

五味子醇甲对小鼠神经管畸形的预防作用及其机制研究

茹意¹, 谢良骥¹, 王新亮¹, 肖保国², 金小明³, 马存根¹, 柴智¹, 樊慧杰¹¹山西中医药大学多发性硬化益气活血重点研究室/神经生物学研究中心, 山西晋中 030619; ²复旦大学华山医院神经病学研究所, 上海 200025; ³美国印第安纳大学医学院, 印第安纳波利斯 46202

[中图分类号] R748; R725.8 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.0333.2023.0828

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 茹意, 谢良骥, 王新亮, 等. 五味子醇甲对小鼠神经管畸形的预防作用及其机制研究[J]. 解放军医学杂志, 2023, 48(12): 1370-1377.

[收稿日期] 2023-03-03 [录用日期] 2023-04-06 [上线日期] 2023-08-28

[摘要] 目的 探究五味子醇甲(SCH)对小鼠神经管畸形(NTDs)的预防作用及其机制。方法 将C57BL/6小鼠按照雌雄2:1比例合笼, 将交配后有阴栓的雌鼠(孕鼠)随机分为对照组、模型组、SCH组与叶酸组, 每组9只。除对照组外, 在孕鼠妊娠7.5 d(E 7.5 d)时腹腔注射全反式维甲酸(atRA)(7.5 mg/kg)诱导胎鼠NTDs模型; 在E 0.5 d—E 11.5 d, 叶酸组孕鼠连续灌胃给予叶酸(61.0 μg/(kg·d)), SCH组孕鼠连续灌胃给予SCH(8.0 mg/(kg·d)), 1次/d; 在E 11.5 d实行剖宫产手术取出胎鼠。将PC12细胞分为对照组、模型组与SCH组, 模型组采用atRA(20 μmol/L)处理12 h建立细胞损伤模型, SCH组再使用SCH(2.5 μmol/L)处理24 h。体视显微镜下鉴定胎鼠NTDs; HE染色观察胎鼠神经管闭合情况; Western blotting检测磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路p-PI3K、Akt、p-Akt蛋白表达水平。结果 与对照组比较, 模型组胎鼠NTDs发病率明显升高($P<0.01$); 与模型组比较, 叶酸组和SCH组胎鼠NTDs发病率降低($P<0.01$); 与叶酸组比较, SCH组胎鼠NTDs发病率降低($P<0.01$)。Western blotting检测结果显示, 与对照组比较, 模型组胎鼠组织p-PI3K、p-Akt蛋白表达均明显降低($P<0.01$, $P<0.05$); 与模型组比较, 叶酸组胎鼠组织p-PI3K、p-Akt蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$), SCH组p-PI3K、p-Akt蛋白表达明显增高($P<0.05$)。与对照组比较, 模型组PC12细胞p-PI3K、p-Akt蛋白表达水平降低($P<0.05$); 与模型组比较, SCH组PC12细胞p-PI3K、p-Akt蛋白表达水平增高($P<0.05$)。结论 SCH可降低atRA导致的胎鼠NTDs发病率, 其预防效果优于叶酸, 这可能与激活PI3K/Akt信号通路有关。

[关键词] 神经管畸形; 五味子醇甲; PI3K/Akt信号通路; 预防

Study on the preventive effect of schisandrin on neural tube defects in mice and its mechanism

Ru Yi¹, Xie Liang-Qi¹, Wang Xin-Liang¹, Xiao Bao-Guo², Jin Xiao-Ming³, Ma Cun-Gen¹, Chai Zhi¹, Fan Hui-Jie¹*¹Key Laboratory of Multiple Sclerosis Supplementing Qi and Promoting Blood Circulation/Neurobiology Research Center, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong, Shanxi 030619, China²Institute of Neurology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200025, China³Indiana University School of Medicine, Indianapolis 46202, USA

*Corresponding author. Fan Hui-Jie, E-mail: fanhuijie@sxtcm.edu.cn; Ma Cun-Gen, E-mail: macungen@sxtcm.edu.cn

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81703978), the Natural Science Foundation of Shanxi Province (20210302124293), and the Science and Technology Innovation Ability Cultivation Project of Shanxi University of Chinese Medicine (2020PY-JC-03, 2022PY-TH-16)

[Abstract] **Objective** To investigate the preventive effect of schisandrin (SCH) on fetal neural tube defects (NTDs) of mice and its mechanism. **Methods** C57BL/6 mice were mated with female and male at a ratio of 2:1. Pregnant female mice with vaginal plug after mating were randomly divided into control group, model group, SCH group, and folic acid group, with 9 mice in each group.

[基金项目] 国家自然科学基金(81703978); 山西省自然科学基金(20210302124293); 山西中医药大学科技创新能力培育项目(2020PY-JC-03, 2022PY-TH-16)**[作者简介]** 茹意, 硕士研究生, 主要从事神经系统疾病的中西医结合防治研究**[通信作者]** 樊慧杰, E-mail: fanhuijie@sxtcm.edu.cn; 马存根, E-mail: macungen@sxtcm.edu.cn

The NTDs fetal mice model was induced by intraperitoneal injection of all-trans retinoic acid (atRA) (7.5 mg/kg) on embryonic day 7.5 (E 7.5 d). During E 0.5 d-E 11.5 d, pregnant rats in folic acid group were given folic acid [61.0 μg/(kg·d)] by gavage once a day, and pregnant rats in SCH group were given SCH [8.0 mg/(kg·d)] by gavage once a day. Fetal mice were removed by cesarean section on E 11.5 d. PC12 cells were divided into control group, model group and SCH group. PC12 cells were treated with atRA (20 μmol/L) for 12 hours to establish cell damage model in model group, and treated with SCH (2.5 μmol/L) for 24 hours in SCH group. Fetuses were identified NTDs by stereoscopic microscopy. HE staining was used to observe the closure of the neural tube. The expression levels of p-PI3K, Akt and p-Akt molecules in PI3K/Akt signaling pathway were detected by Western Blotting. **Results** Compared with control group, the incidence of NTDs was significantly increased in mice of model group ($P<0.01$); compared with model group, the incidence of NTDs was decreased in folic acid group and SCH group ($P<0.01$); compared with folic acid group, SCH group had a lower incidence of NTDs ($P<0.01$). Western Blotting results showed that compared with control group, the expression of p-PI3K and p-Akt protein in fetal tissues of model group was significantly decreased ($P<0.01$, $P<0.05$); compared with model group, there was no significant difference in expression of p-PI3K and p-Akt in fetal tissues of folic acid group ($P>0.05$), while the expression of p-PI3K and p-Akt protein in SCH group was significantly higher ($P<0.05$). Compared with control group, PC12 cells in model group showed lower expression levels of p-PI3K and p-Akt ($P<0.05$); compared with model group, PC12 cells in SCH group showed higher expression levels of p-PI3K and p-Akt ($P<0.05$). **Conclusions** SCH can reduce the incidence of atRA-induced NTDs in fetal mice, and its preventive effect is better than folic acid, which may be related to the activation of the PI3K/Akt signaling pathway.

[Key words] neural tube defects; schisandrin; PI3K/Akt signaling pathway; prevention

神经管畸形(neural tube defects, NTDs)是常见的严重出生缺陷性疾病之一^[1]。据世界卫生组织统计,全球每年约有9万例NTDs患儿死亡,860万例患儿残疾^[2]。目前叶酸(folic acid)是预防NTDs的唯一用药,但仍有约30%的NTDs不能被预防^[3-4],因此,亟需寻找更有效的药物来弥补该不足。NTDs的发病机制尚不明确,但大量研究显示,磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶B(phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B, PI3K/Akt)信号通路与NTDs的发生密切相关^[5]。有研究显示,激活PI3K/Akt信号通路可降低NTDs的发生率^[6]。

五味子醇甲(schisandrin, SCH)是中药五味子中可通过血脑屏障的二苯并环辛二烯(dibenzocyclooctadiene lignans)木脂素类成分^[7-8],具有抗凋亡、抗氧化、神经保护等多种药理作用^[9-11]。有临床研究报道,SCH对人体健康不会造成危害^[12-13]。研究显示,SCH对多种神经系统疾病(如阿尔茨海默病、帕金森病等)有一定的治疗作用^[14-15],但其能否预防全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, atRA)诱导的NTDs仍不明确。本研究利用atRA建立NTDs小鼠模型和PC12细胞损伤模型,观察SCH对NTDs是否有预防作用,并探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 8~10周龄SPF级未经产近交系C57BL/6小鼠58只(雌性40只,雄性18只),体重(18±2)g,购自北京维通利华实验动物科技有限公司[实验动物生产许可证号:SCXK(京)2021-0006]。饲养于恒温(22±2)℃、相对湿度40%~60%、12h/12h

昼夜循环的标准实验室条件下。所有动物实验均按照《实验动物-动物福利伦理审查指南》的伦理标准进行。本研究方案经山西中医药大学实验动物伦理委员会批准(AWE20200319)。

1.1.2 细胞 大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞(PC12细胞)由山西中医药大学益气活血国家中医药管理局重点实验室提供,培养于含有10%胎牛血清、1%青链霉素的DMEM高糖培养基中,于37℃、5%CO₂培养箱中培养。

1.1.3 药物 (1)SCH购自成都普菲德生物技术有限公司,白色粉末状,纯度≥99%;分子式C₂₄H₃₂O₇;分子量432.51;批号20120205。SCH药液配制:①动物实验,将SCH粉末溶解于5%羧甲基纤维素钠中配制成浓度8mg/kg的药液,采用超声使其充分溶解,于4℃冰箱中保存,使用前恢复至室温并充分摇匀。②细胞实验,将SCH粉末溶解于DMSO中,用移液枪反复吹打至药物粉末完全溶解,配置成浓度8000μmol/L的母液分装放置于-20℃保存,避免反复冻融。使用时用完全培养基稀释为2.5μmol/L的浓度。

(2)叶酸购自北京斯利安药业有限公司;规格0.4mg/片;批号S181112。避光密封保存。叶酸药液配制:将叶酸药片在研磨钵中研磨成粉末状,于电子天平上精确称量,用生理盐水作为溶剂溶解,将其配制成终浓度为2.44μg/ml的叶酸药液,再经超声进一步充分溶解,将配好的药液分装,避光保存于4℃冰箱中。使用前恢复至室温并充分摇匀。根据人(60kg):小鼠(20g)=1:9.1确定小鼠的叶酸用药剂量为61.0μg/kg。

(3)atRA购自美国Sigma公司,避光密封置于

-20℃保存;批号WXBD1910V。atRA混悬液配制:①动物实验中,atRA的用药剂量为7.5 mg/kg,如小鼠体重为20 g,则注射含有atRA粉末0.15 mg的混悬液。精确称取atRA粉末,用无水乙醇和橄榄油的混合液(无水乙醇体积:橄榄油体积=8:92)作为溶剂,将配好的药液分装,避免反复冻融,避光存储在-20℃冰箱中。使用时提前取出,恢复至室温并充分摇匀。②细胞实验,将atRA粉末溶解于DMSO中,用移液枪反复吹打至药物粉末完全溶解,配置成为浓度为5000 μmol/L的母液分装、避光放置于-20℃保存,使用前用完全培养基稀释为2.5 μmol/L浓度。

1.1.4 试剂与仪器 磷酸化PI3K(p-PI3K)抗体(#4228S)、p-Akt抗体(#4060)、Akt抗体(#4685)购自美国Cell Signaling Technology公司;β-actin抗体(AP0060)和羊抗兔IgG(ZJ2020-R)购自南京Bioworld科技有限公司。

HE染色试剂盒(20201016)购自北京索莱宝科技有限公司;体视显微镜(EZ4D)、荧光显微镜(DM4000B LED)、冰冻切片机(CM1950)购自德国Leica公司;显微镜(DP72)购自日本OLYMPUS公司;电泳仪(PowerPac™)、转膜仪(PowerPac™)购自美国Bio-Rad公司;凝胶成像分析仪(Azure C300)购自美国Azure Biosystems公司。

1.2 实验分组与造模 (1)动物实验:在小鼠适应性喂养1周后,雌鼠与雄鼠交配过夜(下午7时至早晨7时),次日早晨7时取出雌鼠检查阴道栓,将有阴道栓的雌鼠随机分为对照组、模型组、叶酸组与SCH组,每组9只。将发现阴道栓当天中午记为胚胎(embryo, E)0.5 d(E 0.5 d)。在E 7.5 d时,除对照组外各组孕鼠腹腔注射atRA(7.5 mg/kg),对照组孕鼠给予等体积橄榄油腹腔注射;在E 0.5 d—E 11.5 d,叶酸组孕鼠持续灌胃给予叶酸[61.0 μg/(kg·d)],SCH组持续灌胃给予SCH[8.0 mg/(kg·d)]干预,对照组和模型组孕鼠则灌胃给予等体积的生理盐水。E 11.5 d麻醉脱颈处死孕鼠,剖宫产分离胚胎。

(2)细胞实验:将PC12细胞分为对照组、模型组与SCH组。使用atRA(20 μmol/L)处理PC12细胞12 h,建立PC12细胞损伤模型。在atRA处理12 h后,使用浓度为2.5 μmol/L的SCH继续处理24 h。

1.3 指标检测

1.3.1 胎鼠NTDs发病率 在E 11.5 d实行剖宫产、取出胎鼠后,于体视显微镜下辨别是否发生NTDs及其畸形类型,记录、拍照并计算NTDs发病率。

1.3.2 胎鼠组织冷冻切片制备 每组随机取出整个胎鼠组织,置于1×PBS溶液中洗涤(3 min×3次),后置于4%多聚甲醛溶液中4℃固定6-12 h;置于10%、20%、30%蔗糖溶液中进行梯度脱水处理各24 h;3 d

后用1×PBS溶液洗涤,使用OCT(optimum cutting temperature)包埋胶制作整个胎鼠组织包块,置于液氮中快速冷冻,保存于-80℃冰箱,用于制作冷冻切片(于胎鼠冠状位进行7 μm的连续切片),切片晾干后保存于-80℃冰箱,以备后续HE染色。

1.3.3 HE染色观察胎鼠神经管闭合情况 取出冷冻切片,按照HE染色试剂盒说明书进行HE染色操作,待切片自然晾干后中性树脂封片。在显微镜下观察各组胎鼠神经管的发育闭合情况并拍照。

1.3.4 Western blotting 检测胎鼠脑组织和PC12细胞中p-PI3K、Akt、p-Akt蛋白表达水平 提取各组胎鼠脑组织和PC12细胞的蛋白,计算30 μg蛋白样本量,用合适的SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白。电泳完毕后,将分离好的蛋白凝胶用湿转膜法转移到硝酸纤维(PVDF)膜上,5%脱脂奶粉摇床上封闭2 h;充分洗涤后分别加入相应稀释后抗体,p-PI3K抗体(1:1000)、p-Akt抗体(1:1000)、Akt抗体(1:1000)、β-actin抗体(1:5000),4℃孵育过夜;次日洗涤后加入相应的IgG(1:5000),置于摇床上慢速室温孵育2 h。使用化学发光凝胶成像系统进行化学发光反应曝光条带,ImageJ软件进行灰度值比较。

1.4 统计学处理 采用GraphPad Prism 8.0软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用t检验,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD-t检验。计数资料以例(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

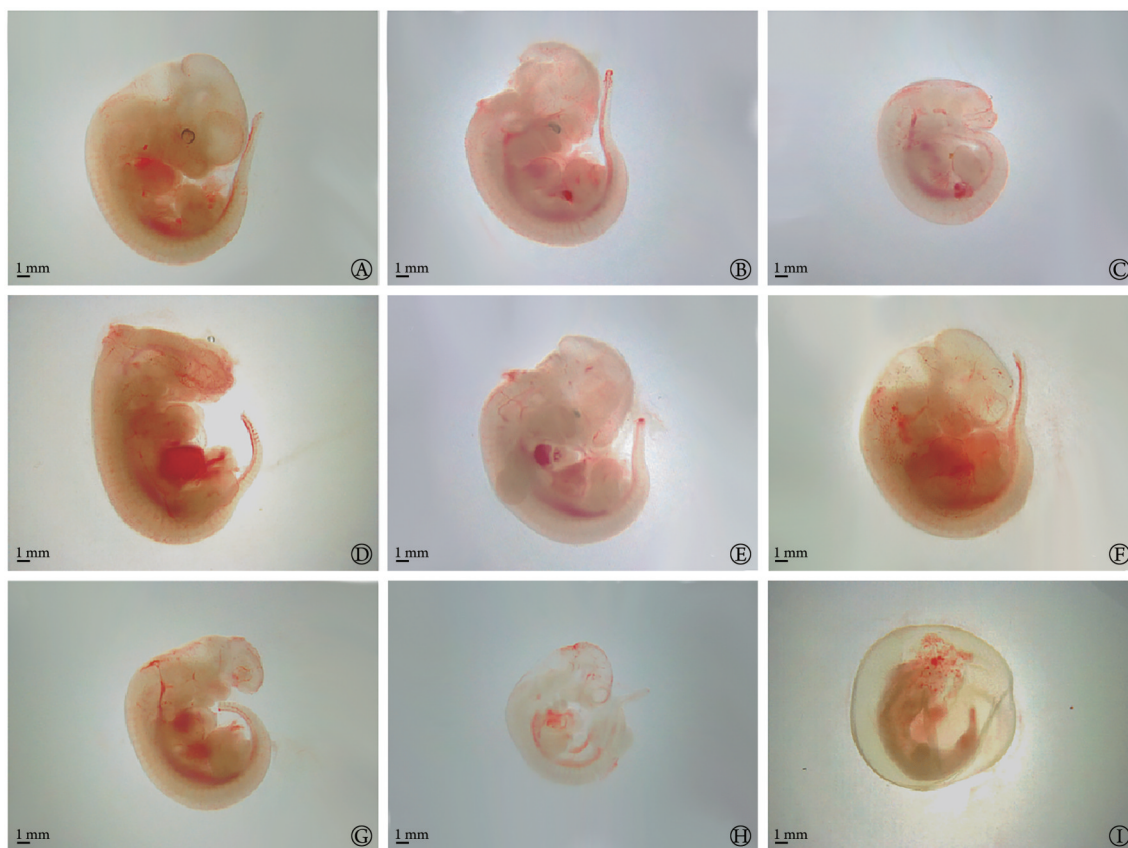
2 结果

2.1 atRA干预孕鼠建立NTDs胎鼠模型 体视显微镜下观察各组胎鼠形态,可见正常胎鼠后脑部及后颈部外观饱满光滑,后脑神经上皮完全融合,形成前、中、后脑泡,眼、耳泡,尾弯曲细长;atRA干预后,部分胎鼠表现出不同的畸形类型(图1)。

2.2 SCH对胎鼠NTDs发病率的影响 与对照组比较,其他各组胎鼠NTDs发病率均明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,叶酸组和SCH组胎鼠NTDs发病率降低($P < 0.01$);与叶酸组比较,SCH组胎鼠NTDs发病率降低($P < 0.01$,表1)。

HE染色结果显示,对照组、SCH组、叶酸组胎鼠中脑、后脑、末脑、间脑、端脑、四脑室等各结构发育良好,外观光滑,发育状态良好;模型组胎鼠只见中脑、间脑、端脑,而后脑、末脑被破坏,神经组织外露;对照组、SCH组、叶酸组胎鼠神经管管腔规则,闭合良好,各结构清晰,细胞排列整齐;模型组胎鼠神经管呈现未闭合状态(图2)。

2.3 SCH对胎鼠脑组织中p-PI3K、Akt、p-Akt蛋白



A. 正常胎鼠; B. 脊柱裂畸形; C. 无脑畸形; D. 脑裂畸形; E. 脑膨出畸形; F. 无眼畸形; G. 颌面部畸形; H. 发育迟缓; I. 吸收胎

图1 体视显微镜下胎鼠形态观察

Fig.1 Morphology of fetus mice under stereomicroscope

表1 各组胎鼠NTDs发病率比较

Tab.1 The incidence of NTDs in each group of mice

组别	孕鼠(只)	胎鼠(只)	NTDs [只(%)]
对照组	9	72	0
模型组	9	73	59(80.8) ⁽¹⁾
SCH组	9	89	19(21.4) ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾
叶酸组	9	69	26(37.7) ⁽¹⁾⁽²⁾

NTDs. 神经管畸形; SCH. 五味子醇甲; 与对照组比较, (1) $P<0.01$; 与模型组比较, (2) $P<0.01$; 与叶酸组比较, (3) $P<0.01$

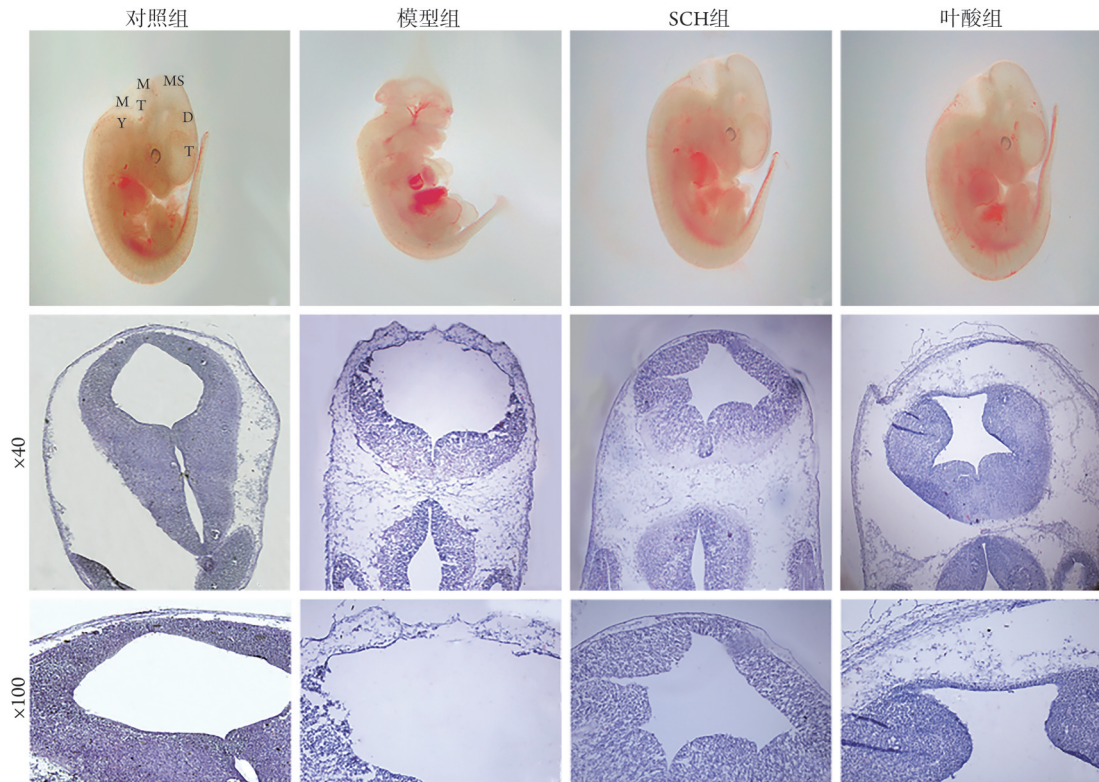
表达的影响 Western blotting 检测结果显示, 与对照组比较, 模型组胎鼠脑组织中 p-PI3K、p-Akt 蛋白表达均明显降低($P<0.01$, $P<0.05$); 与模型组比较, 叶酸组 p-PI3K、p-Akt 蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$), SCH 组 p-PI3K、p-Akt 蛋白表达明显增高($P<0.05$); 与叶酸组比较, SCH 组 p-PI3K、p-Akt 蛋白表达明显增高($P<0.05$, 图3)。

2.4 SCH 对各组 PC12 细胞 p-PI3K、p-Akt 蛋白表达的影响 Western blotting 检测结果显示, 与对照组比较, 模型组 p-PI3K、p-Akt 蛋白表达水平明显降低($P<0.05$); 与模型组比较, SCH 组 p-PI3K、p-Akt 蛋白表达水平明显增高($P<0.05$, 图4)。

3 讨论

NTDs 是常见的出生缺陷性疾病^[16], 主要包括脊柱裂(spinal bifida)、无脑儿(anencephaly)和其他畸形类型^[17], 在世界范围内发病率为 0.5%~2.0%^[18]。中国出生缺陷防治报告指出, 我国目前出生缺陷发生率为 5.6%, 每年新增出生缺陷患儿约 90 万例, 其中 NTDs 占 2% 左右^[19]。我国的 NTDs 发病呈现明显的地域差异, 北方地区是 NTDs 的高发区, 其中山西吕梁的发病率达 5.57%^[20-21]。有报道指出, NTDs 患儿呈现明显的性别差异, 女患儿发病率: 男患儿发病率=3:1^[22]。NTDs 呈现高病死率和高致残率, 患儿一般在孕期即流产, 仅小部分患儿可出生, 出生后大部分会在短时间内死亡, 平均寿命不到 1 年^[23-24], 是导致死胎、死产和新生儿死亡的主要诱因, 给家庭和社会带来了沉重负担^[25]。目前 NTDs 发病机制尚不完全清楚, 且其主要预防药物叶酸仍然存在不足。因此, 寻找更加有效的 NTDs 预防药物显得尤为重要。近年来, 草本植物的提取物由于其突出的生物活性越来越受到关注。

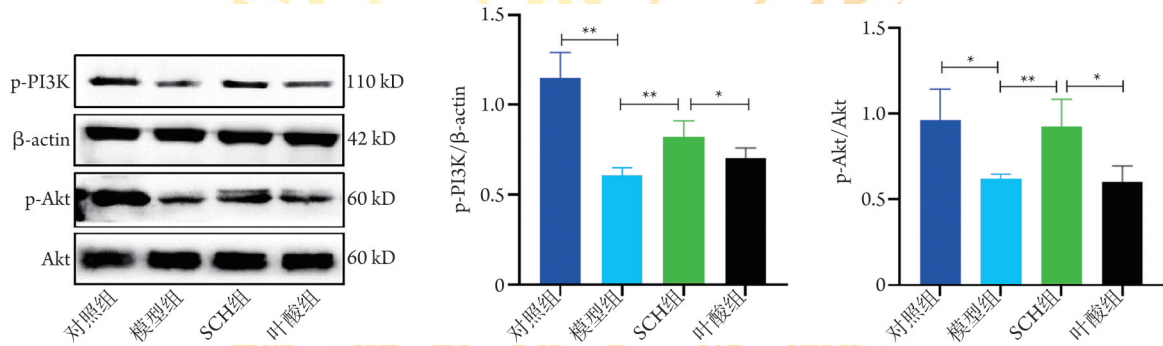
atRA 作为一种维生素 A 的生物活性形式, 在神经系统发育过程中发挥重要作用^[26], 是诱导小鼠



SCH. 五味子醇甲; MY. 末脑; MT. 后脑; MS. 中脑; D. 间脑; T. 端脑

图2 各组胎鼠神经管闭合情况(HE染色)

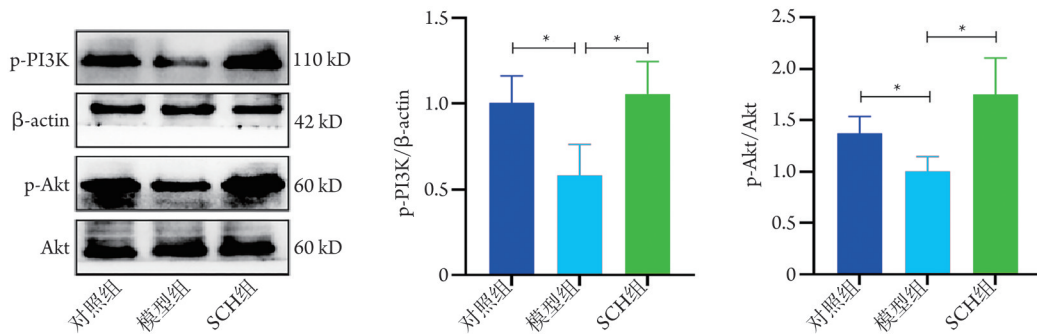
Fig.2 Neural tube closure in each group of fetal mice (HE staining)



p-PI3K. 磷酸化磷脂酰肌醇-3-激酶; Akt. 蛋白激酶B; p-Akt. 磷酸化蛋白激酶B; NTDs. 神经管畸形; SCH. 五味子醇甲; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图3 各组NTDs胎鼠脑组织中p-PI3K、p-Akt蛋白表达水平

Fig.3 Protein expression levels of p-PI3K and p-Akt in brain tissue of NTDs fetal mice in each group



p-PI3K. 磷酸化磷脂酰肌醇-3-激酶; Akt. 蛋白激酶B; p-Akt. 磷酸化蛋白激酶B; SCH. 五味子醇甲; * $P < 0.05$

图4 各组PC12细胞中p-PI3K、p-Akt蛋白表达水平

Fig.4 Protein expression levels of p-PI3K and p-Akt in each group of PC12 cells

NTDs的常用药物^[27-28]。本课题组前期研究显示,五子衍宗丸(WYP)可较好地预防 atRA 诱导的 NTDs 胎鼠发病^[29]。大量研究显示, SCH 可发挥多种药理作用,如神经保护、抗神经细胞凋亡、抗氧化应激、增强小鼠的学习与认知能力等^[30]。此外,本课题组利用网络药理学构建了“药物 WYP 主要单体成分—NTDs 关键靶点”网络,提示 SCH 与 NTDs 关系密切^[31];2022 年中国药典显示, SCH 是 WYP 的主要质控成分之一^[32-33]。因此,虽未有 SCH 预防 NTDs 的相关报道,但基于前期研究,推测 SCH 可能具有预防 NTDs 的作用。本研究观察到, SCH 可明显降低 atRA 诱导的 NTDs 胎鼠模型的发病率,并且 SCH 组胎鼠 NTDs 发病率低于叶酸组,提示 SCH 对胎鼠 NTDs 具有更好的预防作用。

NTDs 的发病机制复杂,涉及多条信号通路,如 PI3K/Akt 信号通路^[6]、经典 Wnt/ β -catenin 信号通路^[34]、平面细胞极性(planar cell polarity, PCP)信号通路^[35]、骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)信号通路^[36]、音猬因子(sonic hedgehog, Shh)信号通路^[37]、维甲酸代谢通路^[38]等。其中 PI3K/Akt 信号通路更受关注,被认为是神经信号转导的关键通路,与神经发育密切相关;通过激活该通路的关键分子,可增强或抑制其下游因子,进而减少 NTDs 的发生^[6]。同时, PI3K/Akt 信号通路也是一条抗细胞凋亡保护性通路,其激活能够促进细胞增殖和抑制细胞凋亡^[39],而这正与 NTDs 的基本发病机制(神经细胞过度凋亡)相契合^[40]。因此,激活 PI3K/Akt 信号通路成为多种药物治疗疾病的作用靶点^[41-42]。Akt 为 PI3K 下游重要的靶激酶,也是调节神经细胞凋亡的重要因子^[43]。Akt 激酶的磷酸化是 PI3K/Akt 信号通路被激活的主要表现^[44]。事实上, SCH 通过正向激活 PI3K/Akt 信号通路减轻疾病症状,已在多种神经系统疾病模型中得到验证,如 SCH 激活 PI3K/Akt 信号通路改善帕金森病小鼠运动障碍^[45]。

本研究的小鼠体内实验结果显示, SCH 可影响 PI3K/Akt 信号通路主要蛋白的表达,上调 p-PI3K 和 p-Akt 表达水平,降低 NTDs 的发病率;采用 SCH 进一步干预损伤后的神经元样细胞,可增强 p-PI3K、p-Akt 的表达,提示 SCH 可能激活 PI3K/Akt 信号通路。由此可见, SCH 降低 NTDs 发病率的作用机制可能是通过激活 PI3K/Akt 信号通路而实现的。

综上所述, SCH 可降低小鼠 NTDs 发病率,且其预防作用优于叶酸;这种预防作用可能与激活 PI3K/Akt 信号通路有关。

【参考文献】

- [1] Lin S, Ren A, Wang L, *et al.* Aberrant methylation of Pax3 gene and neural tube defects in association with exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. *Clin Epigenetics*, 2019, 11(1): 13.
- [2] Zaganjor I, Sekkarie A, Tsang BL, *et al.* Describing the prevalence of neural tube defects worldwide: a systematic literature review[J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0151586.
- [3] Wolujewicz P, Steele JW, Kaltschmidt JA, *et al.* Unraveling the complex genetics of neural tube defects: From biological models to human genomics and back[J]. *Genesis*, 2021, 59(11): 23459.
- [4] Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. MRC Vitamin Study Research Group[J]. *Lancet*, 1991, 338(8760): 131-137.
- [5] An YX, Wang JH, Zhong RG. The research progress of PI3K/AKT pathway and neural tube development[J]. *Chin J Birth Health Hered*, 2016, 24(10): 1-3, 9. [安彦新, 王建华, 钟儒刚. PI3K/Akt 通路 with 神经管发育的研究进展[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2016, 24(10): 1-3, 9.]
- [6] Liu S. Pathogenesis mechanism on PI3K/Akt signaling pathway in neural tube defects under inositol imbalance[D]. Beijing: Beijing University of Technology, 2016. [刘赛. 肌醇失衡 PI3K/Akt 信号通路在神经管发育中的作用机制研究[D]. 北京: 北京工业大学, 2016.]
- [7] Matsumoto T, Takiyama M, Sakamoto T, *et al.* Pharmacokinetic study of Ninjin'yoeito: absorption and brain distribution of Ninjin'yoeito ingredients in mice[J]. *Ethnopharmacol*, 2021, 279: 114332.
- [8] Zhang RJ, Hao HY, Liu QJ, *et al.* Protective effects of schisandrin on high glucose-induced changes of RhoA and eNOS activity in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Pathol Res Pract*, 2018, 214(9): 1324-1329.
- [9] Cheng HY, Hsieh MT, Wu CR, *et al.* Schisandrin protects primary cultures of rat cortical cells from glutamate-induced excitotoxicity[J]. *Pharmacol Sci*, 2008, 107(1): 21-31.
- [10] Yan T, Liu B, Li F, *et al.* Schisandrin ameliorates behavioral disorders in hepatic injury mice *via* regulation of oxidative stress and neuroinflammation[J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2021, 43(2): 212-222.
- [11] Sowndhararajan K, Deepa P, Kim M, *et al.* An overview of neuroprotective and cognitive enhancement properties of lignans from *Schisandra chinensis*[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97: 958-968.
- [12] Wei BB, Liu MY, Chen ZX, *et al.* Schisandrin ameliorates cognitive impairment and attenuates A β deposition in APP/PS1 transgenic mice: involvement of adjusting neurotransmitters and their metabolite changes in the brain[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39(4): 616-625.
- [13] Kormosh N, Laktionov K, Antoshechkina M. Effect of a combination of extract from several plants on cell-mediated and humoral immunity of patients with advanced ovarian cancer[J]. *Phytother Res*, 2006, 20(5): 424-425.
- [14] Song L, Piao ZY, Zhang LM, *et al.* Effects of schisandrin on learning and memory and NF- κ B p65 in APP/PS1 mice[J]. *Chin Arch Tradit Chin*, 2020, 38(2): 180-183, 287. [宋琳, 朴钟源, 张丽梅, 等. 五味子醇甲对 APP/PS1 小鼠学习记忆和 NF- κ B p65 的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2020, 38(2): 180-183, 287.]
- [15] Yan TX, Sun Y, Gong GW, *et al.* The neuroprotective effect of schisandrol A on 6-OHDA-induced PD mice may be related to PI3K/Akt and IKK/I κ B α /NF- κ B pathway[J]. *Experim Gerontol*,

- 2019, 128: 110743.
- [16] Wei BB, Liu MY, Chen ZX, *et al.* Schisandrin ameliorates cognitive impairment and attenuates A β deposition in APP/PS1 transgenic mice: involvement of adjusting neurotransmitters and their metabolite changes in the brain[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39(4): 616-625.
- [17] Lin S, Ren A, Wang L, *et al.* Aberrant methylation of Pax3 gene and neural tube defects in association with exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. *Clin Epigenetics*, 2019, 11(1): 13.
- [18] Yu J. The mechanisms of histone methylation modification in retinic acid-induced neural tube defects[D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2017. [于娟. 组蛋白甲基化修饰在维甲酸致神经管畸形发生中的作用及分子机制研究[D]. 太原: 山西医科大学, 2017.]
- [19] Lin H. China Report on the Prevention and Control of Birth Defects (2012) released by the Ministry of Health[J]. *Chin Mod Med*, 2012, 19(28): 1. [凌寒. 卫生部发布《中国出生缺陷防治报告(2012)》[J]. *中国当代医药*, 2012, 19(28): 1.]
- [20] Gu X, Lin LM, Zheng XY, *et al.* High prevalence of NTDs in Shanxi Province: a combined epidemiological approach[J]. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2017, 79(10): 702-707.
- [21] Wang Jf, Liu X, George C, *et al.* Assessing local determinants of neural tube defects in the Heshun Region, Shanxi Province, China[J]. *BMC Public Health*, 2015, 10(1): 52-63.
- [22] Copp AJ, Stanier P, Greene ND. Neural tube defects: recent advances, unsolved questions, and controversies[J]. *Lancet Neurol*, 2013, 12(8): 799-810.
- [23] Wang XW, Wang JH, Niu B. A review on the neural tube defects animal model[J]. *Chin J Birth Health Hered*, 2011, 19(2): 4-6. [王秀伟, 王建华, 牛勃. 神经管畸形动物模型的研究进展[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2011, 19(2): 4-6.]
- [24] Wang F, Xu C, Reece EA, *et al.* Protein kinase C- α suppresses autophagy and induces neural tube defects *via* mir-129-2 in diabetic pregnancy[J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15182.
- [25] Yacob A, Carr CJ, Foote J, *et al.* The global burden of neural tube defects and disparities in neurosurgical care[J]. *World Neurosurg*, 2021, 149: 803-820.
- [26] Liu J, Zhou R, He Q, *et al.* Calmodulin kinase II activation of mitogen-activated protein kinase in PC12 cell following all-trans retinoic acid treatment[J]. *J Neurotoxicol*, 2009, 30(4): 599-604.
- [27] Wei X, Li H, Miao J, *et al.* Disturbed apoptosis and cell proliferation in developing neuroepithelium of lumbo-sacral neural tubes in retinoic acid-induced spina bifida aperta in rat[J]. *J Int J Dev Neurosci*, 2012, 30(5): 375-381.
- [28] Leck I. Causation of neural tube defects: clues from epidemiology[J]. *J Br Med Bull*, 2017, 30(2): 158-163.
- [29] Yang CJ, Fan HJ, Chai Z, *et al.* Mechanism of Wuzi Yanzong Pill in preventing neural tube defects[J]. *J Basic Chin Med*, 2021, 27(12): 1887-1891. [杨婵娟, 樊慧杰, 柴智, 等. 五子衍宗丸预防神经管畸形的机制研究[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2021, 27(12): 1887-1891.]
- [30] Ru Y, Fan HJ, Chai Z, *et al.* Progress of research on the pharmacological effects of schisandrin on central nervous system[J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2022, 40(7): 182-185. [茹意, 樊慧杰, 柴智, 等. 五味子醇甲对中枢神经系统药理作用研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2022, 40(7): 182-185.]
- [31] Wang XL, Chai Z, Gong Q, *et al.* To investigate the molecular mechanism of Wuzi Yanzong Pill in prevention and control of Neural Tube Defects based on Network Pharmacology[J]. *Lishizhen Med Mater Med*, 2022, 33(7): 1765-1768. [王新亮, 柴智, 弓强, 等. 基于网络药理学探讨五子衍宗丸防控神经管畸形的分子机制[J]. *时珍国医国药*, 2022, 33(7): 1765-1768.]
- [32] Dong QJ, Zhou Y, Fen W, *et al.* Application of fingerprint combined with QAMS in quality evaluation of Wuzi Yanzong Pills[J]. *J Chin Med Mater*, 2019, 42(3): 579-583. [董秋菊, 周园, 冯薇, 等. 指纹图谱结合一测多评法在五子衍宗丸质量评价中的应用[J]. *中药材*, 2019, 42(3): 579-583.]
- [33] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of People's Republic of China: One[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 611-612. [国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 611-612.]
- [34] Li JT, Zhang T, Xie J. Preliminary study on the regulatory mechanism of Gcm1 affecting Wnt β -catenin signaling pathway by folate deficiency and its role in neural tube defects[C]// Proceedings of the 8th Pan-Rim Bohai Society for Biochemistry and Molecular Biology 2018 Academic Exchange Conference. 2018. [李建婷, 张霆, 解军. 叶酸缺乏对 Gcm1 影响 Wnt β -catenin 信号通路的调控机制及其在神经管畸形中的初步研究[C]// 第八届泛环渤海生物化学与分子生物学会 2018 年学术交流会论文集. 2018.]
- [35] Mukhopadhyay P, Greene RM, Pisano MM. MicroRNA targeting of the non-canonical planar cell polarity pathway in the developing neural tube[J]. *Cell Biochem Funct*, 2020, 38(7): 905-920.
- [36] Ybot-gonzalez P, Cogram P, Gerrelli D, *et al.* Sonic hedgehog and the molecular regulation of mouse neural tube closure[J]. *Development*, 2002, 129(10): 2507-2517.
- [37] Li H, Zhang J, Chen S, *et al.* Genetic contribution of retinoid-related genes to neural tube defects[J]. *Hum Mutat*, 2018, 39(4): 550-562.
- [38] Yokoyama K, Tatsumi Y, Hayashi K, *et al.* Effects of ursodeoxycholic acid and insulin on palmitate-induced ROS production and down-regulation of PI3K/Akt signaling activity[J]. *Biol Pharm Bull*, 2017, 40(11): 2001-2004.
- [39] Cao S, Reece EA, Shen Wb, *et al.* Restoring BMP4 expression in vascular endothelial progenitors ameliorates maternal diabetes-induced apoptosis and neural tube defects[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(10): 859.
- [40] Gao L, Chen R, Sun ZH, *et al.* Neuroprotective effect of vitexin in rats with traumatic brain injury by regulating PI3K/Akt pathway[J]. *Drugs Clin*, 2021, 36(11): 2224-2230. [高亮, 陈瑞, 孙志华, 等. 牡荆素调控 PI3K/Akt 通路对脑外伤大鼠的神经保护作用研究[J]. *现代药物与临床*, 2021, 36(11): 2224-2230.]
- [41] Lu LD, Wang YY. Research progress of experimental research with traditional Chinese medicine in the treatment of Parkinson's disease based on PI3K/Akt/mTOR signal pathway[J]. *Clin J Tradit Chin Med*, 2022, 34(2): 372-376. [陆连第, 王义义. 基于 PI3K/Akt/mTOR 信号通路中药治疗帕金森病的实验研究进展[J]. *中医临床杂志*, 2022, 34(2): 372-376.]
- [42] Xue M, Huang C. PI3K/Akt signaling pathway mediated by BDNF in treatment of neuropathic pain[J]. *J Gannan Med Univ*, 2021, 41(4): 327-33. [薛梦, 黄诚. BDNF 介导 PI3K/Akt 信号通路在神经病理性疼痛中的作用及干预研究进展[J]. *赣南医学院学报*, 2021, 41(4): 327-331.]
- [43] Li H, Tang Z, Chu P, *et al.* Neuroprotective effect of phosphocreatine on oxidative stress and mitochondrial dysfunction

- induced apoptosis *in vitro* and *in vivo*: involvement of dual PI3K/Akt and Nrf2/HO-1 pathways[J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 120: 228-238.
- [44] Le AW, Shan LL, Dai XY, *et al*. PI3K, AKT, and P-AKT levels in thin endometrium[J]. *Genet Mol Res*, 2016, 15(1): 7184.
- [45] Yan TX, Sun Y, Gong GW, *et al*. The neuroprotective effect of schisandrol A on 6-OHDA-induced PD mice may be related to PI3K/AKT and IKK/I κ B α /NF- κ B pathway[J]. *Exp Gerontol*, 2019, 128: 110743.

(责任编辑: 蒋铭敏)



解放军医学杂志®