人参皂苷 Re 对鱼藤酮致 SH-SY5Y 细胞帕金森病模型的保护作用机制

赵文学[1, 2]，徐　燕[1, 2#]，刘冬光[1, 2]，孟　雪[1, 2*]，朱建国[1, 2]，姚　茹[1, 2]，姚景春[1, 2]，张贵民[1, 2*]

1. 鲁南制药集团股份有限公司 新药药理中心，山东 临沂　276006
2. 中药制药共性技术国家重点实验室，山东 临沂　276006

摘　要：目的　探究人参皂苷 Re 对鱼藤酮诱导的 SH-SY5Y 细胞帕金森病（Parkinson's disease，PD）模型的保护作用机制。**方法**　利用 0.3 μmol/L 鱼藤酮建立 SH-SY5Y 细胞 PD 模型，给予 2.5、5 μmol/L 人参皂苷 Re 或 10 μmol/L 左旋多巴（levodopa，*L*-DOPA）处理 24 h，通过 CCK-8 试剂盒检测细胞存活率；流式细胞仪检测细胞周期、凋亡、线粒体膜电位及活性氧（reactive oxygen species，ROS）含量变化；能量代谢分析仪检测细胞糖酵解功能及线粒体氧化磷酸化功能；ELISA 检测细胞内三磷酸腺苷（adenosine triphosphate，ATP）含量变化；免疫荧光检测细胞内 Parkin 和 PTEN 诱导性激酶蛋白-1（PTEN induced putative kinase-1，Pink-1）的表达情况；Western blotting 检测细胞内 Parkin、Pink-1、细胞色素 C（cytochrome C，Cyt-C）、B 淋巴细胞瘤-2（B-cell lymphoma-2，Bcl-2）、Bcl-2 相关 X 蛋白（Bcl-2 associated X protein，Bax）、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3（cystein-asparate protease-3，Caspase-3）、cleaved Caspase-3、核因子 E2 相关因子 2（nuclear factor erythroid 2-related factor 2，Nrf2）、血红素氧合酶-1（heme oxygenase-1，HO-1）、谷氨酸半胱氨酸连接酶亚基（glutamate-cysteine ligase catalytic subunit，GCLC）和 NADPH 醌氧化还原酶-1（NADPH quinine oxidoreductase-1，NQO-1）蛋白表达的变化。**结果**　以 0.3 μmol/L 鱼藤酮建立 SH-SY5Y 细胞 PD 模型，细胞存活率显著下降（$P<0.01$），细胞阻滞于 G_0/G_1 期，细胞凋亡比例显著升高（$P<0.01$），线粒体膜电位及 ATP 含量显著下降（$P<0.01$），ROS 生成量显著升高（$P<0.01$），糖酵解 PER 值、细胞的最大呼吸能力、备用呼吸能力及 ATP 合成能力均显著下降（$P<0.01$），Parkin、Pink-1、Bcl-2、HO-1、GCLC、NQO1 蛋白表达显著下调（$P<0.01$），Cyt-C 从线粒体向胞质大量释放（$P<0.01$），Nrf2 核转移降低（$P<0.01$），Bax、cleaved Caspase-3 蛋白表达显著上调（$P<0.01$）；给予 *L*-DOPA 或人参皂苷 Re 干预后，明显增加细胞存活率（$P<0.05$、0.01），降低细胞凋亡率（$P<0.01$），减轻细胞 G_0/G_1 期阻滞作用（$P<0.05$、0.01），增强细胞糖酵解 PER 值、细胞的最大呼吸能力、备用呼吸能力及 ATP 合成能力（$P<0.05$、0.01），维护了线粒体功能稳态，表现为线粒体膜电位、ATP 含量显著增加（$P<0.05$、0.01），ROS 生成量显著减少（$P<0.05$、0.01），Parkin、Pink-1、Bcl-2、HO-1、GCLC、NQO1 表达显著上调（$P<0.05$、0.01），抑制 Cyt-C 从线粒体向细胞质释放（$P<0.05$、0.01），Nrf2 核转移增加（$P<0.05$、0.01），Bax、cleaved Caspase-3 表达显著下调（$P<0.05$、0.01）。**结论**　人参皂苷 Re 可明显改善鱼藤酮诱导的细胞毒性，其机制可能是人参皂苷 Re 通过活化 Parkin 及 Pink-1 蛋白，维护线粒体功能稳态，激活 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1（Kelch like ECH associated protein 1，Keap1）-Nrf2-抗氧化反应元件（antioxidant response element，ARE）信号通路，抑制线粒体介导的 Caspase 级联反应，从而抑制神经细胞凋亡，发挥神经保护作用。

关键词：人参皂苷 Re；帕金森病；SH-SY5Y 细胞；能量代谢；线粒体稳态；氧化应激

中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2023)11 - 3548 - 11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.11.016

Protective mechanism of ginsenoside Re on rotenone-induced SH-SY5Y cell model of Parkinson's disease

ZHAO Wen-xue[1, 2], XU Yan[1, 2], LIU Dong-guang[1, 2], MENG Xue[1, 2], ZHU Jian-guo[1, 2], YAO Ru[1, 2], YAO Jing-chun[1, 2], ZHANG Gui-min[1, 2]

1. New Drug Pharmacology Center of Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 276006, China
2. State Key Laboratory of Generic Technology of Traditional Chinese Medicine, Linyi 276006, China

收稿日期：2023-01-04

基金项目：山东省重大科技创新工程（2021CXGC010508）；山东省自然科学基金资助项目（ZR2021QH289）；国家重点研发计划（2019YFC1711205）；国家重点研发计划（2019YFC1711200）

作者简介：赵文学（1994—），男，硕士，从事中药新药研发与安全性评价。E-mail: zwx940108@163.com

***通信作者：**张贵民（1969—），男，研究员，从事中药新药研发与安全性评价。E-mail: lunanzhangguimin@163.com

孟　雪（1995—），女，硕士，从事中药新药研发与安全性评价。E-mail: 763427259@qq.com

#共同第一作者：徐　燕（1982—），女，硕士，从事中药新药研发与安全性评价。E-mail: xuyan119716@163.com

Abstract: Objective To explore the protective mechanism of ginsenoside Re against rotenone-induced Parkinson's disease (PD) model in SH-SY5Y cells. **Methods** PD model of SH-SY5Y cells was established induced by 0.3 μmol/L rotenone, cells were treated with 2.5, 5 μmol/L ginsenoside Re or 10 μmol/L levodopa (*L*-DOPA) for 24 h, cell survival rate was detected by CCK-8; The changes of cell cycle, apoptosis, mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species (ROS) content were detected by flow cytometry; The cell glycolysis function and mitochondrial oxidative phosphorylation function were detected by energy metabolism analyzer; ELISA was used to detect the intracellular adenosine triphosphate (ATP) content changes; Immunofluorescence was used to detect intracellular expressions of Parkin and PTEN induced kinase protein-1 (PINK-1); Western blotting was used to detect intracellular Parkin, Pink-1, cytochrome C (Cyt-C), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), cysteine aspartate protease-3 (Caspase-3), cleared Caspase-3, nuclear factor E2 related factor 2 (Nrf2), heme oxygenase-1 (HO-1), glutamate cysteine ligase catalytic subunit (GCLC) and NADPH quinine oxidoreductase-1 (NQO-1) expressions. **Results** PD model of SH-SY5Y cells was established with 0.3 μmol/L rotenone, cell survival rate was significantly decreased ($P < 0.01$), cells were arrested in G_0/G_1 phase, percentage of apoptosis was significantly increased ($P < 0.01$), mitochondrial membrane potential and ATP content were significantly decreased ($P < 0.01$), ROS production was significantly increased ($P < 0.01$), glycolytic PER value, maximum respiratory capacity, standby respiratory capacity and ATP synthesis capacity were significantly decreased ($P < 0.01$), Parkin, Pink-1, Bcl-2, HO-1, GCLC and NQO1 protein expressions were significantly decreased ($P < 0.01$), Cyt-C was released in large quantities from mitochondria to cytoplasm ($P < 0.01$), Nrf2 nuclear transfer was reduced ($P < 0.01$), Bax and cleaved Caspase-3 protein expressions were significantly upregulated ($P < 0.01$); After intervention with *L*-DOPA or ginsenoside Re, cell survival rate was significantly increased ($P < 0.05$, 0.01), cell apoptosis rate was reduced ($P < 0.01$), cell G_0/G_1 phase arrest was reduced ($P < 0.05$, 0.01), cell glycolysis PER value, cell maximum respiratory capacity, standby respiratory capacity and ATP synthesis capacity were enhanced ($P < 0.05$, 0.01), functional stability of mitochondria was maintained, manifested as mitochondrial membrane potential, ATP content were significantly increased ($P < 0.05$, 0.01), ROS production was significantly decreased ($P < 0.05$, 0.01), Parkin, Pink-1, Bcl-2, HO-1, GCLC and NQO1 expressions were significantly upregulated ($P < 0.05$, 0.01), Cyt-C release from mitochondria to cytoplasm was inhibited ($P < 0.05$, 0.01), Nrf2 nuclear transfer was increased ($P < 0.05$, 0.01), Bax and cleaved Caspase-3 expressions were significantly downregulated ($P < 0.05$, 0.01). **Conclusion** Ginsenoside Re can significantly improve the cytotoxicity induced by rotenone, and its mechanism may be that ginsenoside Re maintains mitochondrial functional homeostasis by activating Parkin and Pink-1 proteins, activating Kelch like ECH associated protein 1 (Keap1)-Nrf2-antioxidant response element (ARE) signaling pathway, and inhibiting mitochondrial mediated Caspase cascade reaction, thus inhibiting neuronal apoptosis and exerting neuroprotective effects.

Key words: ginsenoside Re; Parkinson's disease; SH-SY5Y cells; energy metabolism; mitochondrial homeostasis; oxidative stress

帕金森病（Parkinson's disease，PD）是发病率仅次于阿尔茨海默病的神经退行性疾病，以其在老年人群中的高发性和对社会的危害性而倍受关注，主要表现为震颤、肌肉强直、运动迟缓和姿势反射障碍等，严重影响患者的生活能力[1-2]。PD 确切的致病机制尚不明确，随着对 PD 致病机制的不断探索，线粒体功能障碍与氧化应激学说已逐渐证实在 PD 的发生和发展中扮演者重要角色，抑制 PD 模型中的线粒体功能损伤与氧化应激已成为当前抵抗 PD 的重要策略[3-5]。目前临床对于 PD 的治疗主要采取对症治疗，当下复方左旋多巴（levodopa，*L*-DOPA）为治疗 PD 的最佳方案，但由于其严重的不良反应，给 PD 的药物治疗前景蒙上了阴影[6]。因此，探寻不良反应小的有效治疗药物已成为 PD 研究的首要问题。

中药资源丰富，从天然产物中筛选出疗效确切、安全无毒防治 PD 的药物具有得天独厚的优势[7]。人参皂苷 Re 作为“百草之王”人参 *Panax ginseng* C. A. Mey.中重要的活性成分，属于四环三萜类衍生物，已被证明具有突出的神经保护作用。据报道，人参皂苷 Re 对 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶（1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine，MPTP）阳离子诱导的人骨髓神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞损伤具有明显的保护作用，人参皂苷 Re 也可挽救 PTEN 诱导性激酶蛋白-1（PTEN induced putative kinase-1，Pink-1）特异性缺失导致的线粒体电子传递链复合物 IV 活力改变，人参皂苷 Re 还可逆转 PD 小鼠多巴胺神经元凋亡一系列调控基因和蛋白的异常表达来实现多巴胺神经元的保护作用，如减少诱导型一氧化氮合酶（inducible nitric oxide synthase，iNOS），从而减少一氧化氮（nitric oxide，NO）的生成，下调 PD 小鼠黑质部促凋亡蛋白 p53 的表达，抑制 MPTP 诱导小鼠黑质星形胶质细胞增生、调节脑内阿片肽和抗黑质多巴胺能神经元凋亡等[8-11]。

课题组前期已对人参皂苷 Re 在 PD 发生及发展过程中的作用途径进行了初步探索[12]，本研究旨在深入剖析人参皂苷 Re 潜在的神经保护作用途径及作用机制，为人参类中药防治 PD 供科学依据。

1 材料

1.1 细胞

SH-SY5Y 细胞购自东莞赛尔生物科技有限公司。

1.2 药品与试剂

人参皂苷 Re（批号 B21055，质量分数≥98%）购自源叶生物科技（上海）有限公司；*L*-DOPA（批号 B21710）购自源叶生物科技（上海）有限公司；鱼藤酮（批号 MB5842）购自大连美仑生物技术有限公司；Annexin V-FITC（批号 556547）购自美国 BD 公司；CCK-8 试剂盒（批号 AR1199）、线粒体蛋白提取试剂盒（批号 C3601）、细胞核蛋白抽提试剂盒（批号 P0028）、线粒体膜电位（mitochondrial membrane potential，MMP）检测试剂盒（批号 C2008S）、细胞周期检测试剂盒（批号 C1052）、活性氧（reactive oxygen species，ROS）检测试剂盒（批号 S0033S）、三磷酸腺苷（adenosine triphosphate，ATP）检测试剂盒（批号 S0027）均购自上海碧云天生物技术有限公司；β-actin 抗体（批号 3700S）、二抗（批号 14708S）、Parkin 抗体（批号 4211S）、Pink-1 抗体（批号 6946S）、B 淋巴细胞瘤-2（B-cell lymphoma-2，Bcl-2）抗体（批号 15071S）、Bcl-2 相关 X 蛋白（Bcl-2 associated X protein，Bax）抗体（批号 14796S）、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3（cystein-asparate protease-3，Caspase-3）抗体（批号 9662S）、cleaved Caspase3 抗体（批号 9664S）、细胞色素 C（cytochrome C，Cyt-C）抗体（批号 4280S）、核因子 E2 相关因子 2（nuclear factor erythroid 2-related factor 2，Nrf2）抗体（批号 12721S）、血红素氧合酶-1（heme oxygenase-1，HO-1）抗体（批号 26416S）、谷氨酸半胱氨酸连接酶亚基（glutamate-cysteine ligase catalytic subunit，GCLC）抗体（批号 48005S）、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（nicotinamide adenine dinucleotide phosphate，NADPH）醌氧化还原酶-1（NADPH quinine oxidoreductase-1，NQO-1）抗体（批号 3187S）均购自美国 CST 公司；牛血清白蛋白（bovine serum albumin，BSA，批号 A1933）购自默克（中国）有限公司；Seahorse XF 细胞线粒体压力测试试剂盒（批号 103015-100）、Seahorse XF 糖酵解速率测定试剂盒（批号 103344-100）均购自美国 Agilent 公司。

1.3 仪器

AMF5000 型 EVOS™成像系统、371 型 CO_2 培养箱、1410101 型 Multiskan™ FC 酶标仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；PL203 型天平、S210 型 pH 计（梅特勒托利多有限公司）；SX-700 型高压蒸汽灭菌锅（上海博讯实业有限医疗设备厂）；WP-UP-YJ-40 型号超纯水机（沃特浦）；1645050 型电泳仪（美国 Bio-Rad 公司）；FL1000 型蛋白成像系统（上海哈灵生物技术有限公司）；Amnis FlowSight 流式细胞仪（美国 Merck 公司）；Seahorse XF HS Mini 能量代谢分析仪（美国 Agilent 公司）。

2 方法

2.1 细胞培养

SH-SY5Y 细胞用含 10%胎牛血清、1%双抗的 DME/F12 培养基，于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养。

2.2 PD 细胞模型的构建及人参皂苷 Re、*L*-DOPA 安全浓度的摸索

取对数生长期的 SH-SY5Y 细胞以 2×10^4/孔接种于 96 孔板，待其融合度达到 70%时，加入预先配制好的 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1.0 μmol/L 的鱼藤酮工作液处理 12、24、48 h，随后按 CCK-8 试剂盒操作说明检测各孔吸光度（*A*）值，计算细胞存活率，筛选出鱼藤酮的最适建模浓度及最佳建模时间。

取对数生长期的 SH-SY5Y 细胞以 2×10^4/孔接种于 96 孔板，待其融合度达到 70%时，加入预先配制好的 2.5、5、10、20、40、60 μmol/L 的人参皂苷 Re 工作液处理 24 h，随后按 CCK-8 试剂盒操作说明检测各孔 *A* 值，计算细胞存活率，筛选出人参皂苷 Re 的安全浓度。

取对数生长期的 SH-SY5Y 细胞以 2×10^4/孔接种于 96 孔板，待其融合度达到 70%时，加入预先配制好的 2.5、5、10、20、40 μmol/L 的 *L*-DOPA 工作液处理 24 h，随后按 CCK-8 试剂盒操作说明检测各孔 *A* 值，计算细胞存活率，筛选出 *L*-DOPA 的安全浓度。

2.3 人参皂苷 Re、*L*-DOPA 对鱼藤酮诱导的 SH-SY5Y 细胞活力的影响

取对数生长期的 SH-SY5Y 细胞以 2×10^4/孔接种于 96 孔板，待其融合度达到 70%时，设置对照组、模型组、*L*-DOPA（2.5、5、10 μmol/L）组和人参皂苷 Re（2.5、5 μmol/L）组，模型组和各给药组加入 0.3 μmol/L 鱼藤酮，各给药组再加入相应药物，对照组加入不含药物的培养基，处理 24 h。按 CCK-8

试剂盒操作说明检测各孔 *A* 值，计算细胞存活率。

2.4 细胞周期的检测

取对数生长期的 SH-SY5Y 细胞以 4×10⁴/孔接种于 6 孔板，待其融合度达到 70%时，设置对照组、模型组、*L*-DOPA（10 μmol/L）组和人参皂苷 Re（2.5、5 μmol/L）组，模型组和各给药组加入 0.3 μmol/L 鱼藤酮，各给药组再加入相应药物，对照组加入不含药物的培养基，处理 24 h。按细胞周期试剂盒操作说明加入 RNase/PI 染色工作液，通过 Amnis 流式细胞仪检测各组细胞在 G_1、S、G_2 期的含量分布。

2.5 细胞凋亡检测

取对数生长期的 SH-SY5Y 细胞以 4×10⁴/孔接种于 6 孔板，待其融合度达到 70%时，按“2.4”项下方法分组并给药，胰蛋白酶消化收集细胞并用预冷的 PBS 漂洗，4 ℃、1500 r/min 离心 10 min，弃上清，用 500 μL 1×Binding Buffer 重悬细胞，加入 5 μL 的 Annexin V-FITC 与 5 μL 的碘化丙啶（PI）染液，混匀后避光静置 15 min，通过流式细胞仪检测各组细胞凋亡水平。

2.6 细胞能量代谢检测

2.6.1 细胞线粒体压力测定 取对数生长期的 SH-SY5Y 细胞以 2×10⁴/孔接种于 XF 细胞培养板中，待其融合度达到 70%时，按“2.4”项下方法分组并给药，弃去培养液，每孔加入 200 μL XF RPMI 培养液，弃去，反复清洗 3 次后加入 XF RPMI 培养液，使各孔终体积为 180 μL，放于 37 ℃无 CO_2 培养箱中静置 1 h，随后按细胞线粒体压力测定试剂盒操作说明上机检测。

2.6.2 细胞糖酵解速率测定 取对数生长期的 SH-SY5Y 细胞以 2×10⁴/孔接种于 XF 细胞培养板中，待其融合度达到 70%时，按“2.4”项下方法分组并给药，弃去各孔培养液，每孔加入 200 μL XF RPMI 培养液，弃去，反复清洗 3 次后加入 XF RPMI 培养液，使各孔终体积为 180 μL，放于 37 ℃无 CO_2 培养箱中静置 1 h，随后按细胞糖酵解测定试剂盒操作说明上机检测。

2.7 线粒体功能检测

2.7.1 MMP 的检测 取对数生长期的 SH-SY5Y 细胞以 4×10⁴/孔接种于 6 孔板，待其融合度达到 70%时，按“2.4”项下方法分组并给药，胰蛋白酶消化收集细胞，并用预冷的 PBS 漂洗，4 ℃、1500 r/min 离心 10 min，弃上清，用 1 mL 罗丹明 123 染色工作液重悬细胞，37 ℃避光孵育 30 min，1500 r/min 离心 5 min，弃上清加入适量 PBS 重悬细胞，通过流式细胞仪检测各组细胞 MMP 的变化[13]。

2.7.2 细胞内 ROS 检测 取对数生长期的 SH-SY5Y 细胞以 4×10⁴/孔接种于 6 孔板，待其融合度达到 70%时，按“2.4”项下方法分组并给药，按 ROS 试剂盒操作说明对各组细胞进行染色，通过荧光显微镜及流式细胞仪检测各组细胞 ROS 含量的变化。

2.7.3 细胞内 ATP 含量检测 取对数生长期的 SH-SY5Y 细胞以 4×10⁴/孔接种于 6 孔板，待其融合度达到 70%时，按“2.4”项下方法分组并给药，弃去培养基，按 ATP 检测试剂盒操作说明使用酶标仪检测细胞内 ATP 含量的变化。

2.8 线粒体相关蛋白表达的检测

2.8.1 免疫荧光检测 Parkin、Pink-1 表达 取对数生长期的 SH-SY5Y 细胞以 4×10⁴/孔接种于 6 孔板，待其融合度达到 70%时，按“2.4”项下方法分组并给药，PBS 缓慢清洗各孔细胞，加入适量 4%多聚甲醛，于 37 ℃固定 20 min，弃去多聚甲醛并用 PBS 清洗各孔细胞，加入 0.5% TritonX-100 置于 37 ℃孵育 15 min，PBS 洗涤后加入 5% BSA 封闭 30 min，加入配制好的一抗，4 ℃孵育过夜，次日弃去一抗，加入相应二抗，室温孵育 1 h，PBS 清洗后加入适量 DAPI 染色 20 min，通过荧光显微镜观察 Parkin、Pink-1 阳性表达情况。

2.8.2 Western blotting 检测 Parkin、Pink-1、Bax、Bcl-2、cleaved Caspase-3、Caspase-3、Cyt-C、Nrf2、HO-1、GCLC 和 NQO1 蛋白表达

（**1**）蛋白提取：取对数生长期的 SH-SY5Y 细胞以 4×10⁴/孔接种于 6 孔板，待其融合度达到 70%时，设置对照组、模型组和人参皂苷 Re（2.5、5 μmol/L）组，模型组和各给药组加入 0.3 μmol/L 鱼藤酮，各给药组再加入相应药物，对照组加入不含药物的培养基，处理 24 h。弃去培养基，用 PBS 洗涤 1 遍，用胰蛋白酶消化细胞，4 ℃、1200 r/min 离心 5 min 收集细胞，弃上清，PBS 洗涤 2 次，按线粒体蛋白提取试剂盒说明书提取线粒体蛋白，按细胞核蛋白抽提试剂盒说明书提取细胞核蛋白。

（**2**）Western blotting 检测：采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白浓度，蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，封闭后加入一抗，4 ℃孵育过夜，次日 PBST 洗膜后加入二抗，室温孵育 2 h，PBST 洗膜后加适量 ECL 荧光剂显影，分析条带灰度值。

2.9　统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，应用 GraphPad Prism 6 软件进行统计学分析，多组间差异分析应用 One-way ANOVA 分析方法中 LSD 分析，两组间差异分析应用 *T* 检验。

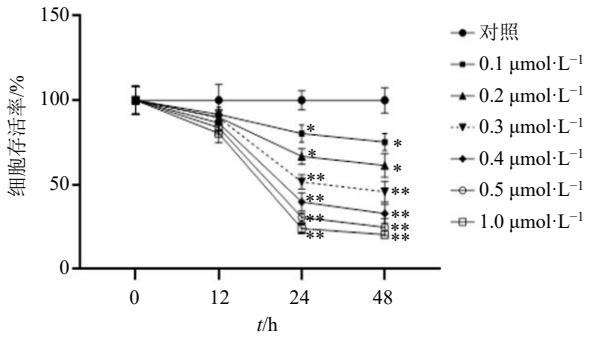
3　结果

3.1　鱼藤酮建模浓度及建模时间的确定

如图 1 所示，与对照组比较，SH-SY5Y 细胞给予不同浓度的鱼藤酮处理 12、24、48 h 后，细胞存活率呈剂量和时间相关性地降低。0.3 μmol/L 鱼藤酮处理 24 h 后，细胞存活率为（51.67±4.22）%，处理 48 h 与 24 h 相比，细胞存活率无显著性变化，因此选择 0.3 μmol/L 处理 24 h 作为鱼藤酮的最佳建模浓度及建模时间。

3.2　人参皂苷 Re 安全浓度的确定及对鱼藤酮诱导 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用

如图 2 所示，SH-SY5Y 细胞给予不同浓度的人参皂苷 Re 处理后，当人参皂苷 Re 的浓度达到 10 μmol/L 时，细胞存活率明显下降（$P<0.05$），且呈剂量相关性，因此选择 2.5、5 μmol/L 的人参皂苷 Re 进行后续实验。SH-SY5Y 细胞给予不同浓度的 *L*-dopa 处理后，当 *L*-DOPA 浓度达到 20 μmol/L 时，细胞存活率明显下降（$P<0.05$），且呈剂量相关性，因此选择 2.5、5、10 μmol/L *L*-DOPA 进行后续考察。



与对照组比较：$^{*}P<0.05$　$^{**}P<0.01$

$^{*}P<0.05$　$^{**}P<0.01$ *vs* control group

图 1　鱼藤酮对 SH-SY5Y 细胞存活率的影响（$\bar{x} \pm s$，$n=3$）

Fig. 1　Effect of rotenone on survival rate of SH-SY5Y cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

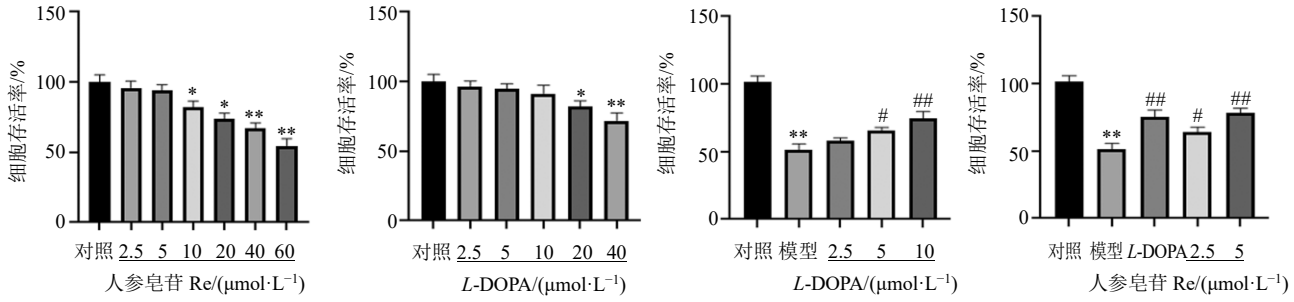
SH-SY5Y 细胞经鱼藤酮诱导损伤后，细胞存活率显著下降（$P<0.01$）；给予 2.5、5 μmol/L 人参皂苷 Re 或 5、10 μmol/L *L*-DOPA 处理后，细胞存活率明显上升（$P<0.05$、0.01），其中 5 μmol/L 人参皂苷 Re 与 10 μmol/L *L*-DOPA 作用效果相比无差异，由此可得出人参皂苷 Re 对鱼藤酮诱导的细胞毒性具有良好的改善作用。

3.3　人参皂苷 Re 对鱼藤酮诱导的 SH-SY5Y 细胞周期的影响

如表 1 所示，与对照组比较，模型组 G_0/G_1 期细胞比例显著升高（$P<0.01$），S 期与 G_2/M 期细胞比例显著降低（$P<0.01$），表明鱼藤酮可诱导 SH-SY5Y 细胞出现明显的 G_1 期阻滞作用；与模型组比较，各给药组 G_0/G_1 期细胞比例显著降低（$P<0.05$、0.01），S 期与 G_2/M 期细胞比例显著升高（$P<0.05$、0.01），以 5 μmol/L 人参皂苷 Re 作用效果最为显著，表明人参皂苷 Re 可显著缓解鱼藤酮诱导 SH-SY5Y 细胞周期的改变。

3.4　人参皂苷 Re 对鱼藤酮诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响

鱼藤酮可诱导细胞损伤，从而导致细胞发生 G_0/G_1 期阻滞，诱发细胞凋亡，因此接下来检测给药前后细胞凋亡的变化，如图 3 所示，与对照组比较，模型组细胞凋亡率显著升高（$P<0.01$）；与模型组比较，各给药组细胞凋亡率均显著下降（$P<0.01$）。



与对照组比较：$^{*}P<0.05$　$^{**}P<0.01$；与模型组比较：$^{\#}P<0.05$　$^{\#\#}P<0.01$，下图同

$^{*}P<0.05$　$^{**}P<0.01$ *vs* control group; $^{\#}P<0.05$　$^{\#\#}P<0.01$ *vs* model group, same as below figures

图 2　人参皂苷 Re 及 *L*-DOPA 对鱼藤酮诱导的 SH-SY5Y 细胞存活率的影响（$\bar{x} \pm s$，$n=3$）

Fig. 2　Effects of ginsenoside Re and *L*-DOPA on survival rate of SH-SY5Y cells induced by rotenone ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

表 1 人参皂苷 Re 对鱼藤酮诱导的 SH-SY5Y 细胞周期的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Table 1 Effect of ginsenoside Re on cell cycle of SH-SY5Y cells induced by rotenone ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	剂量/(μmol·L^{-1})	细胞周期		
		G_0/G_1/%	S/%	G_2/M/%
对照	—	21.62±2.03	41.83±3.44	30.75±2.68
模型	—	57.49±2.41**	10.69±2.87**	12.78±2.28**
L-DOPA	10	37.28±2.15$^{\#\#}$	22.67±3.87$^{\#}$	20.29±1.73$^{\#}$
人参皂苷 Re	2.5	49.25±2.08$^{\#}$	16.83±1.59$^{\#}$	18.12±1.92$^{\#}$
	5	32.56±2.67$^{\#\#}$	27.70±3.12$^{\#\#}$	24.51±1.62$^{\#\#}$

与对照组比较：$^{**}P<0.01$；与模型组比较：$^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$，表 2 同

$^{**}P < 0.01$ *vs* control group; $^{\#}P < 0.05$ $^{\#\#}P < 0.01$ *vs* model group, same as table 2

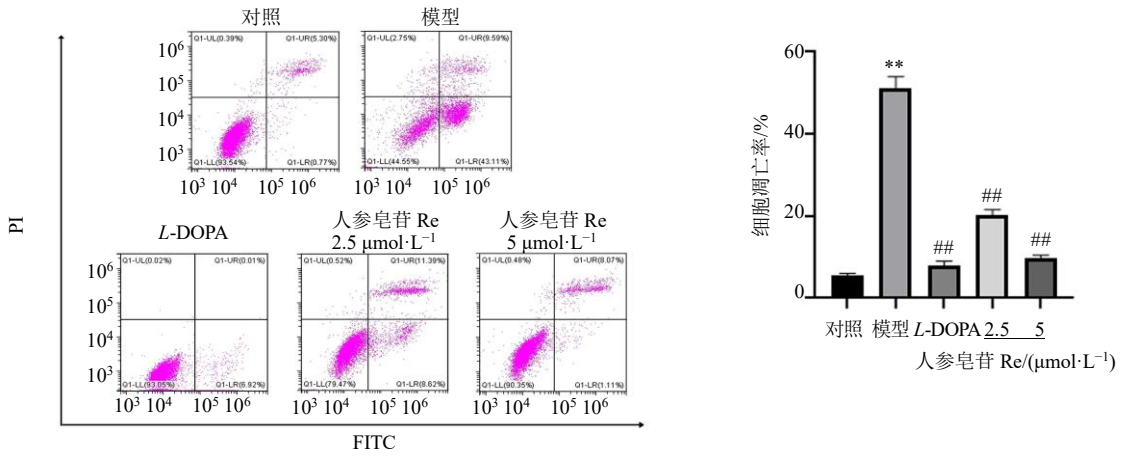
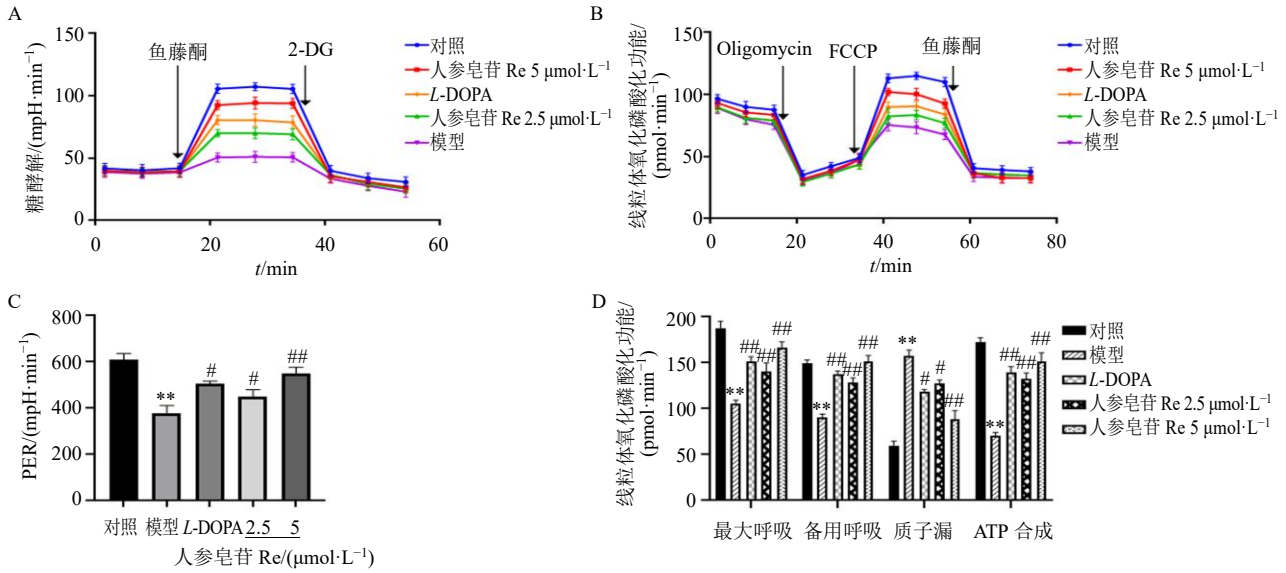


图 3 人参皂苷 Re 对鱼藤酮诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 3 Effect of ginsenoside Re on apoptosis of SH-SY5Y cells induced by rotenone ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.5 人参皂苷 Re 对鱼藤酮诱导的 SH-SY5Y 细胞糖酵解功能及线粒体氧化磷酸化功能的影响

接下来对细胞糖酵解及线粒体氧化磷酸化功能进行检测，如图 4-A、C 所示，与对照组比较，模型组细胞内糖酵解 PER 值显著降低（$P<0.01$）；与模型组比较，各给药组细胞内糖酵解 PER 值明显升高



A、C-细胞糖酵解功能 B、D-线粒体氧化磷酸化功能

A, C-cell glycolysis function B, D-mitochondrial oxidative phosphorylation function

图 4 人参皂苷 Re 对鱼藤酮诱导的 SH-SY5Y 细胞能量代谢的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 4 Effect of ginsenoside Re on energy metabolism of SH-SY5Y cells induced by rotenone ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

（P＜0.05、0.01）。如图 4-B、D 所示，与对照组比较，模型组细胞的最大呼吸能力、备用呼吸能力及 ATP 合成能力均显著降低（P＜0.01），质子漏显著增加（P＜0.01），从而造成线粒体功能损伤；与模型组比较，各给药组细胞的最大呼吸能力、备用呼吸能力及 ATP 合成能力均显著增强（P＜0.01），质子漏降低（P＜0.05、0.01），其中以 5 μmol/L 人参皂苷 Re 作用效果最为显著。

3.6　人参皂苷 Re 对鱼藤酮诱导的 SH-SY5Y 细胞线粒体功能紊乱的保护作用

3.6.1　人参皂苷 Re 对细胞 MMP 的保护作用　接下来对线粒体功能进行一致性评价，首先检测 MMP 水平的变化，如图 5 所示，与对照组比较，模型组胞内 MMP 水平显著降低（P＜0.01）；与模型组比较，各给药组细胞内 MMP 明显升高（P＜0.05、0.01），以 5 μmol/L 人参皂苷 Re 作用最为显著。

3.6.2　人参皂苷 Re 对细胞内 ROS 生成的保护作用　ROS 诱导的氧化应激与线粒体功能紊乱密切相关，并且 ROS 也是调控细胞凋亡的重要因素之一。因此接下来检测细胞内 ROS 生成量的变化，如图 6 所示，与对照组比较，模型组细胞内 DCF 荧光强度显著升高（P＜0.01），胞内 ROS 生成量显著增加（P＜

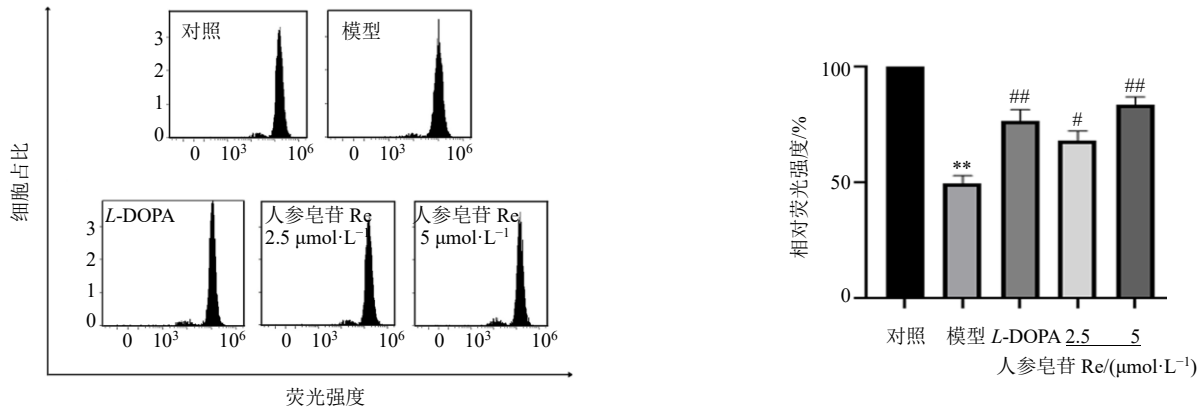


图 5　人参皂苷 Re 对鱼藤酮诱导的 SH-SY5Y 细胞 MMP 的影响（$\bar{x} \pm s$，n = 3）

Fig. 5　Effect of ginsenoside Re on MMP of SH-SY5Y cells induced by rotenone ($\bar{x} \pm s$, n = 3)

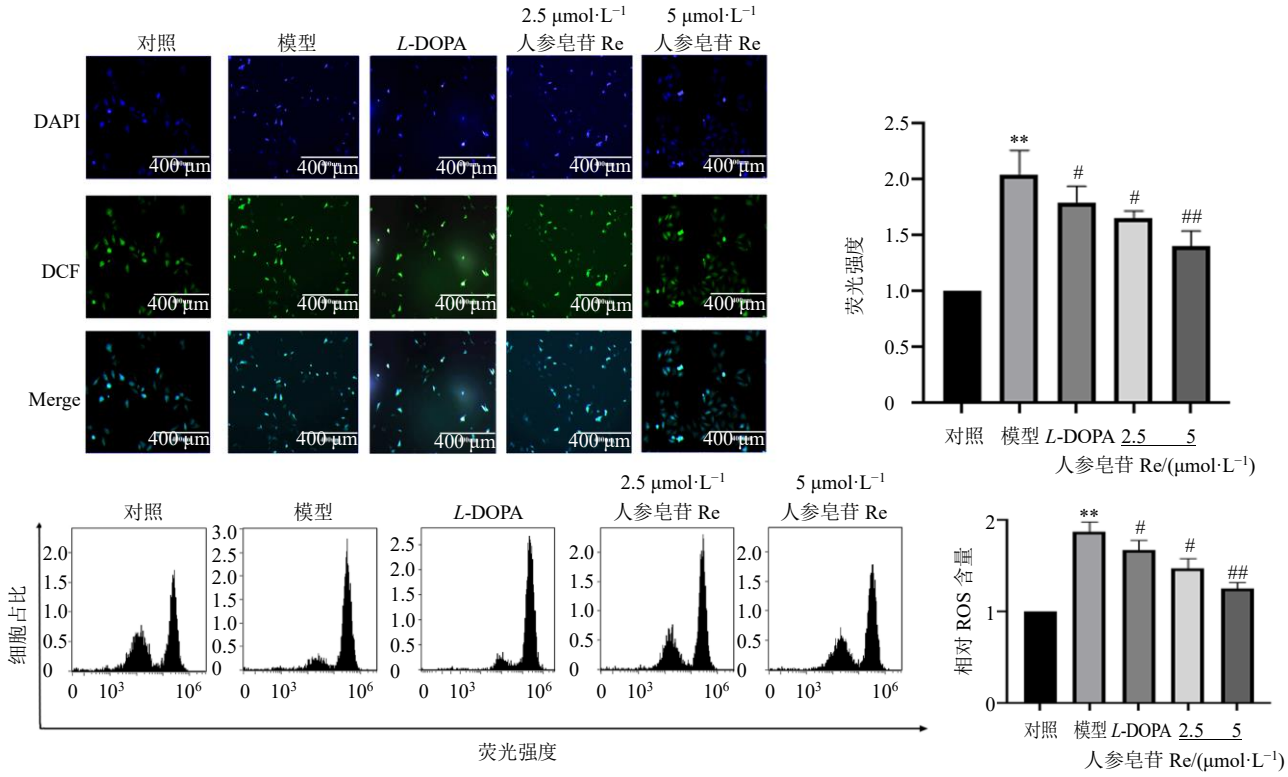


图 6　人参皂苷 Re 对鱼藤酮诱导的 SH-SY5Y 细胞内 ROS 生成的影响（$\bar{x} \pm s$，n = 3;×10）

Fig. 6　Effect of ginsenoside Re on intracellular ROS production of SH-SY5Y cells induced by rotenone ($\bar{x} \pm s$, n = 3; × 10)

0.01）；与模型组比较，各给药组细胞内 DCF 荧光强度显著降低（$P<0.05$、0.01），胞内 ROS 生成量显著降低（$P<0.05$、0.01），以 5 μmol/L 人参皂苷 Re 作用效果最为显著。

3.6.3 人参皂苷 Re 对细胞内 ATP 含量的保护作用 接下来进一步检测线粒体功能的关键指标——胞内 ATP 含量，如表 2 所示，与对照组比较，模型组细胞内 ATP 含量显著降低（$P<0.01$）；与模型组比较，各给药组细胞内 ATP 含量显著升高（$P<0.05$、0.01），以 5 μmol/L 人参皂苷 Re 作用最为显著。

3.7 免疫荧光检测 Pakin 和 Pink-1 蛋白表达

Parkin、Pink-1 的异常表达与 PD 等神经性疾病的发展密切相关，同时也在线粒体功能稳态的维护中起着至关重要的作用[14]，因此本研究从 Parkin 与 Pink-1 对线粒体功能稳态与 PD 之间的关系进行深入探讨，如图 7 所示，与对照组比较，模型组细胞内 Parkin 和 Pink-1 蛋白表达减少；与模型组比较，各给药组细胞内 Parkin 和 Pink-1 蛋白表达增强。

表 2 人参皂苷 Re 对鱼藤酮诱导的 SH-SY5Y 细胞内 ATP 含量的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Table 2 Effect of ginsenoside Re on intracellular ATP content of SH-SY5Y cells induced by rotenone ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	剂量/(μmol·L^{-1})	ATP/(μmol·L^{-1})
对照	—	9.64±0.22
模型	—	2.76±0.38**
L-DOPA	10	5.75±0.87$^{\#}$
人参皂苷 Re	2.5	4.94±0.93$^{\#}$
	5	7.52±0.52$^{\#\#}$

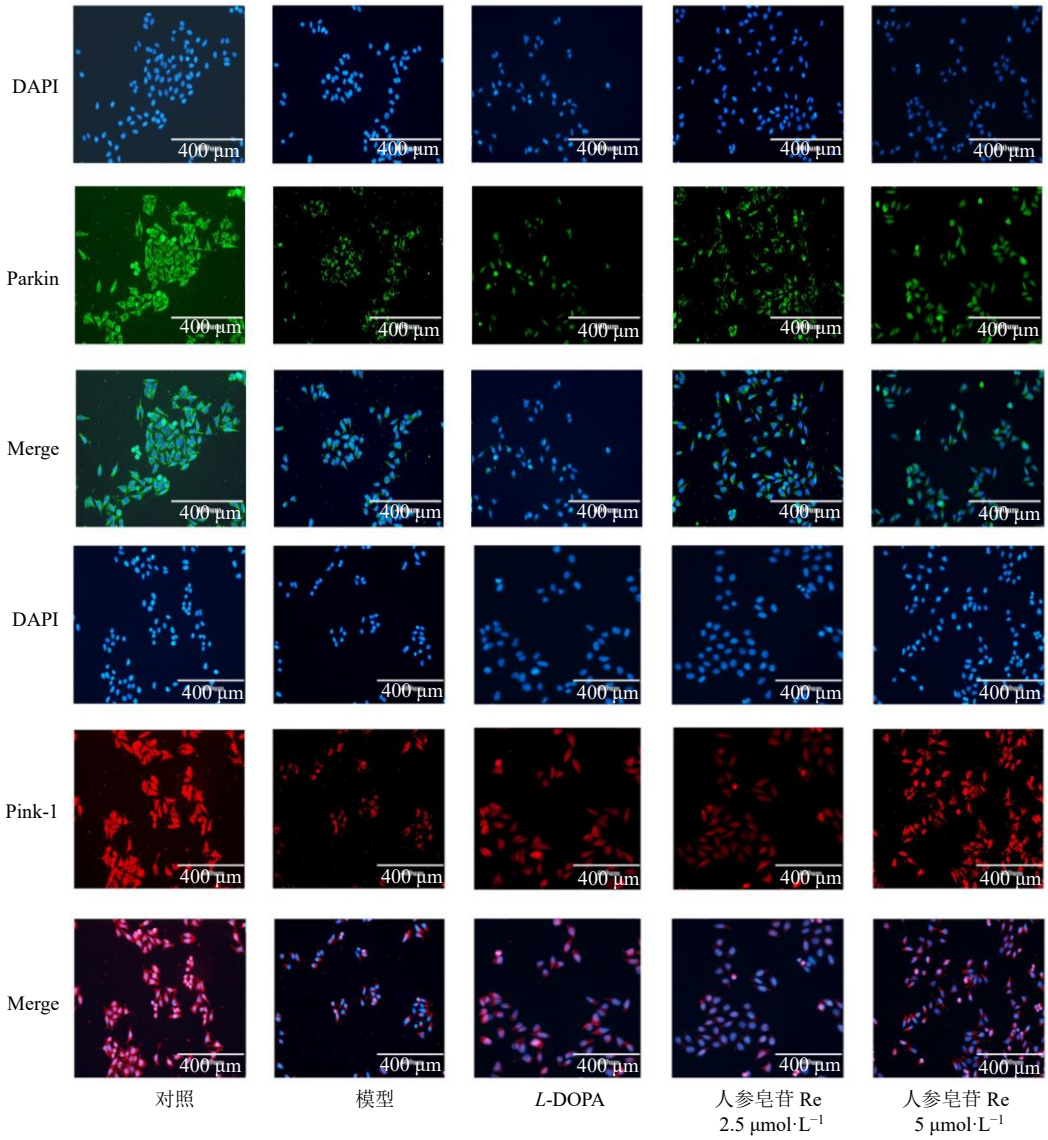


图 7 免疫荧光检测人参皂苷 Re 对鱼藤酮诱导的 SH-SY5Y 细胞内 Parkin 和 Pink-1 表达的影响（×10）

Fig. 7 Immunofluorescence detection of effect of ginsenoside Re on expressions of Parkin and Pink-1 in SH-SY5Y cells induced by rotenone (× 10)

3.8　人参皂苷 Re 对鱼藤酮诱导的 SH-SY5Y 细胞 Parkin、Pink-1、凋亡及抗氧化相关蛋白表达的影响

3.8.1　人参皂苷 Re 对鱼藤酮诱导的 SH-SY5Y 细胞 Parkin 和 Pink-1 蛋白表达的影响　如图 8 所示，与对照组比较，模型组 Parkin 及 Pink-1 蛋白表达显著下调（$P<0.01$）；与模型组比较，各给药组 Parkin 蛋白表达显著升高（$P<0.05$、0.01），人参皂苷 Re（5 μmol/L）组 Pink-1 蛋白表达显著升高（$P<0.01$）。

3.8.2　人参皂苷 Re 对鱼藤酮诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡相关蛋白表达的影响　如图 9 所示，与对照组比较，模型组细胞线粒体内 Cyt-C 蛋白表达水平显著下调（$P<0.01$），胞质中 Cyt-C 蛋白表达水平显著上调（$P<0.01$），Bcl-2 蛋白表达显著下调（$P<0.01$），Bax 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达显著上调（$P<0.01$），表明鱼藤酮可破坏细胞线粒体膜通透性，导致 Cyt-C 大量释放，造成线粒体功能紊乱，诱导凋亡蛋白 Bax、Bcl-2、cleaved Caspase-3 的异常表达；与模型组比较，给予人参皂苷 Re 处理后，可显著升高线粒体内 Cyt-C 蛋白表达（$P<0.05$、0.01），降低胞质中 Cyt-C 蛋白表达（$P<0.05$、0.01），降低 Bax、cleaved Caspase-3 的表达（$P<0.05$、0.01），上调 Bcl-2 的表达（$P<0.05$、0.01），表明人参皂苷 Re 可通过改变线粒体膜的通透性，抑制 Cyt-C 的释放，维护线粒体功能稳态，抑制细胞凋亡的发生。

3.8.3　人参皂苷 Re 对鱼藤酮诱导的 SH-SY5Y 细胞 Nrf2、HO-1、GCLC 和 NQO1 蛋白表达的影响　人参皂苷 Re 对鱼藤酮诱导神经毒性的保护作用与线粒体稳态的维系密切相关，线粒体是 ROS 产生的主要场所，当 ROS 含量较高时会发生氧化应激反应，氧化应激亦是诱导 PD 的主要病因之一，因此，针对人参皂苷 Re 的抗氧化作用进一步研究。如图 10 所示，与对照组比较，模型组细胞 HO-1、GCLC 及

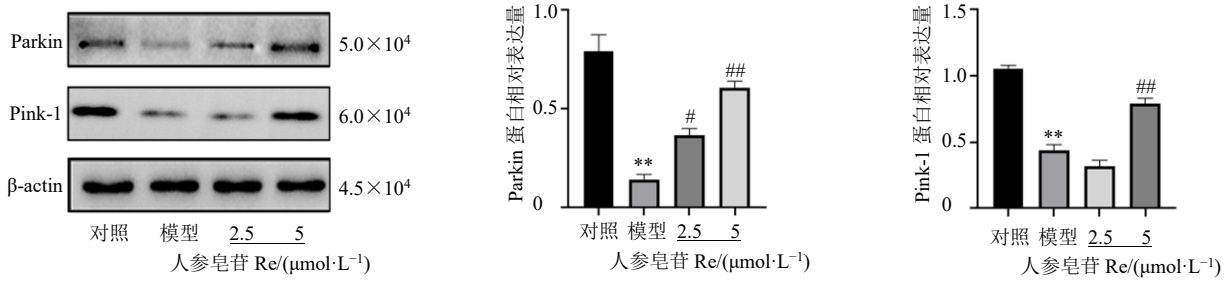


图 8　人参皂苷 Re 对鱼藤酮诱导的 SH-SY5Y 细胞 Parkin 和 Pink-1 蛋白表达的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 8　Effect of ginsenoside Re on Parkin and Pink-1 protein expressions in SH-SY5Y cells induced by rotenone ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

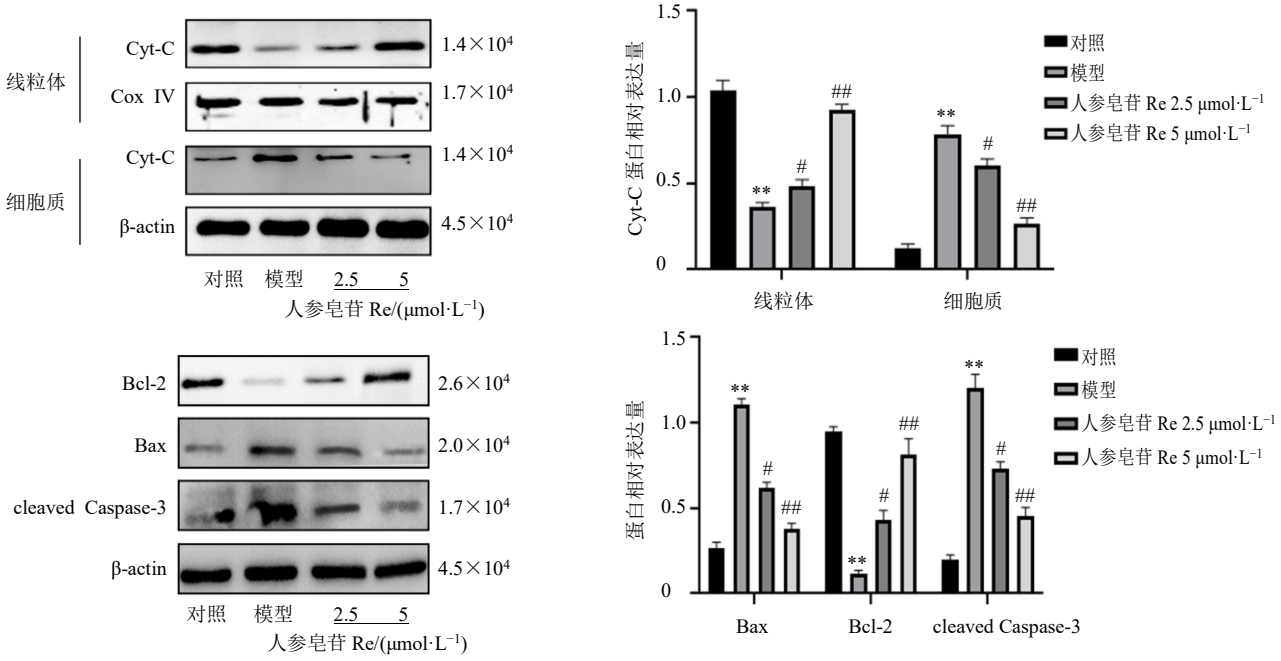


图 9　人参皂苷 Re 对鱼藤酮诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡相关蛋白表达的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 9　Effect of ginsenoside Re on apoptosis related protein expressions in SH-SY5Y cells induced by rotenone ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

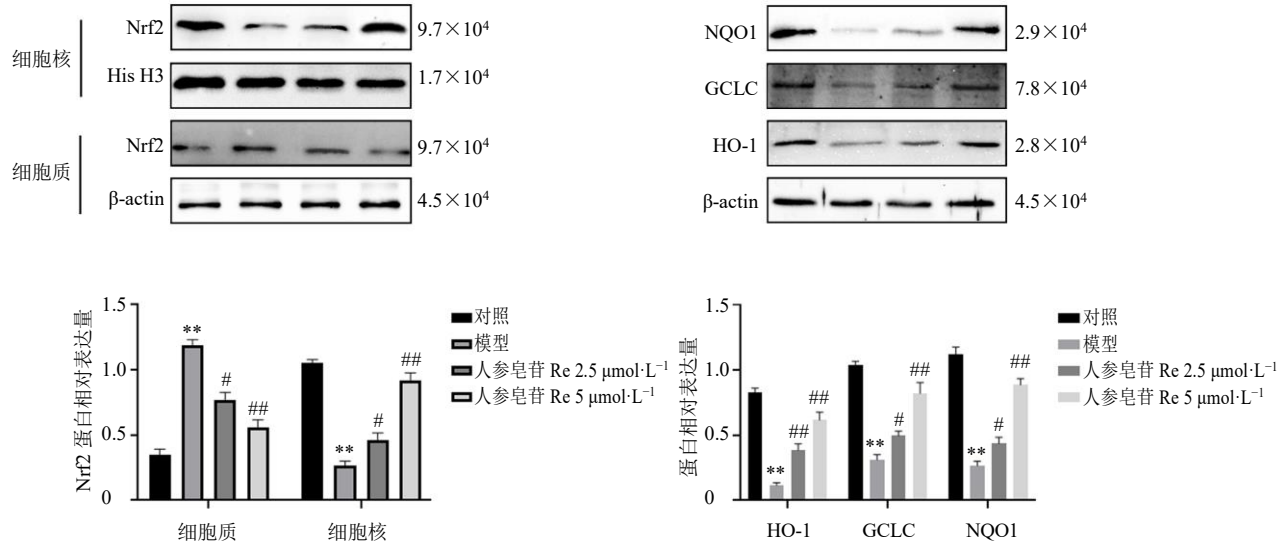


图 10　人参皂苷 Re 对鱼藤酮诱导的 SH-SY5Y 细胞抗氧化相关蛋白表达的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 10　Effect of ginsenoside Re on antioxidant related protein expressions in SH-SY5Y cells induced by rotenone ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

NQO1 表达显著下调（$P<0.01$），Nrf2 核转移显著减少（$P<0.01$）；给予人参皂苷 Re 处理后，细胞内 HO-1、GCLC 及 NQO1 表达显著上调（$P<0.05$、0.01），Nrf2 核转移显著增多（$P<0.05$、0.01）。

4　讨论

近年来，针对 PD 细胞模型的研究已逐渐成为焦点，常用其探索发病机制、了解药物作用靶点及研发新药等，目前常用于实验研究的细胞株有大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤 PC12 细胞系、SH-SY5Y 细胞系及原代中脑细胞系等。其中 SH-SY5Y 细胞系具有人类成熟神经元的形态，与原代海马神经元相比更容易体外培养，因此被广泛用于中枢神经系统的体外模型研究[15-18]。

MPTP 可选择性地引起黑质致密部多巴胺能神经元损伤，成为第一个被证实有中枢 DA 神经元毒性的外源性化学物质，但 MPTP 在自然界中并不存在[19-23]，鱼藤酮是一种线粒体复合物抑制剂，同时作为 MPTP 的结构类似物，具有明显的神经毒性，也具有高度亲脂性，容易越过血脑屏障，不需要任何转运体即可进入多巴胺能神经元[24-27]。因此本研究选用鱼藤酮作为化学诱导剂构建体外 PD 模型，并从线粒体功能稳态与氧化应激等方面对机制进行深入研究。

本研究结果显示，SH-SY5Y 细胞经鱼藤酮诱导损伤后，细胞存活率显著下降，细胞凋亡率显著上升，细胞糖酵解能力及线粒体氧化磷酸化能力明显丧失，推测鱼藤酮可能通过破坏线粒体膜的通透性，导致 MMP 下降，进而造成线粒体内 ATP 合成障碍及线粒体膜转换孔异常打开，从而抑制细胞糖酵解能力及氧化磷酸化能力，诱导线粒体内 Cyt-C 大量释放到细胞质，继而激活 Caspase-3 信号通路，启动 Caspase 级联反应，引起细胞凋亡，抑制神经细胞的生长；给予人参皂苷 Re 处理后，上述 PD 样病理症状均显著改善，推测人参皂苷 Re 可能通过修复线粒体膜的通透性，抑制线粒体内 Cyt-C 的释放，继而维护线粒体功能稳态，激活 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1（Kelch like ECH associated protein 1，Keap1）-Nrf2-抗氧化反应元件（antioxidant response element，ARE）信号通路，提高神经细胞的抗氧化活力，抑制线粒体介导的 Caspase-3 凋亡信号通路，抑制神经元细胞凋亡，从而发挥神经保护作用（图 11）。

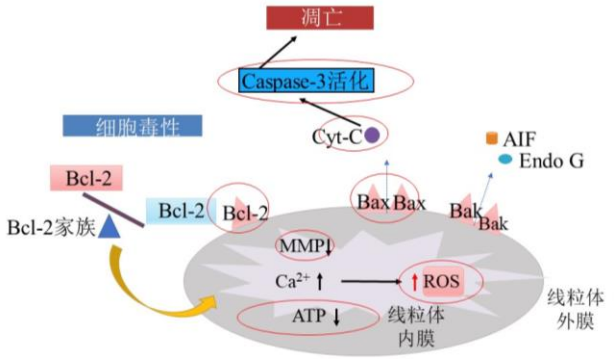


图 11　人参皂苷 Re 对鱼藤酮诱导的 SH-SY5Y 细胞的神经保护作用机制

Fig. 11　Neuroprotective mechanism of ginsenoside Re on SH-SY5Y cells induced by rotenone

综上，本研究以线粒体功能稳态与氧化应激学说为切入点，利用化学诱导的方式建立 SH-SY5Y 细胞体外 PD 模型，充分模仿散发性 PD 的主要病因与病机，初步阐明了人参皂苷 Re 的神经保护作用机制及靶点，为进一步探索散发性 PD 的环境病因提供了大力支持，也为后续 PD 的中药治疗提供了宝贵的科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] de Rijk M C, Launer L J, Berger K, *et al*. Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group [J]. *Neurology*, 2000, 54(11 Suppl 5): S21-S23.

[2] Zasso J, Ahmed M, Cutarelli A, *et al*. Inducible alpha-synuclein expression affects human neural stem cells' behavior [J]. *Stem Cells Dev*, 2018, 27(14): 985-994.

[3] Bose A, Beal M F. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease [J]. *J Neurochem*, 2016, 139: 216-231.

[4] Gautier C A, Corti O, Brice A. Mitochondrial dysfunctions in Parkinson's disease [J]. *Rev Neurol*, 2014, 170(5): 339-343.

[5] 杨智明, 李煦照, 卢芳, 等. 帕金森病的线粒体发病机制研究进展 [J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(21): 6233-6235.

[6] 贾治伟. 中医药治疗帕金森病的研究进展 [J]. 内蒙古中医药, 2003, 22(4): 34-35.

[7] 窦德强, 靳玲, 陈英杰. 人参的化学成分及药理活性的研究进展与展望 [J]. 沈阳药科大学学报, 1999, 16(2): 151-156.

[8] 周厚广, 鲍远程. 中医药治疗帕金森病的研究进展 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2004, 2(10): 593-596.

[9] 王彤宇, 刘建杰. 帕金森病的治疗进展 [J]. 医学综述, 2009, 15(15): 2327-2331.

[10] 徐琲琲, 刘纯青, 马涛, 等. 人参皂苷 Re 对 MPTP 致帕金森病模型小鼠多巴胺能神经元的保护作用 [J]. 沈阳药科大学学报, 2005, 22(1): 36-44.

[11] 李冬, 王欣笛, 郭道宇, 等. 人参皂苷 Rg_1、Rb_1、Rd、Re 和帕金森病的研究进展 [J]. 解剖学杂志, 2020, 43(6): 517-521.

[12] Qiao J H, Zhao Y C, Liu Y, *et al*. Neuroprotective effect of ginsenoside Re against neurotoxin-induced Parkinson's disease models via induction of Nrf2 [J]. *Mol Med Rep*, 2022, 25(6): 215.

[13] 刘瑛琪, 李天德, 楮晓雯, 等. 利用荧光探针 JC-1 检测心肌细胞线粒体膜电位的改变 [J]. 解放军医学杂志, 2002, 27(8): 716-718.

[14] 倪炯臣, 张雷雷, 李思诗, 等. 基于网络药理学方法探讨当归芍药散治疗帕金森病的作用机制 [J]. 广西医学, 2022, 44(9): 1003-1012.

[15] Abushouk A I, Negida A, Ahmed H, *et al*. Neuroprotective mechanisms of plant extracts against MPTP induced neurotoxicity: Future applications in Parkinson's disease [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 85: 635-645.

[16] Ju D T, Sivalingam K, Kuo W W, *et al*. Effect of vasicinone against paraquat-induced MAPK/p53-mediated apoptosis via the IGF-1R/PI3K/AKT pathway in a Parkinson's disease-associated SH-SY5Y cell model [J]. *Nutrients*, 2019, 11(7): 1655.

[17] Silva J, Alves C, Freitas R, *et al*. Antioxidant and neuroprotective potential of the brown seaweed *Bifurcaria bifurcata* in an *in vitro* Parkinson's disease model [J]. *Mar Drugs*, 2019, 17(2): 85.

[18] Peng Z L, Luchtman D W, Wang X F, *et al*. Activation of microglia synergistically enhances neurodegeneration caused by MPP^+ in human SH-SY5Y cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 850: 64-74.

[19] Bové J, Perier C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease [J]. *Neuroscience*, 2012, 211: 51-76.

[20] Tanner C M, Kamel F, Ross G W, *et al*. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease [J]. *Environ Health Perspect*, 2011, 119(6): 866-872.

[21] Chen L W, Wang Y Q, Wei L C, *et al*. Chinese herbs and herbal extracts for neuroprotection of dopaminergic neurons and potential therapeutic treatment of Parkinson's disease [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2007, 6(4): 273-281.

[22] 李立, 孙诚. MPTP 诱导的帕金森病模型小鼠味觉偏好变化 [J]. 神经解剖学杂志, 2022, 38(4): 447-452.

[23] 樊慧杰, 李艳荣, 柴智, 等. FSD-C10 抑制 MPTP 诱导的帕金森病小鼠氧化应激及炎性反应研究 [J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(3): 294-299.

[24] Maniyath S P, Solaiappan N, Rathinasamy M. Neurobehavioural changes in a hemiparkinsonian rat model induced by rotenone [J]. *J Clin Diagn Res*, 2017, 11(3): AF01-AF05.

[25] 胡宇, 唐慧玲, 田清, 等. 鱼藤酮对大鼠认知功能及其海马 Warburg 效应和小胶质细胞极化的影响 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2021, 42(6): 801-807.

[26] 刘文武, 宋琪, 祖宇欣, 等. 地骨皮甲素对鱼藤酮诱导的 PC12 细胞损伤的保护作用 [J]. 中草药, 2020, 51(24): 6302-6309.

[27] 许逸岚, 徐炀, 李鸿飞, 等. 原花青素提高鱼藤酮诱导的帕金森模型细胞活力的研究 [J]. 中国应用生理学杂志, 2020, 36(5): 424-427.

[责任编辑 李亚楠]