

熊果酸减轻 $A\beta_{25-35}$ 诱导的神经细胞氧化应激和细胞凋亡

杨明辉¹, 关东升¹, 赵凤宏², 任德启¹, 郑伟锋¹, 郭健¹, 郭燕可¹
(1. 河南省中医院, 河南 郑州 450002; 2. 山东中医药大学, 山东 济南 250355)

摘要: **目的** 探讨熊果酸对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的神经细胞氧化应激及凋亡的影响及机制。**方法** $A\beta_{25-35}$ 处理 PC12 细胞建立阿尔茨海默病模型, 使用不同浓度的熊果酸处理 PC12 细胞; MTT 检测细胞增殖水平; 流式细胞术检测凋亡率水平; 采用 DCFH-DA 荧光探针检测活性氧 (ROS) 水平, 硫代巴比妥酸法检测丙二醛 (MDA) 水平, 黄嘌呤氧化法测定超氧化物歧化酶 (SOD) 活性; qRT-PCR 检测长链非编码 RNA (LncRNA) *SNHG14* 及微小 RNA-105 (*miR-105*) 表达; 双荧光素酶报告实验验证 *SNHG14* 与 *miR-105* 的靶向关系; 观察沉默 *SNHG14* 表达、*SNHG14* 过表达、*miR-105* 过表达及干扰 *miR-105* 表达对 PC12 细胞增殖、凋亡及氧化应激的影响。Western blot 检测活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3 (Cleaved caspase-3) 的表达。**结果** 熊果酸作用后, $A\beta_{25-35}$ 处理的细胞存活率水平升高, 细胞凋亡率水平降低, Cleaved caspase-3 蛋白表达降低, MDA、ROS 水平降低, SOD 活性升高, *SNHG14* 的表达降低, *miR-105* 的表达升高 ($P < 0.05$); 双荧光素酶报告实验证实 *SNHG14* 能够靶向结合 *miR-105*; 沉默 *SNHG14* 表达或 *miR-105* 过表达后, 细胞存活率水平升高, 细胞凋亡率水平降低, Cleaved caspase-3 蛋白表达降低, MDA、ROS 水平降低, SOD 活性升高 ($P < 0.05$); *SNHG14* 过表达或干扰 *miR-105* 表达可降低熊果酸对 $A\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞的保护作用。**结论** 熊果酸可能通过调控 *SNHG14/miR-105* 分子轴从而抑制 $A\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞凋亡, 并可减轻细胞氧化损伤。

关键词: 熊果酸; 氧化应激; 凋亡

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2021)05-1340-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.05.046

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是临床常见的一种疾病, 我国 AD 发病率逐年上升, 但关于其发病机制尚未阐明^[1]。研究表明氧化应激与神经元凋亡有关^[2-3]。 β -淀粉样蛋白 ($A\beta$) 可促使 AD 患者神经元丢失造成神经细胞功能紊乱, 脑内氧化应激反应与神经细胞凋亡是引起患者痴呆的重要原因^[4]。熊果酸具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化等多种作用, 研究表明熊果酸可通过降低炎症因子水平而抑制炎症反应从而保护肝脏组织免受损伤^[5]。但熊果酸对神经细胞凋亡及氧化应激的作用尚未可知。长链非编码 RNA (Long non-coding RNA *SNHG14*, LncRNA *SNHG14*) 表达升高可促进脂多糖诱导的急性肺损伤^[6]。本研究通过采用 $A\beta_{25-35}$ 处理 PC12 细胞模拟 AD 模型, 探讨熊果酸对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞氧化应激损伤及细胞凋亡的影响及其作用机制。

1 材料

大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞 (PC12 细胞) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司; 杜氏改良培养基 (DMEM)、胎牛血清购自美国 Gibco 公司; Lipofectamine2000 (批号 11668-019) 与 Trizol 试剂 (批号 15596018) 购自美国 Invitrogen 公司; 熊果酸 (纯度 $\geq 98\%$, 批号 XY21403) 购自上海信裕生物科技有限公司; *SNHG14* 小干扰 RNA (si-

SNHG14)、乱序无意义阴性对照 (si-con)、*miR-105* 寡核苷酸模拟物 (*miR-105* mimics) 及阴性对照 mimic NC 序列 (*miR-con*)、*miR-105* 特异性寡核苷酸抑制剂 (anti-*miR-105*) 及 *miR-105* 阴性对照 (anti-*miR-con*) 购自上海吉玛制药有限公司; pcDNA3.1 购自武汉森灵生物科技有限公司; 反转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司; 甲基噻唑基四唑 (MTT, 批号 FP-M-300) 购自北京富龙康泰生物技术有限公司; 膜联蛋白 V (Annexin V) -异硫氰酸荧光素 (FITC) /碘化丙啶 (PI) 细胞凋亡试剂盒 (批号 40302ES20) 购自上海翌圣生物科技有限公司; 二喹啉甲酸 (BCA) 蛋白定量检测试剂盒 (批号 DQ111-01) 购自北京全式金生物技术有限公司; 兔抗鼠活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3 (Cleaved caspase-3) 抗体购自美国 Santa Cruz 公司; 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗兔二抗购自武汉艾美捷科技有限公司; 丙二醛 (MDA, 批号 A003-1-2)、活性氧 (ROS, 批号 E004-1-1) 水平与超氧化物歧化酶 (SOD, 批号 A001-1-2) 活性检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

2 方法

2.1 $A\beta_{25-35}$ 处理 PC12 细胞与实验分组 PC12 细胞培养于含有 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基, 培养条件 37 °C、

收稿日期: 2020-04-06

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81673943)

作者简介: 杨明辉 (1983—), 男, 硕士, 研究方向为中西医结合防治脑血管病。Tel: 15938784040, E-mail: pangrui72234@163.com

5% CO₂，待细胞生长至70%融合度时，加入0.25%胰蛋白酶消化，制备细胞悬液，调整细胞密度为5×10³个/mL，接种于96孔板（100 μL/孔），继续培养24 h，加入终浓度为10 μmol/L的Aβ₂₅₋₃₅处理PC12细胞24 h^[7]，记作Aβ₂₅₋₃₅组。未经任何处理的细胞作为空白组。熊果酸溶解于DMSO中，母液浓度为100 μmol/L，根据实验需要进行稀释（5、20、80 μmol/L）^[8]，分别使用不同浓度的熊果酸与10 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅处理PC12细胞24 h，分别记作Aβ₂₅₋₃₅+熊果酸5 μmol/L组、Aβ₂₅₋₃₅+熊果酸20 μmol/L组、Aβ₂₅₋₃₅+熊果酸80 μmol/L组。同时将含有0.1% DMSO的空白培养基处理PC12细胞24 h，记作Aβ₂₅₋₃₅+DMSO组。为探究熊果酸是否通过调控SNHG14/miR-105而发挥作用，分别将si-con、si-SNHG14、miR-con、miR-105 mimics转染至PC12细胞48 h，加入终浓度为10 μmol/L的Aβ₂₅₋₃₅处理PC12细胞24 h，分别记作Aβ₂₅₋₃₅+si-con组、Aβ₂₅₋₃₅+si-SNHG14组、Aβ₂₅₋₃₅+miR-con组、Aβ₂₅₋₃₅+miR-105组；分别将pcDNA、pcDNA-SNHG14、anti-miR-con、anti-miR-105转染至PC12细胞48 h，加入80 μmol/L的熊果酸与10 μmol/L的Aβ₂₅₋₃₅处理PC12细胞24 h，分别记作Aβ₂₅₋₃₅+熊果酸+pcDNA组、Aβ₂₅₋₃₅+熊果酸+pcDNA-SNHG14组、Aβ₂₅₋₃₅+熊果酸+anti-miR-con组、Aβ₂₅₋₃₅+熊果酸+anti-miR-105组，转染方法参照Lipofectamine2000试剂盒说明书。

2.2 MTT检测细胞增殖 取对数期PC12细胞，调整细胞密度为5×10³个/mL，接种于96孔板（100 μL/孔），按照“2.1”项下方法分组，每组各3个复孔，向每孔加入质量浓度为5 mg/mL的MTT溶液20 μL，37℃培养箱继续培养4 h，3 000 r/min离心5 min，弃上清，每孔加入150 μL DMSO，室温避光振荡孵育5 min，应用酶标仪检测各孔吸光度值（OD_{490 nm}），计算细胞存活率 = (OD_{实验组} - OD_{空白对照组}) / (OD_{正常培养组} - OD_{空白对照}) × 100%。实验重复3次（每孔一一对应计算）。

2.3 流式细胞术检测细胞凋亡率 收集各组对数期PC12细胞，加入PBS，1 000 r/min离心6 min，弃上清，预冷PBS洗涤，加入500 μL结合缓冲液重悬细胞，加入5 μL Annexin V-FITC与5 μL PI，室温振荡孵育10 min，于1 h内应用FACS Calibur流式细胞仪及Cellaquest软件检测各组细胞凋亡率水平。

2.4 检测MDA、ROS、SOD水平 收集各组对数期PC12细胞，采用DCFH-DA荧光探针检测ROS水平，硫代巴比妥酸法检测MDA水平，黄嘌呤氧化法测定SOD活性，严格按照试剂盒说明书进行操作。

2.5 RT-PCR检测细胞中SNHG14、miR-105的表达水平 采用Trizol法各组PC12细胞中的总RNA，应用Nano-drop2000c超微量分光光度计检测RNA浓度与纯度，RNA OD₂₆₀/OD₂₈₀处于1.8~2.0之间。参照反转录试剂盒说明书操作将总RNA反转录合成cDNA。SNHG14正向引物5'-ACAGAACAGCAGCTACCAGA-3'，反向引物5'-AGCTA-AGAATGCCTGCCTCA-3'；miR-105正向引物5'-GGTGT-

CAAATGTCTGCCTC-3'，反向引物5'-AAGCTCTCCTCACTCCAAC-3'；U6正向引物5'-GCTTCGGCAGCATATACT-3'，反向引物5'-GTGCAGGGTCCGAGCTATTC-3'；β-actin正向引物5'-TGCTGTCCCTGTATGCCTCT-3'，反向引物5'-TGATGTCACGCACGATTT-3'，引物由上海生工生物工程股份有限公司设计合成。qRT-PCR反应体系为cDNA 2 μL，Real-Time Master Mix 10 μL，正反向引物各1 μL，RNase-Free ddH₂O补足体系至20 μL；反应条件为95℃ 2 min，95℃ 15 s，60℃ 1 min，72℃ 30 s（循环40次）。SNHG14以β-actin为内参，miR-105以U6为内参，采用2^{-ΔΔCt}法计算SNHG14、miR-105相对表达。

2.6 双荧光素酶报告基因检测SNHG14与miR-105的靶向关系 starbase预测显示SNHG14与miR-105存在结合位点，将含有结合位点的片段克隆至pmiRGLO载体得到野生型载体WT-SNHG14，采用基因定点突变技术突变结合位点构建突变型载体MUT-SNHG14，分别将WT-SNHG14、MUT-SNHG14与miR-con、miR-105 mimics共转染至PC12细胞，转染48 h后收集细胞，检测细胞相对荧光素酶活性。分别将si-con、si-SNHG14、pcDNA、pcDNA-SNHG14转染至PC12细胞，采用qRT-PCR检测各组细胞中miR-105的表达。

2.7 Western blot检测Cleaved caspase-3的蛋白表达 收集各组PC12细胞，加入适量RIPA裂解液提取细胞总蛋白，BCA法测定蛋白浓度。加入SDS上样缓冲液，沸水煮10 min，蛋白变性。取50 μg蛋白样品进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE），电泳结束后将分离的蛋白凝胶转移至PVDF膜，5%脱脂奶粉封闭2 h，加入一抗稀释液（1:1 000），4℃孵育过夜，TBST洗涤，加入二抗稀释液（1:2 000），室温孵育1 h，滴加ECL显影，应用ImageJ软件分析各条带灰度值。

2.8 统计学处理 采用SPSS 21.0统计学软件分析数据，计量资料以(̄x±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，以P<0.05为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 熊果酸对Aβ₂₅₋₃₅处理PC12细胞存活的促进作用 与空白组比较，Aβ₂₅₋₃₅组PC12细胞存活率降低（P<0.05）；与Aβ₂₅₋₃₅+DMSO组比较，Aβ₂₅₋₃₅+熊果酸5 μmol/L组、Aβ₂₅₋₃₅+熊果酸20 μmol/L组、Aβ₂₅₋₃₅+熊果酸80 μmol/L组PC12细胞存活率水平升高（P<0.05），见表1。

表1 不同浓度Aβ₂₅₋₃₅诱导PC12细胞对细胞活性的影响 (̄x±s, n=9)

组别	细胞存活率/%
空白组	101.26±4.86
Aβ ₂₅₋₃₅ 组	62.38±4.58*
Aβ ₂₅₋₃₅ +DMSO组	66.25±3.91
Aβ ₂₅₋₃₅ +熊果酸5 μmol/L组	78.14±4.65#
Aβ ₂₅₋₃₅ +熊果酸20 μmol/L组	83.67±5.32#
Aβ ₂₅₋₃₅ +熊果酸80 μmol/L组	84.09±4.85#

注：与空白组比较，*P<0.05；与Aβ₂₅₋₃₅+DMSO组比较，#P<0.05。

3.2 熊果酸对 $A\beta_{25-35}$ 处理 PC12 细胞凋亡的影响 与空白组比较, $A\beta_{25-35}$ 组细胞凋亡率水平升高 ($P < 0.05$), Cleaved caspase-3 蛋白表达升高 ($P < 0.05$); 与 $A\beta_{25-35}$ + DMSO 组比较, $A\beta_{25-35}$ + 熊果酸 5 $\mu\text{mol/L}$ 组、 $A\beta_{25-35}$ + 熊果酸 20 $\mu\text{mol/L}$ 组、 $A\beta_{25-35}$ + 熊果酸 80 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞凋亡率水平降低 ($P < 0.05$), Cleaved caspase-3 蛋白表达降低 ($P < 0.05$), 见图 1、表 2。

表 2 不同浓度的熊果酸对 $A\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞凋亡率水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	Cleaved caspase-3	细胞凋亡率/%
空白组	0.15 ± 0.03	4.21 ± 0.81
$A\beta_{25-35}$ 组	0.59 ± 0.07*	34.98 ± 2.29*
$A\beta_{25-35}$ + DMSO 组	0.62 ± 0.06	32.53 ± 2.83
$A\beta_{25-35}$ + 熊果酸 5 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.45 ± 0.05 [#]	18.48 ± 1.85 [#]
$A\beta_{25-35}$ + 熊果酸 20 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.38 ± 0.04 [#]	13.56 ± 1.65 [#]
$A\beta_{25-35}$ + 熊果酸 80 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.31 ± 0.04 [#]	11.30 ± 1.75 [#]

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与 $A\beta_{25-35}$ + DMSO 组比较,[#] $P < 0.05$ 。

3.3 熊果酸对 $A\beta_{25-35}$ 处理 PC12 细胞的氧化应激的影响 与空白组比较, $A\beta_{25-35}$ 组 MDA、ROS 水平升高 ($P < 0.05$), SOD 活性降低 ($P < 0.05$); 与 $A\beta_{25-35}$ + DMSO 组比较, $A\beta_{25-35}$ + 熊果酸 5 $\mu\text{mol/L}$ 组、 $A\beta_{25-35}$ + 熊果酸 20 $\mu\text{mol/L}$ 组、 $A\beta_{25-35}$ + 熊果酸 80 $\mu\text{mol/L}$ 组 MDA、ROS 水平降低 ($P < 0.05$), SOD 活性升高 ($P < 0.05$), 见表 3。

表 3 熊果酸对 $A\beta_{25-35}$ 处理 PC12 细胞的氧化应激的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	MDA/($\text{nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$)	SOD/($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)	ROS 相对水平
空白组	11.34 ± 1.08	48.19 ± 3.55	1.02 ± 0.16
$A\beta_{25-35}$ 组	18.61 ± 1.24*	35.56 ± 2.29*	3.39 ± 0.26*
$A\beta_{25-35}$ + DMSO 组	17.75 ± 1.15	36.61 ± 3.38	3.21 ± 0.28
$A\beta_{25-35}$ + 熊果酸 5 $\mu\text{mol/L}$ 组	15.32 ± 1.29 [#]	40.82 ± 3.15 [#]	2.34 ± 0.25 [#]
$A\beta_{25-35}$ + 熊果酸 20 $\mu\text{mol/L}$ 组	14.73 ± 1.34 [#]	42.38 ± 3.63 [#]	2.07 ± 0.22 [#]
$A\beta_{25-35}$ + 熊果酸 80 $\mu\text{mol/L}$ 组	13.65 ± 1.27 [#]	43.22 ± 3.81 [#]	1.89 ± 0.19 [#]

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与 $A\beta_{25-35}$ + DMSO 组比较,[#] $P < 0.05$ 。

3.4 熊果酸对 $A\beta_{25-35}$ 处理 PC12 细胞中 *SNHG14* 和 *miR-105* 表达的影响 与空白组比较, $A\beta_{25-35}$ 组细胞中 *SNHG14* 的表达升高 ($P < 0.05$), *miR-105* 的表达降低 ($P < 0.05$); 与 $A\beta_{25-35}$ + DMSO 组比较, $A\beta_{25-35}$ + 熊果酸 5 $\mu\text{mol/L}$ 组、 $A\beta_{25-35}$ + 熊果酸 20 $\mu\text{mol/L}$ 组、 $A\beta_{25-35}$ + 熊果酸 80 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞中 *SNHG14* 的表达降低 ($P < 0.05$), *miR-105* 表达升高 ($P < 0.05$), 见表 4。

表 4 不同浓度熊果酸对 $A\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞对 *SNHG14* 和 *miR-105* 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	<i>SNHG14</i>	<i>miR-105</i>
空白组	1.07 ± 0.35	0.98 ± 0.07
$A\beta_{25-35}$ 组	5.62 ± 0.25*	0.45 ± 0.06*
$A\beta_{25-35}$ + DMSO 组	5.41 ± 0.46	0.43 ± 0.05
$A\beta_{25-35}$ + 熊果酸 5 $\mu\text{mol/L}$ 组	3.53 ± 0.32 [#]	0.58 ± 0.05 [#]
$A\beta_{25-35}$ + 熊果酸 20 $\mu\text{mol/L}$ 组	2.97 ± 0.24 [#]	0.79 ± 0.06 [#]
$A\beta_{25-35}$ + 熊果酸 80 $\mu\text{mol/L}$ 组	2.62 ± 0.23 [#]	0.84 ± 0.07 [#]

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与 $A\beta_{25-35}$ + DMSO 组比较,[#] $P < 0.05$ 。

3.5 LncRNA *SNHG14* 对 *miR-105* 的表达的靶向调控作用

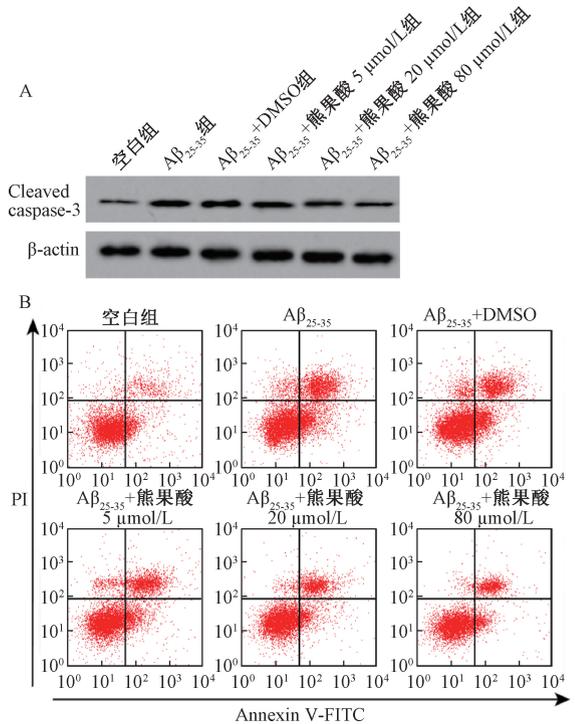


图 1 Western blot 检测 PC12 细胞 Cleaved caspase-3 蛋白表达 (A) 和流式细胞术检测 PC12 细胞凋亡率 (B)

starbase 预测显示 *SNHG14* 与 *miR-105* 存在靶向调控位点, 见图 2。双荧光素酶报告实验结果显示, 转染野生型载体 WT-*SNHG14* 的细胞实验中 *miR-105* 组荧光素酶活性低于 *miR-con* 组 ($P < 0.05$); 转染突变型载体 MUT-*SNHG14* 的细胞实验中 *miR-105* 组荧光素酶活性与 *miR-con* 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 5。qRT-PCR 检测结果显示, 与 si-con 组比较, si-*SNHG14* 组细胞中 *miR-105* 的表达升高 ($P < 0.05$); 与 pcDNA 组比较, pcDNA-*SNHG14* 组细胞中 *miR-105* 的表达降低 ($P < 0.05$), 见表 6。

表 5 双荧光素酶报告实验 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	WT- <i>SNHG14</i>	MUT- <i>SNHG14</i>
<i>miR-con</i> 组	1.04 ± 0.09	1.14 ± 0.13
<i>miR-105</i> 组	0.53 ± 0.08*	1.09 ± 0.12

注:与 *miR-con* 组比较,* $P < 0.05$ 。

3.6 沉默 LncRNA *SNHG14* 或转染 *miR-105* 对 $A\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞的影响 与 $A\beta_{25-35}$ + si-con 组比较, $A\beta_{25-35}$ + si-*SNHG14* 组细胞存活率水平升高 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率水平降低 ($P < 0.05$), Cleaved caspase-3 蛋白表达降低

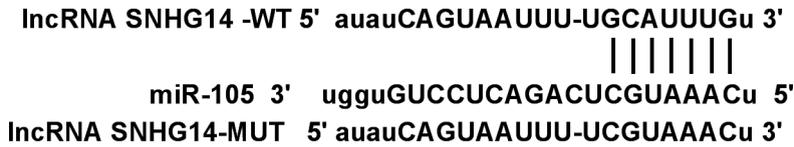


图2 LncRNA SNHG14与miR-105存在靶向调控位点

表6 LncRNA SNHG14对miR-105表达的靶向调控作用 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	miR-105
si-con组	0.95±0.09
si-SNHG14组	3.83±0.33*
pcDNA组	0.97±0.09
pcDNA-SNHG14组	0.64±0.07#

注:与si-con组比较,* $P<0.05$;与pcDNA组比较,# $P<0.05$ 。

($P<0.05$),MDA、ROS水平降低($P<0.05$),SOD活性升高($P<0.05$);与 $A\beta_{25-35}$ +miR-con组比较, $A\beta_{25-35}$ +miR-105组细胞存活率升高($P<0.05$),细胞凋亡率降低($P<0.05$),Cleaved caspase-3蛋白表达降低($P<0.05$),MDA、ROS水平降低($P<0.05$),SOD活性升高($P<0.05$),见图3、表7。

3.7 过表达SNHG14或干扰miR-105对熊果酸对 $A\beta_{25-35}$ 诱导PC12细胞的逆转作用 与 $A\beta_{25-35}$ +熊果酸+pcDNA组比较, $A\beta_{25-35}$ +熊果酸+pcDNA-SNHG14组细胞存活率水平降低($P<0.05$),细胞凋亡率水平升高($P<0.05$),Cleaved caspase-3蛋白表达升高($P<0.05$),MDA、ROS水平升高($P<0.05$),SOD活性降低($P<0.05$),见图4、表8。

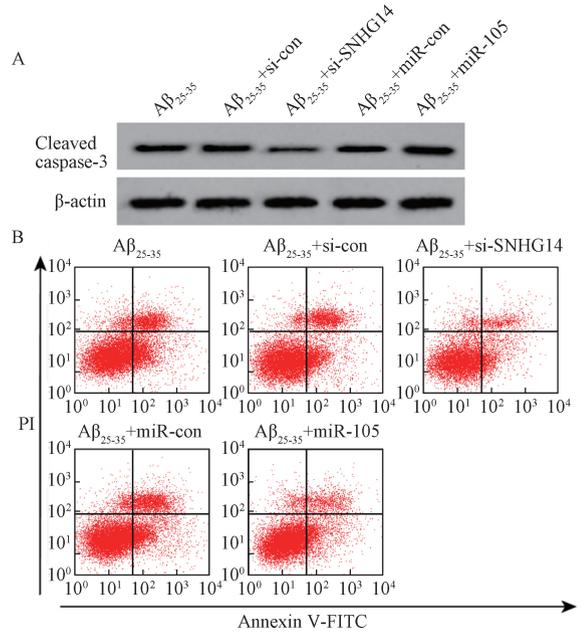


图3 Western blot检测PC12细胞Cleaved caspase-3蛋白表达(A)和流式细胞术检测PC12细胞凋亡率(B)

表7 沉默LncRNA SNHG14或转染miR-105对 $A\beta_{25-35}$ 诱导PC12细胞损伤的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	MDA/(nmol·mL ⁻¹)	SOD/(U·mL ⁻¹)	ROS相对水平	Cleaved caspase-3	细胞存活率/%	细胞凋亡率/%
$A\beta_{25-35}$ 组	18.95±1.26	35.49±3.81	0.95±0.08	0.59±0.06	98.26±8.37	34.86±2.74
$A\beta_{25-35}$ +si-con组	17.17±1.19	36.60±2.84	1.12±0.12	0.63±0.05	99.07±9.56	32.23±2.27
$A\beta_{25-35}$ +si-SNHG14组	14.98±1.05*	47.70±3.17*	0.75±0.11*	0.27±0.04*	141.85±12.32*	14.04±1.82*
$A\beta_{25-35}$ +miR-con组	17.79±1.29	36.64±2.73	0.98±0.09	0.58±0.05	95.73±11.54	32.64±2.11
$A\beta_{25-35}$ +miR-105组	13.22±1.04#	44.68±3.62#	0.73±0.08#	0.29±0.03#	137.42±12.61#	13.38±1.63#

注:与 $A\beta_{25-35}$ +si-con组比较,* $P<0.05$;与miR-con组比较,# $P<0.05$ 。

表8 过表达SNHG14或干扰miR-105对熊果酸处理 $A\beta_{25-35}$ 诱导PC12细胞损伤的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	MDA/(nmol·mL ⁻¹)	SOD/(U·mL ⁻¹)	ROS相对水平	Cleaved caspase-3	细胞存活率/%	细胞凋亡率/%
$A\beta_{25-35}$ +熊果酸+pcDNA组	13.61±1.04	48.67±2.32	1.04±0.12	0.29±0.05	101.42±9.67	13.57±1.78
$A\beta_{25-35}$ +熊果酸+pcDNA-SNHG14组	15.15±1.24*	39.33±2.18*	1.49±0.14*	0.71±0.07*	82.97±6.23*	21.19±2.32*
$A\beta_{25-35}$ +熊果酸+anti-miR-con组	13.75±1.35	47.27±2.29	1.07±0.09	0.35±0.05	100.94±8.24	14.35±1.13
$A\beta_{25-35}$ +熊果酸+anti-miR-105组	15.89±1.42#	41.39±2.37#	1.56±0.13#	0.68±0.06#	83.05±7.37#	19.23±2.06#

注:与 $A\beta_{25-35}$ +熊果酸+pcDNA组比较,* $P<0.05$;与 $A\beta_{25-35}$ +熊果酸+anti-miR-con组比较,# $P<0.05$ 。

3 讨论

AD发病机制相关研究表明氧化应激在其中发挥重要作用,氧化应激可诱导神经损伤,因而抗氧化损伤成为治疗该疾病的重要手段^[9]。既往研究显示部分中医药可减轻 $A\beta_{25-35}$ 诱导的神经细胞损伤^[10]。相关研究表明基因表达异常可促进 $A\beta_{25-35}$ 诱导的神经细胞凋亡而造成神经细胞损伤^[11]。目前关于药物对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的神经细胞损伤的作用

机制尚未阐明。

熊果酸可抑制炎症因子表达从而改善胶原诱导性关节炎大鼠的关节炎^[12]。研究表明熊果酸可抑制中性粒细胞活化而抑制炎症反应从而抑制肺血管内皮细胞迁移^[13]。相关报道指出熊果酸可通过改善抗氧化系统活性及减轻自由基损伤从而改善脑缺血再灌注损伤^[14]。本研究结果显示 $A\beta_{25-35}$ 处理后PC12细胞存活率降低,而不同浓度的熊果酸

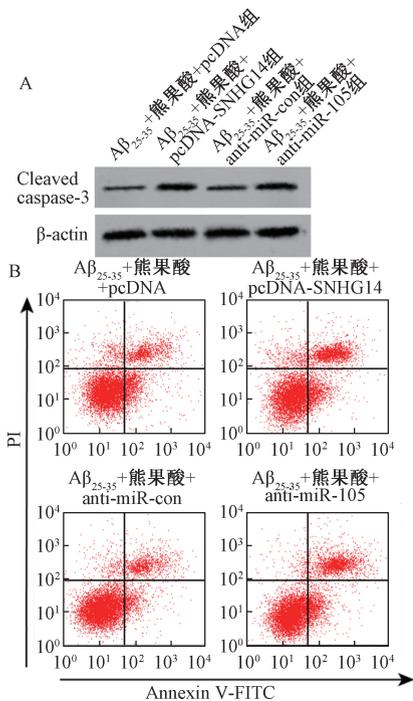


图4 Western blot 检测 PC12 细胞 Cleaved caspase-3 蛋白表达 (A) 和流式细胞术检测 PC12 细胞凋亡率 (B)

处理后细胞存活率升高,提示熊果酸 A 可促进神经细胞存活从而抵抗 $A\beta_{25-35}$ 诱导的细胞损伤。本研究结果显示 $A\beta_{25-35}$ 处理后 PC12 细胞的凋亡率水平升高,而不同浓度的熊果酸处理后凋亡率水平降低,提示熊果酸可抑制 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞凋亡。研究表明 Cleaved caspase-3 表达升高可促进细胞凋亡^[15]。本研究结果显示 $A\beta_{25-35}$ 处理后 PC12 细胞中 Cleaved caspase-3 蛋白水平升高,而熊果酸处理后 Cleaved caspase-3 蛋白表达降低,提示熊果酸可能通过下调 Cleaved caspase-3 表达从而抑制 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞凋亡。氧化应激指标 MDA、ROS、SOD 可参与多种疾病发生及发展过程,研究表明 MDA、ROS 水平升高预示氧化应激反应增强,SOD 属于抗氧化酶类,SOD 活性增强预示氧化应激反应减弱^[16]。本研究结果显示 $A\beta_{25-35}$ 处理后 PC12 细胞中 MDA、ROS 水平升高,SOD 活性降低,而熊果酸处理后 MDA、ROS 水平降低,SOD 活性升高,提示熊果酸可能通过增强神经细胞抗氧化能力从而抑制 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞氧化损伤。

SNHG14 通过调节 *miR-136-5p*/*ROCK1* 分子轴而引起炎症反应从而促进脑缺血/再灌注损伤^[17]。研究表明 *SNHG14* 表达升高与脑梗死发生及发展密切相关^[18]。但 *SNHG14* 在神经细胞损伤中的分子机制尚未可知。通过生物信息学分析显示 *miR-105* 可能是 *SNHG14* 的靶基因,本研究通过双荧光素酶报告实验与 qRT-PCR 实验证实 *SNHG14* 能够靶向结合 *miR-105*,并可负向调控 *miR-105* 的表达。研究表明 *miR-105* 表达降低可能促进神经系统疾病发生及发展^[19-20]。本研究结果显示沉默 *SNHG14* 或 *miR-105* 过表达后可明显

减弱 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞氧化损伤作用,并可抑制细胞凋亡,提示沉默 *SNHG14* 或 *miR-105* 过表达可减轻 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞损伤。同时本研究结果显示熊果酸处理后可明显抑制 *SNHG14* 表达,并可促进 *miR-105* 表达,进一步分析显示 *SNHG14* 过表达或干扰 *miR-105* 表达可明显减弱熊果酸对 $A\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞凋亡及氧化应激的抑制作用。提示熊果酸可能通过下调 *SNHG14* 表达及上调 *miR-105* 表达从而对 $A\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞发挥保护作用。

综上所述,熊果酸可抑制 $A\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞氧化应激损伤及细胞凋亡,其作用机制可能与调控 *SNHG14*/*miR-105* 分子轴有关,可为临床应用熊果酸提供理论依据。

参考文献:

- [1] 徐姗姗,朴美花,王艳姝,等. 异氟醚对 $A\beta_{25-35}$ 诱导大鼠 PC12 细胞氧化应激损伤的影响及海藻糖的保护作用[J]. 吉林大学学报(医学版), 2015, 41(2): 207-212.
- [2] Turunc Bayrakdar E, Uyanikgil Y, Kanit L, et al. Nicotinamide treatment reduces the levels of oxidative stress, apoptosis, and PARP-1 activity in $A\beta$ (1-42) -induced rat model of Alzheimer's disease[J]. *Free Radic Res*, 2014, 48(2): 146-158.
- [3] Wu M F, Yin J H, Hwang C S, et al. NAD attenuates oxidative DNA damages induced by amyloid beta-peptide in primary rat cortical neurons[J]. *Free Radic Res*, 2014, 48(7): 794-805.
- [4] Zhou J, Chao G, Li Y L, et al. Activation of NRF2/ARE by isosilybin alleviates $A\beta_{25-35}$ -induced oxidative stress injury in HT-22 cells[J]. *Neurosci Lett*, 2016, 632(1): 92-97.
- [5] 高敬国. 熊果酸对非酒精性脂肪肝大鼠肝脏的保护作用及机制[J]. 中药药理与临床, 2016, 32(2): 27-31.
- [6] Zhu J, Bai J, Wang S, et al. Down-regulation of long non-coding RNA *SNHG14* protects against acute lung injury induced by lipopolysaccharide through microRNA-34c-3p-dependent inhibition of *WISP1*[J]. *Respir Res*, 2019, 20(1): 233-243.
- [7] 李英,王俨如,张小强,等. 淫羊藿中不同部位及单体化合物对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤的影响[J]. 中草药, 2017, 48(24): 5206-5210.
- [8] 李博,李弼民,何文华,等. 熊果酸对肝星状细胞内活性氧产生的影响及与细胞凋亡的关系[J]. 广东医学, 2011, 32(11): 1391-1394.
- [9] 黄佳佳,张冰,王爱凤. 蒲公英总黄酮抑制 $A\beta_{25-35}$ 诱导的海马神经元细胞凋亡的研究[J]. 中国药物评价, 2018, 35(4): 274-278.
- [10] 陶晓倩,胡玉梅,王俨如,等. 39 个中药材提取物对 $A\beta_{25-35}$ 诱导 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用筛选研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2015, 17(1): 61-65.
- [11] 杨保平,罗拯,邹可,等. RNAi 沉默 *CAPN1* 基因对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的原代神经细胞的神经毒性及凋亡的影响[J]. 中风与神经疾病, 2018, 35(6): 488-491.
- [12] 鲜瑶瑶,周俭,曾光,等. 熊果酸对胶原诱导性关节炎大鼠关节炎相关因子 mRNA 表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2019, 39(6): 689-692.
- [13] 吴超民,金花,卢进昌,等. 熊果酸对脂多糖诱导的小鼠

- 急性肺损伤肺中性粒细胞活性的作用[J]. 国际呼吸杂志, 2018, 38(10): 731-736.
- [14] 陈鹏, 丁志杰. 熊果酸对全脑缺血再灌注模型大鼠的保护作用[J]. 国际中医中药杂志, 2016, 38(7): 629-632.
- [15] 李梅, 孟庆慧, 蔡巧英, 等. 乙酰葛根素对 $A\beta_{25-35}$ 诱导 BV-2 小鼠小胶质细胞株 caspase-8 和 caspase-3 表达的影响[J]. 基础医学与临床, 2016, 36(10): 1369-1373.
- [16] 王成, 李霞, 刘振, 等. 金丝桃苷对高糖诱导的心肌细胞氧化应激损伤的影响及其机制研究[J]. 四川大学学报(医学版), 2018, 49(4): 518-523.
- [17] Zhong Y, Yu C, Qin W. LncRNA SNHG14 promotes inflammatory response induced by cerebral ischemia/reperfusion injury through regulating miR-136-5p/ROCK1[J]. *Cancer Gene Ther*, 2019, 26(7-8): 234-247.
- [18] Qi X, Shao M, Sun H, et al. Long non-coding RNA SNHG14 promotes microglia activation by regulating miR-145-5p/PLA2G4A in cerebral infarction[J]. *Neuroscience*, 2017, 348(5): 98-106.
- [19] Hawley Z C E, Campos-Melo D, Strong M J. miR-105 and miR-9 regulate the mRNA stability of neuronal intermediate filaments. Implications for the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) [J]. *Brain Res*, 2019, 1706(1): 93-100.
- [20] Zhao Y, Zhang J, Yang H, et al. Memory retrieval in addiction: a role for miR-105-mediated regulation of D1 receptors in mPFC neurons projecting to the basolateral amygdala[J]. *BMC Biol*, 2017, 15(1): 128-138.

基于网络药理学探讨艾迪注射液抗肿瘤定位及分子机制分析

段灿灿¹, 何天目², 陈宽², 马逸飞², 张建永^{2*}

(1. 遵义医科大学基础药理教育部重点实验室暨特色民族药教育部国际合作联合实验室, 贵州遵义 563003; 2. 遵义医科大学药学院, 贵州遵义 563009)

摘要: **目的** 基于网络药理学分析艾迪注射液抗肿瘤部位的定位及分子机制。**方法** 检索 TCMS 数据库获取艾迪注射液四味中药的化学成分, 以“里宾斯基五原则”为依据, 进一步筛选活性化合物。采用 Swiss Target Prediction 预测作用靶点, CTD 数据库查询对应的不同部位肿瘤疾病并进行分类。利用 Cytoscape 软件与 OmicShare 平台构建“化合物-靶点”“化合物-靶点-疾病”网络。最后通过生物学信息注释 (DAVID) 对靶点进行信号通路分析。**结果** 本研究共筛选到艾迪注射液中活性化合物 294 个, 可作用靶点 265 个, 疾病主要定位在消化系统肿瘤 (原发性肝癌) 及泌尿系统肿瘤 (前列腺癌) 上, 作用通路主要富集在类固醇激素生物合成、药物代谢、视黄醇代谢及癌症通路等。**结论** 本研究揭示了艾迪注射液的抗肿瘤定位, 及多靶点、多途径的作用规律, 可为其临床应用及深入开展其分子机制研究提供新的思路。

关键词: 艾迪注射液; 肿瘤定位; 网络药理学; 分子机制

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2021)05-1345-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.05.047

《柳叶刀》杂志发布的近年来癌症生存趋势监测数据显示全球癌症 5 年生存率总体呈上升趋势, 其中肝癌、胰腺癌等恶性肿瘤生存率仍然较低^[1]。肿瘤治疗手段当下仍以放疗、化疗等为主, 但易引起严重的不良反应。因此继续寻找新型抗癌药物进行有效补充具有重要意义, 中药复方在我国应用历史悠久, 具有多成分多靶点的特点, 其不但可直接杀伤肿瘤, 还可提高机体免疫力, 此外还具有不

良反应小、无严重副作用等优点, 在改善患者生命质量等诸多方面具有较大优势^[2], 因此从中药复方中研发抗肿瘤药物是一个有效途径。

艾迪注射液是抗肿瘤常用中药注射液, 其由斑蝥为君药, 佐以人参、黄芪、刺五加组成。具有清热解毒、消痰散结之功效, 临床常用于原发性肝癌、肺癌、肠癌、鼻咽癌、泌尿系统肿瘤、恶性淋巴瘤和妇科恶性肿瘤等多种肿

收稿日期: 2019/10/22

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81760746); 国家自然科学基金青年项目 (81803838); 贵州省教育厅科技拔尖人才支持项目 (黔教合 KY 字 [2017] 078); 贵州省科技厅联合基金 (黔科合 LH [2015] 7032); 贵州省国内一流学科建设 (药学) (YLXKJS-YS-05)

作者简介: 段灿灿 (1983—), 女, 硕士, 讲师, 从事中药复方作用机理研究。E-mail: duancan2008@126.com

* **通信作者:** 张建永 (1983—), 男, 博士, 副教授, 从事中药系统生物学研究。E-mail: zhangjianyong2006@126.com