雷公藤红素及其衍生物的体外神经保护作用与机制研究Δ

陈佩佩[1*]，袁晓煊[1]，张　鑫[1]，徐　伟[1]，许少华[1,2#]（1.福建中医药大学药学院，福州　350122；2.中国中医科学院道地药材国家重点实验室，北京　100700）

中图分类号　R965；R285　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2024）05-0536-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2024.05.05

摘　要　目的　从神经炎症和氧化损伤2个方面探究雷公藤红素（Cel）及其衍生物Cel-1、Cel-2的神经保护作用及可能机制。**方法**　利用1 μg/mL脂多糖（LPS）诱导建立小胶质BV2细胞神经炎症模型、200 μmol/L过氧化氢（H_2O_2）诱导建立人神经母细胞瘤SH-SY5Y细胞氧化损伤模型，考察不同浓度（0.625～20 μmol/L）Cel、Cel-1、Cel-2对2种细胞的毒性；并在安全浓度（0.039～0.625 μmol/L）范围内检测LPS诱导BV2细胞培养液中一氧化氮（NO）、肿瘤坏死因子α（TNF-α）、白细胞介素1β（IL-1β）、IL-6含量，检测H_2O_2诱导SH-SY5Y细胞的存活率。检测0.156、0.313、0.625 μmol/L活性化合物Cel-2作用后H_2O_2诱导SH-SY5Y细胞中磷脂酰肌醇3激酶（PI3K）、磷酸化PI3K（p-PI3K）、蛋白激酶B（Akt）、磷酸化Akt（p-Akt）、胱天蛋白酶3（caspase-3）、B淋巴细胞瘤2（Bcl-2）和Bcl-2相关X蛋白（Bax）表达水平。**结果**　在0.039～0.625 μmol/L浓度梯度区间，神经炎症模型实验显示，Cel、Cel-1、Cel-2均可降低BV2细胞培养液中NO、TNF-α、IL-1β、IL-6的含量（$P<0.05$或$P<0.01$），其对神经炎症的半数抑制浓度分别为（0.25±0.04）、（0.61±0.14）、（0.11±0.02）μmol/L；氧化损伤模型实验显示，Cel、Cel-1、Cel-2在一定浓度下可逆转H_2O_2处理后SH-SY5Y细胞存活率降低的现象（$P<0.05$或$P<0.01$），其神经保护的半数效应浓度分别为（0.43±0.08）、（0.45±0.04）、（0.28±0.03）μmol/L。经H_2O_2诱导，Cel-2干预后SH-SY5Y细胞中PI3K、Akt蛋白的磷酸化水平和Bcl-2蛋白表达水平、Bcl-2/Bax比值均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$），caspase-3、Bax蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。**结论**　Cel、Cel-1、Cel-2在一定浓度下均具有显著的神经保护活性，且以Cel-2的活性最强；Cel-2的作用机制可能与调控PI3K/Akt、caspase-3/Bcl-2/Bax信号通路，减轻炎症反应、氧化应激损伤，抑制神经细胞凋亡有关。

关键词　雷公藤红素；衍生物；神经保护作用；神经炎症；氧化应激

Neuroprotective effect and mechanism of celastrol and its derivatives *in vitro*

CHEN Peipei[1], YUAN Xiaoxuan[1], ZHANG Xin[1], XU Wei[1], XU Shaohua[1,2]（1. College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China; 2. State Key Laboratory of Dao-di Herbs, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To explore the neuroprotective effect and possible mechanism of celastrol (Cel) and its derivatives (Cel-1, Cel-2) in terms of neuroinflammation and oxidative damage. **METHODS** Neuroinflammation model of microglial BV2 cells was induced by 1 μg/mL lipopolysaccharide (LPS); oxidative damage model of human neuroblastoma SH-SY5Y cells was induced by 200 μmol/L hydrogen peroxide (H_2O_2). The toxicity of different concentrations of Cel, Cel-1 and Cel-2 (0.625-20 μmol/L) to the two types of cells was investigated. The levels of nitric oxide (NO), tumor necrosis factor α (TNF-α), interleukin 1β (IL-1β), and IL-6 in BV2 cells induced by LPS at safe concentrations (0.039-0.625 μmol/L) were all detected. The survival rate of SH-SY5Y cells induced by H_2O_2 was also determined. The expression levels of phosphoinositide 3-kinase (PI3K), p-PI3K, protein kinase B (Akt), p-Akt, cystatinase 3 (caspase-3), B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) and Bcl-2-related X protein (Bax) in SH-SY5Y cells induced by H_2O_2 at 0.156, 0.313, 0.625 μmol/L of active compound 2 were all detected. **RESULTS** In the concentration gradient range between 0.039 and 0.625 μmol/L, the results of neuroinflammation model experiments showed that Cel, Cel-1 and Cel-2 could reduce the contents of NO, TNF-α, IL-1β, and IL-6 in culture medium of BV2 cells ($P<0.05$ or $P<0.01$); their IC_{50} values for neuroinflammation were (0.25±0.04), (0.61±0.14) and (0.11±0.02) μmol/L respectively. Meanwhile, all of them could reverse the phenomenon of decreased cell survival rate after H_2O_2 treatment in the oxidative damage experiments at a certain concentration ($P<0.05$ or $P<0.01$), with neuroprotective EC_{50} values of (0.43±0.08), (0.45±0.04) and (0.28±0.03) μmol/L, respectively. Induced by H_2O_2, the phosphorylation of PI3K and Akt protein, protein expressions of Bcl-2 and Bcl-2/Bax ratio were all increased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$), while the

Δ**基金项目**　国家自然科学基金项目（No.82104321）；中央本级重大增减支项目（No.2060302）；福建省自然科学基金项目（No.2020J05062）；福建中医药大学基础类学科科研提升计划项目（No.XJC2023009）

＊**第一作者**　硕士研究生。研究方向：中药资源及品质评价。E-mail：2459751484@qq.com

＃**通信作者**　副教授，硕士生导师。研究方向：中药化学成分与活性。E-mail：xushaohua@fjtcm.edu.cn

protein expressions of caspase-3 and Bax were decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). **CONCLUSIONS** Cel, Cel-1, and Cel-2 all have significant neuroprotective activities at certain concentrations, and Cel-2 shows the most significant protective effect. The mechanism of action of Cel-2 may be related to regulating the PI3K/Akt and caspase-3/Bcl-2/Bax signaling pathways, reducing the inflammatory response, oxidative stress damage and inhibiting neuronal apoptosis.

KEYWORDS celastrol; derivatives; neuroprotective; neuroinflammation; oxidative stress

神经退行性疾病是指由于神经细胞或其髓鞘的丧失导致人体出现功能障碍的中枢神经系统疾病，神经炎症、氧化应激、细胞凋亡、兴奋性神经毒素等被认为是诱导该病发生的重要原因[1-2]。目前临床上仍然缺乏治疗此类疾病的方法，开发新型、高效、低毒的神经保护药物迫在眉睫。天然产物具有丰富的药理活性，从中筛选出疗效确切、安全无毒的防治神经退行性疾病的候选药物具有得天独厚的优势。

雷公藤红素（celastrol，Cel）是卫矛科植物雷公藤 *Tripterygiam wilfordil* Hook.F. 的有效成分之一，具有抗炎、抗肿瘤、神经保护等多种药理活性[3]。Liu 等[4]研究表明，Cel 在治疗神经退行性疾病中，主要通过增加抗氧化应激能力、抑制促炎细胞因子及激活神经胶质来减少神经炎症反应、预防神经元损伤，从而发挥神经保护作用。但由于 Cel 存在治疗窗窄、生物利用度低和潜在的毒副作用等问题，研究者们多对其进行结构修饰来获取效果更好、毒性更小的候选化合物[5]。本课题组前期基于生物转化技术对 Cel 进行了结构修饰，即利用橄榄链霉菌 CICC 23628 转化 Cel 得到了 2 个新型 Cel 衍生物——30-羟基-雷公藤红素（Cel-1）和 3，20β，30-trihydroxy-24，29-dinor-1（10），3，5，7-friedelatetraen-2-one（Cel-2）[6]（结构式见图 1），其神经保护作用尚未见报道。

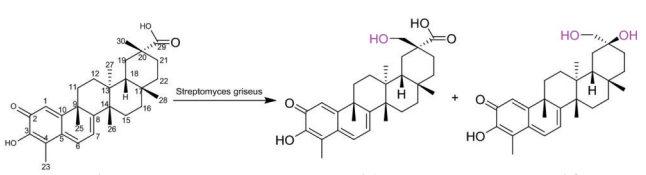


图 1　基于生物转化制备的 Cel 衍生物 Cel-1 和 Cel-2

神经炎症和氧化应激在神经退行性疾病中发挥重要作用。脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）是革兰氏阴性菌内毒素成分，可诱导小鼠小胶质 BV2 细胞释放一系列的炎症因子，表现出严重的神经炎症反应[7-8]。过氧化氢（H_2O_2）是一种主要活性氧，可通过内、外途径诱导人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞凋亡，被广泛用于神经细胞损伤或神经细胞死亡的评估中[9-10]。基于此，本研究在前期研究基础上，分别采用 LPS 诱导构建小胶质 BV2 细胞神经炎症模型和 H_2O_2 诱导构建 SH-SY5Y 细胞氧化损伤模型，从神经炎症和氧化应激 2 个方面比较 Cel 及其衍生物 Cel-1、Cel-2 的神经保护活性，并进一步阐明活性候选化合物的可能作用机制，以期为基于 Cel 衍生物的神经保护药物研究和应用提供依据。

1　材料

1.1　主要仪器

本研究所用的主要仪器包括 REVCO 型 CO_2 培养箱（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）、Infinite M200 Pro 型多功能酶标仪（德国 Tecan 公司）、ECLIPSE TS100-F 型光学显微镜（日本 Nikon 公司）、WIX-easyPR04 型基础电泳仪[韦克斯科技（北京）有限公司]、ChemiDocXRS+ 型凝胶成像分析系统（美国 Bio-Rad 公司）、ZR0Q01600 型超纯水机（美国 Millipore 公司）。

1.2　主要药品与试剂

Cel 对照品（批号 111946-201501，纯度＞98%）购自中国食品药品检定研究院；Cel-1、Cel-2（批号均为 20220820，纯度均大于 98%）均由本课题组前期自制；LPS（批号 L2880，纯度≥99%）购自北京兰博利德生物技术有限公司；DMEM 高糖培养基、胎牛血清、青链霉素（批号分别为 C3113-0500、C04001-500、C3420-0100）均购自上海逍鹏生物科技有限公司；MEM/F12 基础培养基（批号 PM151220）购自武汉普诺赛生物科技有限公司；CCK-8 细胞活力试剂盒、ECL 发光液试剂盒（批号分别为 MA0218-3、MA0186-1）均购自大连美伦生物技术有限公司；一氧化氮（NO）试剂盒、BCA 蛋白定量分析试剂盒（批号分别为 S0021S、P0010）均购自上海碧云天生物技术有限公司；白细胞介素 6（interleukin-6，IL-6）、IL-1β、肿瘤坏死因子 α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）酶联免疫吸附检测（ELISA）试剂盒（批号分别为 MM-0132M1、MM-0163M1、MM-0040M1）均购自江苏酶免实业有限公司；鼠源 β-肌动蛋白（β-actin）抗体（批号 K1716）购自美国 Santa Cruz 公司；兔源磷脂酰肌醇 3 激酶（phosphoinositide 3-kinase，PI3K）、蛋白激酶 B（protein kinase B，Akt）、B 淋巴细胞瘤 2（B-cell lymphoma 2，Bcl-2）、Bcl-2 相关 X 蛋白（Bcl-2 associated X protein，Bax）抗体（货号分别为 20584-1-AP、10176-2、26593-1-AP、50599-2-lg）均购自武汉三鹰生物技术有限公司；兔源胱天蛋白酶 3（caspase-3）、磷酸化 Akt（p-Akt）（Ser473）抗体、辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）标记的山羊抗鼠 IgG 二抗、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗（货号分别为 9662S、4060S、7076S、7074S）均购自美国 CST 公司；兔源磷酸化 PI3K（p-PI3K）（S2448）抗体（货号 Ab182651）购自美国 Abcam 公司。

1.3 细胞

小鼠小胶质BV2细胞购自无锡菩禾生物医药技术有限公司；人神经母细胞瘤SH-SY5Y细胞购自武汉普诺赛生物科技有限公司。

2 方法

2.1 药物配制

称取Cel、Cel-1、Cel-2各1.0 mg，分别溶于二甲基亚砜溶液中，配制成浓度均为10 mmol/L的母液，于4 ℃冰箱中保存备用。临用前，用对应细胞模型所需的培养基稀释至所需浓度。

2.2 细胞培养

将BV2细胞培养于含10%胎牛血清、1%青链霉素的DMEM高糖完全培养基中，将SH-SY5Y细胞培养于含15%胎牛血清、1%青链霉素的MEM/F12完全培养基中，2种细胞均置于37 ℃、5%CO_2培养箱中培养。当细胞达到80%～90%的密度时，用0.25%胰蛋白酶进行消化、传代，待细胞生长至对数生长期时可开展后续实验。

2.3 抗神经炎症活性研究

2.3.1 Cel及其衍生物对BV2细胞毒性的检测

采用CCK-8法进行检测。收集BV2细胞，接种至96孔板中（细胞密度为1×10^5 mL^{-1}，100 μL/孔），于细胞培养箱中常规培养。实验设空白组（无细胞）、对照组（含细胞不含药物）和Cel及其衍生物的不同浓度组（给药浓度均为20、10、5、2.5、1.25、0.625 μmol/L，根据参考文献中所报道的Cel给药浓度范围确定[4]），每组设5个复孔。加药/培养基继续培养24 h后弃上清液，每孔以换液形式加入含10% CCK-8的DMEM高糖培养基100 μL。培养2 h后，用酶标仪在450 nm波长处测定其光密度（optical density，OD）值，计算细胞抑制率，并通过细胞抑制率计算Cel、Cel-1、Cel-2对BV2细胞的半数抑制浓度（median inhibition concentration，IC_{50}）。细胞抑制率（%）=[（对照组OD－给药组OD）/（对照组OD－空白组OD）]×100%。

2.3.2 Cel及其衍生物对BV2细胞培养液中NO含量的影响

采用Griess法进行检测。取BV2细胞，按照“2.3.1”项下的细胞密度进行铺板，待细胞融合至培养皿80%左右的密度时即可更换为含药或不含药的无血清DMEM高糖培养基。实验分为对照组、模型组和Cel及其衍生物的不同浓度组（给药浓度均为0.625、0.313、0.156、0.078、0.039 μmol/L，根据“2.3.1”项下实验结果确定），每组设4个复孔。给药组先给药干预4 h。除对照组外，其余各组均加入终质量浓度为1 μg/mL的LPS刺激24 h，建立神经炎症模型[11]。造模结束后，移取50 μL细胞培养液于新的96孔板内，再依次加入Griess Reagent Ⅰ和Ⅱ各50 μL，利用酶标仪在540 nm波长处测定OD值。根据Griess试剂盒说明书，将$NaNO_2$稀释成浓度分别为0、1、2、5、10、20、40、60、100 μmol/L的系列溶液，制作标准曲线，检测细胞培养液中NO含量并计算药物对神经炎症的抑制率，并根据抑制率计算出Cel、Cel-1、Cel-2对神经炎症的IC_{50}。抑制率（%）=[（模型组OD－给药组OD）/（模型组OD－对照组OD）]×100%。

2.3.3 Cel及其衍生物对BV2细胞培养液中炎症因子含量的影响

采用ELISA法进行检测。取对数生长期的BV2细胞，接种至24孔板中（细胞密度为2×10^5 mL^{-1}，500 μL/孔）。实验分为对照组、模型组和Cel及其衍生物的不同浓度组（给药浓度均为0.156、0.313、0.625 μmol/L，根据“2.3.2”项下实验结果确定），每组设3个复孔。根据“2.3.2”项下方法进行造模，造模结束后，收集细胞培养液。按照ELISA试剂盒说明书操作，测定细胞培养液中TNF-α、IL-1β和IL-6的含量。

2.4 抗氧化损伤活性研究

2.4.1 Cel及其衍生物对SH-SY5Y细胞毒性的影响

采用CCK-8法进行检测。收集SH-SY5Y细胞，接种至96孔板中（细胞密度为5×10^5 mL^{-1}，100 μL/孔），于细胞培养箱中常规培养。分组、给药及后续处理方法参考“2.3.1”项。

2.4.2 Cel及其衍生物对SH-SY5Y细胞存活率的影响

采用CCK-8法进行检测。取SH-SY5Y细胞，按照“2.4.1”项下细胞密度进行铺板，待细胞融合至培养皿90%左右的密度时即可更换为含药或不含药的MEM/F12培养基（含1%血清）。实验分为对照组、模型组和Cel及其衍生物的不同浓度组（给药浓度均为0.625、0.313、0.156、0.078、0.039 μmol/L，根据“2.4.1”项下实验结果确定），每组设4个复孔。给药组先给药干预4 h。除对照组外，其余各组均加入终浓度为200 μmol/L的H_2O_2刺激4 h，建立氧化损伤模型[12]。造模结束后弃上清液，每孔加入100 μL含10% CCK-8试剂的MEM/F12培养基。培养4 h后，用酶标仪在450 nm波长处测定OD值并计算细胞存活率，并根据细胞存活率计算Cel、Cel-1、Cel-2神经保护的半数效应浓度（median effective concentration，EC_{50}）。细胞存活率（%）=[（模型组OD－给药组OD）/（模型组OD－对照组OD）]×100%。

2.5 衍生物Cel-2对SH-SY5Y细胞中凋亡相关蛋白表达的影响

采用Western blot法进行检测。取对数生长期的SH-SY5Y细胞，接种至6孔板中（细胞密度为1×10^6 mL^{-1}，

2 mL/孔），于细胞培养箱中常规培养。按“2.4.2”项下方法分组（其中给药组设低、中、高浓度，分别为0.156、0.313、0.625 μmol/L，浓度根据“2.4.1”项下实验结果确定；每组设3个复孔）、处理、培养。收集细胞进行总蛋白提取，用BCA法测定总蛋白浓度，将蛋白变性后在150 V恒压条件下进行8%烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，随后在恒流400 mA条件下转膜45 min，室温封闭45 min；加入PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、caspase-3、Bax、Bcl-2、β-actin一抗（β-actin的稀释比为1∶200，其余一抗的稀释比均为1∶1 000），4 ℃孵育过夜；TBST洗膜后，加入对应的二抗（稀释比均为1∶2 000），室温孵育1.5 h；TBST洗膜后，滴加ECL化学发光显影液，在凝胶成像系统上进行曝光，采用Image J软件分析各条带的灰度值。以各目标蛋白与内参蛋白（β-actin）条带灰度值的比值表示目标蛋白的表达水平，用磷酸化与对应未磷酸化蛋白表达水平的比值表示该蛋白的磷酸化水平，计算Bcl-2/Bax比值。

2.6 统计学方法

利用SPSS 26.0软件进行统计学分析，采用GraphPad Prism 8.0.1软件制作统计柱形图。数据均以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，方差齐时组间两两比较采用LSD-t检验，方差不齐时组间两两比较采用Games Howell检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 抗神经炎症活性研究结果

3.1.1 Cel及其衍生物对BV2细胞毒性的影响结果

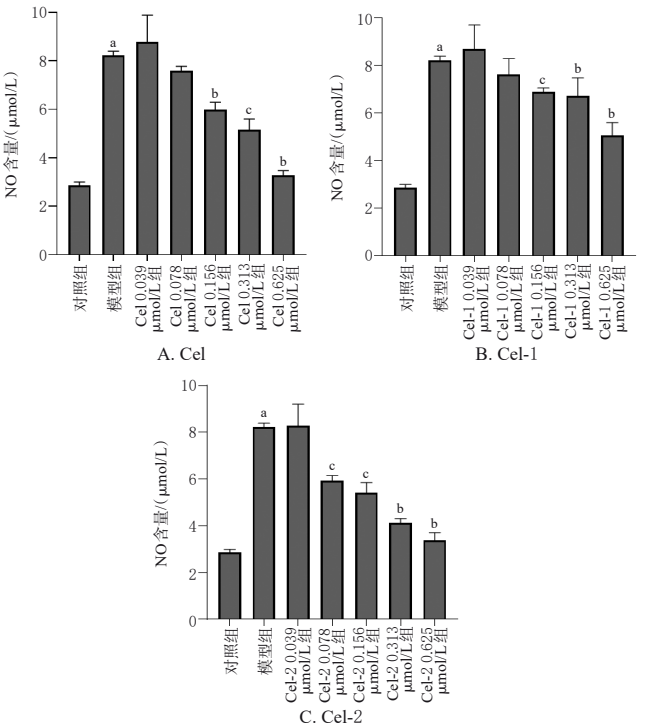
1.25～20 μmol/L Cel及其衍生物作用后BV2细胞的存活率显著下降，提示其存在细胞毒性。Cel、Cel-1、Cel-2对BV2细胞的IC_{50}分别为（1.14±0.08）、（3.14±0.24）、（1.58±0.10）μmol/L（$n=5$）。可见，Cel-2对BV2细胞的毒性作用较Cel小。为了消除Cel及其衍生物的毒性干扰，后续实验选择对细胞生长无显著影响的药物浓度（0.625、0.313、0.156、0.078、0.039 μmol/L）来评估其抗神经炎症活性。

3.1.2 Cel及其衍生物对LPS诱导BV2细胞培养液中NO含量的影响结果

与对照组比较，模型组BV2细胞培养液中NO含量均显著升高（$P<0.01$）。与模型组比较，Cel及其衍生物的0.156、0.313、0.625 μmol/L组细胞培养液中NO含量均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。Cel、Cel-1、Cel-2对神经炎症的IC_{50}分别为（0.25±0.04）、（0.61±0.14）、（0.11±0.02）μmol/L（$n=4$）。可见，Cel-2抑制神经炎的作用效果最优。结果见图2。

3.1.3 Cel及其衍生物对BV2细胞培养液中TNF-α、IL-1β及IL-6含量的影响结果

与对照组比较，模型组细胞培养液中TNF-α、IL-1β及IL-6含量均显著升高（$P<0.01$）。与模型组比较，Cel及其衍生物的不同浓度组细胞培养液中上述指标水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$），并呈现出浓度依赖性趋势。结果见表1。



a：与对照组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.01$；c：与模型组比较，$P<0.05$。

图2 各组细胞培养液中NO含量测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=4$）

表1 各组细胞培养液中TNF-α、IL-1β及IL-6含量的测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$，pg/mL）

组别	TNF-α	IL-1β	IL-6
对照组	566.57±36.33	37.21±4.52	82.62±1.83
模型组	1 989.78±45.12[a]	178.92±14.51[a]	199.53±17.81[a]
Cel 0.156 μmol/L组	1 183.92±40.83[b]	124.45±6.18[b]	155.79±5.47[b]
Cel 0.313 μmol/L组	1 009.26±41.84[b]	95.02±0.79[b]	142.99±1.49[c]
Cel 0.625 μmol/L组	910.61±33.63[c]	87.47±0.64[b]	131.59±4.31[c]
Cel-1 0.156 μmol/L组	1 618.51±67.12[b]	134.59±4.40[b]	177.07±10.07[b]
Cel-1 0.313 μmol/L组	1 274.94±84.38[c]	121.24±4.62[b]	150.63±4.50[c]
Cel-1 0.625 μmol/L组	1 027.70±60.59[c]	101.68±4.56[b]	130.64±4.64[c]
Cel-2 0.156 μmol/L组	1 163.53±25.53[b]	108.67±8.55[b]	155.88±3.71[b]
Cel-2 0.313 μmol/L组	1 053.53±52.51[c]	94.81±4.33[b]	145.82±6.19[c]
Cel-2 0.625 μmol/L组	914.81±51.33[c]	79.74±3.59[b]	121.22±9.35[c]

a：与对照组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与模型组比较，$P<0.01$。

3.2 抗氧化损伤活性的研究结果

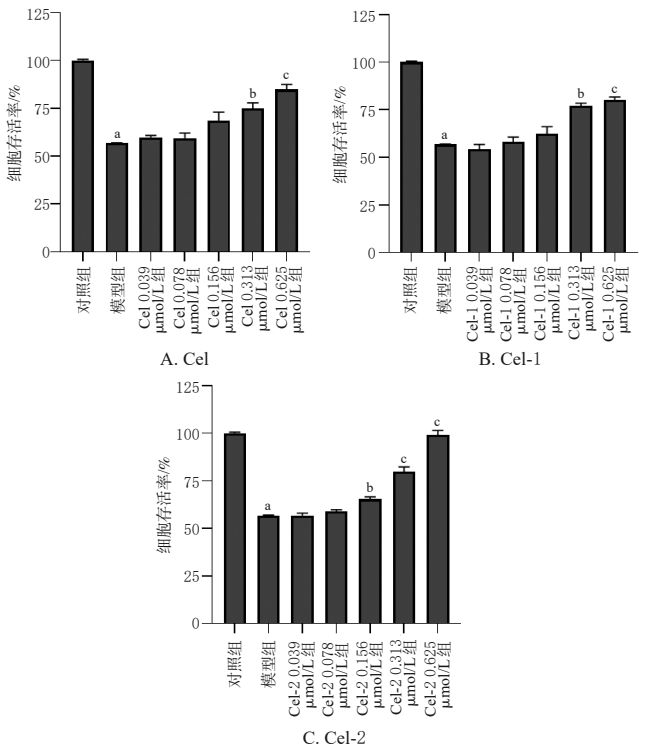
3.2.1 Cel及其衍生物对SH-SY5Y细胞毒性的影响结果

1.25～20 μmol/L的Cel及其衍生物作用后SH-SY5Y细胞的存活率显著下降，提示其存在细胞毒性。Cel、Cel-1、Cel-2对细胞的IC_{50}分别为（1.30±0.09）、（3.90±0.16）、（1.42±0.10）μmol/L（$n=5$）。为了消除

Cel及其衍生物的毒性干扰，后续实验选择对细胞生长无显著影响的药物浓度（0.625、0.313、0.156、0.078、0.039 μmol/L）来评估其抗氧化损伤活性。

3.2.2　Cel及其衍生物对SH-SY5Y细胞存活率的影响结果

与对照组比较，模型组细胞存活率显著降低（$P<0.01$）。与模型组比较，Cel及其衍生物的不同浓度组细胞存活率呈浓度依赖性趋势升高，并且0.313、0.625 μmol/L Cel及其衍生物均可显著逆转H_2O_2处理后细胞存活率降低的现象（$P<0.05$或$P<0.01$）。Cel、Cel-1、Cel-2神经保护的EC_{50}分别为（0.43±0.08）、（0.45±0.04）、（0.28±0.03）μmol/L（$n=5$）。可见，Cel-2的神经保护活性最强。结果见图3。



a：与对照组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与模型组比较，$P<0.01$。

图3　各组SH-SY5Y细胞存活率测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=4$，%）

3.3　衍生物Cel-2对SH-SY5Y细胞中凋亡相关蛋白表达的影响结果

与对照组比较，模型组细胞中PI3K、Akt蛋白的磷酸化水平及Bcl-2蛋白表达水平均显著降低（$P<0.01$），caspase-3、Bax蛋白表达水平和Bcl-2/Bax比值均显著升高（$P<0.01$）；与模型组比较，Cel-2中、高浓度组细胞中PI3K、Akt蛋白的磷酸化水平及Bcl-2蛋白表达水平、Bcl-2/Bax比值均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$），caspase-3、Bax蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见图4、表2。

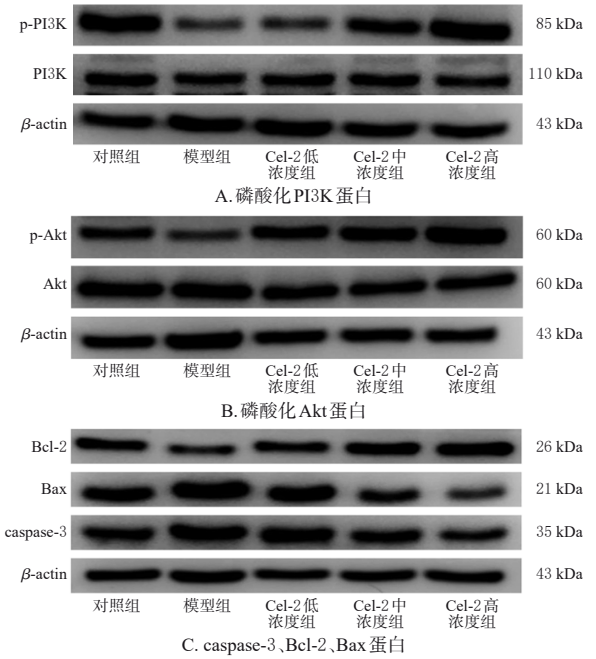


图4　各组细胞中凋亡相关蛋白表达检测的电泳图

表2　各组细胞中凋亡相关蛋白的表达水平测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt	caspase-3/β-actin	Bcl-2/β-actin	Bax/β-actin	Bcl-2/Bax
对照组	1.00±0.18	1.00±0.13	1.00±0.14	1.00±0.10	1.00±0.13	1.00±0.04
模型组	0.61±0.05[a]	0.55±0.18[a]	1.40±0.17[a]	0.59±0.16[a]	1.32±0.03[a]	0.45±0.13[a]
Cel-2低浓度组	0.63±0.10	0.88±0.21[b]	1.40±0.30	0.96±0.02[b]	1.13±0.06[b]	0.85±0.06[b]
Cel-2中浓度组	1.04±0.21[b]	0.97±0.25[b]	1.17±0.30[b]	1.11±0.10[c]	0.94±0.11[c]	1.19±0.08[c]
Cel-2高浓度组	1.29±0.28[b]	1.25±0.11[c]	0.94±0.28[c]	1.21±0.13[c]	0.79±0.15[c]	1.56±0.15[c]

a：与对照组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与模型组比较，$P<0.01$。

4　讨论

随着老龄化群体的增加，神经退行性疾病的发病率在不断攀升，预防与年龄相关的神经退行性疾病是老龄化社会的一个重要问题[13]。其中，神经炎症和氧化应激是神经退行性疾病较为常见的病理表现[7,10]。已有研究表明，Cel在LPS诱导的人神经胶质瘤细胞神经炎症模型中，可显著抑制活性氧产生[2]；Cel在H_2O_2诱导的人视网膜色素上皮细胞中具有减弱氧化损伤和抑制细胞凋亡的作用[14]。本研究结果显示，Cel及其衍生物Cel-1、Cel-2在一定浓度下具有神经保护作用，其神经保护作用大小依次为Cel-2＞Cel＞Cel-1，细胞毒性大小依次为Cel＞Cel-2＞Cel-1。

凋亡是一种由基因高度调控的程序性细胞死亡方式，过度的细胞凋亡可能导致多种疾病的发生[15]。已有研究报道，激活后的BV2细胞可引起炎症反应，进一步损伤神经元；氧化损伤的SH-SY5Y细胞可使神经元凋亡[7,9-10]。caspase-3/Bcl-2/Bax信号通路是细胞凋亡发生发展的重要途径，Bcl-2家族蛋白是调控凋亡因子释放的主要分子，caspase-3是细胞凋亡的中心调节分子[16]。

PI3K/Akt信号通路与氧化应激引起的细胞凋亡密切相关，激活PI3K/Akt信号通路可以抑制细胞凋亡，促进神经元存活，从而抑制神经元的可塑性[17—18]。本研究结果表明，Cel及其衍生物可降低LPS诱导后BV2细胞培养液中NO含量及TNF-α、IL-1β、IL-6含量，说明其发挥神经保护作用可能与减轻神经炎症反应有关；此外，Cel及其衍生物还可逆转H_2O_2诱导的SH-SY5Y细胞存活率降低的现象，其中Cel-2的神经保护活性最强。因此，本研究以Cel-2为研究对象，进一步检测其对凋亡相关蛋白表达的影响。结果显示，Cel-2可升高H_2O_2诱导SH-SY5Y细胞中Bcl-2蛋白表达水平及PI3K、Akt蛋白的磷酸化水平，降低Bax、caspase-3蛋白表达水平。

综上所述，Cel及其衍生物Cel-1、Cel-2均具有一定的神经保护活性，且以Cel-2的活性最强。Cel-2的神经保护作用机制可能与调控PI3K/Akt、caspase-3/Bcl-2/Bax信号通路，减轻炎症反应、氧化应激损伤，抑制神经细胞凋亡有关。但本研究目前仅局限于体外模型，这些活性化合物的具体作用机制尚需进一步通过动物实验加以验证。

参考文献

[1] REY F, OTTOLENGHI S, ZUCCOTTI G V, et al. Mitochondrial dysfunctions in neurodegenerative diseases: role in disease pathogenesis, strategies for analysis and therapeutic prospects[J]. Neural Regen Res, 2022, 17(4): 754-758.

[2] ZHAO Y, ZHAO H L, LOBO N, et al. Celastrol enhances cell viability and inhibits amyloid-β production induced by lipopolysaccharide *in vitro*[J]. J Alzheimers Dis, 2014, 41(3): 835-844.

[3] XU S H, FENG Y Q, HE W S, et al. Celastrol in metabolic diseases: progress and application prospects[J]. Pharmacol Res, 2021, 167: 105572.

[4] LIU D D, ZHANG Q, LUO P, et al. Neuroprotective effects of celastrol in neurodegenerative diseases-unscramble its major mechanisms of action and targets[J]. Aging Dis, 2022, 13(3): 815-836.

[5] HOU W, LIU B, XU H T. Celastrol: progresses in structure-modifications, structure-activity relationships, pharmacology and toxicology[J]. Eur J Med Chem, 2020, 189: 112081.

[6] FENG Y Q, CHEN P P, HUANG C Y, et al. New STAT3 inhibitor through biotransformation of celastrol by *Streptomyces olivaceus* CICC 23628[J]. Arab J Chem, 2023, 16(2): 104456.

[7] TSENG Y T, HSU Y Y, SHIH Y T, et al. Paeonol attenuates microglia-mediated inflammation and oxidative stress-induced neurotoxicity in rat primary microglia and cortical neurons[J]. Shock, 2012, 37(3): 312-318.

[8] ZHANG G, GHOSH S. Molecular mechanisms of NF-κB activation induced by bacterial lipopolysaccharide through Toll-like receptors[J]. J Endotoxin Res, 2000, 6(6): 453-457.

[9] XICOY H, WIERINGA B, MARTENS G J M. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review[J]. Mol Neurodegener, 2017, 12(1): 10.

[10] LOPEZ-SUAREZ L, AWABDH S A, COUMOUL X, et al. The SH-SY5Y human neuroblastoma cell line, a relevant *in vitro* cell model for investigating neurotoxicology in human: focus on organic pollutants[J]. Neurotoxicology, 2022, 92: 131-155.

[11] DHEEN S T, KAUR C, LING E G. Microglial activation and its implications in the brain diseases[J]. Curr Med Chem, 2007, 14(11): 1189-1197.

[12] TIAN W S, ZHAO J, LEE J H, et al. Neuroprotective effects of *Cornus officinalis* on stress-induced hippocampal deficits in rats and H_2O_2-induced neurotoxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells[J]. Antioxidants, 2019, 9(1): 27.

[13] WYSS-CORAY T. Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation[J]. Nature, 2016, 539(7628): 180-186.

[14] DU Z J, ZHANG W, WANG S Y, et al. Celastrol protects human retinal pigment epithelial cells against hydrogen peroxide mediated oxidative stress, autophagy, and apoptosis through sirtuin 3 signal pathway[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(6): 10413-10420.

[15] 张冬梅，张洁，石志群，等. 黄芩素对缺氧致大鼠皮质神经元细胞损伤的保护作用及机制[J]. 中国药房，2023，34(12)：1431-1436.
ZHANG D M, ZHANG J, SHI Z Q, et al. Protective effect and mechanism of baicalein on hypoxia-induced cortical neuron injury in rats[J]. China Pharm, 2023, 34(12): 1431-1436.

[16] COIMBRA-COSTA D, GARZÓN F, ALVA N, et al. Intermittent hypobaric hypoxic preconditioning provides neuroprotection by increasing antioxidant activity, erythropoietin expression and preventing apoptosis and astrogliosis in the brain of adult rats exposed to acute severe hypoxia[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(10): 5272.

[17] ZHANG R, TENG L L, ZHONG Y, et al. Neuroprotection of isookanin against MPTP-induced cell death of SH-SY5Y cells via BCL2/BAX and PI3K/AKT pathways[J]. Psychopharmacology, 2023, 240(7): 1509-1520.

[18] CHEN M Y, TSAI B C, KUO W W, et al. Diosgenin attenuates myocardial cell apoptosis triggered by oxidative stress through estrogen receptor to activate the PI3K/Akt and ERK axes[J]. Am J Chin Med, 2023, 51(5): 1211-1232.

（收稿日期：2023-09-20　修回日期：2023-12-28）
（编辑：林　静）