOD 检测试剂盒测定活性氧 (ROS), 过氧化氢 ( $H_2O_2$ ), 超氧化物歧化酶 (SOD) 等氧化应激相关指标。采用 Annexin-V-PI/FITC 凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡。采用 RT-PCR、蛋白质印迹法分析抗氧化酶相关基因核转录相关因子 (Nrf2)、血红素氧化酶-1 (HO-1)、醌氧化还原酶 (NQO1)、凋亡相关基因 (Bcl-2、Bax) 的转录和蛋白表达。结果表明花色苷预处理显著抑制  $A\beta_{1-42}$  诱导的细胞内 ROS、 $H_2O_2$  的增加, 并通过上调 Nrf2、HO-1、NQO-1 表达来增加 SOD 表达。通过下调 Bax, 上调 Bcl-2 显著抑制细胞凋亡。从而得出高纯度的黑果腺肋花楸花色苷可以通过 Nrf2 机制保护 SH-SY5Y 细胞免受  $A\beta_{1-42}$  诱导的氧化应激和细胞凋亡。

**关键词:** 黑果腺肋花楸; 花色苷; SH-SY5Y 细胞; 氧化应激; 细胞凋亡

中图分类号: Q954.6; R361

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021)7-1086-10

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.7.002

## *Aronia melanocarpa* anthocyanins protect SH-SY5Y cells against $A\beta_{1-42}$ induced oxidative stress and apoptosis through a Nrf2 mechanism

MENG Ling-shuai<sup>1</sup>, CAO Sen<sup>1</sup>, PENG Lin<sup>1</sup>, MA Li-zhi<sup>1</sup>, MENG Xian-jun<sup>2</sup>, ZHOU Xiao-li<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> School of Food and Pharmaceutical Engineering, Guiyang College, Guiyang 550000, China;

<sup>2</sup> College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China

**Abstract:** We investigated the cytoprotective effects of anthocyanins, including cyanidin-3-O-(galactoside, glucoside, arabinoside, xyloside), from *Aronia melanocarpa* against oxidative stress and apoptosis induced by  $A\beta_{1-42}$ . The MTT assay was conducted by MTT colorimetric assay and cell group was done, oxidative stress related indicators, including reactive oxygen species (ROS), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), superoxide dismutase (SOD), were measured using ROS,  $H_2O_2$ , SOD detection kit, respectively, apoptosis was detected by Annexin-V-PI/FITC apoptosis detection kit. Besides, the gene transcription and protein expression of antioxidant-related gene nuclear factor erythroid (Nrf2), heme oxygenase-1 (HO-1), quinone oxidoreductase (NQO1) and apoptosis-related genes (Bcl-2, Bax) were analyzed by RT-PCR and Western blot. These results showed that anthocyanins pretreatment significantly inhibited  $A\beta_{1-42}$ -induced increase in intracellular ROS,  $H_2O_2$ , and increased the SOD expression through upregulating the Nrf2, HO-1, NQO-1 expression. Apoptosis was significantly inhibited by anthocyanins via down-regulation of Bax and up-regulation of Bcl-2. It can be concluded that high-purity *Aronia melanocarpa* anthocyanins could protect SH-SY5Y cell from  $A\beta_{1-42}$ -induced oxidative stress and apoptosis through a Nrf2 mechanism.

**Key words:** *Aronia melanocarpa*; anthocyanins; SH-SY5Y cell; oxidative stress; apoptosis

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD), 又叫老年性痴呆, 是一种进行性神经退行性疾病, 能够导

致记忆丧失, 认知功能障碍, 行为障碍, 社会障碍, 并且是痴呆的最常见原因<sup>[1,2]</sup>。据估计, 全世界有 2 400 万人患有痴呆症, 其中大多数人患有阿尔茨海默病<sup>[3]</sup>。此外, 阿尔茨海默病是一种常见的与年龄相关的疾病, 最常见于 65 岁或以上的人群<sup>[4,5]</sup>。因此, 阿尔茨海默病仍然是人口老龄化的主要健康问题之一, 阿尔茨海默病病例在未来几十年注定会显

收稿日期: 2020-05-09 接受日期: 2021-05-24

基金项目: 贵阳市财政支持贵阳学院学科建设与研究生教育项目 (2021-XK15); 贵州省普通高等学校功能食品重点实验室建设项目 (黔教合 KY 字 [2016] 007)

\* 通信作者 E-mail: lizi008009@126.com

著增长。目前,有几种假设可以解释阿尔茨海默病的发病机制,包括 $\beta$ -淀粉样蛋白( $A\beta$ )肽和 tau 蛋白过度磷酸化,这些在阿尔茨海默病的发病机制中起主要作用<sup>[6]</sup>。此外,越来越多的证据表明氧化应激和细胞凋亡在阿尔茨海默病中起关键作用<sup>[7]</sup>。相关研究表明,AD 患者的氧化应激能够导致细胞凋亡<sup>[8,9]</sup>。同时,氧化应激能够激活细胞保护机制,包括内源性抗氧化剂和抗氧化酶系统。参与这种保护作用的主要抗氧化酶是血红素氧合酶-1(HO-1),超氧化物歧化酶(SOD),过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)。抗氧化酶基因的转录激活主要受核转录相关因子(Nrf2)<sup>[10]</sup>的调节。一些植物化学物质可以激活 Nrf2/抗氧化反应元件(ARE)信号,从而上调抗氧化酶的表达,增强神经元对氧化应激的抵抗力<sup>[11]</sup>。在静息状态下,Nrf2 以复合物的形式存在。当复合物被破坏时,Nrf2 易位至细胞核并与 ARE 序列结合以促进抗氧化酶的表达。已知  $A\beta$  的细胞外沉积会导致神经元的氧化损伤和细胞凋亡,并且  $A\beta$  也被证明可诱导 ROS 和过氧化氢( $H_2O_2$ )过量产生,并降低 SOD 和 GSH-Px 水平,从而导致氧化应激<sup>[12]</sup>。

目前,花色苷对于阿尔茨海默病的预防、保护作用已经取得了一定的研究进展。Heo 等<sup>[13]</sup>研究了草莓花色苷对阿尔茨海默病细胞模型的神经保护活性。研究表明,草莓花色苷能够减少氧化应激的发生以及氧化应激诱导的细胞凋亡,从而能够对神经细胞起到保护的作用。Badshah 等<sup>[14]</sup>研究了黑大豆中花色苷对  $A\beta_{1-42}$  诱导的神经退行性细胞和动物模型的神经保护作用。研究表明了花色苷通过维持  $Ca^{2+}$  稳态,有效的减少神经细胞凋亡,对神经细胞能够起到保护作用。Meng 等<sup>[15]</sup>研究了矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷对阿尔茨海默病细胞模型的保护作用。结果表明矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷能够通过调节细胞抗氧化和凋亡相关基因来保护阿尔茨海默病细胞免受  $A\beta_{1-40}$  诱导的氧化应激和细胞凋亡。以上研究说明了花色苷可能成为 AD 等神经退行性疾病的潜在候选药物。此外,最近 Isaak 等<sup>[16]</sup>的研究发现由矢车菊-3-*O*-半乳糖苷,矢车菊-3-*O*-葡萄糖苷和矢车菊-3-*O*-阿拉伯糖苷组成的越橘花色苷能够保护心肌细胞免受氧化应激及细胞凋亡产生的损伤。先前的研究表明了黑果腺肋花楸中花色苷含量非常高,结构简单,主要由矢车菊-3-*O*-半乳糖苷,矢车菊-3-*O*-葡萄糖苷,矢车菊-3-*O*-阿拉伯糖苷及矢车菊-3-*O*

木糖苷组成<sup>[17]</sup>,高纯度的花色苷相对更容易分离出来。因此,我们选择高纯度的黑果腺肋花楸花色苷来研究对氧化应激相关的阿尔茨海默病的预防和保护作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和试剂

试验所需高纯度花色苷请参考 Meng 等<sup>[17]</sup>;  $\beta$ -淀粉样肽(1-42) ( $A\beta_{1-42}$ ,北京博奥森生物技术有限公司); DMEM (10565-018)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 10099-141)、gluta max(35050061) (美国 Gibco 公司); 二甲基亚砷(DMSO) (D8371,上海索莱宝公司); 2, 3-二甲氧基-1, 4-萘醌啉(D5439-5MG)、 $H_2O_2$  检测试剂盒(29300) (中国碧云天公司); SOD 检测试剂盒(19160)、annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒(APOAF-20TST) (美国 Sigma 公司); Nrf2 抗体(ab62352)、HO-1 抗体(ab13248)、NQO1 抗体(ab28947)、Bcl-2 抗体(ab196495)、Bax 抗体(ab32503)、GAPDH 内参抗体(Sc-32233)、山羊抗兔 IgG H&L (HRP, Ab6721)、山羊抗鼠 IgG H&L (HRP, Ab6789) (英国 Abcam 公司); BCA 蛋白质测定试剂盒(WLA004,沈阳万类生物有限公司); 试验所需引物(沈阳汇佰生物科技有限公司); TRIzol、TaKaRa 试剂盒(美国 Gibco 公司); SH-SY5Y 细胞(中科院上海细胞库)。

### 1.2 主要仪器设备

倒置显微镜(中国奥林巴斯有限公司); H-2050R 型超速冷冻离心机(湖南湘仪离心机有限公司); DZF-6050 型真空干燥箱(上海 SYSBERY 仪器有限公司); iMarkTM 型酶标仪(美国 Bio-Rad 有限公司); Mini-PROTEAN<sup>®</sup> Tetra 型垂直蛋白电泳仪(美国 Bio-Rad 有限公司); 5200 型凝胶成像系统(上海 Tianon 有限公司); ExicyclerTM 96 型荧光定量仪(韩国 BIONEER 有限公司)。

### 1.3 SH-SY5Y 细胞培养及分组

SH-SY5Y 细胞培养于含有 5%  $CO_2$ 、10% FBS 的 37 °C DMEM 培养基中,经过复苏、传代,然后保存于 4 °C 备用。共 200 g 的溶解于 10 mL 的 DMSO 中,得到 20 mg/mL 的花色苷原液并储存于 4 °C 备用。共 2 mg 的  $A\beta_{1-42}$  溶解于 1.8 mL 的 DMSO 中制成 257 mM 的原液并储存于 4 °C 备用。花色苷及  $A\beta_{1-42}$  的浓度的筛选,细胞给药及细胞分组参考 Meng 等<sup>[18]</sup>的方法,细胞主要分组如下。

对照组:SH-SY5Y 细胞在含有 5%  $CO_2$  的培养

箱中于 37 °C 下培养 24 h。

模型组 ( $A\beta_{1-42}$  组): 将  $A\beta_{1-42}$  提前一天放入含有 5%  $CO_2$  的培养箱中于 37 °C 老化 24 h, 然后加入 SH-SY5Y 细胞中, 在含有 5%  $CO_2$  的培养箱中于 37 °C 培养 24 h, 终浓度为 1  $\mu M$ 。

低剂量药物保护组、中剂量药物保护组以及高剂量药物保护组分别先用 20、40、60  $\mu g/mL$  花色苷预处理 SH-SY5Y 细胞 24 h, 在含有 5%  $CO_2$  的培养箱中于 37 °C 培养 24 h, 然后用 1  $\mu M$   $A\beta_{1-42}$  处理, 继续在含有 5%  $CO_2$  的培养箱中于 37 °C 培养 24 h。所述  $A\beta_{1-42}$  已在 37 °C 下老化 24 h。

## 1.4 氧化应激相关指标的测定

### 1.4.1 细胞内 ROS (reactive oxygen species) 的检测

采用 2,3-二甲氧基-1,4-萘醌对 SH-SY5Y 细胞进行染色, 使用荧光显微镜观察细胞内 ROS 水平。简而言之, 将生长良好且没有污染的 SH-SY5Y 细胞弃去培养基, 用适量 PBS 清洗细胞表面, 并弃去 PBS, 然后在 37 °C 的细胞培养箱中用适量胰蛋白酶消化细胞。待消化完成后, 用胰酶 2 倍体积的完全培养基中止消化, 并吹打培养瓶瓶底, 将细胞移入离心管, 1 000 rpm 离心 5 min, 去掉上清液, 加 1 mL 完全培养基吹打混匀细胞 (沿壁轻轻吹打 24 次左右), 每孔放入  $3 \times 10^5$  个细胞, 过夜, 根据试验分组对细胞进行给药, 过夜。爬片的细胞 PBS 2 mL 浸洗 2 次, 将 2,3-二甲氧基-1,4-萘醌母液稀释 100 倍, 对已放置在盖玻片上的细胞染色 15 min, PBS 2 mL 浸洗 2 次, 载玻片滴加一滴甘油, 将染色好的盖玻片反扣于甘油上 (细胞面朝下盖到载玻片上), 透明指甲油封片, 荧光显微镜 200 倍观察, 拍照。

### 1.4.2 细胞内超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 的检测

采用 SOD 测定试剂盒对细胞内 SOD 进行检测, 每个浓度收集  $1 \times 10^6$  个细胞, 用 100  $\mu L$  含 1% 蛋白酶抑制剂的 PBS 稀释, 并 12 000 rpm 离心 10 min, 取上清。准备 96 孔板, 每个样品分为样品孔和三个空白孔, 空白孔 1、空白孔 2、空白孔 3。样品孔和空白孔 2 加入 20  $\mu L$  样品, 在空白孔 1 和空白孔 3 中加入 20  $\mu L$  ddH<sub>2</sub>O; 每孔加入 200  $\mu L$  WST working solution, 并混匀。在空白孔 2 和空白孔 3 中加入 Dilution Buffer 20  $\mu L$ 。在空白孔 1 和样品孔中加入 20  $\mu L$  Enzyme Working Solution。37 °C 孵育 20 min, 酶标仪 450 nm 处进行读数。计算公式为:

$$\text{SOD 活性} = \{ [(S1-S3)-(SS-S2)] / (S1-S3) \} \times 100\%$$

SS: 样品孔的吸光度值; S1: 空白孔 1 的吸光度值; S2: 空白孔 2 的吸光度值; S3: 空白孔 3 的吸光度值。

### 1.4.3 细胞内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的检测

简而言之, 将 SH-SY5Y 细胞在裂解缓冲液中裂解并以 12 000 rpm 离心 10 min, 弃去沉淀, 将上清液储存在 -20 °C, 使用 BCA 蛋白质定量测定试剂盒定量蛋白质含量。用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 检测试剂盒测量细胞内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 水平, 并根据标准曲线计算, 样品中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度表示为  $\mu mol/g$  蛋白质。

## 1.5 Annexin-V-PI/FITC 检测细胞凋亡

采用 Annexin V-PI/FITC 细胞凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡。简而言之, 用 PBS 洗涤细胞, 然后弃去 PBS。在 37 °C 的培养箱中用胰蛋白酶消化细胞。然后用完全培养基终止消化, 并将细胞转移到离心管中。将细胞以 1 000 rpm 离心 5 min, 弃去上清液。吹打细胞并与 1 mL 培养基混合, 向每个孔中加入  $1 \times 10^6$  个细胞并放入培养箱中过夜。根据实验组处理细胞并在孵育 24 h 后收集。用 1  $\times$  结合缓冲液将细胞悬浮至  $1 \times 10^6/mL$ , 并将 500  $\mu L$  细胞悬浮液加入与 5  $\mu L$  Annexin V FITC 和 10  $\mu L$  PI 混合于每个流动管中。最后, 将反应体系在室温下避光孵育, 并使用 BD C6 流式细胞仪进行检测。

## 1.6 蛋白质印迹 (Western blot)

根据试验分组对 SH-SY5Y 细胞进行给药处理。根据文献所述提取蛋白质<sup>[14]</sup>。采用 BCA 蛋白质定量测定试剂盒测定蛋白质水平, 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶分离电泳 (SDS-PAGE) 分离蛋白质, 并将其转移到 PVDF 膜, 将膜用 PBST 浸泡, 在室温下转移到封闭溶液中 1.5 h, 然后与 PBST 稀释的一抗钙调蛋白、细胞色素 c、caspase-9、裂解的 caspase-3、Bcl-2、Bax 等抗体 (抗体信息见表 1) 在 4 °C 培养过夜 (GAPDH 为内参蛋白)。将膜与二抗以 1:2 000 的稀释度按照上述方式制备, 室温孕育 1.5 h, 然后用 PBST 洗涤三次, 大约 10 min。采用 ECL 显色试剂盒进行化学发光反应, 用 ECL 发光仪器观察条带, 并用凝胶图像处理系统进行光密度分析。

## 1.7 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR)

取对数生长期 SH-SY5Y 细胞, PBS 洗涤细胞表面, 弃去 PBS, 然后在 37 °C 的细胞培养箱中用胰蛋

表 1 抗体

Table 1 Antibodies

名称 Name	公司 Company	来源 Source	分子量 Molecular weight(kD)	稀释比例 Dilution ratio
Nrf-2	Abcam	Rabbit	68	1:1 000
HO-1	Abcam	Mouse	32	1:1 000
NQO1	Abcam	Rabbit	30	1:1 000
GAPDH	Abcam	Mouse	37	1:1 000

白酶消化细胞,消化完成后,使用完全培养基终止消化,吹打培养瓶底部,将细胞转移到离心管中,1 000 rpm 离心 5 min,弃去上清液,用 1 mL 完全培养基反复洗涤细胞三次并用其混合,然后在 37 °C 的细胞培养箱中培养过夜。根据试验分组对 SH-SY5Y 细胞进行给药处理,并将其置于含有 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中于 37 °C 下培养 24 h,然后收集。使用 TRIzol 从培养的 SH-SY5Y 细胞中提取总 RNA,并使用 TaKaRa

试剂盒进行逆转录。以通过反转录获得的 cDNA 为模板,采用荧光定量 PCR 仪进行扩增,反应体系为 20  $\mu$ L,其中,cDNA 模板 1  $\mu$ L,上下游引物(10  $\mu$ M)(见表 2)各 0.5  $\mu$ L,SYBR GREEN mastermix 10  $\mu$ L,然后 ddH<sub>2</sub>O 补足至 20  $\mu$ L。反应条件为 95 °C,10 min,(95 °C,10 s;60 °C,20 s;72 °C,30 s)共 40 个循环,4 °C,5 min。最后采用 Exicycler 96 实时定量荧光检测器进行 RT-PCR 分析。

表 2 荧光定量 PCR 所用引物

Table 2 Oligonucleotide primer sets for real-time PCR

名称 Name	序列(5'→3') Sequence(5'→3')
Nrf2-F	ACTTCTGTTGCTCAGGTAGCC
Nrf2-R	TGTCAGTTTGGCTTCTGGACT
HO-1-F	TGCACACCCAGGCAGAGAATG
HO-1-R	TGCAGCTCTTCTGGGAGTAG
NQO1-F	CTCACCGAGAGCCTAGTTCC
NQO1-R	ACGATCAGTGCTTCTTGCC
GAPDH F	TCAAGGCTGAGAACGGGAAG
GAPDH R	TGGACTCCACGACGTACTCA

## 1.8 数据统计与分析

采用 Excel 软件计算平均值和标准差。采用 SPSS 17.0 软件对所得数据进行统计分析。采用单因素方差分析(ANOVA)法进行组间差异显著性分析, $P < 0.05$  为显著, $P < 0.01$  为极显著。采用 Origin 7.5 软件作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 细胞内 ROS 的测定

由图 1 的结果我们可以看出,与对照组(control)相比,模型组( $A\beta_{1-42}$ )中的氧自由基明显增多,说明  $A\beta_{1-42}$  能够诱导 SH-SY5Y 细胞产生氧化应激。此外,与模型组相比,药物保护组中的氧自由基明显减少,而且,随着药物保护组中花色苷(anthocya-

nins, Ant)剂量的升高,细胞中的氧自由基也不断降低。其中,高剂量药物保护组( $A\beta_{1-42}$  + Ant(60  $\mu$ g/mL))细胞中的氧自由基含量最少,对细胞的保护作用最好。说明 Ant 能够削弱  $A\beta_{1-42}$  诱导 SH-SY5Y 细胞产生的氧化应激,能够对细胞起到保护作用。

### 2.2 细胞内 SOD 的测定

由图 2 的结果可以看出,与对照组相比,模型组的 SOD 活性显著低于对照组( $P < 0.05$ ),大约降低 16.24%。与模型组相比,药物保护组中随着花色苷含量的升高,SOD 的活性逐渐显著升高( $P < 0.05$ ),其中,高剂量药物保护组( $A\beta_{1-42}$  + Ant(60  $\mu$ g/mL))的 SOD 活性最高为 99.54%,与模型组相比,SOD 活性升高了 23.24%。

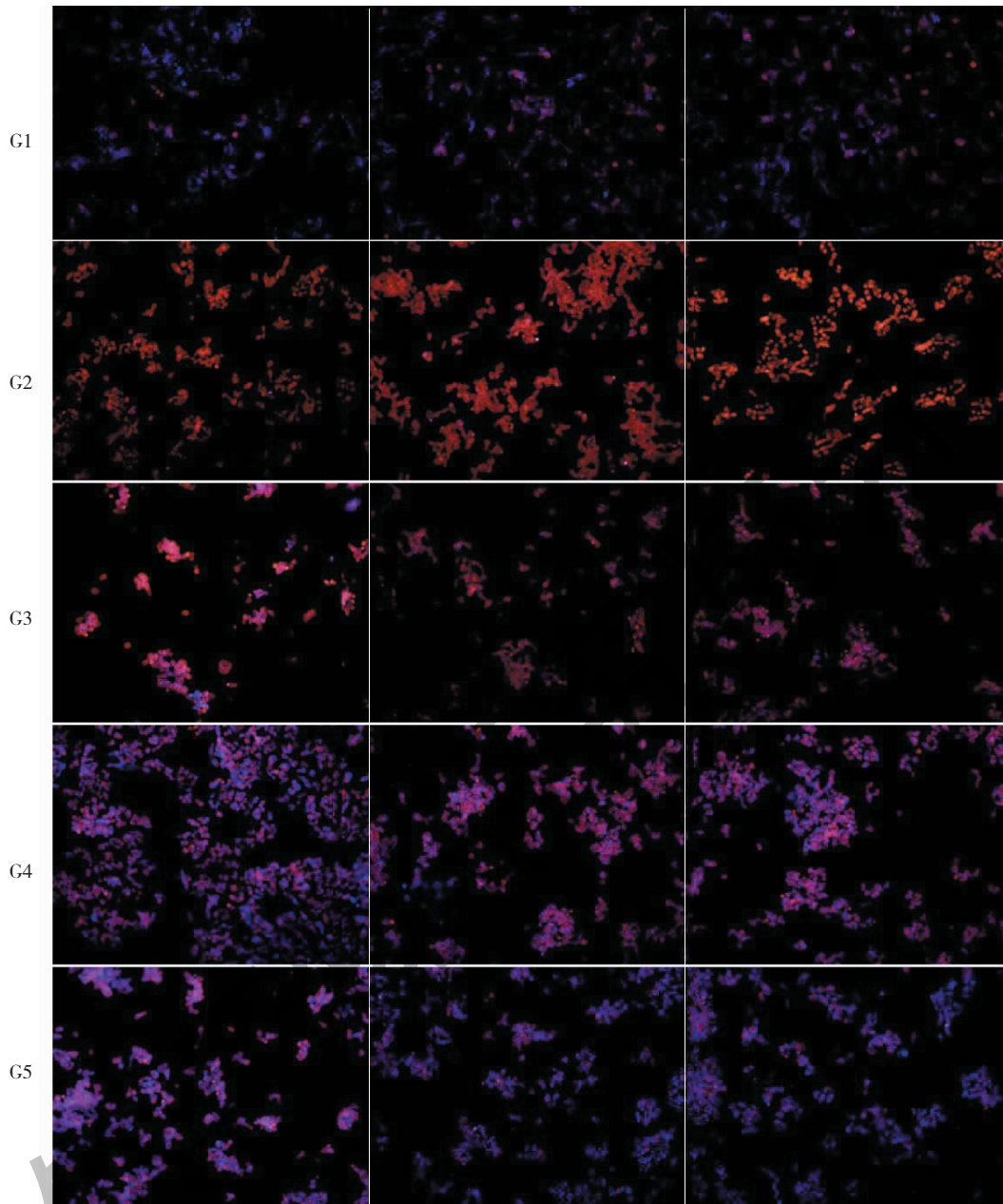


图1 细胞内 ROS 的测定

Fig. 1 The determination of intracellular ROS

注:红色:氧自由基生成增多;蓝色:抗氧化作用增加,氧自由基受抑制;G1:对照组;G2:模型组;G3:花色苷干预组(20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ );G4:花色苷干预组(40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ );G5:花色苷干预组(60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),下同。Note:Red:oxygen free radical production increased;Blue:antioxidant effect increased and oxygen free radical was inhibited;G1:Control group;G2:Model group ( $A\beta_{1-42}$ );G3: $A\beta_{1-42}$  + Ant (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ );G4: $A\beta_{1-42}$  + Ant (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ );G5: $A\beta_{1-42}$  + Ant (60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), the same below.

### 2.3 细胞内 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的测定

从图 3 可以看出,与对照组相比,模型组( $A\beta_{1-42}$ )细胞内  $\text{H}_2\text{O}_2$  的产生显著增加( $P < 0.05$ ),表明  $A\beta_{1-42}$  可诱导  $\text{H}_2\text{O}_2$  的产生。此外,在药物保护组中,随着花色苷浓度的增加,细胞内  $\text{H}_2\text{O}_2$  的产生

与模型组相比显著降低( $P < 0.05$ )。当花色苷浓度为 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,与对照组相比,细胞内  $\text{H}_2\text{O}_2$  的产生无明显变化( $P > 0.05$ )。这些结果表明,黑果腺肋花楸花色苷可以减少 SH-SY5Y 细胞中  $A\beta_{1-42}$  诱导的  $\text{H}_2\text{O}_2$  的产生。

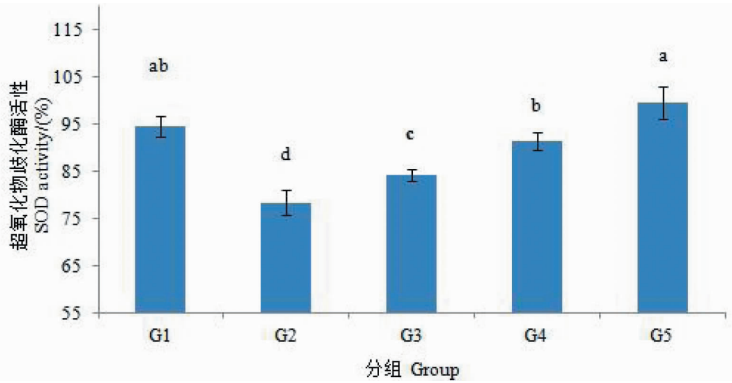
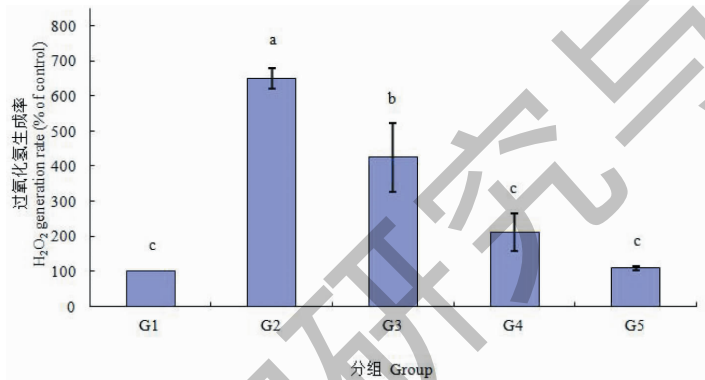


图 2 细胞内 SOD 的测定

Fig. 2 The determination of intracellular SOD

注:小写字母不同表示差异显著( $P < 0.05$ )。Note: Different lowercase letters represent significant difference ( $P < 0.05$ ).

图 3 细胞内  $H_2O_2$  的测定Fig. 3 The determination of intracellular  $H_2O_2$ 

注:小写字母不同表示差异显著( $P < 0.05$ )。Note: Different lowercase letters represent significant difference ( $P < 0.05$ ).

## 2.4 细胞凋亡的检测

从图 4 和表 3 可以看出,与对照组相比,模型组中早期细胞凋亡率增加了 3.3%,晚期细胞凋亡率增加了 4.5%,细胞总凋亡率增加了 7.8%,表明  $A\beta_{1-42}$  可诱导 SH-SY5Y 细胞凋亡。与模型组相比,在药物保护组中,随着药物保护组中花色苷含量的

增加,早期凋亡率,晚期凋亡率和总细胞凋亡率逐渐降低。当花色苷浓度为 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,与模型组相比,总细胞凋亡率下降了 8.3%。这些结果表明,黑果腺肋花楸花色苷预处理能够有效的削弱  $A\beta_{1-42}$  诱导 SH-SY5Y 细胞产生的细胞凋亡。

表 3 SH-SY5Y 细胞凋亡

Table 3 The apoptosis in SH-SY5Y cell

分组 Group	Q1 (%)	Q2 (%)	Q3 (%)	Q4 (%)
G1	0.3	0.9	94.0	4.8
G2	0.3	5.4	86.2	8.1
G3	0.3	2.5	91.3	5.9
G4	0.3	1.5	93.5	4.7
G5	0.1	1.0	94.7	4.2

注:Q1:死亡细胞占比;Q2:晚期凋亡细胞占比;Q3:正常细胞占比;Q4:早期凋亡细胞占比。

Note: Q1: The percentage of dead cells; Q2: The percentage of late apoptotic cells; Q3: The percentage of normal cells; Q4: The percentage of early apoptotic cells.

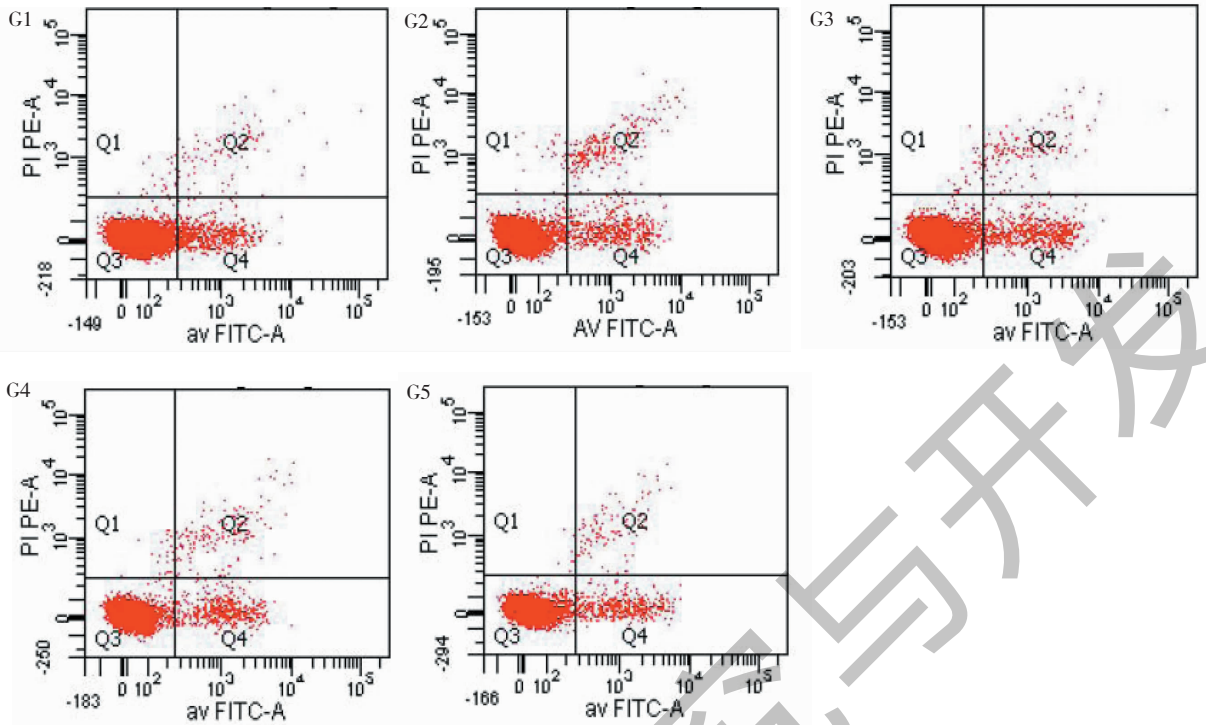


图4 SH-SY5Y 细胞凋亡

Fig. 4 The apoptosis in SH-SY5Y cell

## 2.5 蛋白印记分析

通过蛋白质印迹分析 Nrf2 相关抗氧化蛋白及凋亡相关蛋白表达,结果显示在图 5 中。与对照组相比, $\beta_{1-42}$ 组中 Nrf2、HO-1、NQO1、Bax 蛋白表达上调, $\beta_{1-42}$ 组 Bcl-2 蛋白表达下调。在药物保护组中,随着花色苷浓度的增加,与模型组相比,Nrf2、HO-1、NQO1 蛋白的表达逐渐上调,Bax 蛋白的表达逐渐下调,当花色苷浓度为 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,Nrf2、HO-1 和 NQO1 蛋白的表达量最高,Bax 蛋白的表达量最低。此外,当花色苷浓度为 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,与对照组相比,Bcl-2 蛋白表达略有下调,之后随着花色苷浓度的增加,Bcl-2 蛋白表达逐渐上调。当花色苷浓度为 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,Bcl-2 蛋白表达量最高。这些结果说明花色苷能够激活 Nrf2,使其转入细胞核内促进 HO-1 及 NQO1 蛋白的表达。此外,花色苷也能够促进抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,抑制促凋亡蛋白 Bax 的表达。

## 2.6 RT-PCR 分析

通过 RT-PCR 检测 Nrf2 相关基因和凋亡相关基因的转录,详细结果见图 6。从图中可以看出,与对照组相比, $\beta_{1-42}$ 组中 Nrf2、HO-1、NQO1 和 Bax 相对 mRNA 表达显著上调( $P < 0.05$ ), $\beta_{1-42}$ 组中 Bcl-2 相

对 mRNA 表达显著下调( $P < 0.05$ )。在药物保护组中,与模型组相比,当花色苷浓度为 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,Nrf2 相对 mRNA 表达下降 0.095,随着花色苷浓度的继续增加,Nrf2 相对 mRNA 表达与模型组相比显著上调( $P < 0.05$ )。当花色苷浓度为 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,NQO1、Bcl-2 相对 mRNA 表达与模型组相比无显著变化( $P > 0.05$ ),随着花色苷浓度的继续增加,NQO1、Bcl-2 相对 mRNA 表达相比于模型组显著上调( $P < 0.05$ )。此外,随着花色苷浓度的增加,与模型组相比,HO-1 相对 mRNA 表达显著上调( $P < 0.05$ ),Bax 显著下调( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论与结论

氧化应激产生的 ROS 直接或间接地损伤细胞内蛋白质、脂质、核酸等大分子物质的生理功能,是众多疾病发生的病理生理基础。机体在应对氧化应激的发生时形成了一套复杂的氧化应激应答系统来应对自由基和有毒物质的损害,当暴露于亲电子试剂或活性氧刺激时,机体自身能诱导出一系列的保护性蛋白,以缓解细胞所受的损害<sup>[19]</sup>。这一协调反应是由保护性蛋白 DNA 上游调节区的抗氧化反应元件(antioxidant responsive element, ARE)来调控的。研究表明,核转录相关因子 Nrf2 (nuclear factor

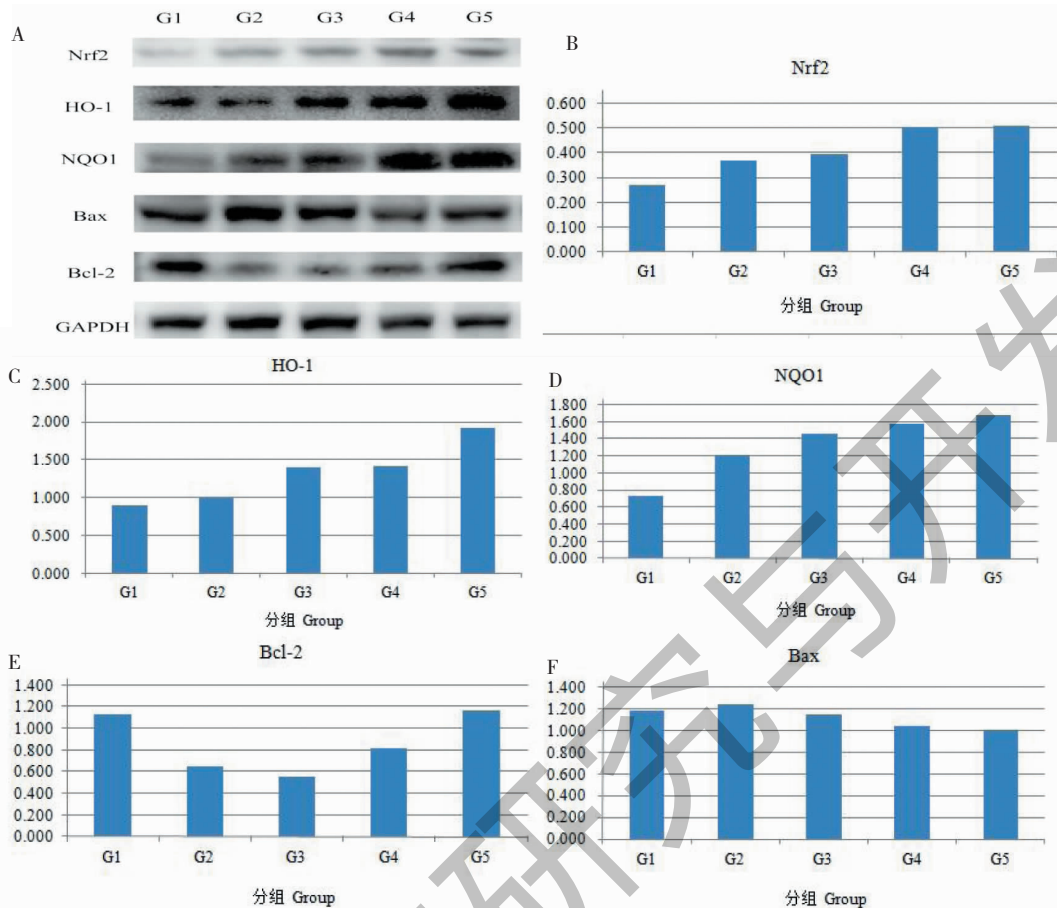


图5  $A\beta_{1-42}$  诱导的 SH-SY5Y 细胞中的凋亡相关蛋白的蛋白印记分析

Fig. 5 Western blot analysis of apoptotic-related proteins in  $A\beta_{1-42}$ -induced SH-SY5Y cells

erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 通过与 ARE 相互作用调节编码抗氧化蛋白,是迄今为止发现的最为重要的内源性抗氧化应激通路<sup>[20]</sup>。先前的研究已经表明了花色苷因其较强的抗氧化能力,能够清除体内自由基,降低氧化应激水平,保护机体免受氧化应激造成的损伤<sup>[21-23]</sup>。随着研究的进一步深入,研究表明花色苷能够通过 Nrf2 信号通路上调相关抗氧化酶的表达,降低氧化应激水平,从而保护阿尔茨海默病细胞或者动物模型免受氧化应激引起的损伤<sup>[24]</sup>。

此外,细胞凋亡经常伴随氧化应激的发生而发生,并且哺乳动物细胞中的细胞凋亡通过外在和内在途径进行。外在途径涉及细胞外信号因子与质膜中死亡受体的结合<sup>[25]</sup>。内在途径由细胞内应激激活并通过线粒体进行。线粒体凋亡途径受 Bcl-2 家族的调节,Bcl-2 家族包括抗凋亡蛋白如 Bcl-2 和 Bcl-xL,以及促凋亡蛋白如 Bax 和 Bak<sup>[26]</sup>。近年来,研究表明氧化应激和细胞凋亡促进了 AD 的发展。

因此,发掘可以预防神经元氧化损伤和凋亡的生物活性物质,从而有助于预防和控制 AD,具有重要的研究意义。

在前言中已经介绍了,目前一些研究已经报道花色苷能够通过减少氧化应激的发生以及氧化应激诱导的细胞凋亡从而对阿尔茨海默病起到预防和保护的作用。因此本研究采用  $A\beta_{1-42}$  诱导的 SH-SY5Y 细胞构建阿尔茨海默病细胞模型系统,选择 ROS、SOD、 $H_2O_2$  作为氧化应激相关指标,通过 Nrf2 信号通路研究花色苷对氧化应激及细胞凋亡的保护作用,评价花色苷的细胞保护作用。结果表明了黑果腺肋花楸花色苷能够激活 Nrf2 代谢通路,上调 HO-1、NQO1 基因 mRNA 及蛋白的表达,从而上调 HO-1、NQO1、SOD 等相关抗氧化酶的表达,降低细胞内的氧化应激水平。同时,黑果腺肋花楸花色苷还能够上调 Bcl-2 基因及蛋白的表达,下调 Bax 基因及蛋白的表达,从而降低细胞的凋亡。因此,黑果腺肋花楸花色苷能够有效保护阿尔茨海默病免受  $A\beta_{1-42}$



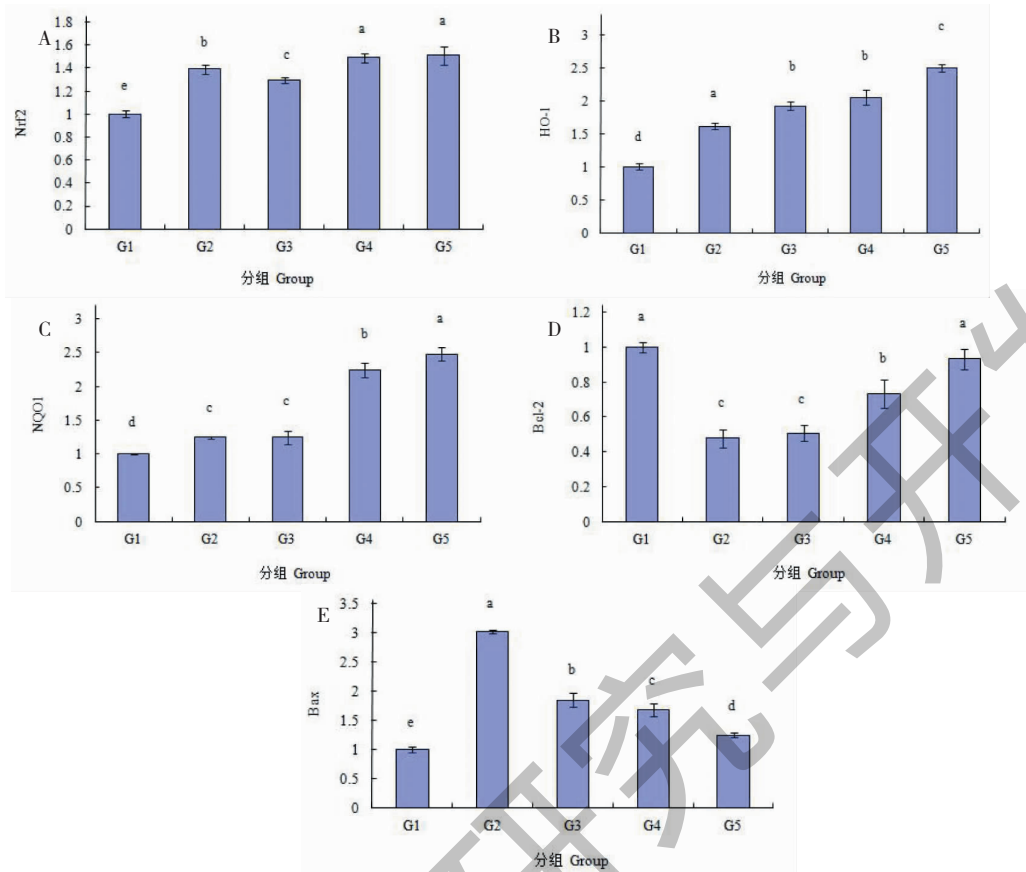


图6 RT-PCR对 $A\beta_{1-42}$ 诱导的SH-SY5Y细胞中相对mRNA表达分析

Fig. 6 The relative mRNA expression analysis using Real Time-PCR in  $A\beta_{1-42}$ -induced SH-SY5Y cells

注:小写字母不同表示差异显著( $P < 0.05$ )。Note: Different lowercase letters represent significant difference ( $P < 0.05$ ).

诱导SH-SY5Y细胞产生的氧化应激及细胞凋亡。先前的关于花色苷对阿尔茨海默病影响的研究大多数采用的花色苷均为粗提物或者混合物,而本次研究采用的花色苷混合物结构简单明确,并且纯度达到93%以上,更能够说明花色苷对阿尔茨海默病的作用,这对于花色苷及其相关产品的进一步开发具有重要的意义。

#### 参考文献

- 1 Kaj B, Leon MJD, Henrik Z. Alzheimer's disease [J]. Lancet, 2006, 368(9533): 387-403.
- 2 Yu Y, He W. Effects of imperatorin on the learning and memory impairment of  $A\beta_{1-42}$ -induced model of Alzheimer's disease in mice [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2017, 29: 1030-1034.
- 3 Ballard C, Gauthier S, Corbett A, et al. Alzheimer's disease [J]. Lancet, 2011, 377: 1019-1031.
- 4 Association A. Alzheimer's disease facts and figures [J]. Alzheimers Dement, 2014, 10(2): e47.

- 5 Prince M, Bryce R, Albanese E, et al. The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis [J]. Alzheimers Dement, 2013, 9(1): 63.
- 6 Brunden KR, Trojanowski JQ, Lee VM. Advances in tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies [J]. Nat Rev Drug Discov 2009, 8: 783-793.
- 7 Raynaud F, Marcilhac A. Implication of calpain in neuronal apoptosis. A possible regulation of Alzheimer's disease [J]. FEBS J, 2010, 273: 3437-3443.
- 8 Casado Á, López-Fernández ME, Casado MC, et al. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in vascular and Alzheimer dementias [J]. Neurochem Res, 2008, 33: 450-458.
- 9 Liang L, Luo M, Fu Y, et al. Cajaninstilbene acid (CSA) exerts cytoprotective effects against oxidative stress through the Nrf2-dependent antioxidant pathway [J]. Toxicol Lett, 2013, 219: 254-261.
- 10 Shokeir AA, Hussein AM, Barakat N, et al. Activation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and Nrf-2-dependent genes by ischaemic pre-conditioning and post-condi-

- tioning; new adaptive endogenous protective responses against renal ischaemia/reperfusion injury [J]. *Acta Physiol*, 2014, 210:342-353.
- 11 Kim SS, Lim J, Bang Y, et al. Licochalcone E activates Nrf2/ antioxidant response element signaling pathway in both neuronal and microglial cells; therapeutic relevance to neurodegenerative disease [J]. *J Nutr Biochem*, 2012, 23 (10): 1314.
- 12 Michelucci A. Characterization of the microglial phenotype under specific pro-inflammatory and anti-inflammatory conditions; Effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta [J]. *J Neuroimmunol*, 2009, 210(1-2): 3-12.
- 13 Heo HJ, Lee CY. Strawberry and its anthocyanins reduce oxidative stress-induced apoptosis in PC12 cells [J]. *J Agr Food Chem*, 2005, 53:1984-1989.
- 14 Badshah H, Kim TH, Kim MO. Protective effects of anthocyanins against amyloid beta-induced neurotoxicity *in vivo* and *in vitro* [J]. *Neurochem Int*, 2015, 80:51-59.
- 15 Meng LS, Li B, Li DN, et al. Cyanidin-3-O-glucoside attenuates amyloid-beta(1-40)-induced oxidative stress and apoptosis in SH-SY5Y cells through a Nrf2 mechanism [J]. *J Funct Foods*, 2017, 38:474-485.
- 16 Isaak CK, Petkau JC, Blewett H, et al. Lingonberry anthocyanins protect cardiac cells from oxidative-stress-induced apoptosis [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2017, 95:904-910.
- 17 Meng LS, Zhu JY, Ma Y, et al. Composition and antioxidant activity of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* cultivated in Haicheng, Liaoning, China [J]. *Food Biosci*, 2019, 30: 100413.
- 18 Meng LS, Xin G, Li B, et al. Anthocyanins extracted from *Aronia melanocarpa* protect SH-SY5Y cells against amyloid-beta(1-42)-induced apoptosis by regulating  $Ca^{2+}$  homeostasis and inhibiting mitochondrial dysfunction [J]. *J Agr Food Chem*, 2018, 66:12967-12977.
- 19 Talalay P, Dinkova-kostova AT, Holtzclaw WD. Importance of phase 2 gene regulation in protection against electrophile and reactive oxygen toxicity and carcinogenesis [J]. *Adv Enzyme Regul*, 2003, 43(1):121-134.
- 20 Yu X, Kensler T. Nrf2 as a target for cancer chemoprevention [J]. *Mutat Res-fund Mol M*, 2005, 591(1):93-102.
- 21 Braunlich M, Sliemstad R, Wangensteen H, et al. Extracts, anthocyanins and procyanidins from *Aronia melanocarpa* as radical scavengers and enzyme inhibitors [J]. *Nutrients*, 2013, 5:663-678.
- 22 Lee HY, Jin BW, Ryu G, et al. Neuroprotective effect of *Aronia melanocarpa* extract against glutamate-induced oxidative stress in HT22 cells [J]. *Bmc Complem Altern M*, 2017, 17: 207.
- 23 Broncel M, Kozirog M, Duchnowicz P, et al. *Aronia melanocarpa* extract reduces blood pressure, serum endothelin, lipid, and oxidative stress marker levels in patients with metabolic syndrome [J]. *Med Sci Monitor*, 2010, 16(1):CR28.
- 24 Fang Y, Li X, Li L, et al. The role of Nrf2 in protection against Pb-induced oxidative stress and apoptosis in SH-SY5Y cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2015, 86:191-201.
- 25 Gonzalez F, Schmg ZT, Houtkooper RH, et al. Cardiolipin provides an essential activating platform for caspase-8 on mitochondria [J]. *J Cell Biol*, 2008, 183(4):681.
- 26 Walensky LD. BCL-2 in the crosshairs; tipping the balance of life and death [J]. *Cell Death Differ*, 2006, 13(8):1339.

致谢:对以下合作单位参与本刊的学术建设表示由衷的感谢!

昆明医科大学药学院

西南交通大学生命科学与工程学院

西南交通大学期刊社