

## 补骨脂酚抑制 PI3K/Akt/Nrf2/HO-1 对氧糖剥夺所致 SH-SY5Y 细胞损伤的作用及机制

徐玥玮<sup>1</sup>, 张 坤<sup>2</sup>, 高晓明<sup>1</sup>, 王 丽<sup>1</sup>, 杨满琴<sup>1</sup>, 张梦翔<sup>1</sup>, 杨晓丹<sup>1</sup>, 戴文玲<sup>2\*</sup>, 蔡 明<sup>1\*</sup>

1. 安徽中医院大学第二附属医院, 安徽 合肥 230061

2. 中国药科大学, 江苏 南京 210000

**摘要:** 目的 研究补骨脂酚对氧糖剥夺/复糖复氧 (OGD/R) 诱导人源性神经母细胞瘤细胞 (SH-SY5Y) 损伤的影响。方法 MTT 法检测补骨脂酚 (5、10、20、40、80  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 对 SH-SY5Y 细胞活性的影响。将 SH-SY5Y 细胞分为对照组、模型组、补骨脂酚 (5、10、20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 组、补骨脂酚 (20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) + ML385 (2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , Nrf2 抑制剂) 组、补骨脂酚 (20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) + LY294002 [5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) 抑制剂] 组。MTT 法检测 SH-SY5Y 细胞活力, 倒置显微镜观察各组 SH-SY5Y 细胞形态, 试剂盒法检测细胞上清超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 活性, 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法和 Western blotting 法测定磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)、丝氨酸/苏氨酸激酶 B (Akt)、核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)、血红素加氧酶 1 (HO-1) mRNA 和蛋白水平。结果 补骨脂酚对正常 SH-SY5Y 细胞存活率无影响。与对照组比较, 模型组细胞存活率显著下降 ( $P < 0.01$ ), 细胞个数明显减少, 部分细胞裂解成碎片, 部分细胞死亡; SOD、CAT 活性显著降低 ( $P < 0.01$ ), PI3K/Akt/Nrf2/HO-1 mRNA 及蛋白水平显著下调 ( $P < 0.05$ , 0.01, 0.001)。与模型组比较, 补骨脂酚显著增加细胞存活率 ( $P < 0.01$ ), 明显增加细胞个数, 显著上调 SOD、CAT 活性 ( $P < 0.05$ , 0.01), 显著上调 PI3K/Akt/Nrf2/HO-1 mRNA 及蛋白水平 ( $P < 0.05$ , 0.01, 0.001)。与补骨脂酚 (20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 组比较, 补骨脂酚 + ML385 可逆转补骨脂酚对 HO-1 mRNA 及蛋白的上调作用 ( $P < 0.05$ , 0.01), 补骨脂酚 + LY294002 可逆转补骨脂酚对 Nrf2、HO-1 mRNA 及蛋白水平的上调作用 ( $P < 0.05$ , 0.01)。结论 补骨脂酚可显著改善 OGD/R 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤, 且机制可能是通过激活 PI3K/Akt 进而上调 Nrf2/HO-1 抑制氧化应激改善神经损伤。

**关键词:** 补骨脂酚; SH-SY5Y 细胞; 脑缺血再灌注; 氧糖剥夺/复糖复氧; Nrf2/HO-1; PI3K/Akt

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 6376(2025)02 - 0448 - 07

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.02.018

## Study on protective effect and mechanism of bakuchiol inhibiting PI3K/Akt/Nrf2/HO-1 pathway against oxygen-glucose deprivation-induced injury in SH-SY5Y cells

XU Yuewei<sup>1</sup>, ZHANG Shen<sup>2</sup>, GAO Xiaoming<sup>1</sup>, WANG Li<sup>1</sup>, YANG Manqin<sup>1</sup>, ZHANG Mengxiang<sup>1</sup>, YANG Xiaodan<sup>1</sup>, DAI Wenling<sup>2</sup>, CAI Ming<sup>1</sup>

1. Acupuncture Hospital of Anhui University of TCM, Hefei 230061, China

2. China Pharmaceutical University, Nanjing 210000, China

**Abstract: Objective** To study the protected effect of bakuchiol on human neuroblastoma cells (SH-SY5Y) injury induced by oxygen glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R). **Methods** The effect of BAK (5, 10, 20, 40, and 80  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) on the viability of SH-SY5Y cells was detected by MTT assay. SH-SY5Y cells were divided into control group, model group, the BAK (5, 10, 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) groups, the BAK (20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) + ML385 (2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , Nrf2 inhibitor) group, and the BAK (20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) + LY294002 [5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitor] group. The viability of SH-SY5Y cells was detected by MTT assay, the morphology of

收稿日期: 2024-07-31

基金项目: 安徽省高等学校科学研究项目 (自然科学类) 重点项目 (2022AH050524, 2023AH050866); 安徽中医药大学第二附属医院“杏林英才”培育计划项目 (2023-0500-48-41, 2023-0500-48-46); 安徽省高校优秀青年教师项目 (YQYB2024030)

作者简介: 徐玥玮, 硕士, 副主任药师, 主要从事临床药理学、心血管方向临床药学研究。E-mail: xyw0826@foxmail.com

\*通信作者: 戴文玲, 博士, 副研究员, 主要从事中药药效及物质基础研究。E-mail: daiwenling@cpu.edu.cn

蔡 明, 男, 副主任药师, 硕士研究生导师, 研究方向为中医药防治慢性疾病的作用及机制研究。E-mail: caiming@ahtcm.edu.cn

SH-SY5Y cells in each group was observed by inverted microscope, the activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in the cell supernatant were detected by kit method, and the mRNA and protein levels of PI3K, serine/threonine kinase B (Akt), nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), and heme oxygenase 1 (HO-1) were determined by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) and Western blotting. **Results** Bakuchiol had no effect on the survival rate of normal SH-SY5Y cells. Compared with the control group, the cell survival rate in the model group was significantly decreased ( $P < 0.01$ ), the number of cells was significantly reduced, some cells were lysed into fragments, and some cells died; the activities of SOD and CAT were significantly decreased ( $P < 0.01$ ), and the mRNA and protein levels of PI3K/Akt/Nrf2/HO-1 were significantly down-regulated ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ). Compared with the model group, psoralen significantly increased the cell survival rate ( $P < 0.01$ ), significantly increased the number of cells, significantly up-regulated the activities of SOD and CAT ( $P < 0.05, 0.01$ ), and significantly up-regulated the mRNA and protein levels of PI3K/Akt/Nrf2/HO-1 ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ). Compared with the BAK ( $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) group, BAK + ML385 could reverse the up-regulation effect of BAK on HO-1 mRNA and protein ( $P < 0.05, 0.01$ ), and BAK + LY294002 could reverse the up-regulation effect of BAK on Nrf2 and HO-1 mRNA and protein levels ( $P < 0.05, 0.01$ ). **Conclusion** Bakuchiol can improve the injury of SH-SY5Y cells induced by OGD/R, and the mechanism may be through the activation of PI3K/AKT, leading to the activation of Nrf2/HO-1 to suppress oxidative stress.

**Key words:** bakuchiol; SH-SY5Y cells; cerebral ischemia reperfusion; oxygen glucose deprivation/glucose reoxygenation; Nrf2/HO-1; PI3K/Akt

卒中是世界范围内导致死亡和残疾的主要原因,也是最常见的心血管疾病之一。主要分为缺血性脑卒中和出血性脑卒中,其中缺血性脑卒中是指由于脑的供血不足导致的脑组织坏死的总称,病例超过所有脑卒中病例的 80%<sup>[1]</sup>。临床治疗多以药物介导的溶栓等为主,旨在恢复血流供应<sup>[2]</sup>。但是脑缺血再灌注在缓解缺血导致的脑梗死以及功能障碍的同时,也会因为快速再灌注反而加重脑功能障碍,即脑缺血再灌注损伤,是导致患者残疾和死亡的关键因素之一<sup>[3]</sup>。因此,在临床实践中,需要采取有效措施来预防和治疗脑缺血再灌注损伤。

补骨脂酚是从补骨脂种子中分离得到的一种异戊二烯酚萜类化合物,是补骨脂的主要活性成分之一<sup>[4]</sup>。研究表明补骨脂酚可以缓解脑缺血再灌注损伤,并可抑制活性氧(ROS)及上调核转录因子 E2 相关因子 2/血红素加氧酶-1 (Nrf2/HO-1)<sup>[5]</sup>。但补骨脂酚对氧糖剥夺/复糖复氧(OGD/R)诱导的神经元损伤是否具有改善作用及可能机制仍未明确。本研究拟通过体外实验观察补骨脂酚对 OGD/R 损伤人源性神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)的影响,并初步探索其可能的作用机制。

## 1 材料

### 1.1 细胞

SH-SY5Y 细胞系购自中国科学院上海细胞库。

### 1.2 药物及主要试剂

补骨脂酚购自江苏艾康生物医药研发有限公司(批号 AZF22-1015526-2); DMEM 培养基、血

清、胰蛋白酶、MTT 购自美国 Sigma 公司;超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;ML385(货号 846557-71-9, Nrf2 抑制剂)、LY294002<sup>[6]</sup>(货号 154447-36-6, 磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)抑制剂)自美国 MCE 公司。

### 1.3 实验器材

Milli-Q 超纯水仪,美国 Millipore 公司;XW-80A 涡旋仪,上海精科实业有限公司;微量电动组织匀浆器,美国 Kimble 公司;Infinite200PRO 酶标仪,瑞士 Tecan 公司;超净工作台,苏净集团安泰公司;5424R 离心机,德国 Eppendorf 公司;高压蒸汽灭菌锅,上海博讯实业有限公司;IX53 荧光倒置显微镜,日本 Olympus 公司;细胞培养板、培养皿、细胞用离心管,美国 Corning 公司;细胞培养箱,美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

SH-SY5Y 细胞复苏后接种于含有 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中,置于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 恒温培养箱中培养。

### 2.2 OGD/R 模型的构建方法

取生长密度达 80%的细胞以每孔  $5 \times 10^5$  个接种于 6 孔板,培养箱中培养 24 h,设置对照组、模型组和补骨脂酚组。给予补骨脂酚 1 h 后,模型组与补骨脂酚组加入 DMEM 无糖培养基,放置于缺氧盒中进行换气,换气时先置换气体 1 min 再充入

氮气 3 min 完成缺氧环境。放置于 5% CO<sub>2</sub> 的常氧培养箱中缺氧培养 4 h。OGD 处理结束后, 弃去无糖 DMEM 培养基, 加入 10% 完全培养基, 然后将细胞置于 5% CO<sub>2</sub> 的常氧培养箱继续培养, 在复糖复氧 24 h 后, 收集细胞用于后续实验研究, 补骨脂酚在 OGD/R 期间持续存在。

### 2.3 形态学观察

倒置显微镜观察各组 SH-SY5Y 细胞经不同处理后的生长情况。

### 2.4 MTT 法检测细胞存活率

将细胞以每孔  $5 \times 10^3$  个接种于 96 孔板, 四周每孔添加 200  $\mu\text{L}$  磷酸盐缓冲液 (PBS) 以减少液体挥发, 培养箱中培养 12 h 使细胞贴壁。弃原培养基, 将细胞分为对照组、补骨脂酚 (5、10、20、40、80  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 组, 根据分组分别加入空白及含药培养基, 每组 5 个复孔, 继续培养 24 h。观察补骨脂酚对正常 SH-SY5Y 细胞活力的影响。弃上清, 避光条件下每孔加入 150  $\mu\text{L}$  MTT 工作液, 培养箱内培养 3 h。弃上清, 每孔加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO, 600  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  振荡 10 min, 立即用酶标仪在 570/650 nm 双波长下测定吸光度 ( $A_{570}/A_{650}$ ) 值。以对照组细胞存活率为 100%, 计算其他组细胞存活率。

细胞存活率 = (其他组  $A_{570}/A_{650}$ ) / (对照组  $A_{570}/A_{650}$ )

将细胞分为对照组、模型组、补骨脂酚 (5、10、20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 组, OGD/R 造模参照“2.2”项下方法进行, 造模前 1 h 给予补骨脂酚, 造模后继续培养 24 h。MTT 法检测细胞存活率。

### 2.5 SOD、CAT 含量测定

按“2.4”项下方法进行细胞接种、造模及给药, 细胞分为对照组、模型组、补骨脂酚 (5、10、20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 组, 24 h 后收集细胞上清液, 试剂盒法检测 SOD、CAT 含量。

### 2.6 细胞总 RNA 提取

按“2.2”项下方法进行细胞接种、造模及给药, 细胞分为对照组、模型组、补骨脂酚 (5、10、20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 组、补骨脂酚 (20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) + ML385 (2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 组、补骨脂酚 (20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) + LY294002 (5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 组, 其中联合给药组在给予 ML385 或 LY294002 后 15 min 给予补骨脂酚。24 h 后收集细胞, 加入 50  $\mu\text{L}$  TransZol Up 吹打, 每管加入 10  $\mu\text{L}$  氯仿, 涡旋混匀后冰上放置 5 min, 4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 15 min。吸取上层水相

与等体积异丙醇温和颠倒混匀, 静置 15 min 后, 4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 15 min。弃上清, 沉淀与 75% 乙醇 (0.1% DEPC 水稀释) 混匀后, 4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 15 min。弃上清, 沉淀半干时加入 20  $\mu\text{L}$  DEPC 水溶解 RNA, 样品保存于 -20  $^{\circ}\text{C}$ 。使用 NanoDrop 微量分光光度计测定 RNA 浓度和纯度 ( $A_{260}/A_{280}$  处于 1.8~2.2 即 RNA 纯度较高)。用 Oligo (dT) 试剂盒将 mRNA 逆转录为 cDNA, 体系为 20  $\mu\text{L}$ : 1  $\mu\text{L}$  4 $\times$ gDNA wiper Mix, 10  $\mu\text{L}$  Rnase free ddH<sub>2</sub>O, 5  $\mu\text{L}$  模板 RNA (1  $\mu\text{g}$ ), 4  $\mu\text{L}$  5 $\times$ HiScriptIIqRT SuperMix II。逆转录条件为 45  $^{\circ}\text{C}$  15 min、85  $^{\circ}\text{C}$  5 s。

### 2.7 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)

取“2.6”项下总 RNA, 参照 ChamQ SYBR qPCR Master Mix 试剂说明书进行 qRT-PCR 反应, 模板 RNA 用 0.1% DEPC 水稀释备用。在专用 96 孔 PCR 反应板中加入 10  $\mu\text{L}$  2 $\times$ ChamQ SYBR qPCR Master Mix、0.4  $\mu\text{L}$  Forward Primer、0.4  $\mu\text{L}$  Reverse Primer、9.2  $\mu\text{L}$  cDNA, 混匀, 封板后置于 qRT-PCR 仪进行反应。具体基因扩增条件为: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 1 min, 维持 40 个循环 (94  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  40 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  40 s), 72  $^{\circ}\text{C}$  维持 5 min, 60  $^{\circ}\text{C}$  维持 1 min, 0.15  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$  升温至 94  $^{\circ}\text{C}$  最终获得熔解曲线。扩增结束后对  $C_t$  值、熔解曲线、扩增曲线进行分析, 根据公式  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  进行相对定量分析。实验所用目的基因引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	序列 (5'→3')
<i>Nrf2</i>	正向: TCAGCGACGGAAAGAGTATGA 反向: CCACTGGTTTCTGACTGGATGT
<i>HO-1</i>	正向: GCTCAAAAAGATTGCCAGAG 反向: GCTCTGGTCCTTGGGTGTCAT
<i>PI3K</i>	正向: TCTACAACCAGGACCATGAGAA 反向: GAGTAGGAGAACTGGGGAAGT
丝氨酸/苏氨酸激酶 B ( <i>Akt</i> )	正向: TCACCTCTGAGACCGACACC 反向: ACTGGCTGAGTAGGAGAACTGG
<i>GAPDH</i>	正向: CCAGGTGGTCTCTCTGA 反向: GCTGTAGCCAAATCGTTGT

### 2.8 Western blotting 实验

细胞接种、分组、造模、给药方式均同“2.6”项, 24 h 后收集细胞, 加入含蛋白酶抑制剂及磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液 60  $\mu\text{L}$  抽提蛋白, 经 BCA

蛋白试剂盒进行定量。蛋白加入 5×上样缓冲液沸水浴 10 min。将 20 μg 蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 并通过湿转法转膜。将膜用 5% 牛血清白蛋白 (BSA) 封闭, 并经一抗、二抗孵育后, 加入 ECL 化学发光液显影, 凝胶成像系统扫描分析。

### 2.9 统计学方法

采用 GraphPad Prism 6 版本统计软件进行数据分析, 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析, 组间差异用 *t* 检验。

## 3 结果

### 3.1 补骨脂酚对正常 SH-SY5Y 细胞活力的影响

如图 1 所示, 以对照组 SH-SY5Y 细胞活力为 100% 计, 5、10、20、40、80 μmol·L<sup>-1</sup> 的补骨脂酚作用于细胞后, 细胞活力均无显著变化, 表明其对正常的 SH-SY5Y 细胞活力无显著影响。

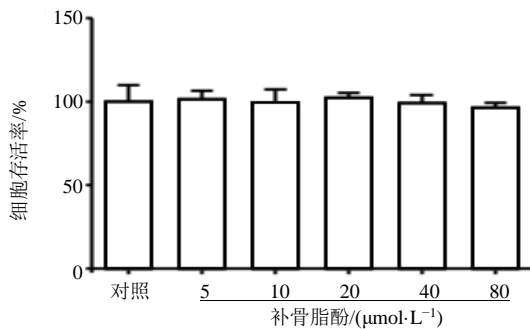
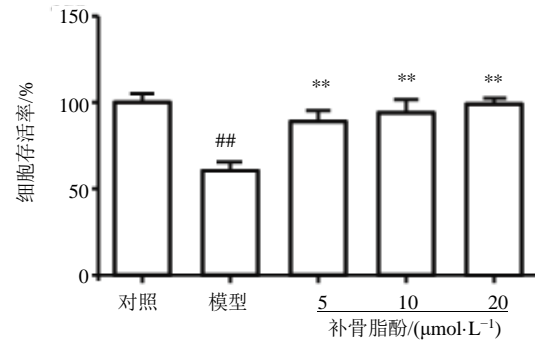


图 1 补骨脂酚对 SH-SY5Y 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Fig. 1 Effect of BAK on cell viability of SH-SY5Y ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

### 3.2 补骨脂酚对 OGD/R 诱导的 SH-SY5Y 细胞活力的影响

如图 2 所示, 以对照组 SH-SY5Y 细胞活力为 100% 计, 模型组细胞存活率显著降低, 且存



与对照组比较: <sup>##</sup>*P*<0.01; 与模型组比较: <sup>\*\*</sup>*P*<0.01。  
<sup>##</sup>*P*<0.01 vs control group; <sup>\*\*</sup>*P*<0.01 vs model group.

图 2 补骨脂酚对 OGD/R 诱导的 SH-SY5Y 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

Fig. 2 Effect of BAK on cell viability of OGD/R stimulated SH-SY5Y ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

活率约在 60% (*P*<0.01); 与模型组比较, 5、10、20 μmol·L<sup>-1</sup> 的补骨脂酚均可显著提高细胞活力 (*P*<0.01)。

### 3.3 补骨脂酚对 OGD/R 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤的影响

如图 3 所示, 细胞给予 OGD/R 刺激后, 细胞个数明显减少, 部分细胞裂解成碎片, 部分细胞死亡; 而给予不同浓度补骨脂酚 (5、10、20 μmol·L<sup>-1</sup>) 可明显增加细胞个数。

### 3.4 补骨脂酚对 OGD/R 诱导的 SH-SY5Y 细胞氧化酶的影响

如图 4 所示, 与对照组相比, 模型组细胞 SOD、CAT 活性显著降低 (*P*<0.01); 与模型组比较, 补骨脂酚 5、10、20 μmol·L<sup>-1</sup> 组 SOD 活性显著升高 (*P*<0.05、0.01), 补骨脂酚 10、20 μmol·L<sup>-1</sup> 组 CAT 活性显著升高 (*P*<0.05、0.01), 提示补骨脂酚具有抗氧化的作用。

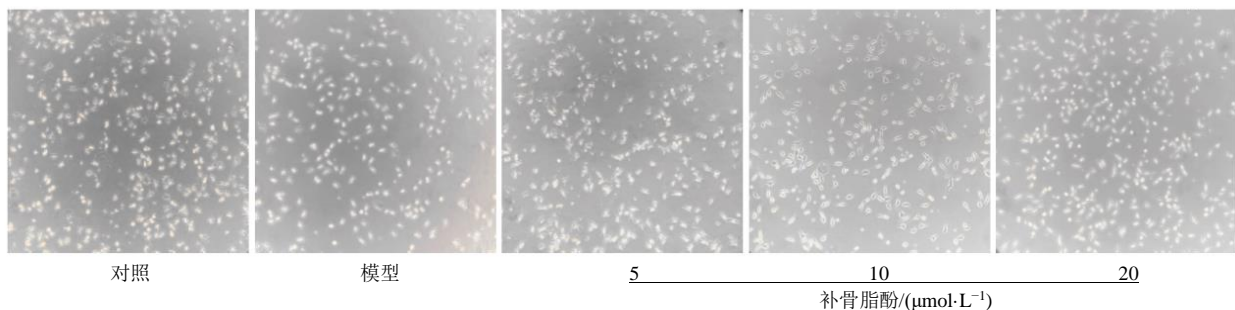


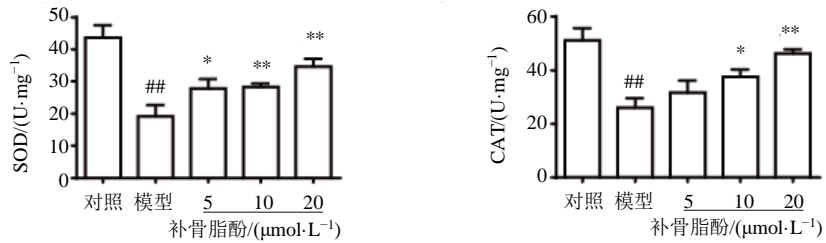
图 3 补骨脂酚对 OGD/R 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤的影响

Fig. 3 Effect of BAK on cell injury of OGD/R stimulated SH-SY5Y

### 3.5 补骨脂酚对 OGD/R 诱导的 SH-SY5Y 细胞 Nrf2/HO-1 水平的影响

与对照组相比, OGD/R 诱导的 SH-SY5Y 细胞 Nrf2、HO-1 mRNA 及蛋白水平均显著降低 ( $P < 0.05$ 、0.01、0.001); 与模型组比较, 给予补骨脂酚 (10、

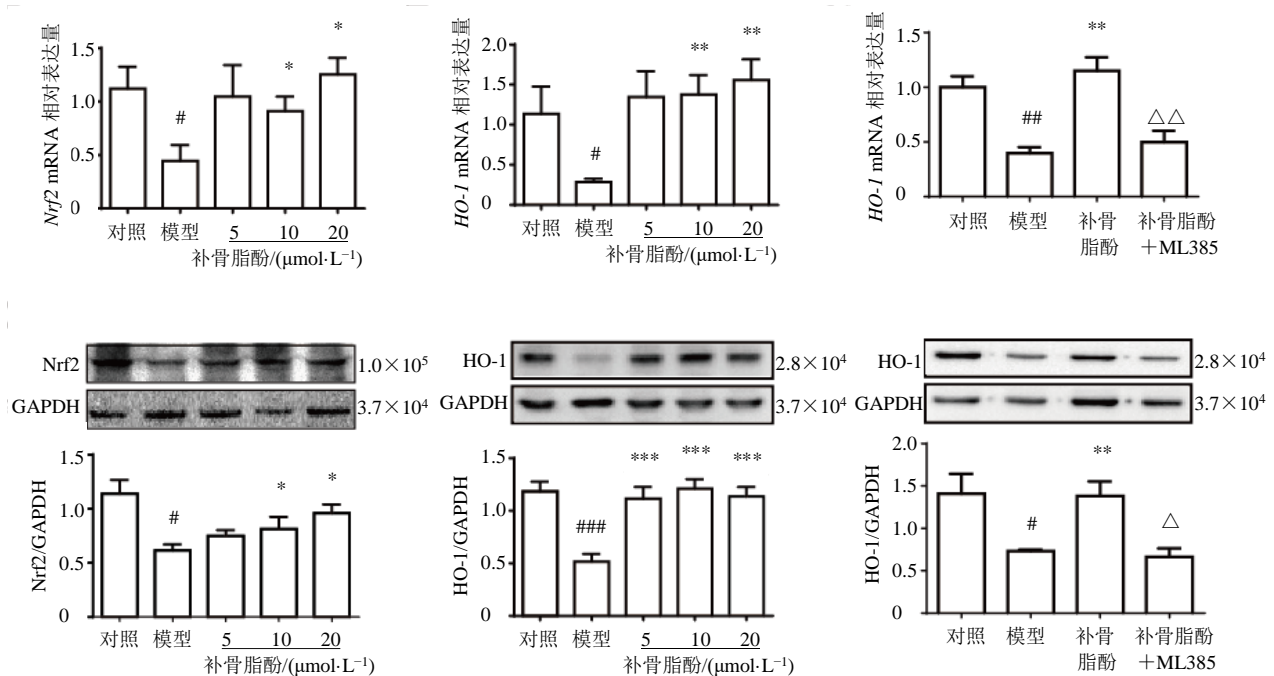
20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 可显著上调 Nrf2、HO-1 mRNA 及蛋白水平 ( $P < 0.05$ 、0.01、0.001); 与补骨脂酚 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组比较, 联合给予 Nrf2 抑制剂可逆转补骨脂酚对 HO-1 mRNA 及蛋白的上调作用 ( $P < 0.05$ 、0.01), 表明补骨脂酚通过上调 Nrf2 上调 HO-1 水平。见图 5。



与对照组比较: ## $P < 0.01$ ; 与模型组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ 。  
## $P < 0.01$  vs control group; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs model group.

图 4 补骨脂酚对 OGD/R 诱导的 SH-SY5Y 细胞氧化酶的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

Fig. 4 Effect of BAK on enzyme activity of SOD and CAT in OGD/R stimulated SH-SY5Y ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )



与对照组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$ ; 与模型组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ ; 与补骨脂酚组比较:  $\Delta P < 0.05$   $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

# $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$  vs control group; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs model group;  $\Delta P < 0.05$   $\Delta\Delta P < 0.01$  vs BAK group.

图 5 补骨脂酚对 OGD/R 诱导的 SH-SY5Y 细胞 Nrf2/HO-1 mRNA 及蛋白水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

Fig. 5 Effect of BAK on mRNA and protein level of Nrf2/HO-1 in OGD/R stimulated SH-SY5Y ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

### 3.6 补骨脂酚对 OGD/R 诱导的 SH-SY5Y 细胞 PI3K/Akt/Nrf2/HO-1 通路的影响

如图 6 所示, 与对照组相比, 模型组 PI3K、Akt mRNA 和蛋白水平显著降低 ( $P < 0.05$ 、0.01); 与模型组比较, 给予补骨脂酚 (10、20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 可显著上调 OGD/R 诱导的 SH-SY5Y 细胞中 PI3K、

Akt mRNA 和蛋白水平 ( $P < 0.05$ 、0.01)。与补骨脂酚 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组比较, 联合给予 PI3K 抑制剂 LY294002 可逆转补骨脂酚对 Nrf2、HO-1 mRNA 及蛋白水平的上调作用 ( $P < 0.05$ 、0.01)。提示补骨脂酚可通过激活 PI3K/Akt 上调 Nrf2/HO-1 水平发挥抗氧化应激作用。

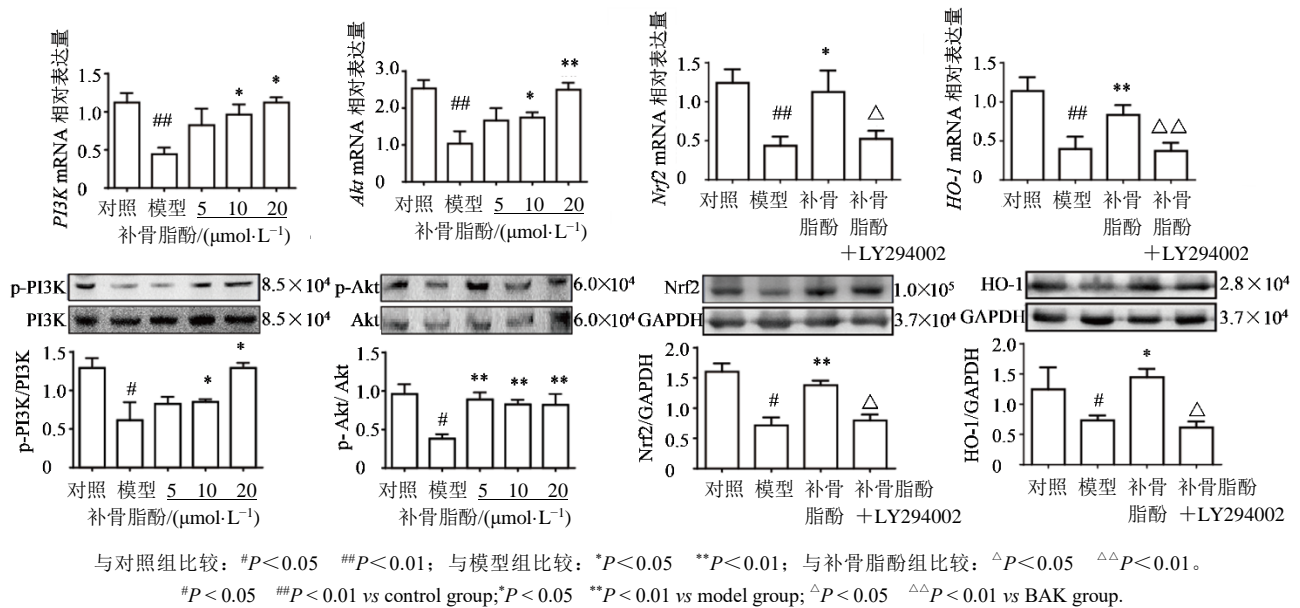


图 6 补骨脂酚对 OGD/R 诱导的 SH-SY5Y 细胞 PI3K/Akt/Nrf2/HO-1 通路蛋白及 mRNA 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )  
Fig. 6 Effect of BAK on protein and mRNA level of PI3K/Akt/Nrf2/HO-1 signaling pathway in OGD/R stimulated SH-SY5Y ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

#### 4 讨论

缺血再灌注损伤严重损害大脑,影响包括语言、记忆、视力及运动等方面功能,对家庭和社会产生了沉重的负担<sup>[6]</sup>。目前临床上用于治疗缺血再灌注损伤有效药物少,而中药由于其作用广泛以及毒性较小等优点,从中发掘安全、有效的治疗药物具有重要前景和意义<sup>[7]</sup>。本课题组前期研究显示补骨脂酚可缓解脑缺血再灌注损伤,但是其是否通过调控神经元损伤发挥作用仍不清楚。本研究中 SH-SY5Y 细胞来源于人神经母细胞瘤株,其形态、生理、生化功能与人体细胞相似,可转化为神经元样细胞,且具有与原代神经元的培养相比没有伦理问题等优势,被广泛运用于神经系统疾病的体外实验研究中<sup>[8]</sup>。本研究显示补骨脂酚(5、10、20、40、80  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )对正常培养的 SH-SY5Y 细胞存活率无显著影响,但是可改善 OGD/R 诱导的细胞损伤。

脑缺血再灌注可促进 ROS 的产生<sup>[9]</sup>,而 ROS 过度产生会引起一系列级联反应,如增加血管通透性,进一步导致脑组织水肿坏死,是缺血再灌注损伤中重要的病理生理机制<sup>[10]</sup>。文献报道 Nrf2 是重要的内源性氧化应激调节因子<sup>[11]</sup>,可直接调节 HO-1 启动子活性,从而控制 HO-1 的表达,而 HO-1 可通过清除体内的氧自由基和其他有毒代谢产物进而减轻缺血再灌注引起的氧化应激损伤<sup>[12]</sup>。调控

Nrf2/HO-1 信号通路在调控缺血性脑卒中细胞氧化应激中发挥重要作用<sup>[13-14]</sup>,本研究显示补骨脂酚可显著上调 OGD/R 降低的 SOD、CAT 进而抑制氧化应激,且可上调 Nrf2/HO-1 水平,提示其可激活 Nrf2/HO-1 抑制氧化应激。文献报道 Nrf2/HO-1 可被多种信号如 PI3K/Akt 激活,抑制 PI3K/Akt 可抑制 Nrf2/HO-1 水平,且激活 PI3K/Akt 也可缓解缺血再灌注损伤<sup>[15-16]</sup>。本研究显示补骨脂酚可显著上调 PI3K、Akt mRNA 及蛋白水平,且 PI3K 抑制剂可逆转补骨脂酚对 Nrf2、HO-1 mRNA 及蛋白水平的上调作用, Nrf2 抑制剂可逆转补骨脂酚对 HO-1 mRNA 及蛋白水平的上调作用。

补骨脂酚可显著改善 OGD/R 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤,作用机制可能是与激活 PI3K/Akt/Nrf2/HO-1 途径抑制氧化应激相关。本实验为补骨脂酚缓解缺血再灌注损伤的机制研究进一步提供理论参考。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 中华医学会神经病学分会,中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2018 [J]. 中华神经科杂志, 2018, 51(9): 666-682. Chinese Medical Association Neurology Branch, Cerebrovascular Disease Group of Chinese Medical Association Neurology Branch. Chinese guidelines for diagnosis and treatment of acute ischemic stroke 2018 [J].

- Chin J Neurol, 2018, 51(9): 666-682.
- [2] 张健, 丁砚兵, 陈小敏, 等. 活血类口服中成药联合阿替普酶静脉溶栓术治疗急性脑梗死的系统评价 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(3): 557-567.
- Zhang J, Ding Y B, Chen X M, et al. Traditional Chinese medicine theoretical mechanism of blood-activating and stasis-resolving therapy combined with thrombolysis/thrombectomy in improving clinical efficacy [J]. China J Chin Mater Med, 2024, 49(17): 4812-4817.
- [3] Eltzschig H K, Eckle T. Ischemia and reperfusion: From mechanism to translation [J]. Nat Med, 2011, 17(11): 1391-1401.
- [4] 王静宜, 吕明月, 殷佳, 等. 补骨脂炮制历史沿革和机制研究进展及质量标志物 (Q-Marker) 预测 [J]. 中草药, 2023, 54(17): 5759-5772.
- Wang J Y, Lv M Y, Yin J, et al. Research progress on processing historical evolution and mechanism of *Psoralea Fructus* and its quality marker predictive analysis [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(17): 5759-5772.
- [5] 周亚军. SIRT1 信号通路介导补骨脂酚抗心肌缺血再灌注损伤的机制研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2016.
- Zhou Y J. Mechanism of SIRT1 signaling pathway mediating the anti myocardial ischemia-reperfusion injury effect of psoralen [D]. Nanchang: Nanchang University, 2016.
- [6] Tsao C W, Aday A W, Almarzooq Z I, et al. Heart disease and stroke statistics-2022 update: A report from the American heart association [J]. Circulation, 2022, 145(8): e153-e639.
- [7] 金晶, 郗欧, 马进, 等. 基于 CiteSpace 知识图谱的中医药治疗脑缺血再灌注损伤研究现状分析 [J]. 浙江中医杂志, 2024, 59(3): 275-278.
- Jin J, Xi O, Ma J, et al. Research status of traditional Chinese medicine in the treatment of cerebral ischemia-reperfusion injury based on CiteSpace knowledge graph analysis [J]. Zhejiang J Tradit Chin Med, 2024, 59(3): 275-278.
- [8] 冯波, 王蓉, 盛树力. 神经退行性疾病研究中拟神经细胞模型: 人神经母细胞瘤株 SH-SY5Y 的来源特性及应用 [J]. 中国临床康复, 2006, 10(6): 121-123.
- Feng B, Wang R, Sheng S L. Mimic model of nerve cells in the study of neurodegenerative disease: Origin, characteristics and application of human neuroblastoma cell line SH-SY5Y [J]. Chin J Clin Rehabil, 2006, 10(6): 121-123.
- [9] 张勇, 付雪琴, 邹旭欢, 等. 急性脑缺血/再灌注损伤后神经元细胞骨架蛋白的动态变化 [J]. 中国药理学通报, 2024, 40(2): 263-272.
- Zhang Y, Fu X Q, Zou X H, et al. Dynamic changes in cytoskeletal elements following acute cerebral ischemia and reperfusion in rats [J]. Chin Pharmacol Bull, 2024, 40(2): 263-272.
- [10] 顾彩锋, 陈俊峰, 申捷. GPR124 在脑缺血再灌注大鼠血脑屏障功能障碍中的作用及可能机制 [J]. 解剖科学进展, 2024, 30(1): 71-74.
- Gu C F, Chen J F, Shen J. The role and possible mechanism of GPR124 in blood-brain barrier dysfunction in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. Prog Anat Sci, 2024, 30(1): 71-74.
- [11] 唐赫鹏, 车楠, 刘函晔, 等. 连翘酯苷 A 通过抑制 PI3K/Akt 通路并激活 Nrf2/HO-1 通路抑制 LPS 诱导的炎症及氧化应激 [J]. 免疫学杂志, 2021, 37(5): 390-396.
- Tang H P, Che N, Liu H Y, et al. Forsythiaside A suppresses LPS-induced inflammation and oxidative stress by inhibiting PI3K/Akt pathway and activating Nrf2/HO-1 pathway [J]. Immunol J, 2021, 37(5): 390-396.
- [12] 李倩, 王智超. 参附注射液对大鼠心肌组织缺血/再灌注损伤及血红素加氧酶-1 表达的影响 [J]. 湖北中医药大学学报, 2018, 20(3): 17-20.
- Li Q, Wang Z C. Effects of Shenfu injection on myocardial tissue ischemia/reperfusion injury and the expression of heme oxygenase-1 in rats [J]. J Hubei Univ Chin Med, 2018, 20(3): 17-20.
- [13] 罗佳, 吴宇, 刘京东, 等. 香叶醇通过调控 Nrf2/HO-1 途径调节氧化应激减轻大鼠脑缺血/再灌注损伤 [J]. 中国药理学通报, 2024, 40(3): 431-439.
- Luo J, Wu Y, Liu J D, et al. Geraniol attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats by regulating oxidative stress via Nrf2/HO-1 pathway [J]. Chin Pharmacol Bull, 2024, 40(3): 431-439.
- [14] An X S, Shang F T. RA-XII exerts anti-oxidant and anti-inflammatory activities on lipopolysaccharide-induced acute renal injury by suppressing NF- $\kappa$ B and MAPKs regulated by HO-1/Nrf2 pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 495(3): 2317-2323.
- [15] 董艺薇, 杨智超, 姜维佳, 等. 原花青素 B2 通过调节 PI3K/Akt 和 Nrf2/HO-1 信号通路保护 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 PC12 细胞氧化损伤 [J]. 中国药理学通报, 2023, 39(9): 1654-1661.
- Dong Y W, Yang Z C, Jiang W J, et al. Procyanidin B2 protects H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage in PC12 cells by regulating PI3K/Akt and Nrf2/HO-1 signaling pathways [J]. Chin Pharmacol Bull, 2023, 39(9): 1654-1661.
- [16] 张晏宁, 朱崇田. 藤黄健骨胶囊对膝关节炎鼠骨代谢指标及 PI3K/Akt/Nrf2/HO-1 信号通路的影响 [J]. 世界中西医结合杂志, 2024, 19(4): 694-698, 704.
- Zhang Y N, Zhu C T. Effects of Tenghuang jianggu capsule on bone metabolism and PI3K/Akt/Nrf2/HO-1 signaling pathway in rats with knee osteoarthritis [J]. World J Integr Tradit West Med, 2024, 19(4): 694-698, 704.