双去甲氧基姜黄素对小鼠脑神经母瘤细胞的促神经分化作用及机制研究Δ

王嘉欣[1*]，房红志[2]，吴　敏[2]，阳泽界[2]，许文博[2]，张　双[2]，李莎莉[2]，唐根云[1,2,3#]（1.南华大学衡阳医学院细胞与遗传研究所，湖南 衡阳　421001；2.湖南医药学院基础医学院，湖南 怀化　418000；3.脑与神经内分泌疾病湖南省高等学校重点实验室，湖南 怀化　418000）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2024）05-0578-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2024.05.12

摘　要　目的　研究姜黄素衍生物双去甲氧基姜黄素（BC）对小鼠脑神经母瘤细胞Neuro-2a（N2a）的促神经分化作用及机制。**方法**　采用MTT法检测BC（1、2、4、6、8、10 μmol/L）对N2a细胞存活率的影响，确定药物处理浓度范围。设对照组、视黄酸（RA）组（10 μmol/L）和BC组（1、2、4 μmol/L），培养48、72 h后，对分化细胞的神经突起长度进行测量并计算细胞分化率；采用Western blot法检测4 μmol/L BC作用5、15、30、60、120 min后细胞中蛋白激酶B（Akt）、细胞外调节蛋白激酶1/2（ERK1/2）、p38丝裂原活化蛋白激酶（p38）蛋白的磷酸化水平。以抑制剂LY294002（LY）和PD98059（PD）干预后，进一步验证BC对Akt和ERK蛋白磷酸化水平及促神经分化的影响。**结果**　根据MTT实验确定后续诱导细胞分化的BC浓度为1、2、4 μmol/L。分化48 h后，与对照组比较，RA组和BC 1、2、4 μmol/L组细胞分化率及BC 4 μmol/L组细胞神经突起长度均显著升高/增加（$P<0.05$或$P<0.01$）；BC继续诱导分化至72 h后，与对照组比较，RA组细胞分化率和神经突起长度、BC 4 μmol/L组细胞分化率和BC 2 μmol/L组细胞神经突起长度均显著升高/增加（$P<0.05$或$P<0.01$）。与0 min组比较，BC 4 μmol/L作用5、15、30、60、120 min组细胞中Akt、ERK1/2、p38蛋白的磷酸化水平均有不同程度升高，部分差异有统计学意义（$P<0.05$或$P<0.01$）。加入抑制剂LY/PD后，与BC组比较，PD+BC组细胞中ERK1/2蛋白的磷酸化水平显著降低（$P<0.01$），LY组、LY+BC组、PD组、PD+BC组细胞分化率均显著降低（$P<0.01$）。**结论**　BC可以促进N2a细胞分化，增加细胞分化率和神经突起长度，其机制可能与激活MEK/ERK和PI3K/Akt信号通路有关。

关键词　双去甲氧基姜黄素；脑神经母瘤细胞；促神经分化；阿尔茨海默病；神经营养活性

Effects of bisdemethoxycurcumin promoting neuronal differentiation of neuroblastoma cells in mice and its mechanism

WANG Jiaxin[1], FANG Hongzhi[2], WU Min[2], YANG Zejie[2], XU Wenbo[2], ZHANG Shuang[2], LI Shali[2], TANG Genyun[1,2,3]（1. Institute of Cytology and Genetics, Hengyang Medical School, University of South China, Hunan Hengyang 421001, China; 2. School of Basic Medicine, Hunan University of Medicine, Hunan Huaihua 418000, China; 3. Key Laboratory of Brain and Neuroendocrine Diseases, Colleges of Hunan Province, Hunan Huaihua 418000, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To study the effects of the curcumin derivative bisdemethoxycurcumin (BC) promoting neuronal differentiation of neuroblastoma cells Neuro-2a (N2a) in mice and its mechanism. **METHODS** The effects of BC (1, 2, 4, 6, 8, 10 μmol/L) on the viability of N2a cells were detected by MTT assay to determine the concentration range of drug treatment. The control group, retinoic acid (RA) group (10 μmol/L) and BC groups (1, 2 and 4 μmol/L) were set up, and the length of neural protrusions of the differentiated cells was measured and the cell differentiation rate was calculated after 48 h and 72 h of culture. Compared with 0 min group, Western blot was used to detect the phosphorylation levels of protein kinase B (Akt), extracellular-signal regulated kinase 1/2 (ERK1/2), and p38 mitogen-activated protein kinase (p38) proteins in cells treated by 4 μmol/L BC for 5, 15, 30, 60, 120 min. After intervention with inhibitors LY294002 (LY) and PD98059 (PD), the effects of BC on Akt and ERK1/2 protein phosphorylation levels and promoting neural differentiation were further validated. **RESULTS** According to the MTT experiment, the BC concentrations for subsequent induction of cell differentiation were determined to be 1, 2, and 4 μmol/L. After 48 hours of differentiation, compared with the control group, the cell differentiation rate in RA group and BC 1, 2 and 4 μmol/L groups, the length of cellular neural processes in the BC 4 μmol/L group significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$); after inducing differentiation of BC for 72 hours, compared with the control group, the cell differentiation rate

Δ **基金项目**　湖南省大学生创新创业训练计划项目（No. S202112214017）

＊ **第一作者**　硕士研究生。研究方向：神经药理学。E-mail：wjxhhxx413@163.com

\# **通信作者**　副教授，博士。研究方向：神经药理学。E-mail：hnyyxy_tanggenyun@126.com

and the length of cellular neural processes in the RA group, the cell differentiation rate in the BC 4 μmol/L group, and the length of cellular neural processes in the BC 2 μmol/L group all significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$).Compared with the 0 min group, the phosphorylation levels of Akt, ERK1/2, and p38 proteins in cells of the 5, 15, 30, 60 and 120 min groups increased to varying degrees after treated by 4 μmol/L BC, and some differences were statistically significant ($P<0.05$ or $P<0.01$). After adding the inhibitor LY/PD, compared with the BC group, the phosphorylation level of ERK1/2 protein in the PD+BC group cells were significantly reduced ($P<0.01$), and the cell differentiation rates in the LY group, LY+BC group, PD group, and PD+BC group was significantly reduced ($P<0.01$). **CONCLUSIONS** BC promotes N2a cell differentiation mainly by increasing cell differentiation rate and neural protrusion length. The mechanism may be related to the activation of mitogen-activated protein kinase/ERK and PI3K/Akt signaling pathways.

KEYWORDS bisdemethoxycurcumin; neuroblastoma cell; promoting neuronal differentiation; Alzheimer's disease; neurotrophic activity

随着全球人口老龄化日趋严重，阿尔茨海默病（Alzheimer's disease，AD）已成为全球公共健康的主要威胁，给患者家庭和社会带来巨大负担。《世界阿尔茨海默病报告》指出，预计到2050年，全球AD的患病数将增至1.52亿[1]。AD的病理特征包括β淀粉样蛋白（amyloid β-protein，Aβ）沉积、过度磷酸化Tau蛋白的积累及神经元的丢失[2]。上述因素均可激活小胶质细胞而引发神经炎症，最终引起神经突触功能障碍、变性和死亡[3]。目前，针对AD的获批药物有胆碱酯酶抑制剂多奈哌齐、卡巴拉汀、加兰他敏，以及谷氨酸拮抗剂匹马万色林，但这些药物只能减缓患者症状，不能从根本上治疗或延缓病程，甚至还会导致患者认知恶化或治疗无效[4]。虽然神经营养因子对神经元有维持生存和促进分化的作用[5]，但人工合成的神经营养因子很难透过血脑屏障进入大脑发挥作用。有研究表明，许多作用于磷脂酰肌醇3激酶（phosphoinositide 3-kinase，PI3K）/蛋白激酶B（protein kinase B，Akt）和丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase，MEK）/细胞外调节蛋白激酶（extracellular-signal regulated kinase，ERK）信号通路的天然产物可以保护神经元，并抑制小胶质细胞的活化，从而在AD的防治中发挥作用[6-7]。因此，寻找有效治疗AD且具有神经营养作用的低分子量、亲脂性天然化合物以替代神经营养因子是目前研究的热点。

姜黄素是中药姜黄的主要活性成分，具有神经保护作用，可用于治疗神经退行性疾病和神经系统疾病[8]。双去甲氧基姜黄素（bisdemethoxycurcumin，BC）是姜黄素的天然衍生物，其稳定性和溶解度均优于姜黄素[9]。BC能减少炎症反应、增强记忆力、改善氧化应激和认知功能，具有较好的神经保护作用，可用于相关神经系统性疾病的治疗[10]。研究指出，BC对$A\beta_{1-42}$诱导的人脑神经母瘤细胞SK-N-SH损伤有保护作用，可改善小鼠认知功能，并通过抑制氧化应激来发挥神经保护作用[11]。本研究以视黄酸（retinoic acid，RA）为阳性对照药，以小鼠脑神经母瘤细胞Neuro-2a（N2a）为细胞模型，研究BC对N2a细胞的促神经分化作用及可能机制，为将其开发为AD治疗相关药物提供实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

3111型CO_2细胞培养箱购自美国Thermo Fisher Scientifc公司；Axio Vert.A1型倒置显微镜购自德国Carl Zeiss公司；PowerPac HC型电泳、转膜系统及ChemiDoc XRs+型自动曝光分析系统均购自美国Bio-Rad公司；RT-2100C型酶标仪购自深圳雷杜生命科学股份有限公司。

1.2 主要药品与试剂

BC对照品（批号F1606064，纯度＞98%）购自阿拉丁试剂（上海）有限公司；RA对照品（阳性对照药，批号WXBC0408V，纯度≥98%）购自美国Sigma公司；MEM培养基（批号AG29820721）购自美国HyClone公司；胎牛血清（批号42A0378K）购自美国Gibco公司；杜氏磷酸盐缓冲液（Du's phosphate buffer solution，DPBS）（批号22059220）购自广州硕谱生物科技有限公司；胰酶细胞消化液（批号YM3428512）购自上海中乔新舟生物科技有限公司；二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide，DMSO）细胞冻存液（批号YB0506）购自安诺伦（北京）生物科技有限公司；蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物（批号K10151133EE8D）购自美国APExBIO公司；细胞裂解液（批号11102222-1130）、兔Akt抗体（批号0034021220768）、兔磷酸化Akt（p-Akt）抗体（批号33021210511）、兔ERK1/2抗体（批号122822230629）、兔磷酸化ERK1/2（p-ERK1/2）抗体（批号121522230609）、兔p38 MEK（简写为"p38"）抗体（批号090122230710）、鼠β-肌动蛋白（β-actin）抗体（批号033778920125）、辣根过氧化物酶（HRP）标记的山羊抗兔、山羊抗鼠IgG二抗（批号分别为030623230711、030522230675）、ERK1/2抑制剂PD98059（简写为"PD"）对照品（批号036057789123，纯度＞98%）、PI3K/Akt抑制剂LY294002（简写为"LY"）对照品（批号062922220901，纯度＞98%）、极超敏ECL化学发光试剂盒（批号042921211206）、MTT试剂（批号062320200715）均购自上海碧云天生物技术股份有限公司；兔磷酸化p38（p-p38）抗体（批号13）购自美国CST公司；BCA蛋白分析试剂盒（批号SF249044）购自美国Thermo Fisher Scientifc公司。

1.3 细胞

小鼠脑神经母瘤细胞N2a购自美国典型培养物保藏中心。

2 方法

2.1 细胞培养

将N2a细胞接种于含10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素双抗的MEM培养基中，置于37 ℃、5%CO_2细胞培养箱中培养。待细胞融合至60%～70%时进行传代（每3 d传代1次），诱导分化液为含0.5%胎牛血清的MEM培养基。

2.2 细胞存活率的检测

采用MTT法检测。用含0.5%胎牛血清的MEM培养基将BC母液（以细胞培养级DMSO原液为溶剂进行溶解后制成10 mmol/L的母液）稀释成不同浓度（1、2、4、6、8、10 μmol/L，浓度依据本课题组预实验结果确定）。取对数期生长的N2a细胞，用含10%胎牛血清的MEM培养基制备细胞悬液，以5×10^3个/孔的细胞密度接种于96孔板中，每孔100 μL。将实验分为BC不同浓度（1、2、4、6、8、10 μmol/L）组、对照组（含细胞不含药物，加入给药组等量体积的溶剂）和空白组（不含细胞也不含药物），每组平行设置4个复孔。铺板24 h后，弃去上清液，加入相应药物/溶剂继续培养48 h，然后每孔加入10 μL MTT试剂（5 mg/mL）（避光操作），放入37 ℃、5%CO_2细胞培养箱中孵育4 h；弃去上清液，每孔加100 μL DMSO溶解，摇床15 min后使用酶标仪检测490 nm波长处各孔的吸光度，计算细胞存活率。细胞存活率（%）=（BC组吸光度－空白组吸光度）/（对照组吸光度－空白组吸光度）×100%。

2.3 细胞分化情况检测

采用倒置显微镜拍照并测量。将对数生长期的N2a细胞常规消化后，以4×10^4个/孔的细胞密度接种于6孔板中，每孔2 mL。铺板24 h后，弃去培养液，换分化培养液。将实验分为对照组、RA组（10 μmol/L，浓度依据本课题组预实验结果确定）和BC不同浓度组（1、2、4 μmol/L，浓度依据MTT实验筛选所得），每组平行设置3个复孔。分别继续培养48、72 h后使用倒置显微镜观察、拍照，并用Image J软件进行图像处理，对图片中的分化细胞进行数量统计，检测BC对N2a细胞分化的影响。分化细胞指神经突起长度大于2倍胞体直径的细胞[12]。对分化细胞的神经突起长度进行测量并计算细胞分化率，细胞分化率（%）=分化细胞数/细胞总数×100%。

2.4 细胞中Akt、ERK和p38蛋白磷酸化水平检测

采用Western blot法检测。根据作用时间的不同，分为作用0（对照）、5、15、30、60、120 min组，每组平行设置4个培养皿。将对数生长期的N2a细胞按3×10^5个/皿的密度均匀铺至6个60 mm培养皿中，每皿4 mL。培养24 h后弃掉培养液，5、15、30、60、120 min组均加入含BC 4 μmol/L的分化培养液，对照组加入等体积溶剂，作用不同时间后收集各组细胞。弃掉细胞培养液，使用预冷的1×DPBS清洗1次，每孔加入细胞裂解液、蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物，收集细胞并在冰上裂解30 min；使用高速冷冻离心机离心（于4 ℃预冷15 min后，以12 000 r/min离心15 min），收集上清液，使用BCA蛋白分析试剂盒检测总蛋白浓度，对上样蛋白进行定量（≥20 μg/孔）；95 ℃煮蛋白10 min；使用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离上样蛋白；将蛋白转移到PVDF膜，然后用含5%的脱脂奶粉室温封闭1 h；1×TBST洗膜3次（每次8 min）后加入相应一抗（Akt、p-Akt、p-ERK1/2、p38、p-p38的稀释度均为1∶1 000，ERK1/2的稀释度为1∶2 000，β-actin的稀释度为1∶1 000），4 ℃孵育过夜；1×TBST洗膜3次，加入山羊抗兔/抗鼠IgG二抗（稀释度均为1∶1 000），室温孵育1 h；1×TBST洗膜3次，ECL显影，采用自动曝光分析系统对条带进行成像，分析实验结果。采用Quantity One软件统计各条带的灰度值，以各目的蛋白与内参蛋白（β-actin）条带灰度值的比值表示目的蛋白的表达水平，以p-Akt/Akt、p-ERK/ERK、p-p38/p38比值表示Akt、ERK、p38蛋白的磷酸化水平。

2.5 抑制剂干预下BC激活信号通路关键蛋白磷酸化及促神经分化的作用检测

采用Western blot法检测蛋白表达情况，细胞分化及神经突起长度检测方法同“2.3”项下。将细胞分为对照组、BC组（最佳分化浓度4 μmol/L）、LY组、PD组、PD+BC组、LY+BC组（抑制剂LY、PD的浓度均为10 μmol/L，浓度依据本课题组预实验结果确定），每组平行设置3个复孔。同“2.4”项下方法处理细胞，换分化培养液1 h后，抑制剂组分别加入抑制剂LY/PD作用60 min，各组分别加入药物BC/等量溶剂进行处理（LY组药物作用30 min，PD组药物作用60 min），检测细胞中Akt、ERK蛋白的磷酸化水平。同法分组、给药和培养细胞，加入抑制剂PD/LY作用60 min后，各组再加BC/等量溶剂，作用48 h后检测抑制剂PD/LY对BC诱导的N2a细胞分化的影响，对分化细胞的神经突起长度进行测量并计算细胞分化率。

2.6 统计学方法

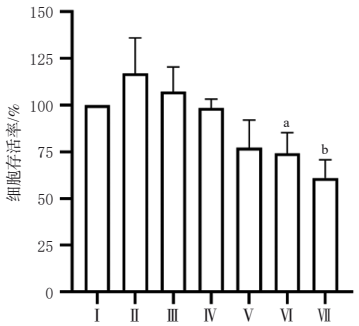
采用GraphPad Prism 8.0软件对实验数据进行统计分析。实验数据以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD-t检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 BC对N2a细胞存活率的影响

与对照组比较，BC 1、2、4、6 μmol/L组细胞的存活率差异均无统计学意义（$P>0.05$），而BC 8、10 μmol/L组细胞的存活率显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。其中，

BC 6 μmol/L组细胞存活率虽然和对照组比较没有显著性差异，但和BC 8 μmol/L组的细胞存活率非常接近，所以本研究最终确定设置BC浓度为1、2、4 μmol/L，用于诱导N2a细胞分化。结果见图1。



Ⅰ：对照组；Ⅱ：BC 1 μmol/L组；Ⅲ：BC 2 μmol/L组；Ⅳ：BC 4 μmol/L组；Ⅴ：BC 6 μmol/L组；Ⅵ：BC 8 μmol/L组；Ⅶ：BC 10 μmol/L组；a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与对照组比较，$P<0.01$。

图1　不同浓度BC对N2a细胞存活率的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=4$）

3.2　BC对N2a细胞神经分化的影响

与对照组比较，BC 1、2、4 μmol/L组细胞神经突起长度有不同程度增加，细胞形态变为梭形。通过对BC诱导不同时间（48、72 h）细胞分化结果进行统计分析，结果显示，随着BC浓度的增加，整体上细胞分化率和神经突起长度呈剂量依赖性趋势增加。分化48 h后，与对照组比较，RA组和BC 1、2、4 μmol/L组细胞分化率均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$），BC 4 μmol/L组细胞神经突起长度显著增加（$P<0.01$）；BC继续诱导分化至72 h后，与对照组比较，RA组细胞分化率和神经突起长度显著升高/增加（$P<0.05$或$P<0.01$），BC 4 μmol/L组细胞分化率和BC 2 μmol/L组细胞神经突起长度均显著升高/增加（$P<0.05$）。BC诱导48 h的细胞分化作用明显，诱导72 h后细胞分化率和神经突起长度较正常组未诱导分化的细胞均有一定程度的升高/增加，但大部分差异无统计学意义；且考虑到作用时间太长，拍照时发现部分细胞已死亡，因此后续实验确定BC作用时间为48 h。结果见图2、表1。

表1　BC诱导分化不同时间后的N2a细胞分化率及神经突起长度比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	48 h		72 h	
	细胞分化率/%	神经突起长度/μm	细胞分化率/%	神经突起长度/μm
对照组	3.703±0.576	91.153±9.128	6.594±1.085	113.414±5.392
RA组	6.346±0.882[a]	117.513±7.283	13.231±1.929[a]	169.812±5.619[b]
BC 1 μmol/L组	7.537±1.225[b]	111.912±13.388	10.528±1.607	136.008±6.496
BC 2 μmol/L组	9.942±0.640[b]	120.278±8.509	11.028±1.787	150.649±6.816[a]
BC 4 μmol/L组	11.383±0.399[b]	143.911±15.951[b]	13.158±2.240[a]	148.402±24.949

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与对照组比较，$P<0.01$。

3.3　BC对N2a细胞中Akt、ERK1/2和p38蛋白磷酸化的影响

与0 min组比较，加入含BC 4 μmol/L的分化培养液后，5、15、30、60、120 min组细胞中Akt、ERK1/2、p38蛋白的磷酸化水平均有不同程度升高，部分差异有统计学意义（$P<0.05$或$P<0.01$）。同时，结果显示，激活PI3K/Akt信号通路的最佳药物作用时间是30 min，激活MEK/ERK信号通路的最佳药物作用时间为60 min。因此，后续实验采用抑制剂LY、PD干预BC作用的时间分别为30、60 min。结果见图3、图4。

3.4　不同抑制剂对BC激活信号通路中关键蛋白磷酸化的影响

加入抑制剂LY后，与对照组比较，BC组细胞中Akt蛋白的磷酸化水平显著升高（$P<0.05$），LY组细胞中Akt蛋白的磷酸化水平显著降低（$P<0.01$）。加入抑制剂PD后，与对照组比较，PD组细胞中ERK1/2蛋白的磷酸化水平显著降低（$P<0.01$）；与BC组比较，PD+BC组细胞中ERK1/2蛋白的磷酸化水平显著降低（$P<0.01$）。结果见图5、图6。

3.5　不同抑制剂对BC促神经分化作用的影响

与对照组比较，BC组细胞分化率显著升高（$P<0.01$）；与BC组比较，LY组、LY+BC组、PD组、PD+BC组细胞分化率均显著降低（$P<0.01$）。各给药组与对照组间，神经突起长度差异均无统计学意义（$P>0.05$）。结果见图7、图8。

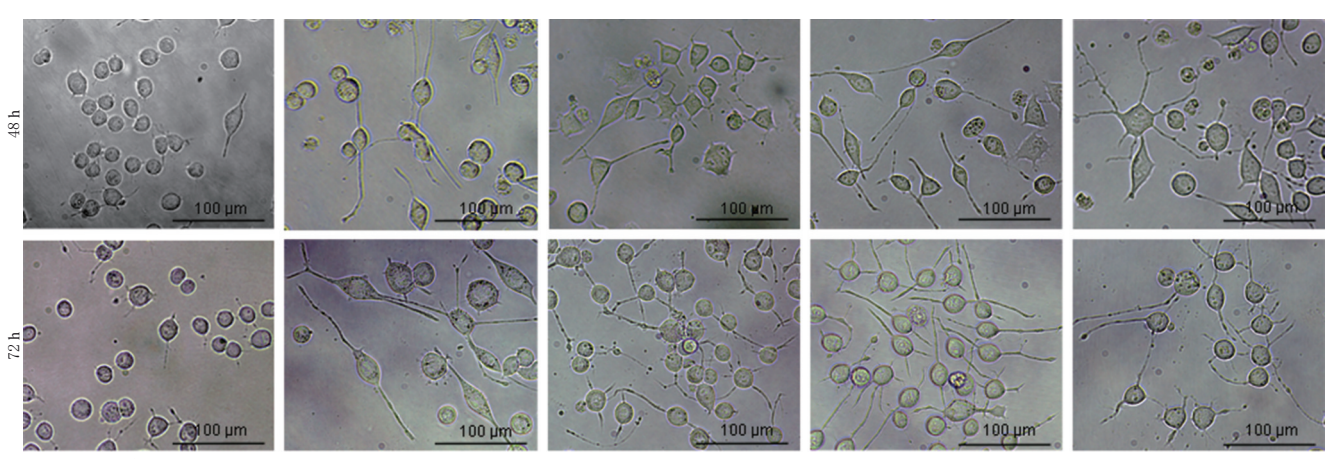
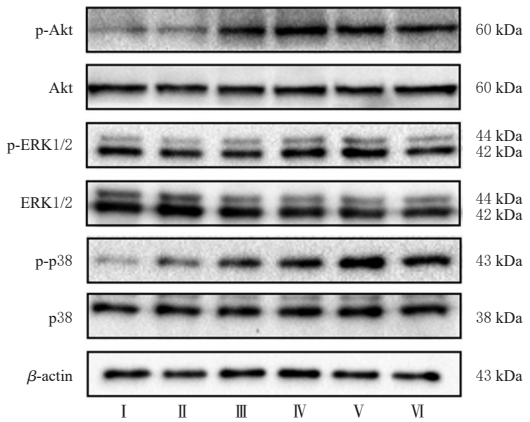
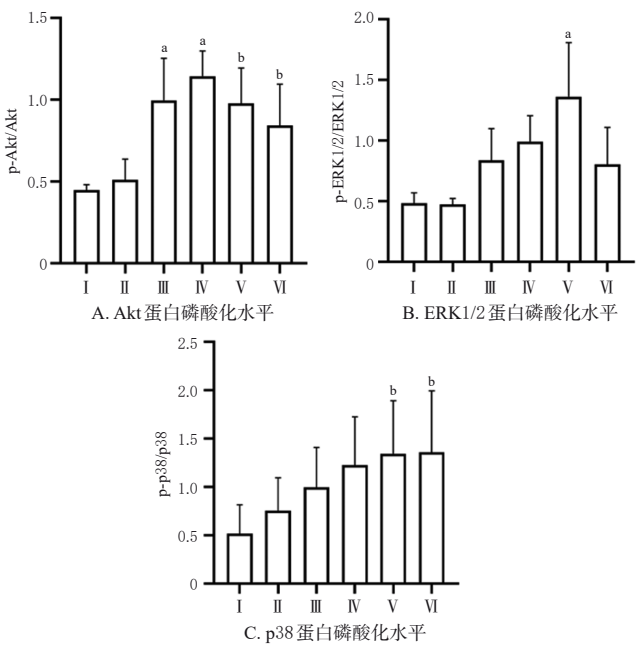


图2　BC诱导分化不同时间后N2a细胞的形态显微图



Ⅰ：0 min组；Ⅱ：5 min组；Ⅲ：15 min组；Ⅳ：30 min组；Ⅴ：60 min组；Ⅵ：120 min组。

图3　BC作用不同时间后细胞中Akt、ERK1/2和p38蛋白磷酸化检测的电泳图

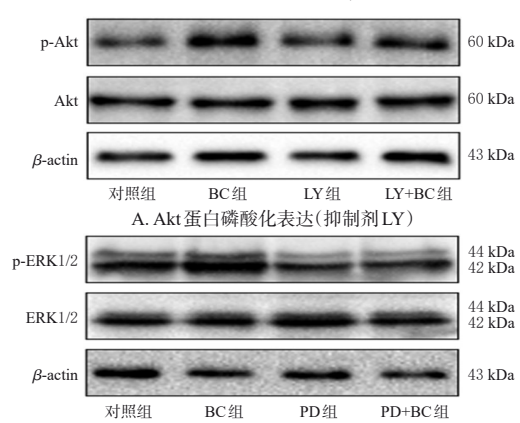


A. Akt蛋白磷酸化水平　B. ERK1/2蛋白磷酸化水平

C. p38蛋白磷酸化水平

Ⅰ：0 min组；Ⅱ：5 min组；Ⅲ：15 min组；Ⅳ：30 min组；Ⅴ：60 min组；Ⅵ：120 min组；a：与0 min组比较，$P<0.01$；b：与0 min组比较，$P<0.05$。

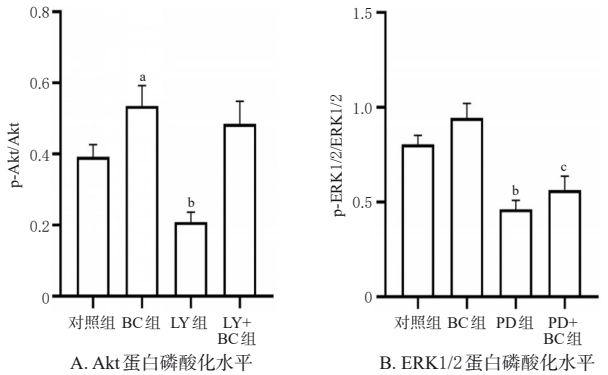
图4　BC作用不同时间后细胞中Akt、ERK1/2和p38蛋白磷酸化水平测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=4$）



A. Akt蛋白磷酸化表达（抑制剂LY）

B. ERK1/2蛋白磷酸化表达（抑制剂PD）

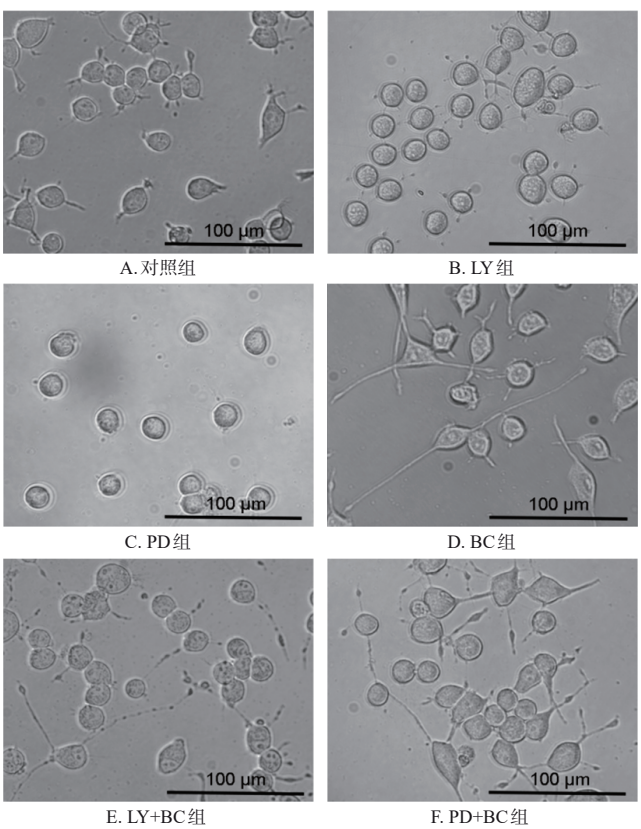
图5　不同抑制剂对BC激活信号通路关键蛋白磷酸化表达影响的电泳图



A. Akt蛋白磷酸化水平　B. ERK1/2蛋白磷酸化水平

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与对照组比较，$P<0.01$；c：与BC组比较，$P<0.01$。

图6　不同抑制剂作用BC后细胞中Akt、ERK1/2蛋白的磷酸化水平测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

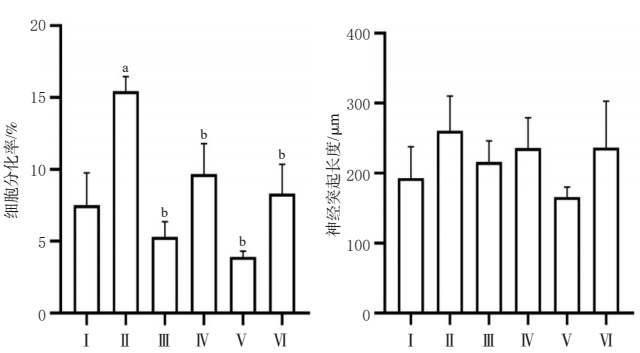


A. 对照组　B. LY组

C. PD组　D. BC组

E. LY+BC组　F. PD+BC组

图7　不同抑制剂干预BC诱导的N2a细胞分化形态显微图



A. 细胞分化率　B. 神经突起长度

Ⅰ：对照组；Ⅱ：BC组；Ⅲ：LY组；Ⅳ：LY+BC组；Ⅴ：PD组；Ⅵ：PD+BC组；a：与对照组比较，$P<0.01$；b：与BC组比较，$P<0.01$。

图8　不同抑制剂对BC促神经分化的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

4 讨论

神经突起的生长在神经系统发育过程中非常重要，神经分化是神经元从胞体长出树突和轴突形成神经网络的过程，这个过程会直接影响神经突触的形成和神经递质的传递[13]。Aβ具有很强的突触毒性，Aβ的积累使AD患者的大脑神经突触断裂，直接引起神经突触减少，导致记忆丢失和认知功能障碍[14]。而神经网络的失调会导致AD的病理级联反应[15]。因此，促进神经分化、调节神经网络形成成为开发治疗AD新药的一种主要途径。本研究在检测不同浓度BC对细胞存活率影响的基础上，确定了药物浓度范围为1～4 μmol/L。BC（1、2、4 μmol/L）诱导N2a细胞分化48 h后，神经突起长度不同程度增加，细胞形态变为梭形，细胞分化率显著升高。

ERK1/2能够抑制过度的Tau蛋白磷酸化从而延缓AD的进程，PI3K/Akt信号通路的激活能够促进Aβ模型细胞分化，发挥神经保护作用[16]。PI3K/Akt和MEK/ERK信号通路的激活对神经突触的生长至关重要[17]。本研究结果表明，BC能够上调模型细胞中Akt、ERK1/2和p38蛋白的磷酸化水平。对BC作用不同时间后细胞中磷酸化蛋白水平进行检测，发现作用30 min时，细胞中Akt蛋白的磷酸化水平最高，作用60 min时细胞中ERK1/2蛋白的磷酸化水平最高。使用信号通路关键蛋白磷酸化特异性抑制剂LY和PD预处理60 min后发现，LY虽然不能够显著抑制BC诱导的Akt蛋白磷酸化水平上调，但是能够显著抑制BC诱导的细胞分化率的升高；PD既能抑制BC诱导的ERK蛋白磷酸化水平的上调，也能够显著抑制BC诱导的细胞分化率的升高。这2种抑制剂的干预对神经突起长度的影响均不显著，可能原因是BC诱导的N2a细胞神经突起只要长出后就不再受相应信号通路的影响。

综上所述，BC可以促进N2a细胞分化，增加细胞分化率和神经突起长度，其分子作用机制主要涉及MEK/ERK和PI3K/Akt信号通路的激活。

参考文献

[1] PRITAM P, DEKA R, BHARDWAJ A, et al. Antioxidants in Alzheimer's disease: current therapeutic significance and future prospects[J]. Biology, 2022, 11(2): 212.

[2] SCHELTENS P, DE STROOPER B, KIVIPELTO M, et al. Alzheimer's disease[J]. Lancet, 2021, 397(10284): 1577-1590.

[3] KHAN S, BARVE K H, KUMAR M S. Recent advancements in pathogenesis, diagnostics and treatment of Alzheimer's disease[J]. Curr Neuropharmacol, 2020, 18(11): 1106-1125.

[4] MICULAS D C, NEGRU P A, BUNGAU S G, et al. Pharmacotherapy evolution in Alzheimer's disease: current framework and relevant directions[J]. Cells, 2022, 12(1): 131.

[5] SHORT C A, ONESTO M M, REMPEL S K, et al. Familiar growth factors have diverse roles in neural network assembly [J]. Curr Opin Neurobiol, 2021, 66: 233-239.

[6] LONG H Z, CHENG Y, ZHOU Z W, et al. PI3K/AKT signal pathway: a target of natural products in the prevention and treatment of Alzheimer's disease and Parkinson's disease[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 648636.

[7] TAN L, ZHANG H, LI H Q, et al. Blueberry extracts antagonize $A\beta_{25\text{-}35}$ neurotoxicity and exert a neuroprotective effect through MEK-ERK-BDNF/UCH-L1 signaling pathway in rat and mouse hippocampus[J]. Nutr Neurosci, 2023: 1-16.

[8] MEO F D, MARGARUCCI S, GALDERISI U, et al. Curcumin, gut microbiota, and neuroprotection[J]. Nutrients, 2019, 11(10): 2426.

[9] HSU K Y, HO C T, PAN M H. The therapeutic potential of curcumin and its related substances in turmeric: from raw material selection to application strategies[J]. J Food Drug Anal, 2023, 31(2): 194-211.

[10] GAGLIARDI S, FRANCO V, SORRENTINO S, et al. Curcumin and novel synthetic analogs in cell-based studies of Alzheimer's disease[J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 1404.

[11] XU C L, XIAO Z J, WU H, et al. BDMC protects AD *in vitro* via AMPK and SIRT1[J]. Transl Neurosci, 2020, 11(1): 319-327.

[12] GAO W L, CHEN R, XIE N, et al. Duloxetine-induced neural cell death and promoted neurite outgrowth in N2a cells[J]. Neurotox Res, 2020, 38(4): 859-870.

[13] NUNES C, GORCZYCA G, MENDOZA-DEGYVES E, et al. Upscaling biological complexity to boost neuronal and oligodendroglia maturation and improve *in vitro* developmental neurotoxicity (DNT) evaluation[J]. Reprod Toxicol, 2022, 110: 124-140.

[14] ZHANG H Q, JIANG X F, MA L N, et al. Role of Aβ in Alzheimer's related synaptic dysfunction[J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10: 964075.

[15] JI D S, WU X M, LI D L, et al. Protective effects of chondroitin sulphate nano-selenium on a mouse model of Alzheimer's disease[J]. Int J Biol Macromol, 2020, 154: 233-245.

[16] LU Q, ZHU H L, LIU X J, et al. Icariin sustains the proliferation and differentiation of $A\beta_{25\text{-}35}$-treated hippocampal neural stem cells via the BDNF-TrkB-ERK/Akt signaling pathway[J]. Neurol Res, 2020, 42(11): 936-945.

[17] WEN W, WANG Y C, LI H, et al. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF) regulates neurite outgrowth through the activation of Akt/mTOR and ERK/mTOR signaling pathways[J]. Front Mol Neurosci, 2020, 13: 560020.

（收稿日期：2023-08-19　修回日期：2023-11-03）

（编辑：舒安琴）