

槟榔碱对 H_2O_2 诱导 SH-SY5Y 神经细胞氧化应激损伤的保护作用及机制研究

孙 源^{1,2,4}, 王丹阳², 孙 晶², 白亚娟^{1,2,3}, 范 蓓^{2,3}, 宋洪波⁴, 吉建邦^{1,3,5*},
卢 聪^{1,2,3,5*}, 王凤忠^{1,2,3*}

1. 三亚中国农业科学院国家南繁研究院, 海南三亚 572024; 2. 中国农业科学院农产品加工研究所, 北京 100193;
3. 海南省农业科学院三亚研究院, 海南三亚 572025; 4. 福建农林大学食品科学学院, 福建福州 350002; 5. 海口市
槟榔加工研究重点实验室, 海南海口 570100

摘 要: 本研究通过建立过氧化氢 (H_2O_2) 诱导的 SH-SY5Y 神经细胞氧化应激模型, 旨在探究槟榔碱对氧化应激诱导神经细胞损伤的保护作用及其作用机制。采用 CCK-8 法检测细胞活力, 采用分光光度法检测乳酸脱氢酶 (LDH) 释放、丙二醛 (MDA) 含量、超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化氢酶 (CAT) 活性, 采用流式细胞术检测细胞凋亡、线粒体膜电位, 采用 Western blot 技术检测 Nrf2、HO-1、Keap1、Bcl-2、Bax、Caspase-3 的表达。结果表明: 槟榔碱干预均能有效降低细胞凋亡并显著上调线粒体膜电位; 在提高 SOD、CAT 水平的同时降低 MDA 水平; 140 $\mu\text{mol/L}$ 槟榔碱处理能够显著上调 Nrf2、HO-1、Bcl-2 蛋白的表达 ($P<0.001$, $P<0.0001$), 并下调 Keap1、Bax、Caspase-3 蛋白的表达 ($P<0.001$, $P<0.0001$)。表明槟榔碱能够有效改善 H_2O_2 诱导的氧化应激损伤, 其作用机制与激活 Nrf2/HO-1 信号通路、提升细胞抗氧化活力、调控 Bcl-2/Bax/Caspase-3 信号通路和抑制细胞凋亡有关。

关键词: 槟榔碱; SH-SY5Y; 氧化应激; 神经保护; 作用机制

中图分类号: R285.5 文献标志码: A

Neuroprotective Effect and Mechanism of Arecoline on H_2O_2 -induced Damage in SH-SY5Y Cell

SUN Yuan^{1,2,4}, WANG Danyang², SUN Jing², BAI Yajuan^{1,2,3}, FAN Bei^{2,3}, SONG Hongbo⁴, JI Jianbang^{1,3,5*},
LU Cong^{1,2,3,5*}, WANG Fengzhong^{1,2,3*}

1. National Nanfan Research Institute (Sanya), Chinese Academy of Agricultural Sciences, Sanya, Hainan 572024, China; 2. Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 3. Sanya Institute, Hainan Academy of Agricultural Sciences, Sanya, Hainan 572025, China; 4. College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China; 5. Haikou Key Laboratory of Areca Processing Research, Haikou, Hainan 570100, China

Abstract: The aim of this study was to explore the protective effect of arecoline on the cell model of H_2O_2 -induced oxidative stress damaged model in SH-SY5Y cells and elucidate its mechanism. Cell viability was detected by CCK-8 assay. Spectrophotometry was used to detect LDH release, MDA, SOD, and CAT contents. Flow cytometry was used to detect cell apoptosis and mitochondrial membrane potential. Western blot was used to detect the expressions of Nrf2, HO-1, Keap1, Bcl-2, Bax and Caspase-3. Arecoline could reduce cell apoptosis and significantly increase mitochondrial membrane potential. The level of SOD elucidateand CAT increased while the level of MDA decreased. Arecoline 140 $\mu\text{mol/L}$

收稿日期 2023-06-09; 修回日期 2023-08-31

基金项目 三亚中国农业科学院国家南繁研究院“南繁专项”2022 年院院联合攻关项目 (No. YYLH05); 三亚中国农业科学院国家南繁研究院“南繁专项”2023 年重点项目 (No. ZDXM2302); 国家重点研发计划项目 (No. 2022YFD1600303)。

作者简介 孙 源 (1998—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食药同源物质功能挖掘及作用机制。*通信作者 (Corresponding author): 吉建邦 (JI Jianbang), E-mail: jijianbang@haas.cn; 卢 聪 (LU Cong), E-mail: lucong198912@126.com; 王凤忠 (WANG Fengzhong), E-mail: wangfengzhong@sina.com。

group could significantly up-regulate the protein expression of Nrf2, HO-1 and Bcl-2 ($P<0.001$, $P<0.0001$), and down-regulate the protein expression of Keap1, Bax and Caspase-3 ($P<0.001$, $P<0.0001$). Conclusions: arecoline can effectively improve H₂O₂-induced oxidative stress injury in SH-SY5Y cell by activating the Nrf2/HO-1 signaling pathway, enhancing the activities of antioxidant enzymes and regulating the oxidation reduction system of cells, as well as regulating the Bcl-2/Bax/Caspase-3 signaling pathway and inhibiting cell apoptosis.

Keywords: arecoline; SH-SY5Y; oxidative stress; neuroprotection; mechanism of action

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.06.017

槟榔(*Areca catechu* L.)为棕榈科(Palmaceae) 槟榔属(*Areca*)常绿乔木,是我国南部热带亚热带地区的经济作物之一。近年国家广播电视总局发文禁止宣传槟榔及其产品,同时国家食品药品监督管理总局对槟榔下达限制加工生产令,导致我国槟榔产业遭遇生存危机。除食用价值外,槟榔具有驱虫^[1-2]、消肿镇痛^[3]、消食化积^[4-5]、抗炎抗氧化^[6]、抗病毒^[6]、改善神经系统^[7-10]等多种药理活性,药用槟榔位列我国“四大南药”之首,因此深入挖掘槟榔的药用价值,解析其作用机制,将槟榔回归南药是目前我国槟榔产业寻求发展的重要路径之一。

槟榔碱是槟榔中重要的活性物质之一,具有拟胆碱作用、阻止神经抑制效应^[11]、增强内源性促肾上腺皮质激素的释放^[12]、改善阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)病人认知能力^[13-14]、抗抑郁^[15]等活性,槟榔碱具备良好的神经功效挖掘及开发利用价值。然而,目前槟榔碱的生物活性功能尚未被完全发掘,特别是槟榔碱的神经保护功效研究相对空缺,已知生物活性功能的作用机制并不清楚,有待进一步深入研究。过氧化氢(H₂O₂)避光保存下性质相对稳定,并且是一种极易穿过细胞膜的外源活性氧,在其穿过细胞膜进入到细胞后,促进细胞内产生大量活性氧,导致细胞发生一系列氧化应激反应^[16]。因此, H₂O₂ 诱导的 SH-SY5Y 神经细胞损伤常作为一种经典的体外氧化应激模型。槟榔碱改善氧化应激所导致神经细胞损伤的研究未见报道,其作用机制尚不清楚。因此,本研究采用槟榔碱作用于 H₂O₂ 损伤的 SH-SY5Y 神经细胞体外氧化应激模型,从抗氧化、抑制细胞凋亡两方面探究槟榔碱的神经保护作用,以期为槟榔碱神经功能评价及开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 SH-SY5Y 人神经母细胞瘤细

胞、SH-SY5Y 完全培养基(武汉尚恩生物技术有限公司); 槟榔碱(上海源叶生物科技有限公司); DMEM 培养基、0.25% Trypsin-EDTA Gibco; 磷酸盐缓冲液(PBS 1×)(Hyclone); 无血清细胞冻存液(苏州新赛美生物科技有限公司); BCA 试剂盒、丙二醛(MDA)检测试剂盒、总超氧化物歧化酶(SOD)活性检测试剂盒、乳酸脱氢酶(LDH)释放检测试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)、RIPA 裂解液(碧云天生物技术公司); DMSO、CCK-8 细胞活性检测试剂盒、Keap1(北京索莱宝科技有限公司); Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit(美国 BD 公司); 0.45 μm PVDF 膜、ECL(Millipore 公司); 显影定影试剂(Servicebio 公司); Caspase-3、β-actin(CST 公司); Nrf2、HO-1(Proteintech 公司); Bcl-2、Bax(ABCAM 公司); HRP 标记山羊抗兔(Jackson)。

1.1.2 主要仪器与设备 细胞培养箱(Herocell 180),上海润度生物科技有限公司; 低温冷冻离心机,德国 sigma 公司; 流式细胞仪 CytoFLEX; 酶标仪(spectra MAX190)Molecular devices; 微量核酸/蛋白分析仪,英国 BioDrop μLite; 电泳仪,美国伯乐 Bio-Rad; 凝胶成像系统(FluorChen HD2),美国 Alpha; Olympus BX53 倒置光学显微镜,日本 Olympus 公司; 垂直电泳仪、转印电泳仪, Tanon 公司; 扫描仪, EPSON 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 SH-SY5Y 细胞用含 10%胎牛血清、1%青链霉素的完全培养基,置于 37 °C 饱和湿度、5%体积分数的 CO₂ 培养箱中培养。48 h 更换新培养基,次日进行传代培养。取对数生长期的细胞进行后续试验。

1.2.2 槟榔碱对 SH-SY5Y 细胞活力的影响 将处于对数生长期的细胞按 6×10^5 个/mL 密度接种于 96 孔板中,每孔 100 μL,每组设置 5 个复孔。槟榔碱干预组中加入含有不同槟榔碱浓度(25、50、100、150、200、250、300、350、400 μmol/L,

编号依次为 T₁~T₉) 的 DMEM 培养基, 对照组 (CK) 加入等量的 DMEM 培养基。培养结束时, 每孔加入 10 μ L CCK-8 工作液, 孵育合适时间, 酶标仪调至 450 nm 处, 测量各孔的吸光度 (optical density, OD) 值。

1.2.3 槟榔碱对 H₂O₂ 诱导 SH-SY5Y 细胞氧化损伤的影响 (1) SH-SY5Y 细胞 H₂O₂ 氧化损伤模型的建立。细胞铺板按照 1.2.2 处理。设置对照组 (CK) 和 H₂O₂ 损伤组 (50、100、150、200、250、300 μ mol/L, 编号依次为 A₁~A₆), 培养 24 h 后, 每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液, 孵育合适时间, 酶标仪调至 450 nm 处, 测量各孔的 OD 值。

(2) 槟榔碱对 H₂O₂ 诱导 SH-SY5Y 细胞损伤的影响。细胞铺板按照 1.2.2 处理, 设置对照组 (CK)、H₂O₂ 模型组 (150 μ mol/L)、H₂O₂ (150 μ mol/L)+ 槟榔碱 (35、70、140 μ mol/L) 干预组 (编号依次为 B₁~B₃)。在培养结束时, 每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液, 孵育合适时间, 酶标仪调至 450 nm 处, 测量各孔的 OD 值。

1.2.4 槟榔碱对 H₂O₂ 诱导 SH-SY5Y 细胞神经保护作用 将处于对数生长期的细胞按 6×10^5 个/mL 密度接种于 6 孔板中, 每孔 2 mL, 每组 6 个复孔, 孵育 24 h 后, 按对照组 (CK)、模型组 (H₂O₂)、槟榔碱组、槟榔碱+H₂O₂ 组处理细胞。除去原培养基, 加入槟榔碱 (35、70、140 μ mol/L) 预保护 24 h 后, 各槟榔碱组加入 H₂O₂ 处理 24 h, 其中 CK 组仅加入 DMEM 完全培养基, 模型组加入 H₂O₂ (150 μ mol/L), 槟榔碱+H₂O₂ 组加入槟榔碱 (35、70、140 μ mol/L) 及 H₂O₂ (150 μ mol/L)。分组处理细胞后检测各项指标。

(1) LDH 释放率检测。分组处理细胞 24 h 后, 按照试剂盒说明书对细胞 LDH 释放率进行检测。

(2) 细胞凋亡检测。分组处理细胞 24 h 后, 参照 Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit 试剂盒说明书染色, 避光、室温孵育 15 min, 孵育结束后在 30 min 内用 CytoFLEX 流式细胞仪检测细胞凋亡情况并计算凋亡率。

(3) 线粒体膜电位检测。分组处理细胞 24 h 后, 参照线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1) 说明书染色, 避光、室温孵育 15 min, 孵育结束后在 30 min 内用 CytoFLEX 流式细胞仪检测细胞线粒体膜电位。

(4) 细胞内 SOD、过氧化氢酶 (CAT) 活

性和 MDA 含量测定 分组处理细胞 24 h 后, 1000 r/min 离心 5 min, 收集细胞沉淀, 使用预冷的 RIPA 蛋白裂解液裂解细胞, 置于 -4 $^{\circ}$ C 充分裂解 30 min, 并每隔 5 min 振荡 30 s。裂解结束后于 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 参照 BCA 试剂盒说明书计算细胞总蛋白, 根据 SOD、MDA、CAT 检测试剂盒说明书操作步骤, 酶标仪检测吸光度值。

(5) 相关蛋白表达检测。细胞蛋白提取: 分组处理细胞 24 h 后, 1000 r/min 离心 5 min, 收集细胞沉淀, 使用预冷的 RIPA 蛋白裂解液裂解细胞, 置于 -4 $^{\circ}$ C 充分裂解 30 min, 并每隔 5 min 振荡 30 s。裂解结束后于 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 对蛋白进行定量。

蛋白浓度测定及样品制备。按照 BCA 蛋白定量试剂盒使用说明书操作。绘制标准曲线并计算蛋白浓度。①根据所测目的蛋白的分子量, 配制 8%~10% 分离胶。②将待测蛋白样品以每孔 30 μ g 上样。③电泳: 浓缩胶恒压 90 V, 约 20 min; 分离胶恒压 120 V, 通过预染蛋白 marker 确定电泳停止时间。④转膜: 去除浓缩胶、保留分离胶, 裁剪合适大小的 0.45 μ m 孔径的 PVDF 膜, 转膜 300 mA 恒流, 60 min。⑤封闭: 取出 PVDF 膜完全浸没于 5% BSA-TBST 中, 水平摇床孵育 1 h 逆转录 (RT)。⑥一抗孵育: 利用 5% BSA-TBST 稀释一抗, 4 $^{\circ}$ C 水平摇床孵育过夜。次日, 用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。⑦二抗孵育: 利用 5% BSA-TBST 稀释二抗, 山羊抗兔 IgG 室温孵育 1 h 后 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。⑧胶片曝光: 滴加 ECL 到膜的蛋白面, 反应 3~5 min 后曝光 2 min, 显影 2 min, 定影。

表 1 一抗信息及其稀释比例

Tab. 1 First antibody information and its dilution ratio

编号 No.	一抗名称 First antibody name	来源 Source	稀释比例 Dilution ratio	分子量 Molecular weight/kDa
1	HO-1	Rabbit	1 : 1000	33
2	Bcl-2	Rabbit	1 : 2000	26
3	Bax	Rabbit	1 : 2000	21
4	Nrf2	Rabbit	1 : 1000	110
5	Caspase-3	Rabbit	1 : 2000	35/19
6	Keap1	Rabbit	1 : 2000	69
7	β -actin	Rabbit	1 : 1000	42

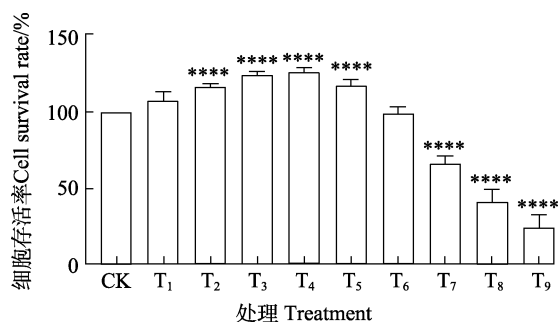
1.3 数据处理

采用 SPSS 26.0 和 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据分析及绘图, 利用 Image-PRO 软件进行灰度分析, 多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 利用 LSD 法验证两两比较的显著性 ($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 槟榔碱对 SH-SY5Y 细胞存活率的影响

如图 1 所示, 在槟榔碱处理细胞 48 h 后, 检测细胞存活率。与 CK 相比, $T_2 \sim T_4$ 处理中, 即槟榔碱浓度在 50~150 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内, 细胞存活率呈现出随槟榔碱浓度升高而上升的趋势, 在槟榔碱浓度为 150 $\mu\text{mol/L}$ 时 SH-SY5Y 细胞存活率最大, 当继续增大槟榔碱浓度时 SH-SY5Y 细胞存活率明显下降, 且成剂量依赖性, 具有统计学意义 ($P<0.0001$)。



****表示处理与 CK 间差异极显著 ($P<0.0001$)。
**** indicates extremely significant difference between treatments and CK ($P<0.0001$).

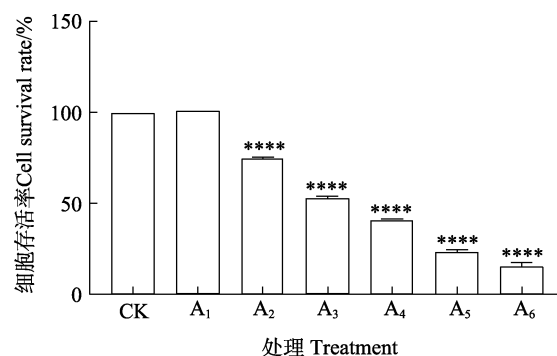
图 1 槟榔碱对 SH-SY5Y 细胞存活率的影响

Fig. 1 Effect of arecoline on survival rate of SH-SY5Y cells

2.2 槟榔碱对 H_2O_2 诱导 SH-SY5Y 细胞氧化损伤的影响

2.2.1 H_2O_2 诱导 SH-SY5Y 细胞氧化损伤模型的建立 H_2O_2 诱导细胞氧化损伤反应便于发生, 并且 H_2O_2 容易获得, 避光保存时性质相对稳定可控, 是研究细胞氧化应激损伤最常用的体外评价模型^[17-18]。如图 2 所示, 将 H_2O_2 系列浓度作用于 SH-SY5Y 细胞 24 h 时, H_2O_2 能剂量依赖性地抑制 SH-SY5Y 细胞的增殖, 在 H_2O_2 浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 时, 对细胞损伤甚微, 细胞存活率约为 100%, 而在 H_2O_2 浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时细胞损伤较小, 细胞存活率在 75% 左右, 未达到造模要求。当 H_2O_2 浓度大于 150 $\mu\text{mol/L}$ 时抑制作用过强,

H_2O_2 浓度为 150 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞存活率约 50%, 较为适中, 差异具有统计学意义 ($P<0.0001$)。因此, 最终造模条件为 150 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用 24 h。



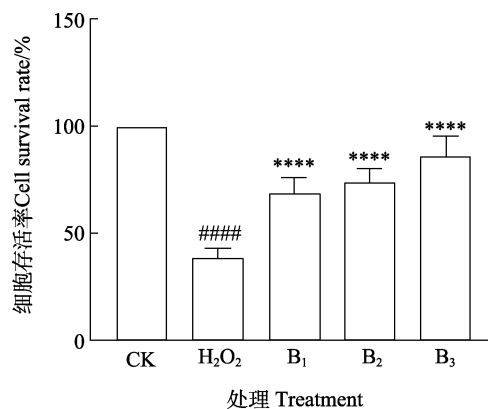
****表示处理与 CK 间差异极显著 ($P<0.0001$)。

**** indicates extremely significant difference between treatments and CK ($P<0.0001$).

图 2 H_2O_2 对 SH-SY5Y 细胞活力的影响

Fig. 2 Effect of H_2O_2 on cell viability of SH-SY5Y cells

2.2.2 槟榔碱对 H_2O_2 诱导 SH-SY5Y 细胞存活率的影响 如图 3 所示, 将槟榔碱作用于 H_2O_2 诱导的 SH-SY5Y 细胞 24 h 时, 与 CK 相比, H_2O_2 模型组的细胞活力显著降低 ($P<0.0001$); 与 H_2O_2 模型组相比, 槟榔碱组在 35、70、140 $\mu\text{mol/L}$ 三个浓度干预下均能显著提升氧化损伤细胞模型的存活率 ($P<0.0001$)。



####表示处理与 CK 间差异极显著 ($P<0.0001$) ;

****表示处理与模型组间差异极显著 ($P<0.0001$)。

indicates extremely significant difference between treatments and CK ($P<0.0001$); **** indicates extremely significant difference between treatments and model group ($P<0.0001$).

图 3 槟榔碱对 H_2O_2 诱导 SH-SY5Y 细胞活力的影响

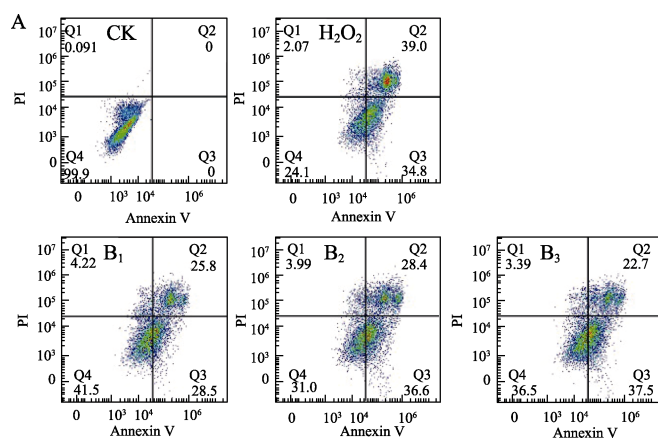
Fig. 3 Effect of arecoline on cell viability of H_2O_2 -induced SH-SY5Y cells

2.3 槟榔碱对 H_2O_2 诱导 SH-SY5Y 细胞神经的保护作用

2.3.1 细胞 LDH 释放率 如图 4 所示, 与 CK 相比, H_2O_2 模型组的细胞 LDH 活性显著升高 ($P<$

0.001), H_2O_2 诱导使 LDH 大量释放, 产生细胞毒性, 表明细胞发生死亡。在槟榔碱干预后, 与 H_2O_2 模型组相比, 槟榔碱各干预组的 LDH 活性显著下降 ($P<0.001$), 表明槟榔碱能显著降低 H_2O_2 造成的细胞毒性作用。

2.3.2 细胞凋亡情况 Annexin-V/PI 双染色法可用于区分坏死细胞、早期凋亡细胞及晚期凋亡细胞。如图 5A 所示, Q4 为正常细胞, Q3 为早调细胞, Q2 为晚调细胞, Q1 为死亡细胞, 试验操作中也会造成细胞的机械性死亡 (Q1 象限)。依据图 5B 流式细胞术结果显示, 与 CK 相比, H_2O_2 模型组由于含有 H_2O_2 , 导致凋亡细胞显著增加 ($P<0.0001$); 而在槟榔碱干预后, 凋亡细胞较模型组显著下降 ($P<0.01$, $P<0.0001$)。



A: 流式图; B: 细胞凋亡率。####表示处理与 CK 间差异极显著 ($P<0.0001$);

、**表示处理与模型组间差异极显著 ($P<0.01$, $P<0.0001$)。

A: Flow cytometry; B: Cell apoptosis ratio. #### indicates extremely significant difference between treatments and CK ($P<0.0001$);

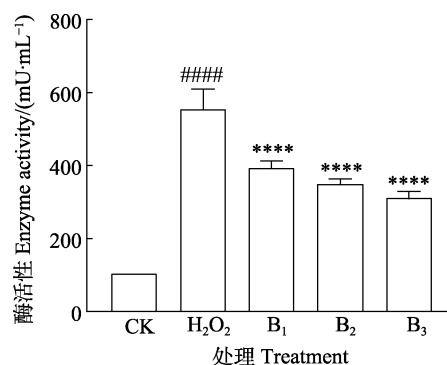
, ** indicates extremely significant difference between treatments and model group ($P<0.01$, $P<0.0001$).

图 5 槟榔碱对 H_2O_2 诱导 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响

Fig. 5 Effect of arecoline on cell apoptosis of H_2O_2 -induced SH-SY5Y cells

2.3.3 线粒体膜电位 线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 的下降是线粒体膜损伤和细胞凋亡的早期指标, 线粒体膜电位的失衡预示着细胞凋亡的发生^[19]。如图 6 所示, $150 \mu\text{mol/L}$ H_2O_2 可以使线粒体膜电位明显下降, 说明 H_2O_2 诱导使得线粒体膜内外电势差下降, 并且破坏了线粒体膜的完整性, 与 CK 相比, 极显著下降 ($P<0.0001$); 与 H_2O_2 模型组相比, 槟榔碱各浓度处理组均显著升高线粒体膜电位 ($P<0.001$, $P<0.0001$), 减轻 SH-SY5Y 细胞的氧化损伤。

3.3.4 胞内 MDA 含量和 SOD、CAT 活性 MDA 是脂质过氧化物, 一定程度上反映了细胞内的氧化程度^[20], 而抗氧化酶 SOD、CAT 等是抗氧化的

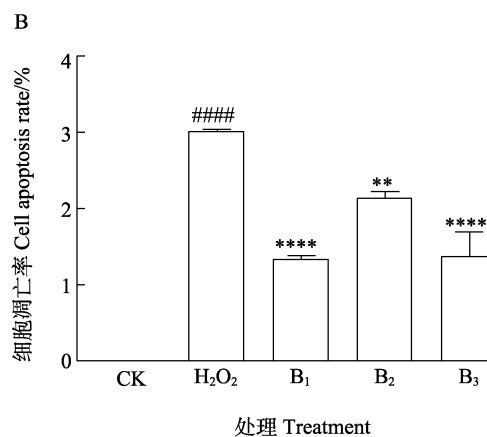


####表示处理与 CK 间差异极显著 ($P<0.0001$); ****表示处理与模型组间差异极显著 ($P<0.0001$)。

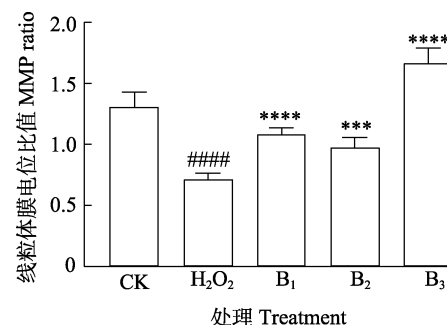
indicates extremely significant difference between treatments and CK ($P<0.0001$); **** indicates extremely significant difference between treatments and model group ($P<0.0001$).

图 4 槟榔碱对 H_2O_2 诱导 SH-SY5Y 细胞 LDH 活性的影响

Fig. 4 Effect of arecoline on LDH activity of H_2O_2 -induced SH-SY5Y cells



处理 Treatment



处理 Treatment

####表示处理与 CK 间差异极显著 ($P<0.0001$); **、****表示处理与模型组间差异极显著 ($P<0.001$, $P<0.0001$)。#### indicates extremely significant difference between treatments and CK ($P<0.0001$); **, **** indicates extremely significant difference between treatments and model group ($P<0.001$, $P<0.0001$).

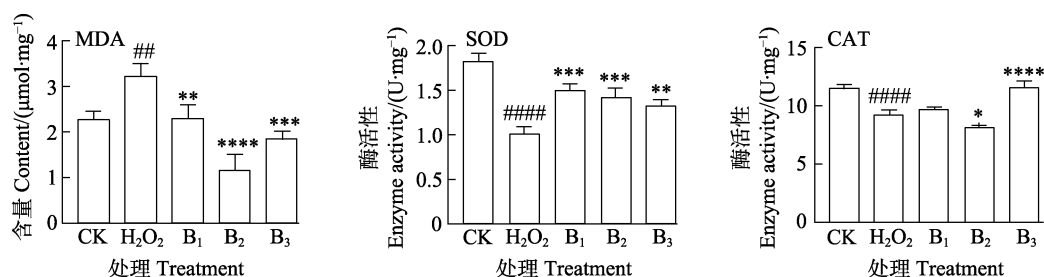
图 6 槟榔碱对 H_2O_2 诱导 SH-SY5Y 细胞线粒体膜电位的影响

Fig. 6 Effect of arecoline on Mitochondrial membrane potential of H_2O_2 -induced SH-SY5Y cells

重要因素^[21-22], 通过制约氧化损伤来维持细胞内氧化-抗氧化平衡。如图 7 所示, H_2O_2 诱导后, H_2O_2 模型组细胞中的 MDA 含量显著高于 CK ($P<0.01$), 而 SOD 和 CAT 活性则显著下降 ($P<0.0001$); 在槟榔碱干预后, 与 H_2O_2 模型组相比, 槟榔碱高剂量组 (140 $\mu\text{mol/L}$) 均能显著下调 MDA 水平 ($P<0.001$), 并提高抗氧化物 SOD、CAT 活性 ($P<0.01$, $P<0.0001$)。表明在槟榔碱干预后提高了细胞内的抗氧化物水平。

2.3.5 相关蛋白表达分析 (1) Nrf2/HO-1 信号

通路相关蛋白。核因子促红细胞生成素相关因子-2 (nuclear factor E2-related factor-2, Nrf2) 是作用于机体氧化应激调节中枢中重要的抗氧化转录因子^[23]。激活后的 Nrf2 与抗氧化反应的元件 (antioxidant response element, ARE) 结合^[24], 被转移到细胞核中, 上调血红素加氧酶 1 (heme oxygenase-1, HO-1) 的表达以达到减轻氧化应激的目的。通常情况下, Keap1 与 Nrf2 在细胞质结合为二聚体, 并作为 Nrf2 的内源性抑制剂, 以维持细胞内 Nrf2 稳态^[25]。如图 8 所示, 与 CK 相比,

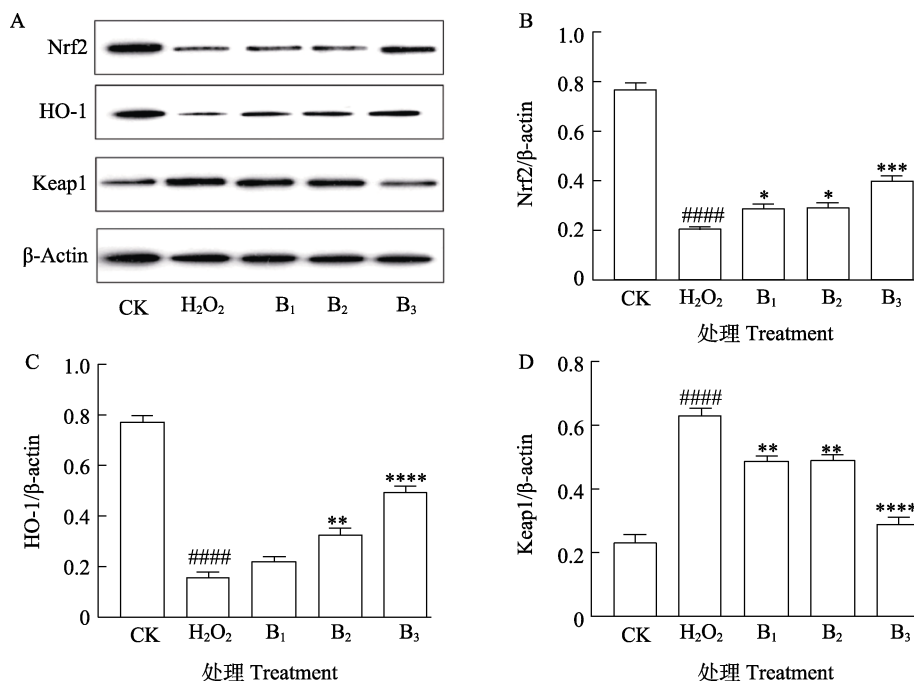


##、####表示处理与 CK 间差异极显著 ($P<0.01$, $P<0.0001$); *表示处理与模型组间差异显著 ($P<0.05$), **、***、****表示处理与模型组间差异极显著 ($P<0.01$, $P<0.001$, $P<0.0001$)。

##, #### indicates extremely significant difference between treatments and CK ($P<0.01$, $P<0.0001$); * indicates significant difference between treatments and model group ($P<0.05$), **, ***, **** indicates extremely significant difference between treatments and model group ($P<0.01$, $P<0.001$, $P<0.0001$).

图 7 槟榔碱对 H_2O_2 诱导 SH-SY5Y 细胞 MDA 含量和 SOD、CAT 活性的影响

Fig. 7 Effect of arecoline on MDA content and SOD, CAT activity of H_2O_2 -induced SH-SY5Y cells



A: 蛋白印记图; B: Nrf2 蛋白; C: HO-1 蛋白; D: Keap1 蛋白。####表示处理与 CK 间差异极显著 ($P<0.0001$); *表示处理与模型组间差异显著 ($P<0.05$), **、***、****表示处理与模型组间差异极显著 ($P<0.01$, $P<0.001$, $P<0.0001$)。

A: Protein imprinting map; B: Nrf2 protein; C: HO-1 protein; D: Keap1 protein. #### indicates extremely significant difference between treatments and CK ($P<0.0001$); * indicates significant difference between treatments and model group ($P<0.05$), **, ***, **** indicates extremely significant difference between treatments and model group ($P<0.01$, $P<0.001$, $P<0.0001$).

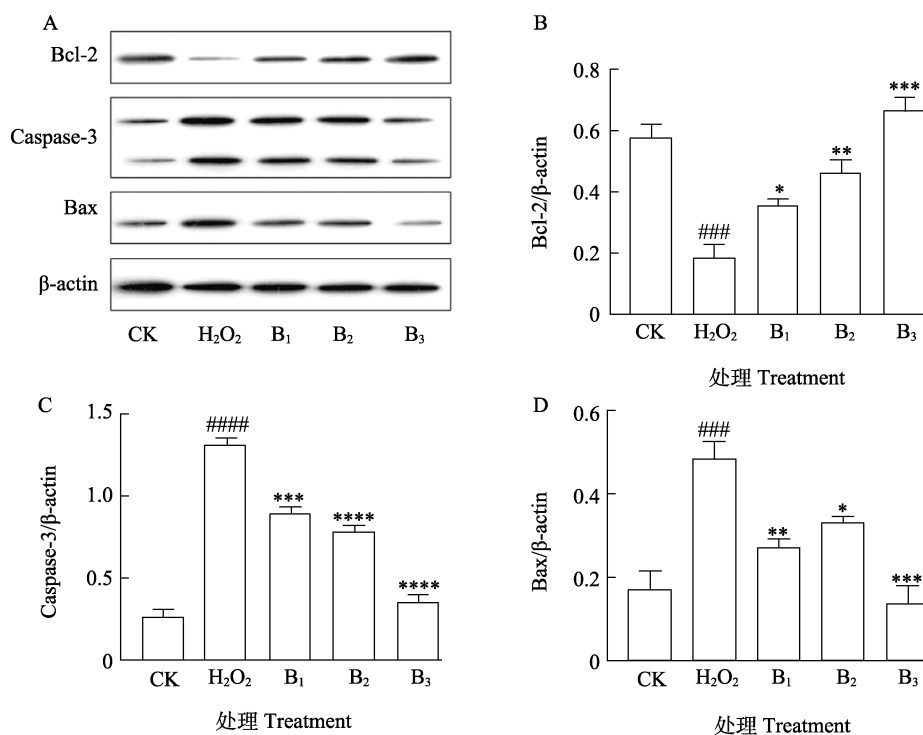
图 8 槟榔碱对 H_2O_2 诱导 SH-SY5Y 细胞 Nrf2/HO-1 信号通路相关蛋白的影响

Fig. 8 Effect of arecoline on the Nrf2/HO-1 signaling pathway related proteins in H_2O_2 -induced SH-SY5Y cells

H₂O₂ 模型组中的 Nrf2、HO-1 蛋白水平显著下降 ($P<0.0001$), 对 Nrf2/HO-1 信号通路有负调控功能的 Keap1 蛋白水平显著升高 ($P<0.0001$)。与 H₂O₂ 模型组相比, 槟榔碱干预组能显著提高 Nrf2、HO-1 蛋白水平 ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$, $P<0.0001$); 显著下调 Keap1 蛋白水平 ($P<0.01$, $P<0.0001$)。结果表明, 槟榔碱可通过提高 Nrf2/HO-1 信号通路中的 Nrf2、HO-1 蛋白水平, 抑制 Keap1 蛋白水平来减轻 H₂O₂ 对 SH-SY5Y 细胞的氧化损伤。

(2) Bcl-2/Bax/Caspase-3 信号通路相关蛋白。细胞凋亡是一个由多种因素和多种蛋白共同调控的复杂生理过程, 其中, Bcl-2、Caspase 家族蛋

白是细胞凋亡的关键调节分子, 线粒体是其调控内在凋亡途径的靶点^[26]。线粒体形态的改变、外膜电位变化与细胞损伤、凋亡密切相关^[27]。如图 9 所示, 与 CK 相比, H₂O₂ 模型组中的 Bcl-2 蛋白水平显著下降 ($P<0.001$), 而 Bax、Caspase-3 蛋白水平显著提高 ($P<0.001$, $P<0.0001$)。与 H₂O₂ 模型组相比, 槟榔碱干预组能显著提高 Bcl-2 蛋白水平 ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.0001$), 而显著下调 Bax、Caspase-3 蛋白水平 ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$, $P<0.0001$)。结果表明, 槟榔碱可通过提高 Bcl-2/Bax/Caspase-3 信号通路中的 Bcl-2 蛋白水平, 抑制 Bax 和 Caspase-3 蛋白水平来减轻 H₂O₂ 对 SH-SY5Y 细胞的氧化损伤。



A: 蛋白印记图; B: Bcl-2 蛋白; C: Caspase-3 蛋白; D: Bax 蛋白。###、####表示处理与 CK 间差异极显著 ($P<0.0001$); *表示处理与模型组间差异显著 ($P<0.05$), **, ***, ****表示处理与模型组间差异极显著 ($P<0.01$, $P<0.001$, $P<0.0001$)。

A: Protein imprinting map; B: Bcl-2 protein; C: Caspase-3 protein; D: Bax protein. ###, #### indicates extremely significant difference between treatments and CK ($P<0.001$, $P<0.0001$); * indicates significant difference between treatments and model group ($P<0.05$), **, ***, **** indicates extremely significant difference between treatments and model group ($P<0.01$, $P<0.001$, $P<0.0001$).

图 9 槟榔碱对 H₂O₂ 诱导 SH-SY5Y 细胞 Bcl-2/Bax/Caspase-3 信号通路相关蛋白的影响

Fig. 9 Effect of arecoline on Bcl-2/Bax/Caspase-3 signaling pathway related proteins in H₂O₂-induced SH-SY5Y cells

3 讨论

近年来, 氧化应激被认为是多种神经退行性疾病中一个重要的致病因素^[28]。细胞内的氧化-抗氧化失衡会促使细胞发生氧化应激^[29], 进而损伤线粒体功能、DNA、RNA 蛋白质和脂质或诱发细胞凋亡, 对机体造成不可逆伤害^[30]。研究表明,

低浓度槟榔碱能上调血红素加氧酶-1^[31]、铁蛋白轻链、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、谷氨酸-半胱氨酸连接酶催化亚基和谷胱甘肽还原酶^[32]。槟榔水提醇沉物可作为一种潜在的镇痛、抗炎抗氧化剂^[6]。石翠格等^[33]发现 100 μmol/L 槟榔碱能够逆转 ox-LDL 所致的内皮细胞损伤, 并下调炎症因子表

达, 其作用机制可能与激活内皮细胞乙酰胆碱靶点有关, 这一点在张伟等^[34]的研究中得到证实, 并且张伟等^[34]发现 1×10^{-5} mol/L 槟榔碱能下调小鼠巨噬细胞中炎症因子表达从而减轻炎症水平, 其作用机制可能与过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ) 有关。裴海月等^[15]研究发现在连续给予槟榔 14 d 后, 小鼠体内 SOD、CAT 活性明显升高, 且 MDA 含量显著下降, 表明槟榔具有较好的抗氧化活性。此外, 槟榔碱能通过提高细胞的总抗氧化能力, 降低 MDA 的产生来减轻链尿佐菌素 (STZ) 诱导的 INS-1 细胞氧化损伤^[35]。本研究发现, 槟榔碱在 50~200 μ mol/L 浓度范围内对 SH-SY5Y 细胞无毒性作用; 在 150 μ mol/L H₂O₂ 诱导 24 h 条件下, 以槟榔碱 35、70、140 μ mol/L 三个浓度对细胞进行预保护处理, 可以有效降低 H₂O₂ 对细胞的氧化损伤, 使细胞活力以及细胞内线粒体膜电位升高, 减少细胞凋亡, 降低 MDA 的产生, 提高细胞内 SOD、CAT 活性, 槟榔碱各浓度组均能上调 Nrf2、HO-1 蛋白水平并下调 Keap1 蛋白表达水平。该结果表明, 槟榔碱的抗氧化作用与 Nrf2/HO-1/Keap1 通路有关, 能负调控 Keap1 蛋白水平, 降低 Nrf2 泛素化降解, 提高下游抗氧化蛋白 HO-1 水平, 增强细胞内抗氧化酶活性, 减少氧化物的产生, 以维持细胞内氧化-抗氧化平衡。

H₂O₂ 诱导使活性氧大量增加, 导致线粒体外膜电位损耗、渗透压改变, 进而导致线粒体膜破裂, 细胞凋亡的发生变得不可逆转。本研究结果表明, 槟榔碱可有效调控 Bcl-2/Caspase-3/Bax 凋亡通路, 下调凋亡因子 Caspase-3、Bax 的表达水平, 上调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达水平, 阻止 Caspase-3 的活化进而发生级联反应。此前研究表明, 槟榔碱干预能上调抑凋亡基因 Bcl-2 的表达, 保护胰腺与 β 细胞^[36]。表明抗凋亡是槟榔碱发挥神经细胞保护作用的另一作用机制。

综上所述, 在无毒浓度范围内, 槟榔碱可有效清除 LDH、MDA, 并能够提高抗氧化酶 SOD、CAT 活性, 在改善 H₂O₂ 诱导的细胞氧化应激方面表现出良好的效果, 其作用机制可能与激活抗氧化信号通路 Nrf2/HO-1/Keap1, 并抑制凋亡信号通路 Bcl-2/Caspase-3/Bax 的表达有关。本研究结果可为槟榔碱神经活性的深入挖掘提供数据支

持, 并为槟榔用于神经调节类健康产品的开发奠定理论基础。

参考文献

- [1] LI T, ITO A, CHEN X, LONG C, OKAMOTO M, RAOUL F, GIRAUDOUX P, YANAGIDA T, NAKAO M, SAKO Y, XIAO N, CRAIG P S. Usefulness of pumpkin seeds combined with areca nut extract in community-based treatment of human taeniasis in northwest Sichuan province, China[J]. Acta Trop, 2012, 124(2): 152-157.
- [2] ZHOU H, HE J. Treatment methods of traditional Chinese medicine for infection with *Ascaris lumbricoides* and other nematodes[M]//MEHLHORN H, WU Z D, YE B. Treatment of human parasitosis in traditional Chinese medicine. Berlin, Heidelberg: Springer, 2014: 203-213.
- [3] KHAN S, MEHMOOD M H, ALI A N A, AHMED F S, DAR A, GILANI A H. Studies on anti-inflammatory and analgesic activities of betel nut in rodents[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2011, 135(3): 654-661.
- [4] LI C B, YANG X A, TANG W B, LIU C Y, XIE D P. Arecoline excites the contraction of distal colonic smooth muscle strips in rats via the M-3 receptor-extracellular Ca²⁺ influx-Ca²⁺ store release pathway[J]. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 2010, 88(4): 439-447.
- [5] 郭喜军, 王红霞, 丁晓坤, 郑陇军, 王苏霞, 范文杰. 槟榔水提液对大鼠胃肠运动的影响及其机制研究[J]. 四川中医, 2009, 27(2): 25-26.
GUO X J, WANG H X, DING X K, ZHENG L J, WANG S X, FAN W J. The effect and mechanism of betel nut water extract on gastrointestinal motility in rats[J]. Journal of Sichuan of Traditional Chinese Medicine, 2009, 27(2): 25-26. (in Chinese)
- [6] BHANDARE A M, KSHIRSAGAR A D, VYAWAHARE N S, HADAMBAR A A, THORVE V S. Potential analgesic, anti-inflammatory and antioxidant activities of hydroalcoholic extract of *Areca catechu* L. nut[J]. Food and Chemical Toxicology, 2010, 48(12): 3412-3417.
- [7] CALOGERO A E, KAMILARIS T C, GOMEZ M T, JOHNSON E O, TARTAGLIA M E, GOLD P W, CHROUSOS G P. The muscarinic cholinergic agonist arecoline stimulates the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis through a centrally-mediated corticotropin-releasing hormone-dependent mechanism[J]. Endocrinology, 1989, 125(5): 2445-2453.
- [8] DAR A, KHATOON S. Behavioral and biochemical studies of dichloromethane fraction from the *Areca catechu* nut[J]. Pharmacology, Biochemistry, and Behavior, 2000, 65(1): 1-6.

- [9] MAIESE K, HOLLOWAY H H, LARSON D M, SONCRANT T T. Effect of acute and chronic arecoline treatment on cerebral metabolism and blood flow in the conscious rat[J]. Brain research, 1994, 641(1): 65-75.
- [10] ONO M, MINAMOTO Y, SHIBATE S, WATANABE S. Attenuating effect of arecoline and physostigmine on an impairment of mealtime-associated activity rhythm in old rats[J]. Physiology & Behavior, 1995, 57(1): 189-191.
- [11] CHU N S. Effects of betel chewing on the central and autonomic nervous systems[J]. Journal of Biomedical Science, 2001, 8(3): 229-236.
- [12] SERIKULY N, ALPYSHOV E T, WANG D M, WANG J T, YANG L E, HU G J, YAN D N, DEMIN K A, KOLESNIKOVA T O, GALSTYAN D, AMSTISLAVSKAYA T G, BABASHEV A M, MOR M S, EFIMOVA E V, GAINETDINOV R R, STREKALOVA T, DE ABREU M S, SONG C, KALUEFF A V. Effects of acute and chronic arecoline in adult zebrafish: anxiolytic-like activity, elevated brain monoamines and the potential role of microglia[J]. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry, 2021, 104: 109977.
- [13] CHANDRA J, MALVIYA M, SADASHIVA C T, SUBHASH M N, RANGAPPA K S. Effect of novel arecoline thiazolidinones as muscarinic receptor 1 agonist in Alzheimer's dementia models[J]. Neurochemistry International, 2008, 52(3): 376-383.
- [14] LIU Y J, PENG W, HU M B, XU M, WU C J. The pharmacology, toxicology and potential applications of arecoline: a review[J]. Pharmaceutical Biology, 2016, 54(11): 2753-2760.
- [15] 裴海月, 姜宁, 王孟迪, 王凤忠, 敖冬梅, 王琼. 槟榔对小鼠的抗抑郁作用影响及机制研究[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(1): 24-32.
PEI H Y, JIANG N, WANG M D, WANG F Z, AO D M, WANG Q. Study on the antidepressant effect and mechanism of betel nut on mice[J]. Chinese Journal of Comparative Medicine, 2022, 32(1): 24-32. (in Chinese)
- [16] 何方婷, 陈嘉熠, 徐佳伊, 董科, 冷云, 姜春萍, 裴晓方. 氧化应激细胞模型建立的研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(7): 341-345.
HE F T, CHEN J Y, XU J Y, DONG K, LENG Y, JIANG C P, PEI X F. Research progress on the establishment of oxidative stress cell models[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(7): 341-345. (in Chinese)
- [17] 任晓玲, 许莉莉, 吕佩源. SH-SY5Y 细胞的神经分化与神经退行性疾病[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2022, 49(3): 88-92.
REN X L, XU L L, LYU P Y. Neural differentiation of SH-SY5Y cells and neurodegenerative diseases[J]. Journal of International Neurology and Neurosurgery, 2022, 49(3): 88-92. (in Chinese)
- [18] 张斌, 夏作理, 赵晓民, 张和平. 氧化应激模型的建立及其评价[J]. 中国临床康复, 2006(44): 112-114.
ZHANG B, XIA Z L, ZHAO X M, ZHANG H P. Establishment and evaluation of an oxidative stress model[J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2006(44): 112-114. (in Chinese)
- [19] DESAGHER S, MARTINOU J C. Executioners of cell death[J]. Trends in Cell Biology, 2016, 26(8): 560-562.
- [20] HSU W H, CHUNG C P, WANG Y Y, KUO Y H, YE H C H, LEE I J, LIN Y L. *Dendrobium nobile* protects retinal cells from UV-induced oxidative stress damage via Nrf2/HO-1 and MAPK pathways[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2022, 288: 114886.
- [21] KRZYSZCZAK A, DYBOWSKI M, JOSKO I, KUSIAK M, SIKORA M, CZECH B. The antioxidant defense responses of *Hordeum vulgare* L. to polycyclic aromatic hydrocarbons and their derivatives in biochar-amended soil[J]. Environmental Pollution, 2022, 294: 118664.
- [22] TU J, JIN Y C, ZHUO J, CAO X T, LIU G H, DU H J, LIU L, WANG J, XIAO H. Exogenous GABA improves the antioxidant and anti-aging ability of silkworm (*Bombyx mori*)[J]. Food Chemistry, 2022, 383: 132400.
- [23] MA L N, LIU X Q, ZHAO Y Y, CHEN B D, LI X G, QI R M. Ginkgolide B reduces LOX-1 expression by inhibiting Akt phosphorylation and increasing Sirt1 expression in oxidized LDL-stimulated human umbilical vein endothelial cells[J]. PLoS One, 2013, 8(9): e74769.
- [24] SALDANHA J F, LEAL V D, STENVINKEL P, CARRARO-EDUARDO J C, MAFRA D. Resveratrol: why is it a promising therapy for chronic kidney disease patients?[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2013, 2013: 963217.
- [25] LOBODA A, DAMULEWICZ M, PYZA E, JOZKOWICZ A, DULAK J. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2016, 73(17): 3221-3247.
- [26] BRECKENRIDGE D G, XUE D. Regulation of mitochondrial membrane permeabilization by Bcl-2 family proteins and caspases[J]. Current Opinion in Cell Biology, 2004, 16(6): 647-652.
- [27] BERTHOLET A M, DELERUE T, MILLET A M, MOULIS M F, DAVID C, DALOYAU M, ARNAUNE-PELLOQUIN L, DAVEZAC N, MILS V, MIGUEL M C, ROJO M, BELENGUER P. Mitochondrial fusion/fission dynamics in neurodegeneration and neuronal plasticity[J]. Neurobiology

- of Disease, 2016, 90: 3-19.
- [28] ZHU Y J, LI Y, ZHANG Y, YU Z J, SHAO C M. Relationship between transcription factor E2-related factor 2-antioxidant response elements signaling pathway and antioxidant effects[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2013, 25(3): 458-463.
- [29] PARIHAR M S, PARIHAR A, VILLAMENA F A, VACCARO P S, GHAFORIFAR P. Inactivation of mitochondrial respiratory chain complex I leads mitochondrial nitric oxide synthase to become pro-oxidative[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008, 367(4): 761-767.
- [30] NISSANKA N, MORAES C T. Mitochondrial DNA damage and reactive oxygen species in neurodegenerative disease[J]. Febs Letters, 2018, 592(5): 728-742.
- [31] TSAI C H, YANG S F, LEE S S, CHANG Y C. Augmented heme oxygenase-1 expression in areca quid chewing-associated oral submucous fibrosis[J]. Oral Diseases, 2009, 15(4): 281-286.
- [32] THANGJAM G S, KONDAIAH P. Regulation of oxidative-stress responsive genes by arecoline in human keratinocytes[J]. Journal of Periodontal Research, 2009, 44(5): 673-682.
- [33] 石翠格, 胡刚, 汪海. 槟榔碱对脂质过氧化内皮细胞炎症因子表达的影响[J]. 中华心血管病杂志, 2004(7): 81.
- SHI C G, HU G, WANG H. Effect of arecoline on expression of inflammatory factors in endothelial cells with lipid peroxidation[J]. Chinese Journal of Cardiology, 2004(7): 81. (in Chinese)
- [34] 张伟, 周寿红, 凌红艳, 姚起鑫, 亓竹青, 王光, 胡弼. 槟榔碱抑制氧化型低密度脂蛋白诱导的小鼠巨噬细胞炎症因子表达及其机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2009, 17(4): 269-272.
- ZHANG W, ZHOU S H, LING H Y, YAO Q X, QI Z Q, WANG G, HU B. Arecoline inhibits the expression of inflammatory factors in macrophages induced by oxidized low density lipoprotein and its mechanism[J]. Chinese Journal of Arteriosclerosis, 2009, 17(4): 269-272. (in Chinese)
- [35] 李中平, 任文辉, 张保丽, 蔺美玲, 陈红梅, 赵丽, 王志强, 张小郁. 槟榔碱对 STZ 致 INS-1 细胞损伤的保护和修复作用[J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(23): 4583-4585.
- LI Z P, REN W H, ZHANG B L, LIN M L, CHEN H M, ZHAO L, WANG Z Q, ZHANG X Y. The protective and repair effects of arecoline on STS-1 cell damage induced by STZ[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2011, 31(23): 4583-4585. (in Chinese)
- [36] 亓竹青. 槟榔碱对 2 型糖尿病大鼠胰腺细胞的保护作用及其机制[D]. 衡阳: 南华大学, 2010.
- QI Z Q. Protection effect of arecoline on pancreas cells in type 2 diabetic rats and its mechanism[D]. Hengyang: University of South China, 2010. (in Chinese)