

光甘草定衍生物 MG01 通过抑制铁死亡改善 $A\beta_{1-42}$ 对 HT22 细胞的损伤

孟美辰, 王志远, 王丽娟, 杨寒冰, 史佳玮, 魏 彪, 于海洋*, 周延萌*

山东第一医科大学 (山东省医学科学院) 药学院 (药物研究所), 山东 泰安 271016

摘要: 目的 探究光甘草定衍生物 MG01 对 β -淀粉样多肽 1-42 (β -amyloid peptide 1-42, $A\beta_{1-42}$) 诱导的小鼠海马神经元细胞株 HT22 铁死亡的保护以及预防作用。方法 计算机模拟分子对接验证 MG01 可以与雌激素受体 β (estrogen receptor beta, ER β) 以及过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α , PGC-1 α) 相互作用; 利用 Cell counting kit-8 (CCK-8) 试剂盒分析 MG01 对细胞活力的影响并确定最佳给药浓度; 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 试剂盒检测细胞 ROS 的水平; JC-1 线粒体膜电位试剂盒检测线粒体膜电位; 细胞免疫荧光染色检测神经元树突标志物微管相关蛋白-2 (microtubule-associated protein-2, MAP-2)、铁死亡特异性标志物过氧化物酶 3 (peroxiredoxin 3, PRDX3) 的变化; 蛋白质免疫印迹 (Western blotting, WB) 法检测 ER β 、ER α 、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathion peroxidase, GPX4)、PRDX3、膜铁转运蛋白 1 (ferroportin1, FPN1)、铁蛋白 (ferritin)、PGC-1 α 、核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, NRF2)、线粒体转录因子 A (transcription factor A, TFAM) 蛋白表达水平。结果 WB 结果表明 MG01 能显著上调 ER β 与 PGC-1 α 的表达 ($P < 0.05, 0.01$); CCK-8、细胞形态检测与免疫荧光结果表明, 与模型组比较, MG01 组细胞活力和形态得到明显改善 ($P < 0.05, 0.01$), 且有效浓度显著低于光甘草定 ($P < 0.05$)。WB 结果表明, MG01 能够改善 $A\beta_{1-42}$ 诱导的细胞铁死亡, 改善铁死亡标志蛋白 GPX4、PRDX3、FPN1 以及 ferritin 的表达 ($P < 0.01$), 其作用机制可能与上调 ER β /PGC-1 α 促进线粒体生物发生, 改善线粒体膜电位降低, 降低 ROS 的水平有关。结论 MG01 介导 ER β /PGC-1 α 促进线粒体生物发生, 改善线粒体功能, 抑制铁死亡, 发挥神经保护作用。

关键词: 光甘草定衍生物 MG01; 阿尔兹海默病; HT22 细胞; 铁死亡; ER β /PGC-1 α ; 线粒体

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)03-0867-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.03.013

Glabridin derivative MG01 protect HT22 cell from $A\beta_{1-42}$ -induced injury by inhibiting ferroptosis

MENG Meichen, WANG Zhiyuan, WANG Lijuan, YANG Hanbing, SHI Jiawei, WEI Biao, YU Haiyang, ZHOU Yanmeng

Institute of Pharmacology, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Tai'an 271016, China

Abstract: Objective To investigate the protective and preventive effects of glabridin derivative MG01 on ferroptosis induced by beta-amyloid peptide 1-42 ($A\beta_{1-42}$) in HT22 cells. **Methods** Computer simulation of molecular docking verifies that MG01 can interact with estrogen receptor beta (ER β) and peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α). Cell counting kit-8 (CCK-8) was used to analyze the effects of MG01 on cell viability and determine the optimal concentration of MG01. Reactive oxygen species (ROS) detection kit was used to detect the ROS level of cells, and JC-1 mitochondrial membrane potential detection kit was used to detect mitochondrial membrane potential. Cell immunofluorescence (ICC) was used to detect the changes of neuronal dendrite marker microtubule-associated protein-2 (MAP-2), ferroptosis specific marker peroxiredoxin 3 (PRDX3). Western blotting (WB) was used to detect the expression levels of ER β , ER α , glutathion peroxidase (GPX 4), PRDX3, ferroportin1 (FPN1), ferritin, PGC-1 α , nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2), and transcription factor A (TFAM). **Results** WB results showed that MG01 could significantly increase the expression of ER β and PGC-1 α ($P < 0.05, 0.01$). CCK-8, cell morphology detection and immunofluorescence results showed that compared with the model group, the cell viability and morphology of the MG01 group were significantly improved

收稿日期: 2024-08-12

基金项目: 山东省自然科学基金项目 (ZR2024MH226); 国家自然科学基金项目 (82073827)

作者简介: 孟美辰, 女, 硕士研究生, 研究方向为神经药理学。E-mail: 1099349372@qq.com

*通信作者: 于海洋, 男, 副教授, 硕士研究生导师, 从事神经药理学研究。E-mail: hyu@sdfmu.edu.cn

周延萌, 女, 教授, 硕士研究生导师, 从事神经药理学研究。E-mail: ymzhou790412@163.com

($P < 0.05$, 0.01), and the effective concentration was significantly lower than that of glabridin ($P < 0.05$). WB results showed that MG01 could improve the cell ferroptosis induced by $A\beta_{1-42}$, improve the expression of ferroptosis marker proteins GPX4, PRDX3, FPN1, and ferritin ($P < 0.01$), and its mechanism may be related to upregulating ER β /PGC-1 α to promote mitochondrial biogenesis, improving mitochondrial membrane potential, and reducing the level of ROS. **Conclusion** MG01 mediates ER β /PGC-1 α to promote mitochondrial biogenesis, improve mitochondrial function, inhibit ferroptosis, and play a neuroprotective role.

Key words: glabridin derivative MG01; Alzheimer's disease; HT22 cell; ferroptosis; ER β /PGC-1 α ; mitochondria

绝经后女性体内雌激素水平突然下降导致的雌激素缺乏已被认为是阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 发生的危险因素^[1]。雌激素治疗虽有治疗效果^[2], 但由于其会增加卵巢、子宫内膜以及乳腺癌变的几率, 使得上述疗法对治疗女性 AD 患者还存在争议^[3], 对此, 研发更具针对性的新药, 避免雌激素的不良反应迫在眉睫。雌激素的胞内信号主要是雌激素受体 (estrogen receptor, ER)^[4], 主要包括 ER α 和 ER β , 其中, ER β 主要与认知功能相关, 在大脑中广泛分布, 其主要在皮质、海马中表达, 且 ER β 主要影响神经元的功能^[5]。此外, ER β 既存在于细胞核内, 也存在于线粒体上, 在调节线粒体功能中具有重要作用^[6]。因此, 调节 ER β 可能是治疗女性 AD 患者的关键。

神经元死亡引起的大脑退化是 AD 发病机制中最为重要的特征^[7]。神经元损伤死亡在 AD 的早期阶段就已经出现且贯穿 AD 的整个病理进程, 因此, 改善神经元死亡可能会减缓甚至阻止 AD 的进展^[8]。研究表明, 铁死亡在 AD 的发生发展中扮演越来越重要的地位^[9]。铁死亡是最近发现的一种铁依赖性的脂质过氧化的调节性细胞死亡形式^[10]。不饱和脂肪酸磷脂 (polyunsaturated fatty acid, PUFAs) 的过氧化是铁死亡的重要特征之一^[11]。铁死亡的机制涉及铁和不饱和脂质代谢失衡以及抗氧化物谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 耗竭、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase, GPX4) 失活等^[12]。由于神经元具有高代谢率、不饱和脂肪酸含量丰富、铁离子含量丰富以及抗氧化能力有限等特点, 使得神经元极易引发活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 蓄积和铁死亡^[13]。

线粒体稳态失衡是 AD 的另一个早期特征, 线粒体稳态失衡与铁死亡相互影响共同加重 AD 的发展^[14]。损伤线粒体会导致 ROS 的蓄积, 过量 ROS 会加重神经元脂质过氧化和铁死亡^[15]。研究表明, 促进线粒体生物发生, 改善线粒体损伤在改善铁死亡中也具有重要作用^[16]。线粒体发生通过生成新的

线粒体以维持线粒体数量和健康^[17]。氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α , PGC-1 α) 在调节线粒体生物发生中具有重要作用, PGC-1 α 通过激活转录因子 1/2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 1/2, NRF1/2), 促进线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 的复制, 从而促进线粒体生物发生^[18]。研究表明, 激动或过表达 ER β 也能上调 PGC-1 α 促进线粒体生物发生, 改善线粒体损伤, 继而缓解雌激素缺乏 AD 动物模型的认知行为障碍^[19-20]。因此, 共同调节 ER β 与 PGC-1 α 可能在治疗女性 AD 患者中具有重要作用。

本研究前期通过中药系统药理学数据库与分析平台 (traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform, TCMSP) 等数据库筛选出可同时调节 ER β /PGC-1 α 的活性成分光甘草定, 其为存在于豆科植物光果甘草 *Glycyrrhiza glabra* L. 的干燥根和根茎中的异黄酮类化合物^[21]。研究发现, 光甘草定具有抗氧化、保护神经、清除自由基、抗炎及抗骨质疏松等作用^[22], 但其口服易引起胃肠道不适、过敏等不良反应^[23]。据此, 本研究对光甘草定进行结构修饰得到 1 种全新衍生物 MG01, 并在细胞水平探究 MG01 对 β -淀粉样多肽 1-42 (β -amyloid peptide 1-42, $A\beta_{1-42}$) 诱导的神经损伤的保护作用, 以及发挥作用的机制。

1 材料

1.1 细胞株

小鼠海马神经元细胞株 HT22 (批号 20230524) 购自江苏凯基生物技术股份有限公司。

1.2 药品与试剂

10%胎牛血清 (批号 19080504) 购自上海四季青公司; DMEM 高糖培养基 (批号 2309007) 购自江苏凯基生物技术股份有限公司; $A\beta_{1-42}$ 寡聚体 (批号 P230224-1-SY052487) 购自上海吉尔生化有限公司; 光甘草定 (质量分数 $\geq 98\%$, 批号 P2640834) 购自瑞士阿达玛斯试剂公司; CCK-8 检测试剂盒

(批号 MAO218-3-Jan-23G)、活性氧检测试剂盒(批号 060722220624)、线粒体膜电位检测试剂盒 JC-1 (批号 092723240421) 购自上海碧云天生物技术有限公司; ER β (批号 C0321) 购自美国 Santa Cruz Biotechnology; PGC-1 α (批号 GR3315850-1)、线粒体转录因子 A (transcription factor A, TFAM, 批号 GR3322041-4) 购自美国 Abcam Plc 公司; 微管关联蛋白 2 (microtubule-associated protein 2, MAP2, 批号 A124221001) 购自北京索莱宝科技有限公司; 核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, NRF2, 批号 00136168) 购自美国 Cell Signaling Technology; 谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathion peroxidase, GPX4, 批号 10026631)、铁死亡特异性标志物过氧化物酶 3 (peroxiredoxin 3, PRDX3, 批号 00101311)、膜铁转运蛋白 1 (ferroportin1, FPN1, 批号 00133868)、铁蛋白 (ferritin, 批号 10025824) 购自武汉三鹰生物技术有限公司; β -肌动蛋白 (β -actin, 批号 TA-09)、辣根酶标记山羊抗兔 (批号 ZB2303)、山羊抗鼠 (批号 ZB2307) 二抗购自北京中杉金桥生物科技公司。

1.3 仪器

HT-mini04 型电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); Infinite M200 PRO Tecan 酶标仪 (瑞士 TECAN 公司); BM515 型超低温冰箱 (法国 Froilabo 公司); VORTEX-5 型涡旋混匀仪 (江苏其林贝尔仪器制造有限公司); MS-150 型电磁搅拌器 (美国 CENTERLAB 公司); research plus 移液器、5804R 型台式低温离心机 (德国 Eppendorf 公司); SW-CJ-IF 超净工作台 (浙江孚夏医疗科技有限公司); Amersham Imager 600 型自动化学发光凝胶成像分析 (美国 General Electric Company 公司); CPA2250 型电子天平 (北京赛多利斯科学仪器有限公司); IMS-130 型制冰机 (上海安亭科学仪器厂); QT3 型多功能摇床 (上海琪特分析仪器有限公司); Nikon Evlipse E100 型正置荧光显微镜 (日本尼康株式会社)。

2 方法

2.1 细胞培养、造模及给药

光甘草定 (C₂₀H₂₂O₄) 进行甲基化修饰后得到化合物 C₂₂H₂₆O₄, 将修饰后化合物命名为 MG01。

HT22 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养; 当细胞密

度达到 80% 时, 用胰酶消化后传代以维持细胞株的生长。取对数生长期细胞用于实验, 所有实验均重复 3 次。设置空白孔, 将细胞按 1×10⁴ 个/mL 密度接种于 96 孔板, 每孔加入 100 μ L 细胞悬液, 孵育 24 h 后, 弃上清, 设置对照孔, 再分别加入 100 μ L 浓度为 5、10、20、40 μ mol/L 的 A β ₁₋₄₂ 寡聚体孵育 HT22 细胞继续孵育 24 h, 筛选诱导的神经损伤的最佳浓度。设置空白孔, 取对数生长期细胞将细胞按 1×10⁴ 个/mL 密度接种于 96 孔板, 每孔加入 100 μ L 细胞悬液, 设置对照孔, 培养细胞 24 h 贴壁后, 弃上清, 除空白组、对照组外, 其余各组细胞加入 100 μ L 浓度为 20 μ mol/L 的 A β ₁₋₄₂ 诱导神经损伤细胞模型, 设置模型组、MG01 低、高剂量 (0.1、1.0 μ mol/L) 组及光甘草定低、高剂量 (0.1、1.0 μ mol/L) 组, 除模型组外, 每孔加入 100 μ L 含药培养液, 每组设置 5 个复孔, 培养 24 h 后, 每孔加入 10 μ L CCK-8, 37 °C 孵育 1 h 后, 于 450 nm 检测吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.2 细胞形态检测

取对数生长期细胞将按 1×10⁴ 个/mL 接种于 96 孔板, 每孔加入 100 μ L 细胞悬液, 设置对照组、模型组、MG01 (0.1 μ mol/L) 组以及光甘草定 (0.1 μ mol/L) 组, 除对照组外, 其余各组细胞加入 100 μ L 浓度为 20 μ mol/L 的 A β ₁₋₄₂ 诱导神经损伤细胞模型, 培养细胞 24 h 后, 每组设置 3 个复孔, 各组细胞给药培养 24 h 后, 于荧光显微镜下观察并拍照。

2.3 免疫细胞荧光检测 MAP2、PRDX3 蛋白表达

细胞处理及分组同“2.2”项下方法, 各组细胞给药培养 24 h 后, 用 PBS 洗涤细胞后加入 1 mL 多聚甲醛固定, 随后加入 1 mL TritonX-100, 用 APS 进行封闭 1 h 后, 滴加一抗 MAP2 (1:100)、PRDX3 (1:500), 避光、4 °C 孵育过夜, 滴加二抗, 避光、室温孵育 1 h, 避光洗去二抗, 滴加 DAPI 使其充分覆盖 6 孔板, 避光孵育 8 min 弃二抗, PBS 洗涤细胞后, 于荧光显微镜下观察并拍照。

2.4 ROS 检测

细胞处理及分组同“2.2”项下方法, 各组细胞加药培养 24 h 后, 依据试剂盒说明书, 将 ROS 阳性对照组 (50 ng/mL) 先在培养箱中孵育 20 min, 随后加入每孔加入 100 μ L 染色试剂, 继续孵育 20 min 后, 用无血清培养液洗涤细胞 3 次, 于 488 nm 激

发波长、525 nm 发射波长下观察并拍照。

2.5 线粒体膜电位检测

细胞处理及分组同“2.2”项下方法，各组细胞加药培养 24 h。用 PBS 洗涤细胞后加入 1 mL JC-1 染色工作液，充分混匀，于 37 °C、5%CO₂ 培养箱中孵育 20 min。孵育结束后，吸除上清，用 1×JC-1 染色缓冲液洗涤细胞 2 次后，于荧光显微镜下观察并拍照。

2.6 分子对接及 Western blotting 法检测 ERβ 和 PGC-1α 的蛋白表达

5TOA (ERβ)、3D24 (PGC-1α) 的结构文件来源于 PDB 数据库，先去除晶体结构中的水分子和配体，保留原子坐标、原子类型、部分电荷及柔键。采用 ADT 处理配体结构。受体和配体的文件准备好后，打开 Grid Box，格点间距设为 0.375，对接盒子的中心坐标设为 (-1.684, 39.749, 60.591)，盒子的大小为 100×100×80 个网格点。设置参数，蛋白不设置柔性，使用 Protein-Ligand Interaction Profiler (Plip) 蛋白配体非共价相互作用分析工具分析蛋白、化合物的 3D 相互作用，使用 Pymol 软件作图，采用 Ligplot⁺v2.2.8 软件分析蛋白、化合物的 2D 相互作用。

取对数生长期细胞将细胞按 1×10⁴ 个/mL 密度接种于 6 孔板，每孔加入 1 mL 细胞悬液，设置对照组、MG01 (0.1 μmol/L) 组、Aβ₁₋₄₂ (20 μmol/L) 组及 Aβ₁₋₄₂ (20 μmol/L) + MG01 (0.1 μmol/L) 组，培养细胞 24 h 后，每组设置 3 个复孔，各组细胞给药培养 24 h 后收集细胞，加入 RIPA 裂解液裂解细胞，提取细胞总蛋白，用 BCA 法测蛋白浓度。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，分别滴加 ERβ (1:1 000)、PGC-1α (1:5 000)、滴加相应二抗 (1:3 000)，室温孵育 1 h 后，使用 ECL 发光液，用 Image Lab 化学发光系统检测，以 β-actin 为内参，分析目标蛋白的相对表达。

2.7 Western blotting 法检测相关蛋白表达水平

取对数生长期细胞将细胞按 1×10⁴ 个/mL 密度接种于 6 孔板，每孔加入 1 mL 细胞悬液，设置对照组、模型组、MG01 (0.1 μmol/L) 组，培养细胞 24 h 后，每组设置 3 个复孔，各组细胞给药培养 24 h 后收集细胞，加入 RIPA 裂解液裂解细胞，提取细胞总蛋白，用 BCA 法测蛋白浓度。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，分

别滴加 TFAM (1:1 000)、NRF2 (1:2 000)、GPX4 (1:1 000)、PRDX3 (1:2 000)、FPN1 (1:1 000)、ferritin (1:5 000) 一抗，4 °C 孵育过夜，洗膜，滴加相应二抗 (1:3 000)，室温孵育 1 h 后，使用 ECL 发光液，用 Image Lab 化学发光系统检测，以 β-actin 为内参，分析目标蛋白的相对表达。

2.8 统计学分析

采用 Prism 软件处理和分析数据，计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间比较采用独立样本 *t* 检验，多组间比较采用单因素方差分析。

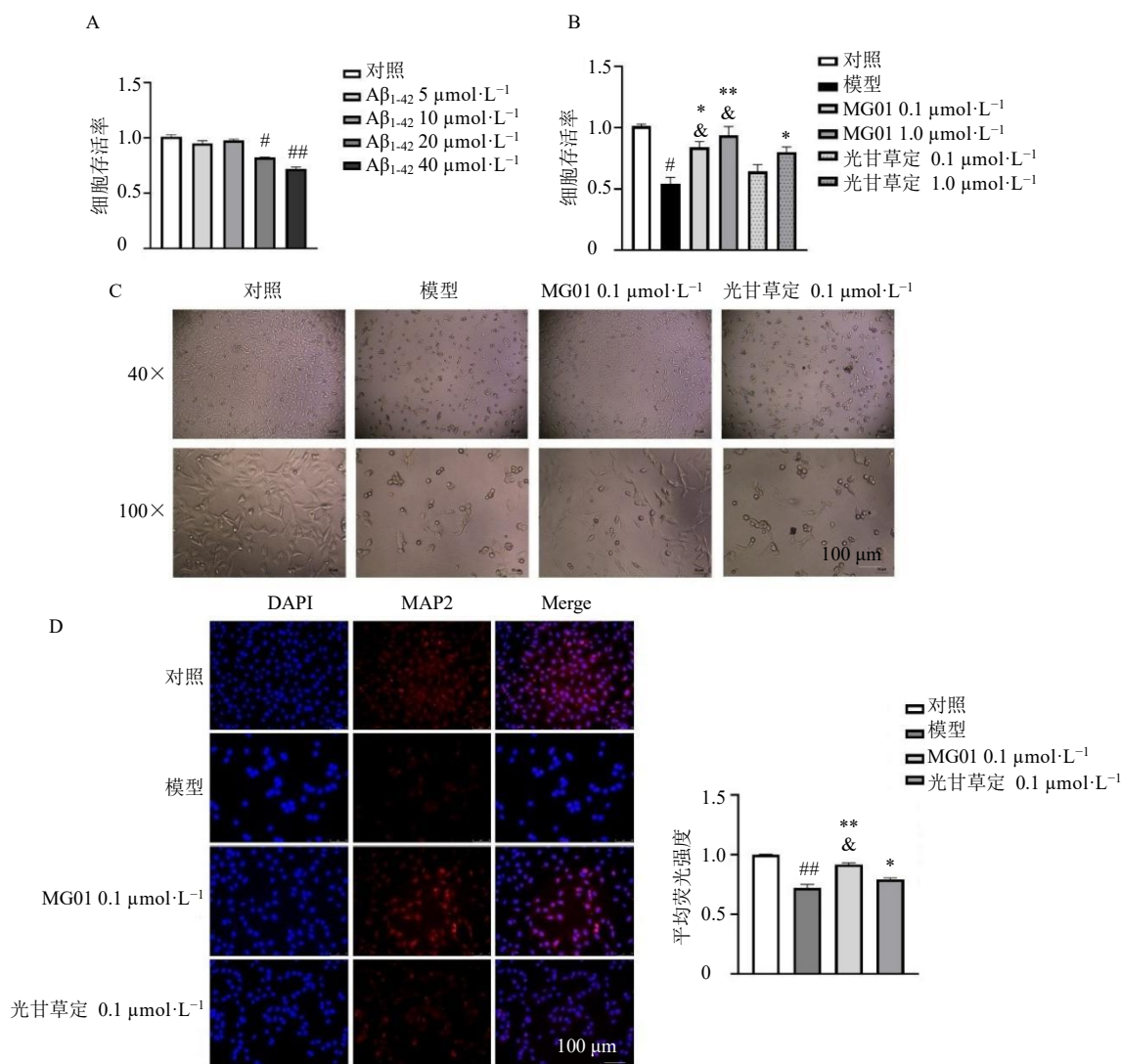
3 结果

3.1 MG01 及光甘草定对 Aβ₁₋₄₂ 诱导的 HT22 细胞活性的影响

如图 1-A 所示，与对照组比较，Aβ₁₋₄₂ 浓度为 20 μmol/L 时细胞活力显著下降 ($P < 0.05$)，后续实验 Aβ₁₋₄₂ 均以 20 μmol/L 浓度进行造模。采用 20 μmol/L Aβ₁₋₄₂ 诱导细胞损伤模型，同时给予不同浓度 (0.1、1.0 μmol/L) MG01 及光甘草定，与模型组比较，0.1、1.0 μmol/L 的 MG01 均能显著改善 Aβ₁₋₄₂ 诱导的细胞损伤 ($P < 0.05$ 、0.01)，而 0.1 μmol/L 的光甘草定对 Aβ₁₋₄₂ 诱导的细胞损伤无明显改善作用，1 μmol/L 的光甘草定对 Aβ₁₋₄₂ 诱导的细胞损伤有改善作用 ($P < 0.05$)，结果表明 MG01 的有效浓度更低 (图 1-B)。因此，选用 0.1 μmol/L 的 MG01 及光甘草定进行后续实验。细胞形态结果显示，与对照组比较，模型组细胞形态损伤严重，细胞皱缩，轴突和树突萎缩变短；与模型组比较，在给予 0.1 μmol/L MG01 及光甘草定后，细胞形态均得到一定改善，但 MG01 的改善作用效果更好 (图 1-C)。免疫荧光染色结果显示 (图 1-D)，与对照组比较，模型组中 MAP-2 的表达水平显著降低 ($P < 0.01$)；与模型组比较，细胞给予 MG01 及光甘草定后，MAP2 的表达水平均显著下降 ($P < 0.05$ 、0.01)；与光甘草定组比较，MG01 组细胞 MAP2 的表达水平下降作用更明显 ($P < 0.05$)。

3.2 MG01 对 Aβ₁₋₄₂ 诱导的 HT22 细胞线粒体功能损伤的影响

如图 2-A 所示，与对照组比较，模型组细胞中 ROS 表达显著降低 ($P < 0.01$)；与模型组比较，分别给予 0.1 μmol/L MG01 与光甘草定后，ROS 表达均显著回升 ($P < 0.05$)；与光甘草定组比较，MG01 的改善作用更为显著 ($P < 0.05$)。如图 2-B 所示，与对照组比较，模型组细胞中线粒体膜电位显著



A- $A\beta_{1-42}$ 诱导的神经损伤的最佳浓度筛选; B-MG01 及光甘草定对 HT22 细胞活性的影响; C-细胞形态检测; D-细胞免疫荧光检测 PRDX3 的表达水平 ($\times 200$); 与对照组比较: $^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$ $^{\#\#\#}P<0.001$; 与模型组比较: $^*P<0.05$ $^{**}P<0.01$; 与光甘草定组比较: $^{\&}P<0.05$, 下同。
A-optimal concentration screening for HT22 cell from $A\beta_{1-42}$ -induced injury; B-effect of MG01 and glabridin on viability of HT22 cells; C-cell morphology detection; D-detection of PRDX3 expression level by cell immunofluorescence ($\times 200$); $^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$ $^{\#\#\#}P<0.001$ vs control group; $^*P<0.05$ $^{**}P<0.01$ vs model group; $^{\&}P<0.05$ vs glabridin group, same as below group.

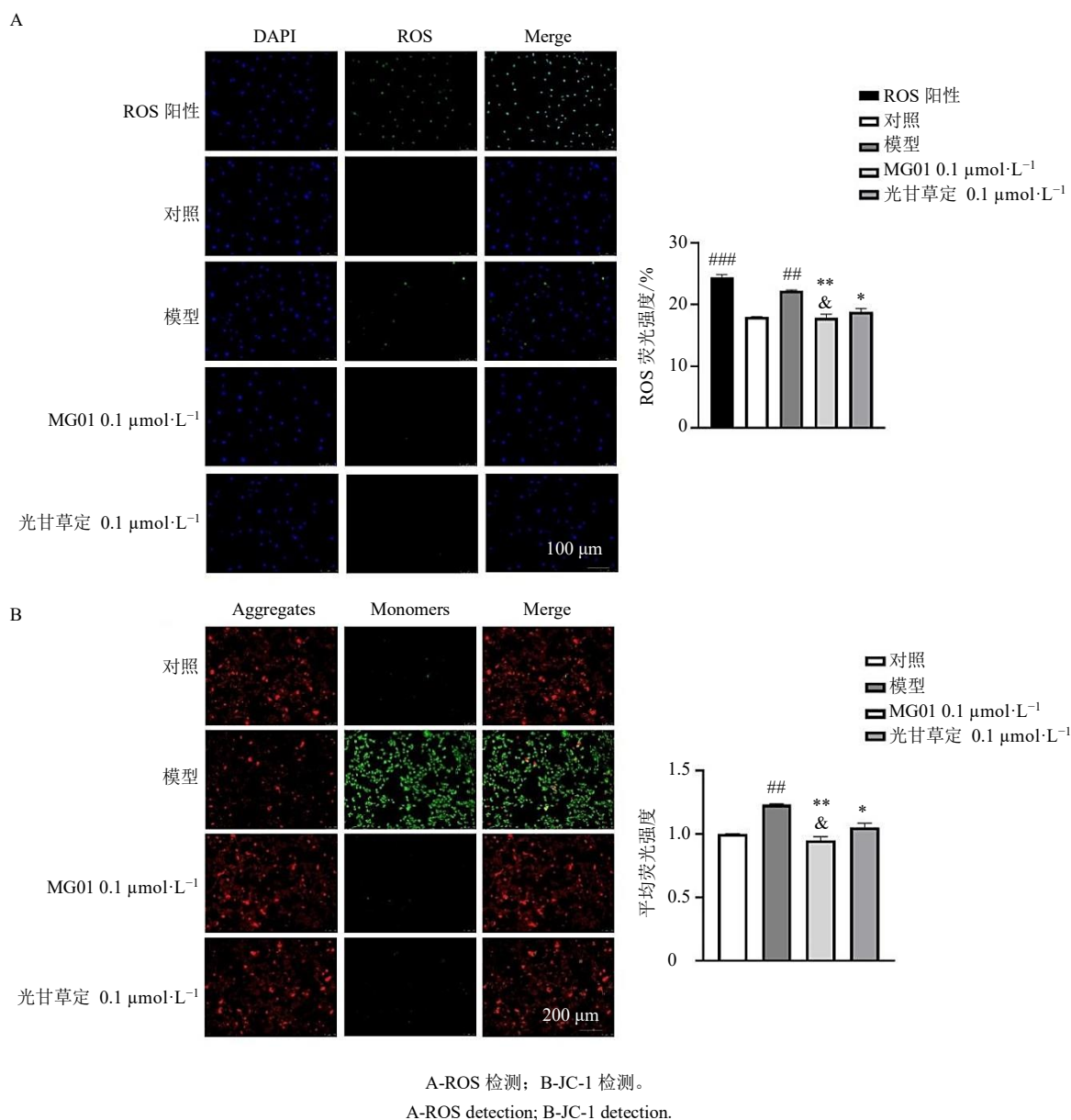
图 1 MG01 及光甘草定对 HT22 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 1 Effects of MG01 and glabridin on activity of HT22 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

增高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 分别给予 $0.1 \mu\text{mol/L}$ MG01 与光甘草定后, 线粒体膜电位显著下降 ($P<0.01$); 与光甘草定组比较, MG01 的作用更为显著 ($P<0.05$)。

3.3 MG01 对 ER β 和 PGC-1 α 蛋白表达的影响

MG01 与 ER β 蛋白的对接结合能为 -7.73 kcal/mol ($1 \text{ kcal/mol}=4.182 \text{ kJ/mol}$), 化合物通过疏水相互作用结合到蛋白上, 疏水相互作用残基为 B 链: PRO277、PRO278 等 (图 3-A)。修饰后的化合物与 PGC-1 α 蛋白的对接结合能为 -8.65 kcal/mol ,

3D24 有 4 条链, 化合物结合在 A 链, 通过疏水相互作用结合到蛋白上, 疏水相互作用残基为 A 链: GLU205、PRO206 等 (图 3-B)。分子对接结果表明, MG01 与 ER β 和 PGC-1 α 均可实现有效的相互作用。Western blotting 结果如图 3-C 所示, 与对照组比较, MG01 组 ER β 和 PGC1- α 的蛋白表达显著上调 ($P<0.05$), $A\beta_{1-42}$ 组 ER β 和 PGC1- α 的表达显著下调 ($P<0.05$ 、 0.01); 与 $A\beta_{1-42}$ 组比较, $A\beta_{1-42}$ +MG01 组细胞 ER β 和 PGC1- α 的蛋白表达显著上调 ($P<0.05$)。

图 2 ROS 及 JC-1 检测结果 ($\times 200$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)Fig. 2 Results of ROS and JC-1 detection ($\times 200$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.4 MG01 对 $\text{A}\beta_{1-42}$ 诱导的 HT22 细胞铁死亡的影响

如图 4-A 所示, 与对照组比较, 模型组中线粒体中铁死亡的标志物 PRDX3 的表达水平显著增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 给予 0.1 $\mu\text{mol/L}$ MG01 后, PRDX3 的表达水平显著下降 ($P < 0.01$)。如图 4-B 所示, 与对照组比较, 模型组中铁死亡的标志物 GPX4、FPN1、ferritin 的蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 给予 0.1 $\mu\text{mol/L}$ MG01 后, GPX4、FPN1、ferritin 的表达水平得到显著改善 ($P < 0.01$)。

3.5 MG01 促进线粒体发生改善 $\text{A}\beta_{1-42}$ 诱导的 HT22 细胞铁死亡

如图 5 所示, 与对照组比较, 模型组细胞中线粒体生物发生相关标志物 PGC-1 α 、NRF2、TFAM 的蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01); 与模型组比较, 给予 0.1 $\mu\text{mol/L}$ MG01 后, PGC-1 α 、NRF2、TFAM 的蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。

4 讨论

绝经后女性患 AD 的风险增加与雌激素水平显著下降密切相关^[24], 激动或上调 ER β 能减少 $\text{A}\beta_{1-42}$

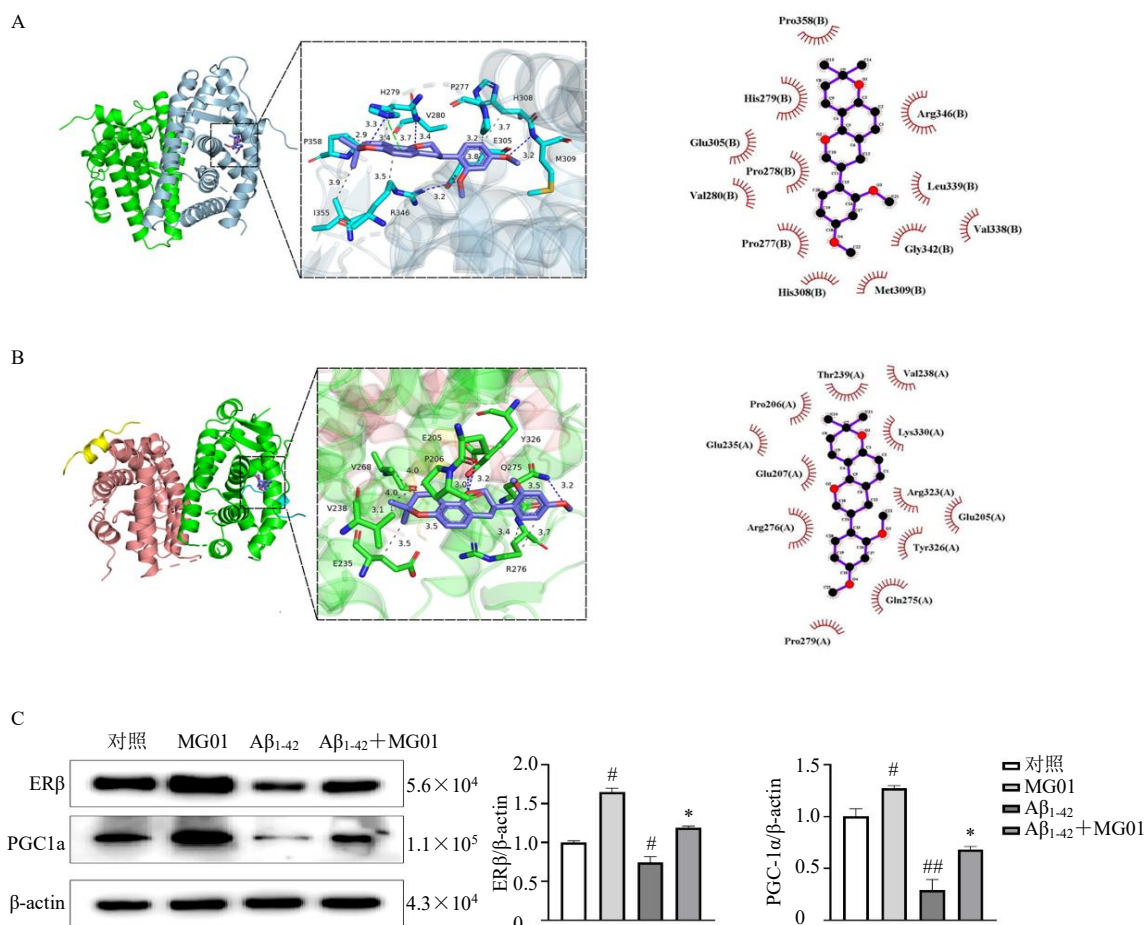
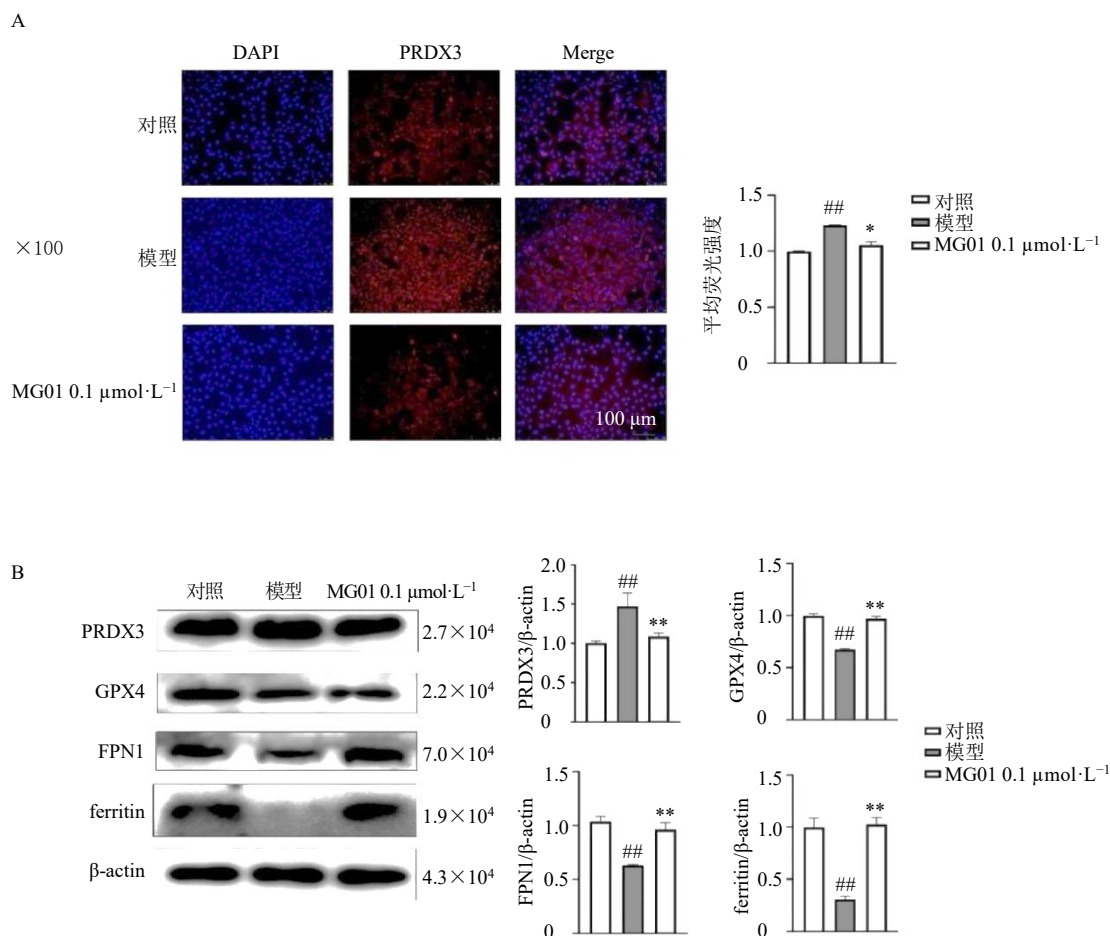


图 3 MG01 对 ERβ 和 PGC-1α 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 3 Effect of MG01 on expression level of ERβ and PGC-1α ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

沉积, 改善 AD 模型大鼠的认知行为障碍^[25], 其作用机制为调节线粒体功能^[26-27]。研究表明, 槲皮素能激活 ERβ, 上调 p38/丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路, 改善 Aβ₂₅₋₃₅ 诱导的大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞线粒体损伤, 发挥神经保护作用^[28]。鉴于脑高代谢需求的特点和线粒体发生对神经元功能实现的重要作用, PGC-1α 作为线粒体发生的调节中心已被人们广泛研究^[29]。研究发现, PGC-1α 可通过改善线粒体功能减缓 AD 进程^[18]。过表达 PGC-1α 显著改善 Aβ₁₋₄₂ 诱导的人神经母细胞瘤细胞线粒体损伤, 降低 ROS 水平, 保护人神经母细胞瘤细胞免受 Aβ₁₋₄₂ 诱导的神经元死亡^[30]。过表达 PGC-1α 还可减少人

淀粉样蛋白前体蛋白 (Mo/HuAPP695swe) 突变体 BE(2)-M17 人神经母细胞瘤细胞损伤, 而敲低 PGC-1α 则加剧线粒体生物发生缺陷^[31]。因此, 上调 ERβ 和 PGC-1α 促进线粒体发生, 改善线粒体健康可能是改善 AD 的有效措施之一^[32]。本研究结果表明, MG01 相较于光甘草定, 可以更显著上调 ERβ 和 PGC-1α 的表达, 表明 MG01 可能通过介导 ERβ 和 PGC-1α 信号实现对 Aβ₁₋₄₂ 诱导 HT22 细胞损伤的保护作用。

近期研究表明, 铁死亡在 AD 发病机制中起关键作用, AD 早期阶段大脑中铁含量已发生异常累积^[33]。在人淀粉样蛋白前体蛋白 (Mo/HuAPP695swe) 和突变人早老蛋白 1 (PS1-dE9) 的双转基因小鼠即



A-细胞免疫荧光检测 PRDX3 的表达水平; B-Western blotting 检测 PRDX3、GPX4、FPN1、ferritin 的表达水平。

A-expression level of PRDX3 detected by cellular immunofluorescence; B-expression levels of PRDX3, GPX4, FPN1, ferritin detected by Western blotting.

图 4 MG01 对 PRDX3、GPX4、FPN1、ferritin 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of MG01 on protein expression levels of PRDX3, GPX4, FPN1 and ferritin ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

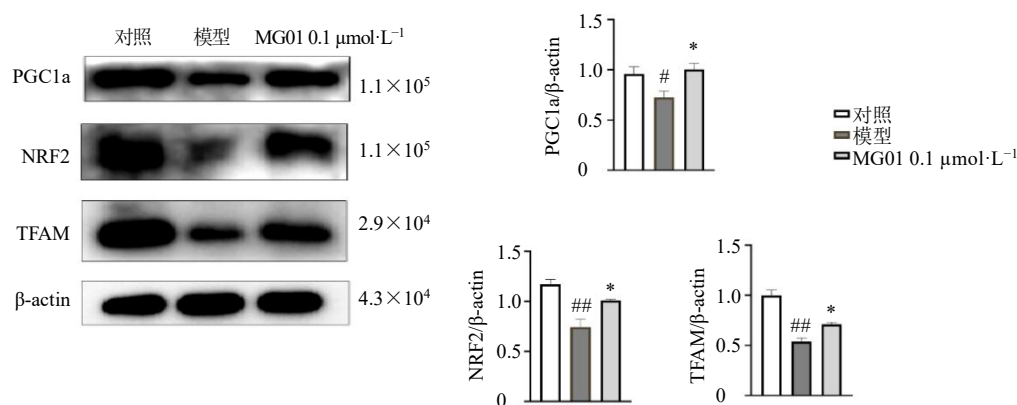


图 5 MG01 对 PGC1-α、NRF2、TFAM 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of MG01 on protein expression levels of PGC1-α, NRF2 and TFAM ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

APP/PS1 小鼠的海马中观察到 FPN1 年龄依赖性下调, 且 FPN1 敲除小鼠表现出认知下降等 AD 病理特征^[34], 改善铁代谢或抑制铁死亡能显著改善学习记忆损伤。例如纳米姜黄素和多奈哌齐联合治疗可改善铁死亡, 实现对 AD 的治疗作用^[35]。本研究也得到类似的结果, MG01 可以逆转 $A\beta_{1-42}$ 诱导的细胞铁死亡标志物 GPX4、PRDX3、FPN1 以及 ferritin 的表达, 表明 MG01 的神经保护作用与改善铁死亡密切相关。

线粒体损伤与铁死亡密切相关^[36-37]。线粒体损伤会引发线粒体氧化应激^[38]进而加重铁依赖性的脂质过氧化和铁死亡^[39]。线粒体生物发生是调节线粒体健康的关键环节, PGC-1 α 作为线粒体发生的主要调节因子, 上调后能改善 AD 动物模型线粒体发生和铁死亡。如红景天苷可以改善 $A\beta_{1-42}$ 诱导的 AD 模型小鼠和谷氨酸诱导的 HT22 细胞的铁死亡, 其机制为激活 PGC-1 α /NRF2 信号通路^[40]。激活 ER β 也可以上调 PGC-1 α 促进线粒体发生, 改善学习记忆障碍。如植物雌激素鹰嘴豆素 A 可通过上调 ER β 促进线粒体生物发生, 逆转线粒体自噬和动力学异常改善 AD 模型小鼠学习记忆障碍^[20]。本实验结果也表明, MG01 能显著改善 $A\beta_{1-42}$ 诱导的线粒体膜电位降低、降低 ROS 水平、改善线粒体损伤, 而给予光甘草定后虽有一定改善作用, 但不及 MG01; MG01 还可上调 PGC-1 α 、NRF2、TFAM 的表达。以上表明, MG01 可能截到促进与 PGC-1 α 相关的线粒体生物发生, 改善线粒体氧化应激, 改善铁死亡, 发挥神经保护作用。

综上, MG01 相较于光甘草定, 可以更明显地改善 $A\beta_{1-42}$ 诱导的 HT22 细胞铁死亡, 其作用机制可能与调节 ER β /PGC-1 α , 促进线粒体发生, 改善氧化应激有关。本研究从体外水平初步观察了 MG01 的作用, 并阐述了其改善铁死亡可能存在的作用机制, 为后续进一步探究该化合物的药理作用提供了实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 莫玮. 阿尔茨海默病发病的遗传基础研究取得新突破—基于单细胞多组学的阿尔茨海默病表观遗传学机制解析 [J]. 中国科学: 生命科学, 2024, 54(7): 1307-1309.
- [2] Barth C, Crestol A, de Lange A G, *et al.* Sex steroids and the female brain across the lifespan: Insights into risk of

- depression and Alzheimer's disease [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2023, 11(12): 926-941.
- [3] Sherwin B B. Estrogen and cognitive aging in women [J]. *Neuroscience*, 2006, 138(3): 1021-1026.
- [4] 郑向红, 许颖. 雌激素受体及与雌激素相关疾病的研究进展 [J]. 海峡药学, 2016, 28(10): 1-5.
- [5] Arao Y, Korach K S. The physiological role of estrogen receptor functional domains [J]. *Essays Biochem*, 2021, 65(6): 867-875.
- [6] Pettersson K, Gustafsson J A. Role of estrogen receptor beta in estrogen action [J]. *Annu Rev Physiol*, 2001, 63: 165-192.
- [7] Fang E F, Hou Y J, Palikaras K, *et al.* Mitophagy inhibits amyloid- β and tau pathology and reverses cognitive deficits in models of Alzheimer's disease [J]. *Nat Neurosci*, 2019, 22(3): 401-412.
- [8] 陈俊宗, 江耀飞, 洪芬芳, 等. 天然药物保护神经元治疗阿尔茨海默病研究新进展 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2019, 25(7): 1014-1018.
- [9] Zhang Y K, Sun R J, Li X L, *et al.* Porcine circovirus 2 induction of ROS is responsible for mitophagy in PK-15 cells via activation of Drp1 phosphorylation [J]. *Viruses*, 2020, 12(3): 289.
- [10] 赵悄雅, 常恒瑞, 常彦忠. 细胞铁死亡的形态学特征及相关疾病治疗 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2023, 50(6): 1286-1295.
- [11] 付国玲. 单不饱和脂肪酸在铁死亡中的作用以及机制的研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2018.
- [12] 李佳明, 韩亦琳, 王雅欣, 等. 阿尔茨海默病与铁死亡关系及相关治疗策略 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2022, 24(4): 447-448.
- [13] 张钰涵, 苏凯奇, 刘昊. 铁死亡机制及其在血管性认知障碍中的作用 [J]. 医学研究生学报, 2022, 35(2): 190-195.
- [14] Gao M H, Yi J M, Zhu J J, *et al.* Role of mitochondria in ferroptosis [J]. *Mol Cell*, 2019, 73(2): 354-363.e3.
- [15] Tadokoro T, Ikeda M, Ide T, *et al.* Mitochondria-dependent ferroptosis plays a pivotal role in doxorubicin cardiotoxicity [J]. *JCI Insight*, 2023, 8(6): e169756.
- [16] Tan Q, Zhang X Q, Li S X, *et al.* DMT1 differentially regulates mitochondrial complex activities to reduce glutathione loss and mitigate ferroptosis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2023, 207: 32-44.
- [17] Collier J J, Oláhová M, McWilliams T G, *et al.* Mitochondrial signalling and homeostasis: From cell biology to neurological disease [J]. *Trends Neurosci*, 2023, 46(2): 137-152.
- [18] Abid H, Cartier D, Hamieh A, *et al.* AMPK activation of

- PGC-1 α /NRF-1-dependent *SELENOT* gene transcription promotes PACAP-induced neuroendocrine cell differentiation through tolerance to oxidative stress [J]. *Mol Neurobiol*, 2019, 56(6): 4086-4101.
- [19] 钱园园, 刘金颖, 孙林琳. 雌激素受体 β 与女性阿尔茨海默病的关系 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2019, 36(11): 1046-1048.
- [20] Hou Y, Zhao W, Yu H Y, *et al.* Biochanin A alleviates cognitive impairment and hippocampal mitochondrial damage in ovariectomized APP/PS1 mice [J]. *Phytomedicine*, 2022, 100: 154056.
- [21] Urban C F, Ermert D, Schmid M, *et al.* Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans* [J]. *PLoS Pathog*, 2009, 5(10): e1000639.
- [22] Pastorino G, Cornara L, Soares S, *et al.* Liquorice (*Glycyrrhiza glabra*): A phytochemical and pharmacological review [J]. *Phytother Res*, 2018, 32(12): 2323-2339.
- [23] 吴少娟. 光甘草定的生物安全性评价及其毒性机制的研究 [D]. 广州: 广东工业大学, 2022.
- [24] Barnes L L, Wilson R S, Bienias J L, *et al.* Sex differences in the clinical manifestations of Alzheimer disease pathology [J]. *Arch Gen Psychiatry*, 2005, 62(6): 685-691.
- [25] Wang L, Andersson S, Warner M, *et al.* Estrogen receptor (ER) β knockout mice reveal a role for ER β in migration of cortical neurons in the developing brain [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(2): 703-708.
- [26] Yao M Z, Nguyen T V, Pike C J. Estrogen regulates Bcl-w and Bim expression: Role in protection against beta-amyloid peptide-induced neuronal death [J]. *J Neurosci*, 2007, 27(6): 1422-1433.
- [27] Pike C J. Estrogen modulates neuronal Bcl-xL expression and beta-amyloid-induced apoptosis: Relevance to Alzheimer's disease [J]. *J Neurochem*, 1999, 72(4): 1552-1563.
- [28] 赵雨薇. 槲皮素通过 p38/MAPK 信号通路对 A β 25-35 诱导 PC12 损伤的神经保护作用研究 [D]. 张家口: 河北北方学院, 2022.
- [29] Tritos N A, Mastaitis J W, Kokkotou E G, *et al.* Characterization of the peroxisome proliferator activated receptor coactivator 1 α (PGC 1 α) expression in the murine brain [J]. *Brain Res*, 2003, 961(2): 255-260.
- [30] Zhang Y Q, Chen C C, Jiang Y L, *et al.* PPAR γ coactivator-1 α (PGC-1 α) protects neuroblastoma cells against amyloid-beta (A β) induced cell death and neuroinflammation via NF- κ B pathway [J]. *BMC Neurosci*, 2017, 18(1): 69.
- [31] Osama A, Zhang J M, Yao J, *et al.* Nrf2: A dark horse in Alzheimer's disease treatment [J]. *Ageing Res Rev*, 2020, 64: 101206.
- [32] Hwang S L, Yen G C. Effect of hesperetin against oxidative stress via ER- and TrkA-mediated actions in PC12 cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(10): 5779-5785.
- [33] Smith M A, Zhu X W, Tabaton M, *et al.* Increased iron and free radical generation in preclinical Alzheimer disease and mild cognitive impairment [J]. *J Alzheimers Dis*, 2010, 19(1): 363-372.
- [34] Bao W D, Pang P, Zhou X T, *et al.* Loss of ferroportin induces memory impairment by promoting ferroptosis in Alzheimer's disease [J]. *Cell Death Differ*, 2021, 28(5): 1548-1562.
- [35] Nawar N F, Beltagy D M, Mohamed T M, *et al.* Ameliorative anti-coagulant, anti-oxidative and anti-ferroptotic activities of nanocurcumin and donepezil on coagulation, oxidation and ferroptosis in Alzheimer's disease [J]. *Toxicol Res*, 2024, 13(2): tfac054.
- [36] 孟炜寒, 杜悦, 朱乐, 等. 线粒体调控在阿尔茨海默病铁死亡中的作用研究进展 [J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2023, 52(6): 878-884.
- [37] Sun 孙意冉 Y, Yan C C, He L B, *et al.* Inhibition of ferroptosis through regulating neuronal calcium homeostasis: An emerging therapeutic target for Alzheimer's disease [J]. *Ageing Res Rev*, 2023, 87: 101899.
- [38] Solis W A, Dalton T P, Dieter M Z, *et al.* Glutamate-cysteine ligase modifier subunit: Mouse Gclm gene structure and regulation by agents that cause oxidative stress [J]. *Biochem Pharmacol*, 2002, 63(9): 1739-1754.
- [39] Goujon M, Liang Z B, Soriano-Castell D, *et al.* The neuroprotective flavonoids sterubin and fisetin maintain mitochondrial health under oxytotic/ferroptotic stress and improve bioenergetic efficiency in HT22 neuronal cells [J]. *Antioxidants*, 2024, 13(4): 460.
- [40] Yang S X, Xie Z P, Pei T T, *et al.* Salidroside attenuates neuronal ferroptosis by activating the Nrf2/HO1 signaling pathway in A β ₁₋₄₂-induced Alzheimer's disease mice and glutamate-injured HT22 cells [J]. *Chin Med*, 2022, 17(1): 82.

[责任编辑 罗 曦]