

木鳖子醇提物调控 Nrf2/Keap1 信号通路缓解过氧化氢诱导的神经细胞氧化损伤

梁海梅^{1,2,3,4,5}, 张玲秋^{1,2,3,4}, 万宛若^{1,2,3,4}, 侯小涛^{1,2,3,4}, 郝二伟^{1,2,3,4}, 邓家刚^{1,2,3,4}, 杜正彩^{1,2,3,4,5*}

1. 广西中医药大学, 广西 南宁 530200
2. 广西中药药效研究重点实验室, 广西 南宁 530200
3. 中药资源循环利用广西高校工程研究中心, 广西 南宁 530200
4. 广西中医湿病方药理论与转化重点实验室, 广西 南宁 530200
5. 广西中医药壮瑶医药研究院, 广西 南宁 530200

摘要: **目的** 探讨木鳖子醇提物对过氧化氢 (hydrogen peroxide, H₂O₂) 诱导的 SH-SY5Y 神经细胞氧化应激损伤及 Kelch 样环氧丙烷相关蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1)/核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 通路的影响。**方法** 采用 200 μmol/L H₂O₂ 诱导 SH-SY5Y 细胞损伤, 给予 8、16、32 μg/mL 木鳖子醇提物干预后, 采用 MTS 检测细胞活力; 采用流式细胞术分析细胞凋亡及活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平; 采用试剂盒测定超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性及丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 水平; 采用 qRT-PCR 检测 *Nrf2*、*Keap1*、血红素氧合酶-1 (heme oxygenase-1, *HO-1*)、醌氧化还原酶 1 [NAD(P)H quinone oxidoreductase 1, *NQO1*]、*SOD1*、*SOD2*、过氧化氢酶 (catalase, *CAT*)、B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, *Bcl-2*)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, *Bax*) mRNA 表达; 采用免疫荧光法检测 Nrf2、Bcl-2 蛋白表达; 采用 Western blotting 检测 Keap1、Bax 蛋白表达。**结果** 与模型组比较, 木鳖子醇提物可改善 H₂O₂ 诱导的 SH-SY5Y 细胞形态, 显著提高细胞活力 ($P < 0.001$), 降低细胞凋亡率和 ROS、MDA 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 提高 SOD 活性 ($P < 0.001$), 上调 *HO-1*、*NQO1*、*CAT*、*SOD1*、*SOD2* mRNA 表达 ($P < 0.01$ 、 0.001), 上调 Nrf2、Bcl-2 mRNA 及蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 促进 Nrf2 入核, 下调 Keap1、Bax mRNA 及蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.001)。**结论** 木鳖子醇提物通过激活 Nrf2/Keap1 信号通路, 提高抗氧化酶活性, 抑制氧化应激损伤, 并通过调控 Bcl-2/Bax 途径抑制细胞凋亡, 从而发挥神经保护作用。

关键词: 木鳖子; 氧化应激; Nrf2/Keap1 信号通路; SH-SY5Y 细胞; 神经保护; 细胞凋亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)16-5826-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.16.012

Ethanol extract of *Momordica cochinchinensis* alleviates hydrogen peroxide-induced oxidative damage in SH-SY5Y cells by regulating Nrf2/Keap1 signaling pathway

LIANG Haimei^{1,2,3,4,5}, ZHANG Lingqiu^{1,2,3,4}, WAN Wanruo^{1,2,3,4}, HOU Xiaotao^{1,2,3,4}, HAO Erwei^{1,2,3,4}, DENG Jiagang^{1,2,3,4}, DU Zhengcai^{1,2,3,4,5}

1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China
2. Guangxi Key Laboratory of Efficacy Study on Chinese Materia Medica, Nanning 530200, China
3. University Engineering Research Center of Reutilization of Traditional Chinese Medicine Resources, Nanning 530200, China
4. Guangxi Key Laboratory of TCM Formulas Theory and Transformation for Damp Diseases, Nanning 530200, China
5. Institute of Traditional Chinese and Zhuang-Yao Ethnic Medicine, Nanning 530200, China

Abstract: Objective To explore the effect of ethanol extract of *Momordica cochinchinensis* on hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced oxidative stress damage in SH-SY5Y neuroblastoma cells and Kelch like ECH associated protein 1 (Keap1)/nuclear factor erythroid

收稿日期: 2025-04-03

基金项目: 广西科技重大专项项目 (桂科 AA17202040-2); 广西中药药效研究重点实验室 (省级) 系统性研究课题 (20-065-38-A3)

作者简介: 梁海梅, 硕士研究生, 研究方向为中药药理学。Tel: 15878093352 E-mail: 1446850485@qq.com

*通信作者: 杜正彩, 研究员, 从事中药药理学及中药新药开发研究。Tel: 15907719818 E-mail: 771528928@qq.com

2-related factor 2 (Nrf2) pathway. **Methods** 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 was used to induce SH-SY5Y cell damage, and after intervention with ethanol extract of *M. cochinchinensis* (8, 16, 32 $\mu\text{g/mL}$), MTS was used to detect cell viability; Cell apoptosis and reactive oxygen species (ROS) level were analyzed by flow cytometry; Reagent kit was used to measure the activity of superoxide dismutase (SOD) and level of malondialdehyde (MDA); qRT-PCR was used to detect the mRNA expressions of *Nrf2*, *Keap1*, heme oxygenase-1 (*HO-1*), NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (*NQO1*), *SOD1*, *SOD2*, catalase (*CAT*), B-cell lymphoma-2 (*Bcl-2*) and Bcl-2 associated X protein (*Bax*); Immunofluorescence method was used to detect the expressions of Nrf2 and Bcl-2 proteins; Western blotting was used to detect the expressions of Keap1 and Bax proteins. **Results** Compared with model group, ethanol extract of *M. cochinchinensis* could improve the morphology of SH-SY5Y cells induced by H_2O_2 , significantly increase cell viability ($P < 0.001$), reduce cell apoptosis rate and levels of ROS, MDA ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), increase SOD activity ($P < 0.001$), up-regulate *HO-1*, *NQO1*, *CAT*, *SOD1*, *SOD2* mRNA expressions ($P < 0.01, 0.001$), up-regulate Nrf2, Bcl-2 mRNA and protein expressions ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), promote Nrf2 nuclear entry, and down-regulate Keap1, Bax mRNA and protein expressions ($P < 0.05, 0.001$). **Conclusion** The ethanol extract of *M. cochinchinensis* exerts neuroprotective effects by activating Nrf2/Keap1 signaling pathway, increasing antioxidant enzyme activity, inhibiting oxidative stress damage, and regulating Bcl-2/Bax pathway to suppress cell apoptosis.

Key words: *Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng.; oxidative stress; Nrf2/Keap1 signaling pathway; SH-SY5Y cells; neuroprotection; cell apoptosis

神经退行性疾病如阿尔茨海默病和帕金森病严重威胁人类健康,其发病机制复杂,而氧化应激是其重要的致病机制之一^[1]。氧化应激是指机体受到有害刺激时,活性氧(reactive oxygen species, ROS)过度积累,机体内的氧化程度超出氧化物的清除能力,导致机体内抗氧化系统失衡,诱发脂质过氧化、蛋白氧化及DNA损伤,进而导致神经元功能障碍,甚至细胞凋亡^[2]。研究表明,核因子E2相关因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)/Kelch样环氧丙烷相关蛋白1(Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1)-抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)信号通路是细胞抵御氧化应激的重要调控机制,当受到氧化应激刺激时,Nrf2与Keap1解离,进入细胞核与ARE结合,影响下游血红素氧合酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)、醌氧化还原酶1[NAD(P)H quinone oxidoreductase 1, NQO1]、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)等抗氧化酶的活性,增强机体的抗氧化防御能力,减少氧化损伤,从而维持机体氧化与抗氧化的平衡^[3-6]。

木鳖子为葫芦科苦瓜属植物木鳖 *Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng.的干燥成熟种子,具有消肿散结、攻毒疗疮的功效,临床上常用于治疗疮疡、乳痈等^[7]。现代药理学研究表明,木鳖子在抗肿瘤、抗炎、免疫调节和抗氧化等方面均具有显著作用,其生物碱部位提取物和乙醇提取物能够有效清除自由基,其水提取物能够模拟神经生长因子

的作用,促进周围和中枢神经系统损伤的恢复^[8-11]。但其在神经保护尤其是缓解氧化应激损伤方面尚无系统研究。本研究通过建立过氧化氢(hydrogen peroxide, H_2O_2)诱导的人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞氧化应激损伤模型,以 Keap1/Nrf2-ARE 信号通路调控 ROS 生成,抑制 SH-SY5Y 细胞氧化应激损伤为切入点,探讨木鳖子醇提物是否通过调控 SH-SY5Y 细胞内的氧化还原平衡,减少氧化应激损伤,抑制细胞凋亡,从而发挥对 SH-SY5Y 细胞的保护作用,以期为木鳖子的神经保护作用提供实验依据,并为其在神经退行性疾病中的潜在应用提供理论支持。

1 材料

1.1 细胞

SH-SY5Y 细胞为本实验室保存,用含 15%胎牛血清、1%青霉素-链霉素的完全培养基,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、饱和湿度、5% CO_2 培养箱中培养。48 h 更换新培养基,次日进行传代,取对数生长期的细胞进行后续实验。

1.2 药材

木鳖子(产地为广西,批号 B092a2201010)购自广西中恒中药材产业发展有限公司,经广西中医药大学药用植物学教研室戴忠华副教授鉴定为葫芦科苦瓜属植物木鳖 *M. cochinchinensis* (Lour.) Spreng.的干燥成熟种子。

1.3 药品与试剂

MEM/F12 培养基(批号 PM151220)购自武汉普诺赛生命科技有限公司;PBS 缓冲液(批号

20231114) 购自江苏凯基生物技术股份有限公司; 胎牛血清(批号 1912660C)、青霉素-链霉素混合液(批号 15140122) 购自美国 Gibco 公司; 细胞增殖检测试剂盒(批号 G3580) 购自美国 Promega 公司; H₂O₂(批号 2021090601) 购自成都科隆化学有限公司; Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(批号 C1062M)、ROS 检测试剂盒(批号 S0033S)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号 P0012) 购自碧云天生物技术有限公司; SOD 试剂盒(批号 20240912)、丙二醛(malondialdehyde, MDA) 试剂盒(批号 20240911) 购自南京建成生物工程研究院; DNA 提取试剂盒(批号 D3396-01)、RNA 提取试剂盒(批号 R6934-01) 购自美国 Promega 公司; Nrf2 抗体(批号 80593-1-RR)、B 细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 抗体(批号 80313-1-RR)、Keap1 抗体(批号 80744-1-RR)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax) 抗体(批号 50599-2-Ig)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体(批号 10494-1-AP)、CoraLite488 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(批号 SA00013-2)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(批号 SA00001-2) 购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.4 仪器

HERAcell 150i 型 CO₂ 细胞培养箱、AttuneNxT 超高速流式细胞仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); SW-CJ-1F 型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); CKX41 型倒置显微成像系统(日本 Olympus 公司); SpectraMaxR iD3 型多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司); LightCycler[®] 96 全自动实时荧光定量 PCR 仪(瑞士 Roche 公司); EVOSM5000 型细胞成像系统(美国 Invitrogen 公司)。

2 方法

2.1 木鳖子醇提物的制备

取木鳖子种仁药材 2 kg, 粉碎, 加入 5 倍量石油醚, 室温浸泡脱脂 3 次, 每次 24 h, 脱脂后挥干石油醚; 加入 10 倍量 50% 乙醇, 回流提取 3 次, 每次 2 h, 滤过, 合并滤液, 减压回收溶剂, 冷冻干燥得木鳖子醇提物干膏 140 g, 得膏率为 7%。以齐墩果酸为对照品, 采用比色法^[12]测定木鳖子总皂苷质量分数为 2.32%。精密称取适量木鳖子醇提物样品, 用二甲亚砜溶解为 45 mg/mL 的母液, 过 0.22 μm 滤膜除菌, 保存于 4 °C 冰箱。

2.2 MTS 法检测细胞活力

2.2.1 木鳖子醇提物对 SH-SY5Y 细胞活力的影响 取对数生长期的 SH-SY5Y 细胞, 调整密度为 1 × 10⁵ 个/mL, 每孔 100 μL 接种于 96 孔板, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 待细胞贴壁后, 实验组分别加入含不同质量浓度(1、2、4、8、16、32、64、128、256 μg/mL) 木鳖子醇提物的培养基, 对照组加入完全培养基, 另设置不接种细胞的空白孔。分别干预 12、24、48 h 后, 弃去培养液, 每孔加入 100 μL 含 10% MTS 的 MEM/F12 完全培养基, 于细胞培养箱中避光孵育 2 h, 采用酶标仪测定 490 nm 处的吸光度(A) 值, 计算细胞活力。

$$\text{细胞活力} = (A_{\text{实验}}/A_{\text{空白}})/(A_{\text{对照}}/A_{\text{空白}})$$

2.2.2 H₂O₂ 对 SH-SY5Y 细胞活力的影响 取适量体积的 30% H₂O₂, 用超纯水稀释成浓度为 100 mmol/L 的母液, 过 0.22 μm 滤膜除菌, 分装储存于 -20 °C。使用时取适量体积的母液, 用完全培养基稀释至所需浓度。取对数生长期的 SH-SY5Y 细胞, 调整密度为 1 × 10⁵ 个/mL, 每孔 100 μL 接种于 96 孔板, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 待细胞贴壁后, 实验组分别加入不同浓度(6.25、12.50、25.00、50.00、100.00、200.00、400.00 μmol/L) 的 H₂O₂ 溶液, 对照组加入完全培养基, 另设置不接种细胞的空白孔。干预 24 h 后, 弃去培养液, 每孔加入 100 μL 含 10% MTS 的完全培养基, 于细胞培养箱中避光孵育 2 h, 采用酶标仪测定 490 nm 处的 A 值, 计算细胞活力。

2.2.3 木鳖子醇提物对 H₂O₂ 诱导的 SH-SY5Y 细胞活力的影响 取对数生长期的 SH-SY5Y 细胞, 调整密度为 1 × 10⁵ 个/mL, 每孔 100 μL 接种于 96 孔板, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 待细胞贴壁后, 设置对照组、模型组和木鳖子醇提物(8、16、32 μg/mL) 组。对照组加入不含药物的培养基, 模型组加入含 200 μmol/L H₂O₂ 的培养基, 给药组加入含不同质量浓度木鳖子醇提物和 200 μmol/L H₂O₂ 的培养基, 另设置不接种细胞的空白孔。培养 24 h 后, 弃去培养液, 每孔加入 100 μL 含 10% MTS 的完全培养基, 于细胞培养箱中避光孵育 2 h, 采用酶标仪测定 490 nm 处的 A 值, 计算细胞活力。

2.3 细胞形态观察

取对数生长期的 SH-SY5Y 细胞, 调整密度为 4 × 10⁵ 个/mL, 每孔 2 mL 接种于 6 孔板, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 待细胞贴壁后, 按照

“2.2.3”项下分组处理细胞 24 h 后，于倒置显微镜下观察各组细胞形态。

2.4 流式细胞术检测细胞凋亡情况

取对数生长期的 SH-SY5Y 细胞，调整密度为 4×10^5 个/mL，每孔 2 mL 接种于 6 孔板，于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 待细胞贴壁后，按照“2.2.3”项下分组处理细胞 24 h 后，收集各组细胞，PBS 重悬并计数，取约 5×10^4 个重悬于 1.5 mL EP 管中，1 000 r/min 离心 5 min，弃上清，加入 195 μL Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞，加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀，再加入 10 μL 碘化丙啶 (PI) 染色液混匀，室温避光孵育 10 min，冰浴避光放置，1 h 内上机检测。

2.5 流式细胞术检测细胞内 ROS 水平

取对数生长期的 SH-SY5Y 细胞，调整密度为 4×10^5 个/mL，每孔 2 mL 接种于 6 孔板，于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 待细胞贴壁后，按照“2.2.3”项下分组处理细胞 24 h 后，按照 ROS 检测试剂盒说明书染色，室温避光孵育 15 min，孵育结束后在 30 min 内用流式细胞仪检测细胞内 ROS 水平。

2.6 细胞内 SOD 活性及 MDA 水平检测

取对数生长期的 SH-SY5Y 细胞，调整密度为 4×10^5 个/mL，每孔 2 mL 接种于 6 孔板，于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 待细胞贴壁后，按照“2.2.3”项下分组处理细胞 24 h 后，收集细胞，PBS 清洗 1 次，收集细胞沉淀，加入 200 μL PBS，置于冷冻匀浆机中充分匀浆，匀浆结束后 4 °C、12 000 r/min 离心 5 min，取上清，采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度，按照试剂盒说明书测定 SOD 活性及 MDA 水平。

2.7 qRT-PCR 法检测抗氧化及凋亡相关基因表达

取对数生长期的 SH-SY5Y 细胞，调整密度为 4×10^5 个/mL 接种于 25 cm² 无菌培养瓶中，每瓶 5 mL，于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 待细胞贴壁后，按照“2.2.3”项下分组处理细胞 24 h 后，胰酶消化，PBS 清洗细胞 2 次，离心收集细胞沉淀，按照总 RNA 提取试剂盒说明书提取细胞中总 RNA，逆转录成 cDNA。引物序列见表 1，使用 LightCycler® 96 荧光定量 PCR 仪，进行 qRT-PCR 检测，反应体系 (20 μL) 为 cDNA 2.0 μL、正反向引物 (10 μmol/L) 各 1 μL、2×SYBR Green GOTap Master Mix 10 μL、ddH₂O 6 μL。反应程序为 95 °C、120 s；95 °C、15 s，60 °C、30 s，共 45 个循环。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	序列 (5'-3')
<i>β-actin</i>	F: AAGGATTCCTATGTGGGCGAC R: CGTACAGGGATAGCACAGCC
<i>Nrf2</i>	F: TCTTCTGTGCTGTCAAGGG R: CTCCTTCCGTCGCTGACT
<i>Keap-1</i>	F: TGCGTCCTGCACAACCTGTAT R: CCAGGAACGTGTGACCATCA
<i>HO-1</i>	F: ACTCCCTGGAGATGACTCCC R: TCTTGCACCTTTGTTGCTGGC
<i>NQO1</i>	F: GCTGGTTTGAGCGAGTGTC R: GTGGATCCCTTGCAGAGAGT
<i>SOD1</i>	F: AAAGATGGTGTGGCCGATGT R: CAAGCAAACGACTTCCAGC
<i>SOD2</i>	F: AAACCTCAGCCCTAACGGTG R: GAGCCTTGGACACCAACAGA
<i>CAT</i>	F: AGTGATCGGGGGATTCCAGA R: GAGGGGTAACCTTCTGTGGC
<i>Bax</i>	F: CATGGGCTGGACATTGGACT R: AAAGTAGGAGAGGAGGCCGT
<i>Bcl-2</i>	F: GAACTGGGGGAGGATTGTGG R: ATCACCAAGTGCACCTACCC

以 *β-actin* 为内参基因，采用 2^{-ΔΔCt} 法计算各基因的相对表达量。

2.8 免疫荧光法检测 Nrf2、Bcl-2 蛋白表达

将细胞接种于 96 孔板 (黑色/透明底) 中，按照“2.2.3”项下分组处理细胞 24 h 后，PBS 清洗 3 次，用 4% 多聚甲醛室温固定 15 min，1% Triton 100 通透 30 min，PBS 清洗 3 次，加入 5% 牛血清白蛋白于室温下封闭 30 min，加入一抗 Nrf2 (1 : 600)、Bcl-2 (1 : 250)，4 °C 孵育过夜。次日，PBS 清洗 3 次后，加入 CoraLite488 标记的山羊抗兔 IgG 二抗，室温下避光孵育 1 h，PBS 清洗 3 次，DAPI 复染核 10 min，于荧光显微镜下观察并拍照，采用 Image J 软件分析荧光强度。

2.9 Western blotting 检测 Keap1、Bax 蛋白表达

取对数生长期的 SH-SY5Y 细胞，调整密度为 4×10^5 个/mL 接种于 25 cm² 无菌培养瓶中，每瓶 5 mL，于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 待细胞贴壁后，按照“2.2.3”项下分组处理细胞 24 h 后，胰酶消化，PBS 清洗细胞 2 次，离心收集细胞沉淀，加入 100 μL 裂解液，置于 -20 °C 冰箱过夜。次日，冰上超声 20 min，12 000 r/min 离心 20 min，取上清，按照 BCA 试剂盒进行蛋白定量，用双蒸水调整蛋白浓度，加入 4×SDS 蛋白上样缓冲液混合，99 °C 加热 10 min 使蛋白变性。蛋白样品经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF

膜, 加入 5%脱脂牛奶于室温封闭 0.5 h 后, TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min。分别加入一抗 Keap1 (1 : 3 000)、Bax (1 : 10 000)、GAPDH (1 : 5 000), 4 ℃ 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min。加入二抗 (1 : 5 000), 室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min。加入 ECL 化学发光试剂显影, 采用 Image J 软件分析条带灰度值。

2.10 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析, GraphPad Prism 9.0 软件绘图, 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 木鳖子醇提取物对 SH-SY5Y 细胞活力的影响

如图 1 所示, 4、8、16、32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的木鳖子醇提取物干预 SH-SY5Y 细胞 12、24、48 h, 对细胞的生长有促进作用; 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 木鳖子醇提取物干预 SH-SY5Y 细胞 12、24 h, 可促进细胞生长, 而 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 木鳖子醇提取物干预 SH-SY5Y 细胞 48 h, 抑制细胞生长; 128、256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 木鳖子醇提取物干预 SH-SY5Y 细胞 12、24、48 h, 对细胞的生长有抑制作用。木鳖子醇提取物干预 SH-SY5Y 细胞 12、24、48 h 的半数抑制浓度 (half inhibitory concentration, IC_{50}) 值分别为 285.8、188.4、83.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。由结果可知, 1~32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 木鳖子醇提取物对 SH-SY5Y 细胞无明显毒性, 且 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 木鳖子醇提取物干预 24 h 时细胞活力最高, 因此, 采用 8、16、32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 木鳖子醇提取物干预 SH-SY5Y 细胞 24 h 进行后续实验。

3.2 H_2O_2 对 SH-SY5Y 细胞活力的影响

如图 2 所示, 200、400 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 H_2O_2 显著抑

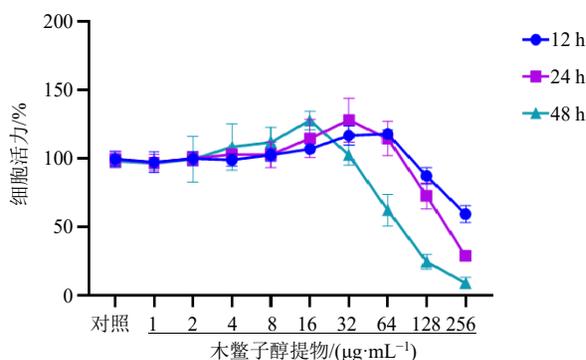


图 1 木鳖子醇提取物对 SH-SY5Y 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Effect of ethanol extract of *M. cochinchinensis* on viability of SH-SY5Y cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

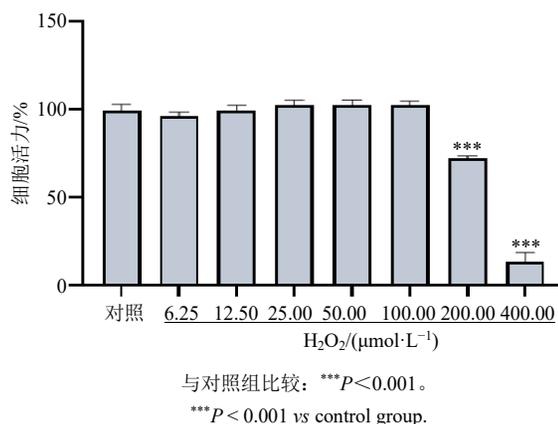
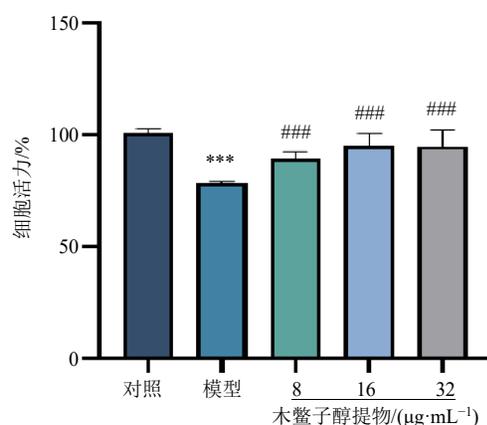


图 2 H_2O_2 对 SH-SY5Y 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Fig. 2 Effect of H_2O_2 on viability of SH-SY5Y cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

制细胞活力 ($P < 0.001$), IC_{50} 为 252.3 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。因此, 采用 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$ H_2O_2 干预 SH-SY5Y 细胞 24 h 建立细胞损伤模型。

3.3 木鳖子醇提取物对 H_2O_2 诱导的 SH-SY5Y 细胞活力的影响

如图 3 所示, 与对照组比较, 模型组细胞活力显著降低 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 8、16、32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的木鳖子醇提取物显著提高 H_2O_2 诱导的 SH-SY5Y 细胞活力 ($P < 0.001$), 表明木鳖子醇提取物能够保护改善 H_2O_2 诱导的氧化应激损伤。



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$, 下同。
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group, same as below figures.

图 3 木鳖子醇提取物对 H_2O_2 诱导的 SH-SY5Y 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Effect of ethanol extract of *M. cochinchinensis* on viability of H_2O_2 -induced SH-SY5Y cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.4 木鳖子醇提取物对 H₂O₂ 诱导的 SH-SY5Y 细胞形态的影响

如图 4 所示, 对照组细胞生长良好, 树枝状轴突明显, 细胞呈椭圆形或梭形, 细胞密度较大且细

胞贴壁性良好; 模型组细胞皱缩, 形态变为圆形, 细胞密度变小, 细胞间隙变大; 木鳖子醇提取物组细胞密度增大, 且呈剂量相关性, 表明木鳖子醇提取物能够改善 H₂O₂ 诱导的 SH-SY5Y 细胞形态损伤。

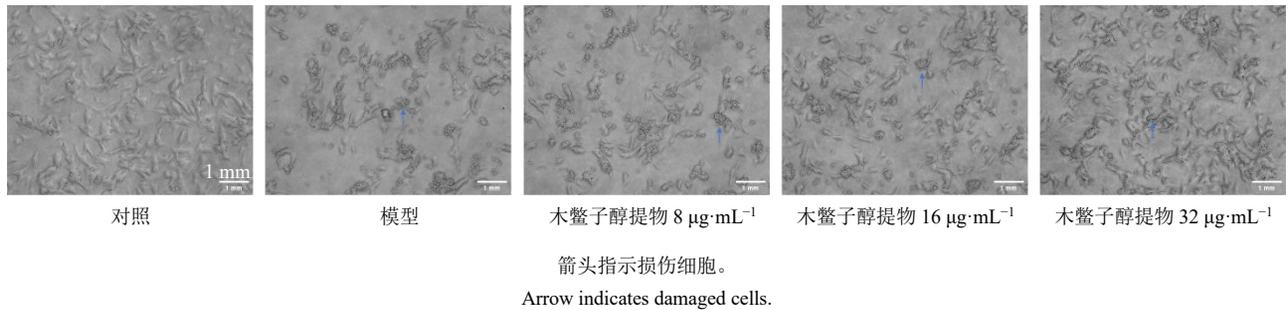


图 4 木鳖子醇提取物对 H₂O₂ 诱导的 SH-SY5Y 细胞形态的影响 (×20)

Fig. 4 Effect of ethanol extract of *M. cochinchinensis* on morphology of H₂O₂-induced SH-SY5Y cells (×20)

3.5 木鳖子醇提取物对 H₂O₂ 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响

Annexin-V/PI 双染色法可用于区分坏死细胞、早期凋亡细胞及晚期凋亡细胞, Q4 为正常细胞, Q3 为早调细胞, Q2 为晚调细胞, Q1 为死亡细胞。如图 5 所示, 与对照组比较, 模型组细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 16、32 μg/mL 的木鳖子醇提取物显著降低 H₂O₂ 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡率 ($P < 0.001$)。

3.6 木鳖子醇提取物对 H₂O₂ 诱导的 SH-SY5Y 细胞内 ROS 水平的影响

如图 6 所示, 与对照组比较, 模型组细胞内 ROS 水平显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 16、32 μg/mL 的木鳖子醇提取物显著抑制 H₂O₂ 诱导的 SH-SY5Y 细胞内 ROS 水平 ($P < 0.05$)。

3.7 木鳖子醇提取物对 H₂O₂ 诱导的 SH-SY5Y 细胞内 SOD 活性及 MDA 水平的影响

如图 7 所示, 与对照组比较, 模型组细胞内

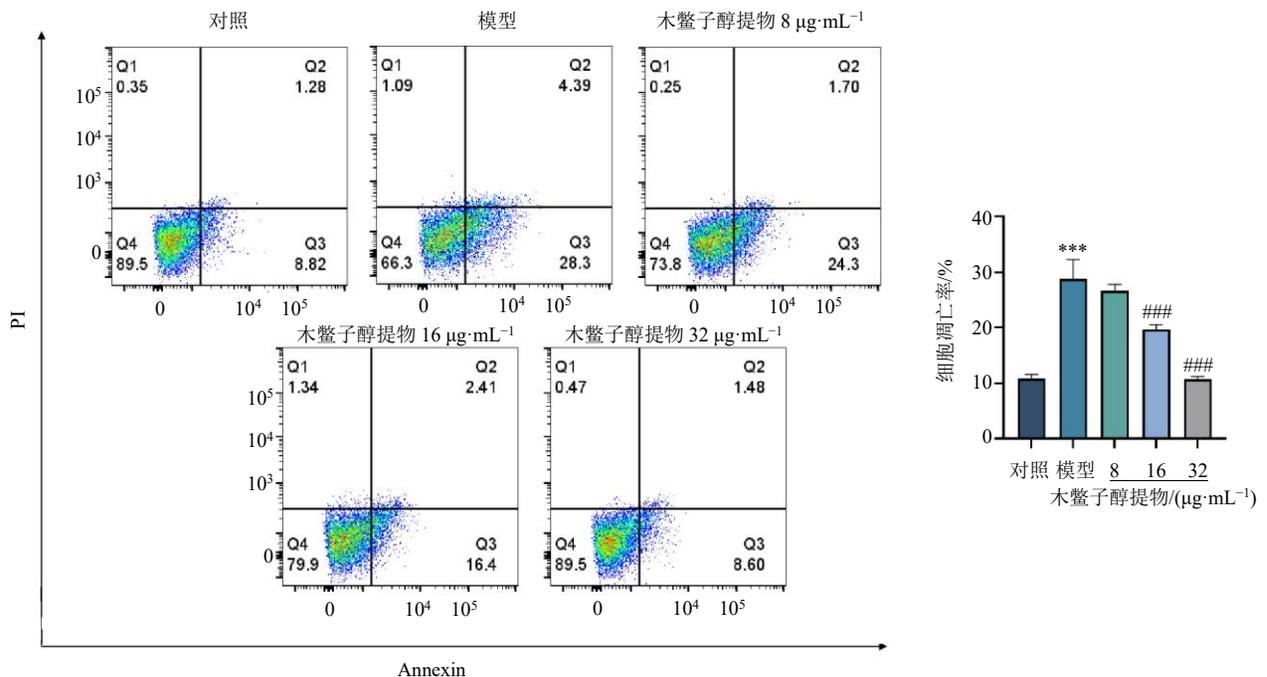


图 5 木鳖子醇提取物对 H₂O₂ 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of ethanol extract of *M. cochinchinensis* on apoptosis of H₂O₂-induced SH-SY5Y cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

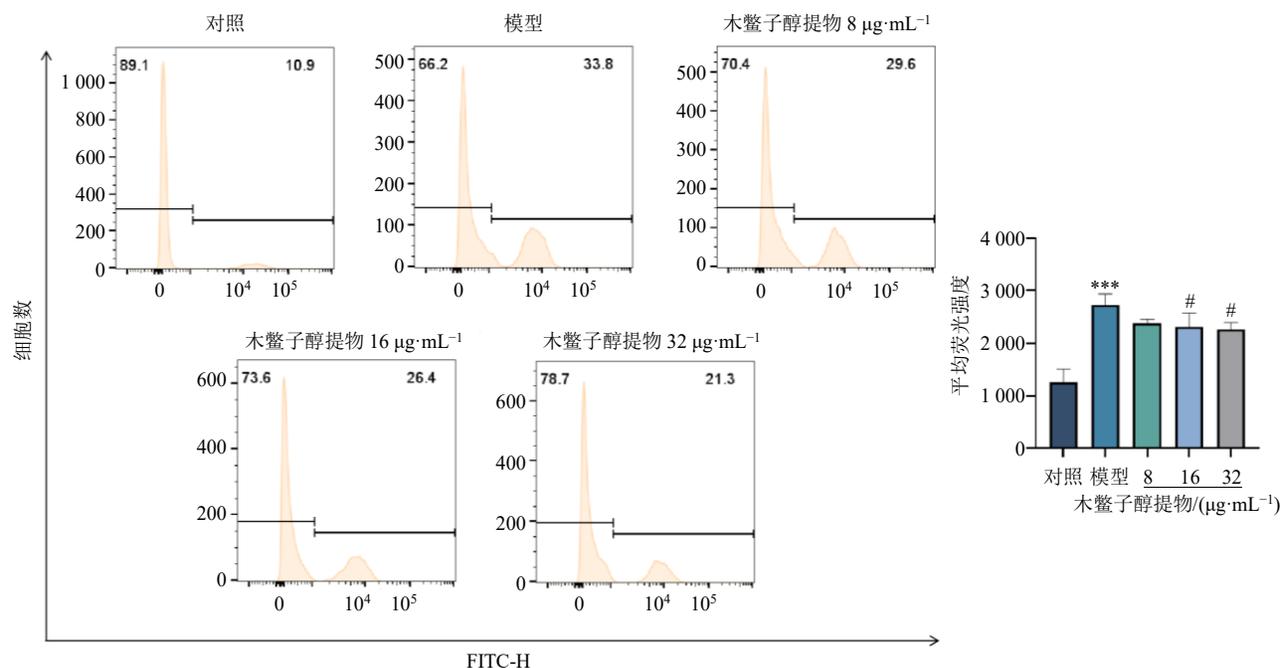


图6 木鳖子醇提取物对 H₂O₂ 诱导的 SH-SY5Y 细胞内 ROS 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of ethanol extract of *M. cochinchinensis* on ROS level in H₂O₂-induced SH-SY5Y cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

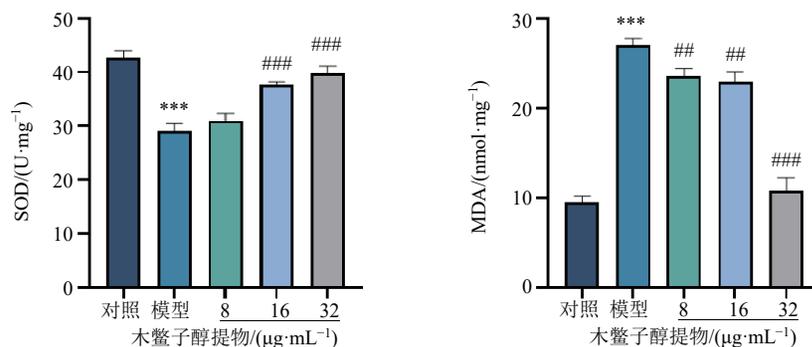


图7 木鳖子醇提取物对 H₂O₂ 诱导的 SH-SY5Y 细胞内 SOD 活性及 MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of ethanol extract of *M. cochinchinensis* on SOD activity and MDA level in H₂O₂-induced SH-SY5Y cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

MDA 水平显著升高 ($P < 0.001$), SOD 活性显著降低 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 16、32 μg/mL 的木鳖子醇提取物显著提高 SOD 活性 ($P < 0.001$), 8、16、32 μg/mL 的木鳖子醇提取物显著降低 MDA 水平 ($P < 0.01、0.001$)。

3.8 木鳖子醇提取物对 H₂O₂ 诱导的 SH-SY5Y 细胞抗氧化及凋亡相关基因表达的影响

如图 8 所示, 与对照组比较, 模型组 *SOD1*、*SOD2*、*CAT*、*Nrf2*、*NQO1* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05、0.01、0.001$); 与模型组比较, 8、16、32 μg/mL 的木鳖子醇提取物显著上调 *SOD1*、*SOD2*、*CAT*、*Nrf2*、*HO-1*、*NQO1*、*Bcl-2* mRNA 表达 ($P <$

0.05、0.01、0.001), 32 μg/mL 的木鳖子醇提取物显著下调 *Bax*、*Keap1* mRNA 表达 ($P < 0.05、0.001$)。

3.9 木鳖子醇提取物对 H₂O₂ 诱导的 SH-SY5Y 细胞 Nrf2、Bcl-2 蛋白表达的影响

如图 9 所示, 对照组 Nrf2 主要分布在细胞质中, 与对照组比较, 模型组细胞质及核内 Nrf2 表达均显著降低 ($P < 0.001$); 给予 16、32 μg/mL 的木鳖子醇提取物干预后, Nrf2 表达显著增加 ($P < 0.001$), 且在细胞核内聚集。如图 10 所示, 与对照组比较, 模型组 Bcl-2 表达显著降低 ($P < 0.001$); 给予 8、16、32 μg/mL 的木鳖子醇提取物干预后, Bcl-2 表达均显著增加 ($P < 0.05、0.001$)。

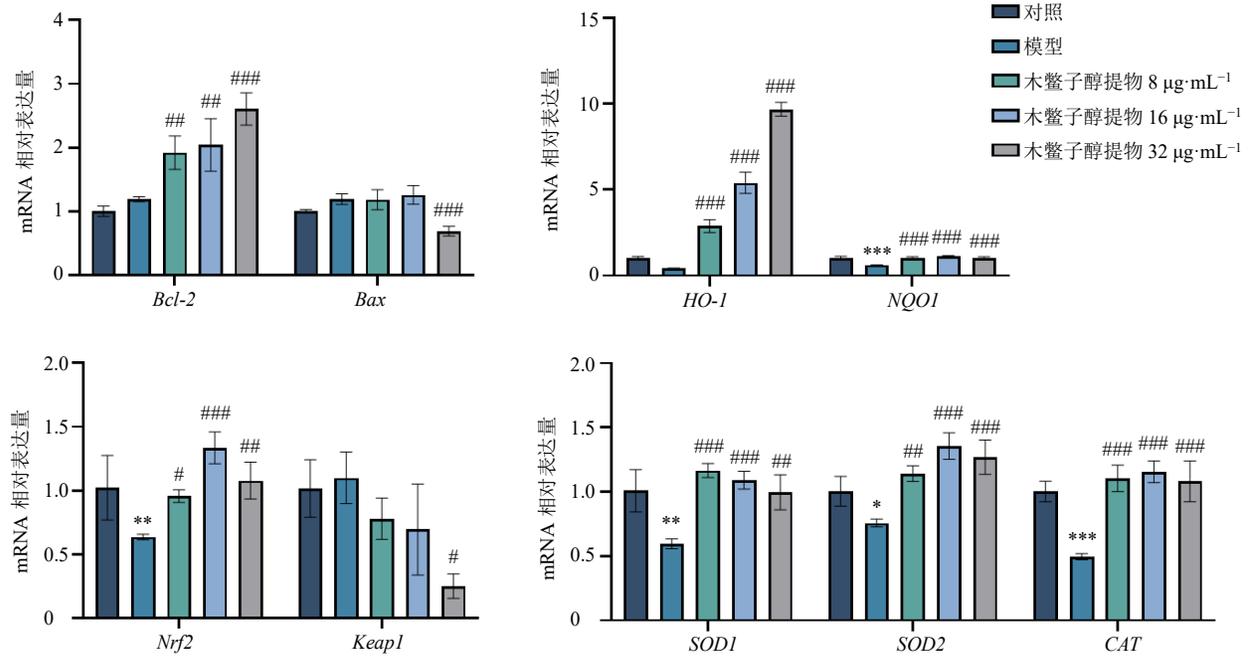


图8 木鳖子醇提取物对H₂O₂诱导的SH-SY5Y细胞抗氧化及凋亡相关基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Effect of ethanol extract of *M. cochinchinensis* on expressions of antioxidant and apoptosis related genes in H₂O₂-induced SH-SY5Y cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

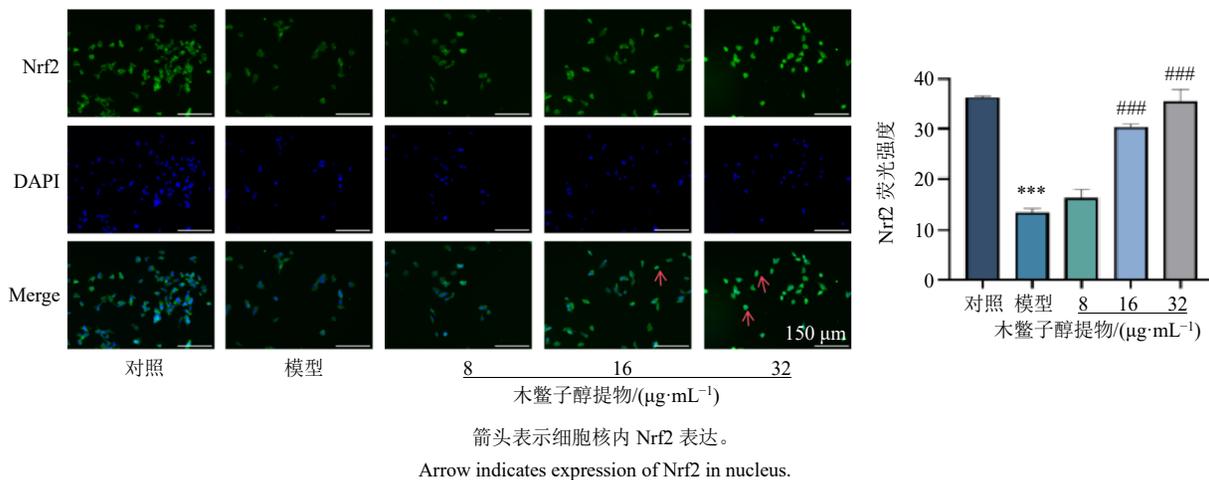


图9 木鳖子醇提取物对H₂O₂诱导的SH-SY5Y细胞Nrf2蛋白表达的影响 (×20; $\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Effect of ethanol extract of *M. cochinchinensis* on Nrf2 protein expression in H₂O₂-induced SH-SY5Y cells (×20; $\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.10 木鳖子醇提取物对H₂O₂诱导的SH-SY5Y细胞Keap1、Bax蛋白表达的影响

如图11所示,与对照组比较,模型组Keap1蛋白表达水平呈升高趋势,Bax蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,32 µg/mL的木鳖子醇提取物显著下调Keap1、Bax蛋白表达水平($P < 0.05$)。

4 讨论

木鳖子具有较强的抗炎、活血化瘀、解毒疗疮作用,在抗炎、抗肿瘤方面有广泛应用,但其药性峻烈,高剂量使用可能引发一定毒性反应,限制了其临床应用。现代研究发现,高剂量(8~12 g)木鳖子入汤剂服用基本安全,仅少数患者出现轻微不良反应如恶心、腹泻和头痛^[13-14]。王笑民教授采用

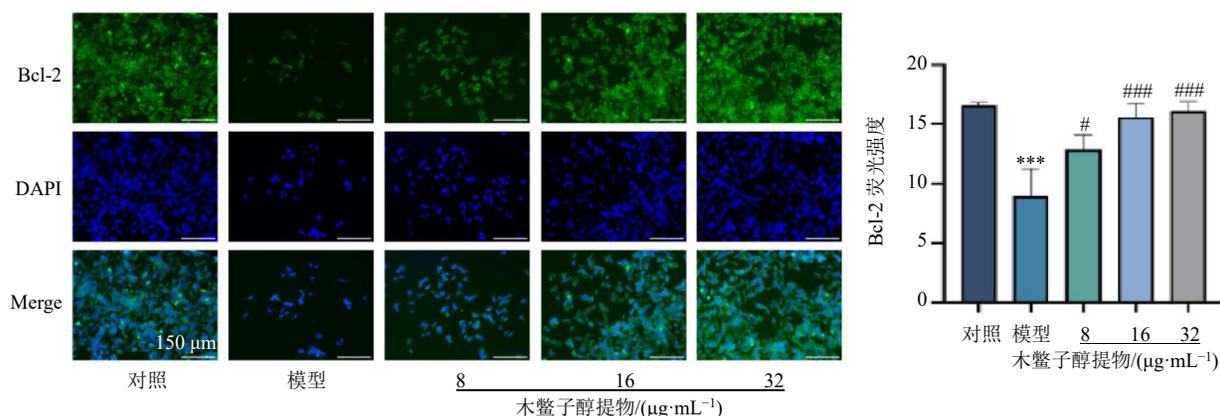


图 10 木鳖子醇提取物对 H₂O₂ 诱导的 SH-SY5Y 细胞 Bcl-2 蛋白表达的影响 (×20; $\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 Effect of ethanol extract of *M. cochinchinensis* on Bcl-2 protein expression in H₂O₂-induced SH-SY5Y cells (×20; $\bar{x} \pm s, n = 3$)

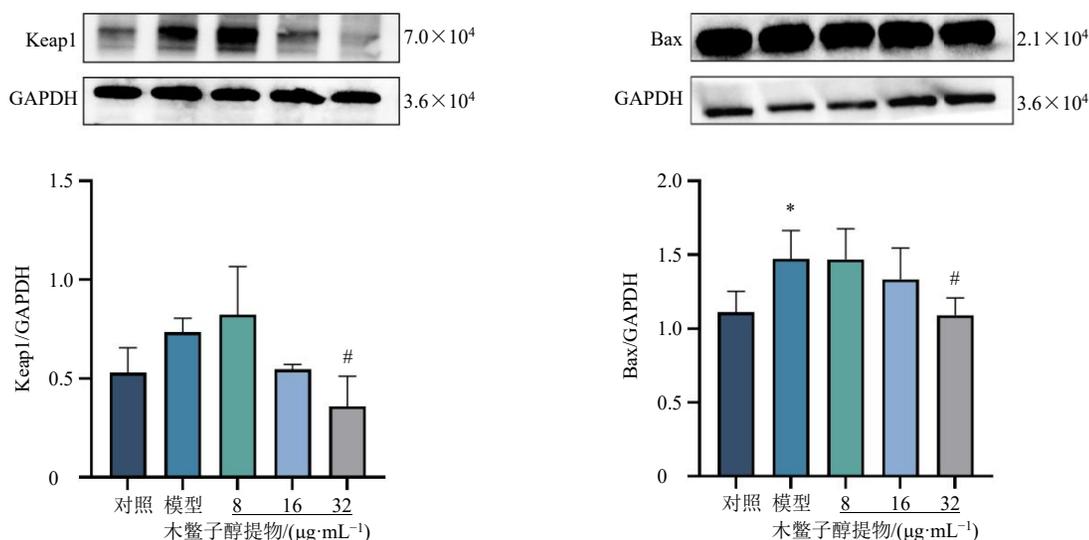


图 11 木鳖子醇提取物对 H₂O₂ 诱导的 SH-SY5Y 细胞 Keap1、Bax 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 11 Effect of ethanol extract of *M. cochinchinensis* on protein expressions of Keap1 and Bax in H₂O₂-induced SH-SY5Y cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

“以毒攻毒”理论，以 5 g 起始剂量逐步增加至 25 g，成功治疗肺癌浮肿患者，说明合理控制剂量可提高安全性，同时保持疗效^[15]。动物实验显示，木鳖子细粉按临床剂量的 20~100 倍给药 3 个月，100 倍临床剂量组大鼠出现肝细胞轻度损伤和肺脏炎症反应，停药后可部分恢复，而 20 倍剂量组未观察到明显毒性，进一步证实木鳖子的安全剂量范围^[16]。本研究通过 MTS 法检测木鳖子醇提取物对 SH-SY5Y 细胞的毒性，发现 1~32 μg/mL 质量浓度范围内未表现出细胞毒性，反而促进了细胞生长，而超出该质量浓度范围的木鳖子醇提取物则呈现一定的细胞毒性效应。这一结果与既往毒理学研究相一致，表

明在适宜剂量下，木鳖子醇提取物可安全用于神经保护研究，同时提示其在神经退行性疾病中的潜在应用价值。

大脑富含多不饱和脂肪酸且消耗氧气量较大，对 ROS 极为敏感，易发生氧化损伤^[17-18]。在氧化应激状态下，ROS 与细胞膜中的脂质发生过氧化作用生成 MDA，同时抗氧化酶 SOD 的活性下降，削弱细胞对氧化损伤的抵抗力^[19]。本研究结果显示，木鳖子醇提取物可降低损伤细胞中 ROS 及 MDA 水平，同时提高 SOD 活性，上调 *SOD1*、*SOD2*、*CAT* mRNA 的表达，表明木鳖子醇提取物可有效激活细胞抗氧化防御系统，改善损伤细胞氧化损伤，维持细胞的氧

化-抗氧化动态平衡。Nrf2 是调控细胞氧化应激反应的关键转录因子，平衡氧化损伤和抗氧化机制。在正常生理条件下，Nrf2 主要与 Keap1 结合并被泛素化降解；当细胞遭受氧化损伤时，Nrf2 与 Keap1 解离，并转位至细胞核与 ARE 结合，进而促进 HO-1、NQO1 表达^[20-22]。本研究结果显示，木鳖子醇提物可上调 HO-1、NQO1 mRNA 表达，上调 Nrf2 mRNA 及蛋白表达，促进 Nrf2 入核，下调 Keap1 mRNA 及蛋白表达水平。表明木鳖子醇提物可能通过激活 Nrf2/Keap1-ARE 通路提高细胞抗氧化能力，减少神经氧化损伤。

氧化应激可诱导线粒体损伤，激活细胞凋亡信号通路，而 Bcl-2 蛋白家族是细胞凋亡的关键调节因子，其中 Bcl-2 具有抗凋亡作用，Bax 则促进细胞凋亡。当氧化应激加剧时，Bax 过度激活可引发线粒体外膜通透性增加，释放细胞色素 C，引发细胞凋亡级联反应^[23-25]。因此，Bcl-2/Bax 值被认为是衡量细胞凋亡程度的重要指标。本研究结果显示，木鳖子醇提物可改善 H₂O₂ 诱导的细胞形态损伤，降低细胞凋亡率，抑制促凋亡蛋白 Bax mRNA 和蛋白表达，促进抗凋亡蛋白 Bcl-2 mRNA 和蛋白表达。表明木鳖子醇提物可通过调节 Bcl-2/Bax 相关信号途径，抑制氧化应激诱导产生的凋亡因子，减轻细胞凋亡程度，从而发挥神经保护作用。

本研究系统评估了木鳖子醇提物对 H₂O₂ 诱导的 SH-SY5Y 细胞氧化应激损伤的保护作用，证实其可通过激活 Nrf2/Keap1-ARE 通路提高抗氧化能力，并调控 Bcl-2/Bax 相关凋亡信号以减少氧化应激诱导的细胞凋亡。这一发现为木鳖子在神经退行性疾病中的潜在应用提供了重要实验依据，推动了中药活性成分在神经保护领域的深入开发。然而，本研究仍存在一定局限性：（1）仅采用细胞实验，尚需进一步结合动物模型以验证木鳖子醇提物在体内的神经保护作用；（2）具体的活性成分尚未明确，未来可进一步分离木鳖子醇提物中的关键化学组分，探讨其具体药理作用机制；（3）虽然本研究聚焦于 Nrf2/Keap1-ARE 和 Bcl-2/Bax 途径，但神经细胞内的抗氧化和抗凋亡机制较为复杂，木鳖子醇提物是否还涉及其他信号通路仍需深入研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 迟羽淳, 蒋鑫, 卢芳, 等. 灵芝防治神经退行性疾病的药理作用研究进展 [J]. 中国医药导报, 2025, 22(5): 47-

51.

- [2] Pruccoli L, Balducci M, Pagliarani B, *et al.* Antioxidant and neuroprotective effects of fucoxanthin and its metabolite fucoxanthinol: A comparative *in vitro* study [J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2024, 46(6): 5984-5998.
- [3] Phukan B C, Roy R, Paul R, *et al.* Traversing through the cell signaling pathways of neuroprotection by betanin: Therapeutic relevance to Alzheimer's disease and Parkinson's Disease [J]. *Metab Brain Dis*, 2023, 38(3): 805-817.
- [4] 朱萍, 李嘉旗, 尹萌辰, 等. 虎杖苷通过调控 Keap1/Nrf2/HO-1 抑制 H₂O₂ 诱导的 SH-SY5Y 细胞氧化应激和线粒体损伤 [J]. 上海中医药大学学报, 2023, 37(4): 28-35.
- [5] 徐玥玮, 张坤, 高晓明, 等. 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 [J]. 药物评价研究, 2025, 48(2): 448-454.
- [6] 方舟, 李光第, 余资江. 穿心莲内酯调节 Keap1/Nrf2 信号通路对 H₂O₂ 诱导的软骨细胞损伤的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2025, 45(3): 683-687.
- [7] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 66-67.
- [8] 赵芳惠, 侯小涛, 郝二伟, 等. 木鳖子化学成分、毒理与药理作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(3): 222-235.
- [9] 邢炎华, 钱昆蝶, 侯少平. 木鳖子生物碱部位提取物抗氧化活性研究 [J]. 陕西农业科学, 2017, 63(12): 52-53.
- [10] 张丹, 潘乐, 江峥, 等. 木鳖子提取液抗氧化活性的分析 [J]. 复旦学报: 医学版, 2010, 37(3): 319-321.
- [11] Mazzi E, Georges B, McTier O, *et al.* Neurotrophic effects of Mubiezi (*Momordica cochinchinensis*) seed elucidated by high-throughput screening of natural products for NGF mimetic effects in PC-12 cells [J]. *Neurochem Res*, 2015, 40(10): 2102-2112.
- [12] 汪斌, 程德怀, 黄带, 等. 木鳖子中总皂苷的提取分离工艺及其急性毒性的研究 [J]. 安徽医药, 2011, 15(2): 147-149.
- [13] 阚月一, 诸妹军, 饶美萍, 等. 中药木鳖子抗肿瘤作用研究进展 [A] // 2023 年华南康复医学与护理研究学术会议论文集 [C]. 广州: 广东省肿瘤康复学会, 2023: 748-751.
- [14] 王皓, 富琦, 王笑民. 含超量木鳖子汤剂毒副反应分析 [J]. 北京中医药, 2011, 30(12): 942-944.
- [15] 王丽, 曾云. 重用木鳖子治疗 5 例肺癌浮肿病人的临床观察与体会 [J]. 微量元素与健康研究, 2013, 30(4): 31.
- [16] 赵芳惠. 木鳖子仁毒性及其物质基础与毒性靶器官研究 [D]. 南宁: 广西中医药大学, 2021.
- [17] 刘梦鸽, 陈斯亮, 冯玮琪, 等. 阿魏酸对阿尔茨海默病的神经保护作用 [J]. 生命的化学, 2025, 45(1): 55-64.

- [18] Olla S, Siguri C, Fais A, *et al.* Inhibitory effect of quercetin on oxidative endogen enzymes: A focus on putative binding modes [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(20): 15391.
- [19] 刘慧, 闫冬, 徐洋洋, 等. 黄杞苷对 H₂O₂ 诱导 SH-SY5Y 细胞氧化应激损伤的保护作用 [J]. 滨州医学院学报, 2021, 44(1): 1-6.
- [20] Fei Q, Liu J, Qiao L, *et al.* Mst1 attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury following heterotopic heart transplantation in mice through regulating Keap1/Nrf2 axis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2023, 644: 140-148.
- [21] Hsu W H, Chung C P, Wang Y Y, *et al.* *Dendrobium nobile* protects retinal cells from UV-induced oxidative stress damage via Nrf2/HO-1 and MAPK pathways [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 288: 114886.
- [22] 牛圣奇, 李星, 李浩田, 等. 药根碱通过调节细胞凋亡和激活 Nrf2/HO-1 信号通路减轻葡聚糖硫酸钠诱导的小鼠溃疡性结肠炎黏膜损伤 [J]. 中草药, 2024, 55(19): 6577-6587.
- [23] 张晓霞, 李筱筱, 孙雅焯, 等. 壳寡糖减轻过氧化氢诱导的 SK-N-SH 细胞氧化损伤机制研究 [J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(14): 57-62.
- [24] 钱舒乐, 于露, 李晓凤, 等. 稳心颗粒对心律失常大鼠凋亡、炎症及氧化应激的影响 [J]. 中草药, 2024, 55(7): 2292-2302.
- [25] 赵文学, 徐燕, 刘冬光, 等. 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 [J]. 中草药, 2023, 54(11): 3548-3558.

[责任编辑 李亚楠]