

松油烯-4-醇通过线粒体途径诱导宫颈癌 Siha 细胞凋亡的机制研究

袁乡石, 苏羽岫, 荣冬芸, 曹 煜*, 王 叶, 唐姗姗
(贵州医科大学, 贵州 贵阳 550004)

摘要: **目的** 探讨松油烯-4-醇对宫颈癌 Siha 细胞凋亡的影响以及其可能的机制。**方法** 采用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养 Siha 细胞, 并将其分为对照组、顺铂组 (10 $\mu\text{mol/L}$) 和 5、7.5、10 $\mu\text{mol/L}$ 松油烯-4-醇组。MTT 法检测不同浓度松油烯-4-醇对 Siha 细胞增殖的影响, TUNEL 荧光染色法和 Annexin V-FITC/PI 法检测 Siha 细胞凋亡情况, JC-1 染色检测线粒体膜电位变化, RT-qPCR 法检测 Siha 细胞 *Bax*、*cytochrome c*、*caspase9*、*HPV E6/E7* mRNA 表达, Western blot 法检测 Siha 细胞 *Bax*、*Bcl-2*、*cytochrome c*、cleaved-*caspase9* 蛋白表达。**结果** 松油烯-4-醇 (5、7.5、10 $\mu\text{mol/L}$) 处理 Siha 细胞 24 h 后, 细胞增殖能力减弱 ($P<0.05$), 细胞凋亡率升高 ($P<0.05$), 线粒体膜电位降低 ($P<0.05$), 细胞 *Bax*、*cytochrome c*、cleaved-*caspase9* 蛋白表达升高 ($P<0.05$), *Bcl-2* 蛋白表达降低 ($P<0.05$), 细胞 *Bax*、*cytochrome c*、*caspase9* mRNA 表达升高 ($P<0.05$), *HPV E6/E7* mRNA 表达降低 ($P<0.05$), 并呈剂量依赖性。**结论** 松油烯-4-醇能抑制 Siha 细胞体外增殖, 诱导细胞凋亡, 其作用机制可能与线粒体途径调控细胞 *Bax*、*Bcl-2*、*cytochrome c*、cleaved-*caspase9* 的表达, 并降低 *HPV E6/E7* mRNA 表达有关。

关键词: 松油烯-4-醇; Siha 细胞; 增殖; 凋亡; 线粒体

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)10-3433-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.10.047

宫颈癌是人类最常见的乳头状瘤病毒 (HPV) 相关癌症, 疫苗接种在很大程度上仍然无法普及, 一旦确诊, 预后较差, 特别是转移或复发性病例^[1]。免疫治疗和靶向治疗已经能够延长整体生存期^[2], 然而存在与化疗相关的缺点, 包括频繁复发、耐药性、对剩余的非癌细胞的副作用^[3]。因此, 寻找适合的药物治疗宫颈癌已成为科研界密切关注的问题。珊瑚姜为苗医常用药材, 具有抗细菌、抗真菌及抗肿瘤等活性^[4-5], 松油烯-4-醇是其主要成分之一^[6-7], 具有抗炎、抗肿瘤、抗菌等活性^[8-9]。松油烯-4-醇被证明对人黑色素瘤细胞^[10]、人非小细胞肺癌^[11]、人白血病细胞^[8]、人胃肠肿瘤细胞^[12]具有抑制作用。但对于人宫颈癌 Siha 细胞的影响及其作用机制方面的研究却少有报道。课题组前期研究发现, 松油烯-4-醇具有较强的抗宫颈癌活性, 表明它也是一种很好的抗宫颈癌候选药物。因此, 本研究将进一步探索松油烯-4-醇对人宫颈癌 Siha 细胞的影响及其作用机制。

1 材料

1.1 细胞 人宫颈癌 Siha 细胞系购自广州吉妮欧生物科技有限公司, 用含 10% FBS 的 DMEM 培养基于 5% CO₂、37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中培养, 待细胞长至 85% 左右时进行传代及后续细胞实验。

1.2 试剂 松油烯-4-醇 (纯度 $\geq 95\%$, 货号 1125A021,

北京索莱宝科技有限公司)。一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (货号 C1086, 上海碧云天生物技术有限公司); Annexin V-FITC/PI 试剂盒、JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒 (货号 MA0220-1、MA0338, 大连美仑生物技术有限公司); RT-qPCR 逆转录试剂盒 [货号 RR036A, 生工生物工程 (上海) 股份有限公司]; 山羊抗兔二抗、山羊抗鼠二抗 (货号 ZB2301、ZB2305, 北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.3 仪器 共聚焦显微镜 (日本 Olympus 公司); RT-qPCR 仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 电泳仪 (北京六一生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 共聚焦显微镜观察细胞形态变化 将 Siha 细胞以每孔 1×10^5 个的密度接种至 6 孔板, 贴壁后分别用 0 (即 0.1% DMSO 处理的对照组)、5、7.5、10 $\mu\text{mol/L}$ 松油烯-4-醇、10 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂 (阳性对照组) 处理 24 h, 通过共聚焦显微镜 ($\times 200$) 明场视野观察细胞形态变化。

2.2 MTT 法检测细胞相对增殖率 将 Siha 细胞以每孔 5 000 个的密度接种至 96 孔板, 贴壁后分别用 0、5、7.5、10 $\mu\text{mol/L}$ 松油烯-4-醇及 10 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂处理细胞, 24 h 后加入 10 μL MTT 溶液, 继续培养 4 h 后吸弃培养基, 加入 150 μL DMSO, 采用酶标仪检测各孔在 490 nm 波长处的吸光度 (*A*), 计算细胞增殖率。

收稿日期: 2022-04-13

基金项目: 贵州省发展和改革委员会健康大学城行动项目 (黔发改规划 2018 [1571] 号); 贵州省科技计划项目 (黔科合基础-ZK [2021] 号)

作者简介: 袁乡石 (1986—), 女, 硕士, 从事中药现代化抗皮肤鳞状细胞癌机制研究。Tel: 16608516717, E-mail: 450379357@qq.com

* 通信作者: 曹 煜 (1963—), 男, 教授, 博士生导师, 从事中药现代化抗皮肤鳞状细胞癌机制研究。E-mail: 2692327139@qq.com

2.3 流式细胞术检测细胞凋亡率 按“2.1”项下方法处理细胞,用不含 EDTA 的胰酶消化,离心并用流式缓冲液吹散细胞,再加入 5 μL Annexin V-FITC、10 μL PI 避光室温孵育 15 min,流式细胞仪上机检测并记录。细胞凋亡率=早期细胞凋亡率+晚期细胞凋亡率。

2.4 TUNEL 法检测细胞凋亡水平 按“2.1”项下方法处理细胞,PBS 洗涤 1 次,4% 多聚甲醛固定 30 min,PBS 洗涤后用含 0.3% TritonX-100 的 PBS 室温孵育 5 min,PBS 洗涤后加 50 μL TUNEL 检测液,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 60 min。通过共聚焦显微镜观察各组 Siha 细胞染色情况,以细胞核呈绿色荧光为 TUNEL 阳性细胞,统计高倍镜($\times 400$)下阳性细胞数目,评估 Siha 细胞凋亡水平。

2.5 线粒体膜电位检测 按“2.1”项下方法处理细胞,PBS 洗涤 1 次,加入 1 mL 细胞培养液,再加入 1 mL JC-1 染色工作液,充分混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min,吸弃上清,用 JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次,再加入 2 mL 细胞培养液,通过共聚焦显微镜($\times 200$)观察。当线粒体膜电位($\Delta\psi\text{m}$)大于 120 mV 时,JC-1 在线粒体基质中形成聚合物,被 490 nm 波长激发光激发后发出红光;当线粒体膜电位($\Delta\psi\text{m}$)小于 120 mV 时,JC-1 不能聚集在线粒体基质中,单体 JC-1 被 490 nm 波长激发光激发后发出绿光,采用 Image J 软件统计红色和绿色荧光强度,以红色和绿色荧光的比值表示线粒体膜电位的变化。

2.6 Western blot 法检测细胞 Bax、Bcl-2、cleaved-caspase9、cytochrome c 蛋白表达 Siha 细胞以每皿 3.0×10^6 个的密度接种至培养皿中,贴壁后分别用 0、5、7.5、10 $\mu\text{mol/L}$ 松油烯-4-醇及 10 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂处理细胞 24 h,收集各组细胞并提取总蛋白,经电泳、转膜、封闭后孵育一抗、二抗,化学发光试剂(ECL)显影,采用 Image J 软件进行灰度分析。

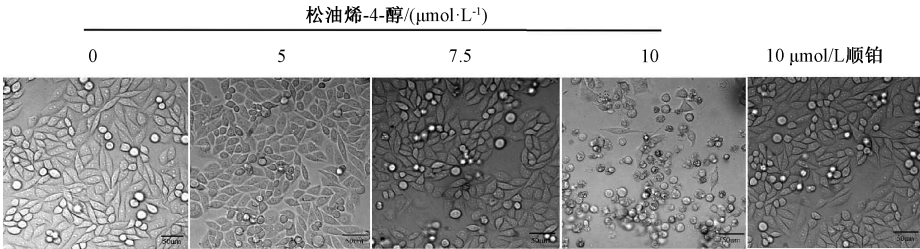


图 1 各组细胞形态变化 ($\times 200$)

3.2 松油烯-4-醇对 Siha 细胞增殖率的影响 与对照组比较,各浓度松油烯-4-醇组、10 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂组细胞增殖率降低($P<0.05$),并且松油烯-4-醇作用呈剂量依赖性;与 10 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂组比较,10 $\mu\text{mol/L}$ 松油烯-4-醇组细胞增殖率降低($P<0.05$),见图 2。

3.3 松油烯-4-醇对 Siha 细胞凋亡的影响

3.3.1 流式细胞术 与对照组比较,各浓度松油烯-4-醇组、10 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂组细胞凋亡率升高($P<0.05$),并且松油烯-4-醇作用呈剂量依赖性;与 10 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂组比较,10 $\mu\text{mol/L}$ 松油烯-4-醇组细胞凋亡率升高($P<0.05$),见

2.7 RT-qPCR 法检测细胞 Bax、caspase9、cytochrome c、HPV E6/E7 mRNA 表达 TRIzol 试剂提取 Siha 细胞中 RNA,使用 cDNA 合成试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA,并进行 RT-qPCR 分析,反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s,64 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,共 30 个循环。以 β -actin 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算目的基因相对表达。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	引物序列(5'→3')
Bax	正向 TCACCGCCTCACTCACCAT
	反向 AGACCACTCTTCCACACACC
caspase9	正向 GTCGCTAATGCTGTTTCGGT
	反向 GCAAGATAAGGCAGGGTGAG
cytochrome c	正向 TCTGAGCTCCTGGCTTTTGTC
	反向 GGCTTCTGTTGCTTTTGCT
HPV E6	正向 CAGGAGCGACCCAGAAAGTT
	反向 GCAGTAAGTGTGCTTGCACT
HPV E7	正向 TGTGACTCTACGCTTCGGTT
	反向 CTAGTGTGCCCATTAACAGGT
β -actin	正向 AGTCGGTTGGAGCGAGCATC
	反向 TGTGGACTTGGGAGAGGACTGG

2.8 统计学分析 通过 SPSS 21.0 软件进行处理,数据以($\bar{x}\pm s$)表示,2 组间比较采用 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。

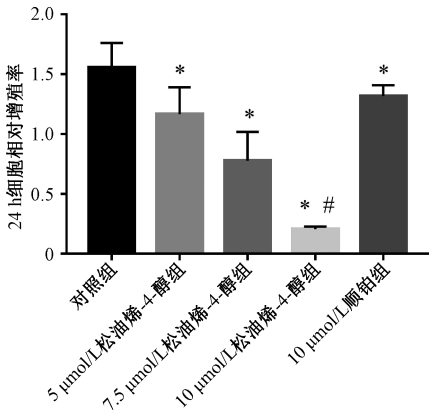
3 结果

3.1 松油烯-4-醇对 Siha 细胞形态变化的影响 各浓度松油烯-4-醇、10 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂处理 Siha 细胞后,细胞变小变圆,细胞质浓缩、形态不规则,细胞膜皱缩,细胞间距离增加,出现很多漂浮细胞,培养基中出现细胞碎片,见图 1。

图 3。

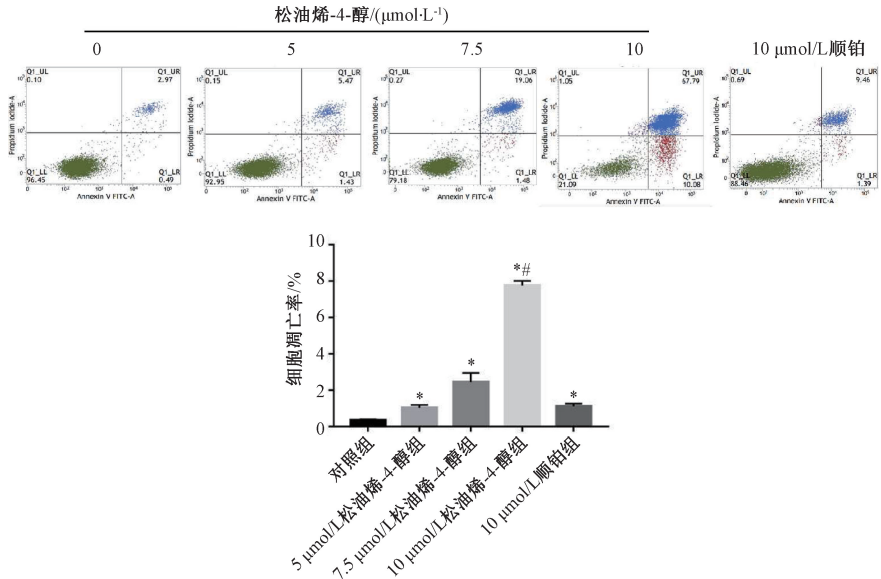
3.3.2 TUNEL 染色 与对照组比较,各浓度松油烯-4-醇组、10 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂组凋亡细胞数增加($P<0.05$),并且松油烯-4-醇作用呈剂量依赖性;与 10 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂组比较,10 $\mu\text{mol/L}$ 松油烯-4-醇组凋亡细胞数增加($P<0.05$),见图 4。

3.4 松油烯-4-醇对 Siha 细胞线粒体膜电位的影响 线粒体膜电位偏高的对照组细胞发出强烈的红色荧光,随着松油烯-4-醇浓度增加,红色荧光逐渐减弱,而绿色荧光逐渐增加,10 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂组细胞膜上仍可见大量红色荧光。与



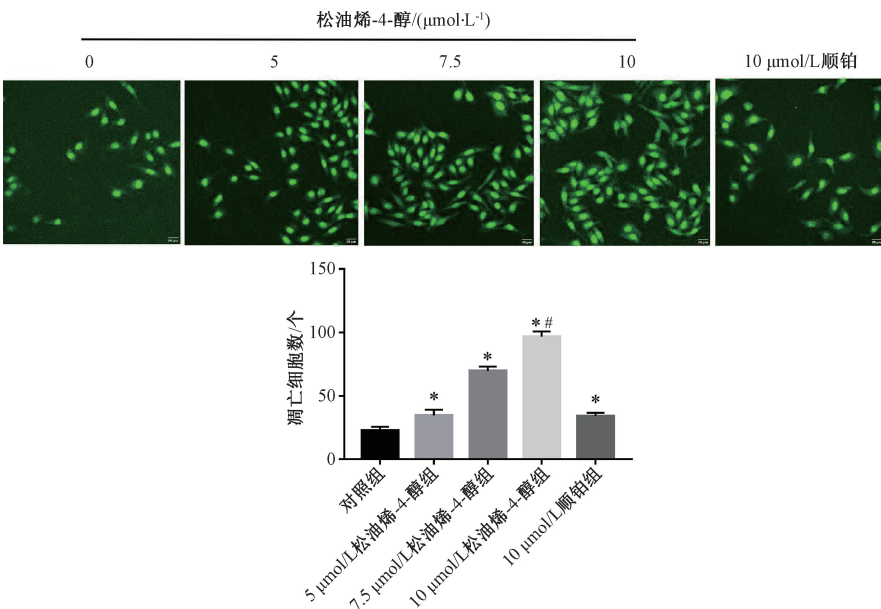
注：与对照组比较, * $P<0.05$; 与 10 μmol/L 顺铂组比较, # $P<0.05$ 。

图 2 各组细胞相对增殖率变化 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)



注：与对照组比较, * $P<0.05$; 与 10 μmol/L 顺铂组比较, # $P<0.05$ 。

图 3 各组细胞凋亡率变化 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

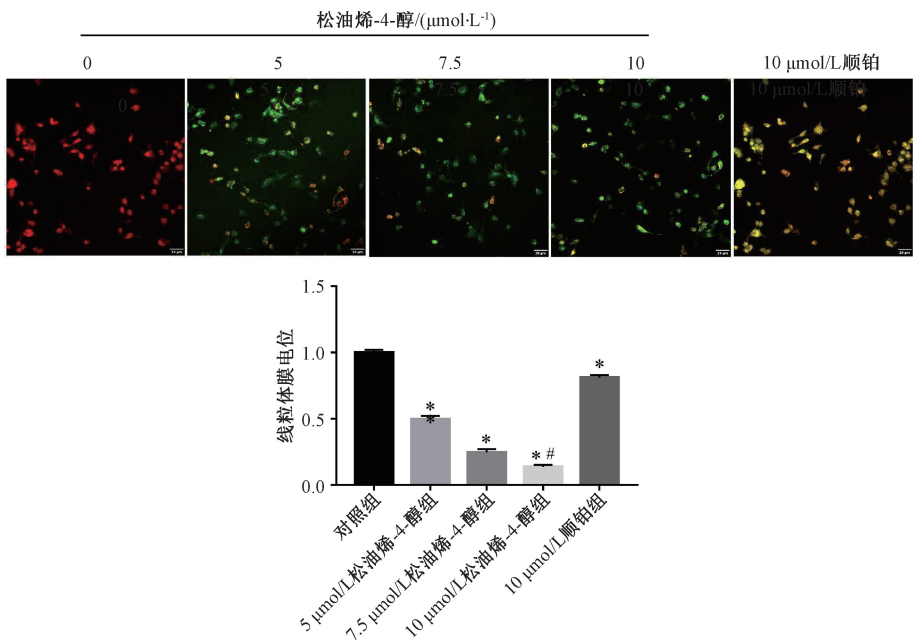


注：与对照组比较, * $P<0.05$; 与 10 μmol/L 顺铂组比较, # $P<0.05$ 。

图 4 各组凋亡细胞数变化 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

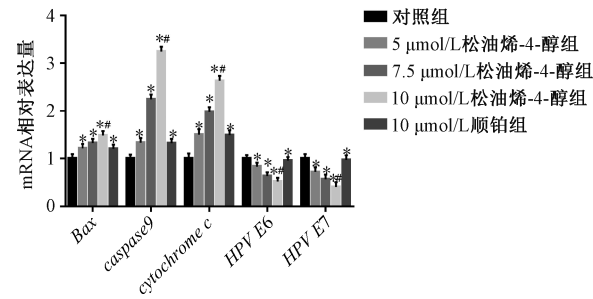
对照组比较, 各浓度松油烯-4-醇组、10 μmol/L 顺铂组线粒体膜电位降低 ($P<0.05$), 并且松油烯-4-醇作用呈剂量依赖性; 与 10 μmol/L 顺铂组比较, 10 μmol/L 松油烯-4-醇组线粒体膜电位降低 ($P<0.05$), 见图 5。

3.5 松油烯-4-醇对 Siha 细胞 *Bax*、*caspase9*、*cytochrome c*、*HPV E6*、*HPV E7* mRNA 表达的影响 与对照组比较, 各浓度松油烯-4-醇组、10 μmol/L 顺铂组 *HPV E6/E7* mRNA 表达降低 ($P<0.05$), *Bax*、*caspase9*、*cytochrome c* mRNA 表达升高 ($P<0.05$), 并且松油烯-4-醇作用呈剂量依赖性; 与 10 μmol/L 顺铂组比较, 10 μmol/L 松油烯-4-醇组细胞 *HPV E6/E7* mRNA 表达降低 ($P<0.05$), *Bax*、*caspase9*、*cytochrome c* mRNA 表达升高 ($P<0.05$), 见图 6。



注：与对照组比较，* $P<0.05$ ；与 10 μmol/L 顺铂组比较，# $P<0.05$ 。

图 5 各组细胞线粒体膜电位变化 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)



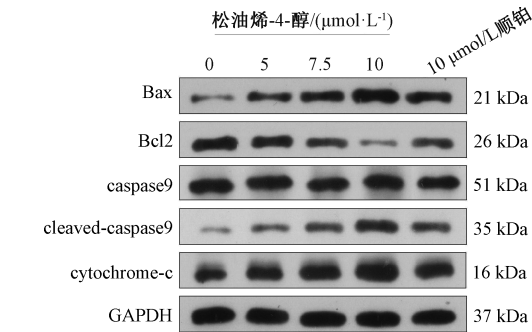
注：与对照组比较，* $P<0.05$ ；与 10 μmol/L 顺铂组比较，# $P<0.05$ 。

图 6 各组细胞 *Bax*、*caspase9*、*cytochrome c*、*HPV E6*、*HPV E7* mRNA 表达变化 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

3.6 松油烯-4-醇对 SiHa 细胞 *Bax*、*Bcl-2*、cleaved-caspase9、cytochrome *c* 蛋白表达的影响 与对照组比较，各浓度松油烯-4-醇组、10 μmol/L 顺铂组细胞 *Bax*、cleaved-caspase9、cytochrome *c* 蛋白表达升高 ($P<0.05$)，*Bcl-2* 蛋白表达降低 ($P<0.05$)，并且松油烯-4-醇作用呈剂量依赖性；与 10 μmol/L 顺铂组比较，10 μmol/L 松油烯-4-醇组细胞 *Bax*、cleaved-caspase9、cytochrome *c* 蛋白表达升高 ($P<0.05$)，*Bcl-2* 蛋白表达降低 ($P<0.05$)，见图 7。

4 讨论

松油烯-4-醇是一种从芳香植物中提取的精油^[13]，主要通过诱导细胞凋亡发挥抗癌活性^[8,10-12]。本研究发现，松油



注：与对照组比较，* $P<0.05$ ；与 10 μmol/L 顺铂组比较，# $P<0.05$ 。

图 7 各组细胞 *Bax*、*Bcl2*、*caspase9*、cleaved-caspase9、cytochrome *c* 蛋白表达变化 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

烯-4-醇对 SiHa 细胞有较强的抑制作用，包括抑制细胞增殖、促进细胞凋亡、降低细胞内癌基因表达等。越来越多的证据表明，*Bax* 是宫颈癌细胞凋亡的关键介质，激活 *Bax* 可能是宫颈癌治疗的新策略^[14]。*Bax* 是 *Bcl-2* 家族的一个关键促凋亡蛋白，是线粒体途径的主要调节因子^[15]，其可促

进细胞凋亡^[16-17]。线粒体是活细胞中产生能量的重要细胞器，其功能障碍与细胞凋亡、坏死和自噬有关^[18]。本研究发现，不同浓度松油烯-4-醇作用于 SiHa 细胞后，细胞变小、变圆，细胞质浓缩，细胞膜皱缩，细胞间距离增加，出现很多漂浮细胞，细胞增殖受到抑制，细胞凋亡率及调

亡细胞数增多, Bax 蛋白和 mRNA 表达均升高, Bcl-2 蛋白表达降低, 并呈现出明显的剂量依赖性, 提示松油烯-4-醇可能通过调节 Bcl-2 家族相关蛋白的表达诱导 Siha 细胞凋亡。本研究发现, 线粒体膜电位 ($\Delta\psi_m$) 随着松油烯-4-醇浓度增加而逐渐降低, 造成线粒体功能障碍, 提示线粒体参与了细胞凋亡的调控。线粒体膜电位的丧失总是伴随着 cytochrome c 的释放^[19]。cytochrome c 在 dATP 或 ATP 存在的情况下直接激活 Apaf-1, 并诱导形成名为“凋亡小体”的多聚体复合物, 该复合物介导了启动子 caspase-9 的激活^[20-21]。本研究结果显示, caspase9 蛋白表达没有明显变化, 但 cleaved-caspase9、cytochrome c 蛋白和 mRNA 表达均升高, 提示松油烯-4-醇可能启动线粒体依赖的内源性凋亡途径, 导致线粒体功能障碍, 线粒体膜电位降低, 释放大量 cytochrome c, 同时激活 caspase-9, 诱导细胞凋亡。

大约 5% 的宫颈癌与人乳头瘤病毒感染有关, 几乎所有宫颈癌病例都可归因于高危 HPV 感染^[22]。大多数 HPV 感染是有害和自发清除的, 但持续的高危 HPV 感染 (特别是 16 型和 18 型) 可导致宫颈癌发生^[23-25]。高危乳头状瘤病毒有 2 种癌基因, 即病毒 E6 和 E7 基因, HPV E6/E7 癌基因的表达对 HPV 的转化活性至关重要, 可以影响细胞 mRNA 的合成, 因此深入了解 HPV E6/E7 癌基因的表达具有重要作用^[26]。本研究表明, 松油烯-4-醇可降低细胞内 HPV E6/E7 mRNA 表达, 可能通过抑制细胞内相关癌基因的表达从而起到抑制宫颈癌的作用。

综上所述, 松油烯-4-醇具有较强的抗肿瘤细胞作用, 可抑制 Siha 细胞增殖, 并通过线粒体途径诱导细胞凋亡, 升高凋亡相关蛋白 Bax、cytochrome c、cleaved-caspase9 的表达, 降低 Bcl-2 的表达, 同时降低 HPV E6/E7 癌基因的表达。本研究为临床开发中药治疗宫颈癌提供了实验依据, 有望为临床治疗宫颈癌提供有效药物。

参考文献:

[1] Canfell K, Kim J J, Brisson M, *et al.* Mortality impact of achieving WHO cervical cancer elimination targets: a comparative modelling analysis in 78 low-income and lower-middle-income countries [J]. *Lancet*, 2020, 395 (10224): 591-603.

[2] Wiertel I, Suszczyk D, Pawłowska A, *et al.* Prognostic and clinical value of interleukin 6 and CD45⁺ CD14⁺ inflammatory cells with PD-L1⁺/PD-L2⁺ expression in patients with different manifestation of ovarian cancer [J]. *J Immunol Res*, 2020, 2020: 1715064.

[3] Huang X M, Yang Z J, Xie Q, *et al.* Natural products for treating colorectal cancer: a mechanistic review [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 117: 109142.

[4] 周琳琳, 杨 策, 王海燕, 等. 珊瑚姜油对常见耐药菌的抑菌作用及急性毒性实验 [J]. 第三军医大学学报, 2010, 32 (2): 111-114.

[5] 曹 煜, 张士英. 野生植物珊瑚姜抗真菌研究及临床疗效观察 [J]. 中华皮肤科杂志, 1989, 22 (2): 103-105.

[6] 罗世琼, 彭全材, 杨雪鸥, 等. 珊瑚姜精油化学成分及其对 4 种植物病原真菌的抑制活性 [J]. 广东农业科学, 2013, 40 (17): 84-86.

[7] 陈文慧, 曹 煜, 杨占南. 珊瑚姜中挥发油的化学成分分析 [J]. 华西药学杂志, 2008, 23 (6): 718-719.

[8] Banjerdpongchai R, Khaw-on P. Terpinen-4-ol induces autophagic and apoptotic cell death in human leukemic HL-60 cells [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14 (12): 7537-7542.

[9] 涂云华, 李明娥, 康颖倩, 等. 松油烯-4-醇对人黑色素瘤 WM35 细胞增殖及凋亡的影响 [J]. 实用医学杂志, 2016, 32 (10): 1584-1587.

[10] Calcabrini A, Stringaro A, Toccaceli L, *et al.* Terpinen-4-ol, the main component of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits the *in vitro* growth of human melanoma cells [J]. *J Invest Dermatol*, 2004, 122 (2): 349-360.

[11] Wu C S, Chen Y J, Chen J J, *et al.* Terpinen-4-ol induces apoptosis in human nonsmall cell lung cancer *in vitro* and *in vivo* [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012: 818261.

[12] Shapira S, Pleban S, Kazanov D, *et al.* Terpinen-4-ol: a novel and promising therapeutic agent for human gastrointestinal cancers [J]. *PLoS One*, 2016, 11 (6): e0156540.

[13] Pazyar N, Yaghoobi R, Bagherani N, *et al.* A review of applications of tea tree oil in dermatology [J]. *Int J Dermatol*, 2013, 52 (7): 784-790.

[14] Won M, Luo Y Y, Lee D H, *et al.* BAX is an essential key mediator of AP5M1-induced apoptosis in cervical carcinoma cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 518 (2): 368-373.

[15] Cosentino K, García-sáez A J. Bax and Bak pores: are we closing the circle [J]. *Trends Cell Biol*, 2017, 27 (4): 266-275.

[16] Dlugosz P J, Billen L P, Annis M G, *et al.* Bcl-2 changes conformation to inhibit Bax oligomerization [J]. *EMBO J*, 2006, 25 (11): 2287-2296.

[17] Jeong S Y, Seol D W. The role of mitochondria in apoptosis [J]. *BMB Rep*, 2008, 41 (1): 11-22.

[18] Yuan P Y, Mao X, Wu X F, *et al.* Mitochondria-targeting, intracellular delivery of native proteins using biodegradable silica nanoparticles [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2019, 58 (23): 7657-7661.

[19] Shrivastava S, Kulkarni P, Thummuri D, *et al.* Piperlongumine, an alkaloid causes inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling axis to induce caspase-dependent apoptosis in human triple-negative breast cancer cells [J]. *Apoptosis*, 2014, 19 (7): 1148-1164.

[20] Mehrbod P, Ande S R, Alizadeh J, *et al.* The roles of apoptosis, autophagy and unfolded protein response in arbovirus, influenza virus, and HIV infections [J]. *Virulence*, 2019, 10 (1): 376-413.

[21] Strasser A, Cory S, Adams J M. Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other

diseases[J]. *EMBO J*, 2011, 30(18): 3667-3683.

[22] Cohen P A, Jhingran A, Oaknin A, *et al.* Cervical cancer[J]. *Lancet*, 2019, 393(10167): 169-182.

[23] Schiffman M, Castle P E, Jeronimo J, *et al.* Human papillomavirus and cervical cancer [J]. *Lancet*, 2007, 370 (9590): 890-907.

[24] 蓝家富. 防城港市 2292 例女性宫颈 HPV 感染与基因分型分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(3): 204-208.

[25] 刚小青, 吴衡慧, 周文磊. 白桦脂醇通过抑制 PI3K/AKT 途径抑制宫颈癌小鼠移植瘤增殖[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(10): 1227-1231.

[26] Honegger A, Schilling D, Sltmann H, *et al.* Identification of E6/E7-dependent microRNAs in HPV-positive cancer cells[J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1699: 119-134.

银杏二萜内酯葡胺对阿尔茨海默病大鼠学习记忆障碍的改善作用

王 颖¹, 王 强¹, 蒋珍秀¹, 陈 军¹, 雒 或^{2*}
(1. 兰州大学第一医院神经内科, 甘肃 兰州 730000; 2. 兰州大学基础医学院病理生理学研究所, 甘肃 兰州 730000)

摘要: **目的** 探讨银杏二萜内酯葡胺对阿尔茨海默病 (AD) 大鼠学习记忆障碍的改善作用及对突触相关蛋白表达的影响。**方法** 40 只大鼠随机分为假手术组、模型组和银杏二萜内酯葡胺低、中、高剂量组 (1.5、3.0、6.0 mg/kg)。通过侧脑室定位注射 A β_{1-42} 建立 AD 大鼠模型, 尾静脉注射给药 4 周后, 通过 Morris 水迷宫实验检测大鼠学习记忆能力, 蛋白免疫印迹法检测大鼠脑组织海马中突触蛋白 NR2B、PSD95、BDNF 表达, 以及下游信号通路蛋白 ERK1/2、CaMK II、CREB、TrkB 表达。**结果** 与模型组比较, 银杏二萜内酯葡胺中、高剂量组大鼠逃避潜伏期缩短 ($P<0.01$), 穿越平台次数、目标象限停留时间和游程增加 ($P<0.01$), 海马 p-NR2B、p-CaMK II、p-ERK、p-CREB、PSD95、BDNF、p-TrkB 蛋白表达升高 ($P<0.01$)。**结论** 银杏二萜内酯葡胺能改善 AD 大鼠学习记忆能力, 其机制可能与激活 NR2B 相关的 CaMK II/ERK/CREB 信号通路, 增强 PSD95、BDNF 表达, 激活 TrkB 信号通路相关。**关键词:** 银杏二萜内酯葡胺; 阿尔茨海默病; 学习记忆; 突触相关蛋白; CaMK II/ERK/CREB 信号通路; TrkB 信号通路
中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)10-3438-04
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.10.048

阿尔茨海默病 (Alzheimer’s disease, AD) 又称老年痴呆, 是一种最常见的老年慢性神经退行性疾病, 65 岁以上人群发病率约 11%, 85 岁则达到了 32%^[1], 患者晚期丧失生活自理能力, 给其亲属和家庭带来严重的经济负担, 影响社会发展^[2]。目前, 仍然没有合适的临床药物能防治 AD, 现有的也只能延缓发病。作为多病因神经退行性疾病, AD 的治疗具有多靶点性^[3-4]。

银杏叶为银杏科植物银杏的叶, 有敛肺气、平喘咳功效, 用于治疗心悸怔忡、肺虚咳喘。现代药理研究证明, 银杏提取物具有神经保护作用, 对学习记忆障碍和老年痴呆症具有一定的防治作用。银杏内酯是银杏叶提取物的主要活性成分, 银杏二萜内酯葡胺注射液主要成分为银杏内酯, 由银杏内酯 A (35%)、B (60%)、C (2%)、K (2%) 等二萜内酯组成^[5]。已有研究表明, 银杏二萜内酯葡胺能改善缺血再灌注大鼠脑缺血引起的行为缺陷, 降低谷氨酸、天冬氨酸等兴奋性氨基酸水平, 增加 γ -氨基丁酸

等抑制性神经递质的释放, 并通过 calpain 通路抑制神经细胞凋亡^[5-8]。银杏二萜内酯葡胺能激活 PI3K/Akt/Nrf2 信号通路, 发挥抗氧化和保护神经细胞的作用^[9-10]。课题组前期研究表明, 银杏二萜内酯葡胺能减轻老年小鼠脑内的炎症反应, 增强自然衰老小鼠学习记忆功能^[11]。但银杏二萜内酯葡胺对 AD 影响的研究较少, 本研究通过建立 AD 大鼠模型, 探讨银杏二萜内酯葡胺对 AD 大鼠认知功能障碍的影响, 并对其相关分子机制作进一步研究。

1 材料

1.1 动物

清洁级 SD 大鼠, 3 月龄, 雌雄各半, 体质量 230~270 g, 由兰州大学实验动物中心提供 [实验动物生产许可证号 SCXK (甘) 2018-0002], 饲养于温度 20~24 $^{\circ}\text{C}$ 、自然光照的实验环境, 自由进食、饮水。本研究涉及的动物实验操作均遵守兰州大学实验动物饲养和使用规范。

1.2 试剂与药物

银杏二萜内酯葡胺注射液 [批号 181005, 5 mL (25 mg) /支, 江苏康缘药业股份有限公

收稿日期: 2022-01-24
基金项目: 甘肃省自然科学基金项目资助项目 (1506RJZA235); 兰州大学中央高校基本科研业务费专项基金资助项目 (lzujbky-2016-70)
作者简介: 王 颖 (1978—), 女, 硕士, 副主任医师, 研究方向为阿尔茨海默病的发病机制、治疗。E-mail: ldyy_wangy@lzu.edu.cn
* 通信作者: 雒 或 (1978—), 男, 博士, 副教授, 研究方向为神经病理生理学。E-mail: luoy@lzu.edu.cn