

· 研究论文 ·

异鼠李素激活 Sirt1/PGC-1 α 信号通路抑制 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤

张雯¹, 宋俊科¹, 朱晓瑜², 杨海光¹, 周启蒙¹, 许启泰^{2*}, 杜冠华^{1*}

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 药物靶点研究与新药筛选北京市重点实验室, 北京 100050; 2. 海南绿槟榔科技发展有限公司, 海南 定安 571200)

摘要: 研究异鼠李素 (isorhamnetin, ISO) 对 1-甲基-4-苯基吡啶离子 (1-methyl-4-phenylpyridinium, MPP⁺) 损伤 SH-SY5Y 细胞的保护作用及机制。建立 MPP⁺ 损伤 SH-SY5Y 细胞模型, MTT 和 LDH 法检测细胞活力, 并测定细胞内超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 的活性, 考察细胞氧化应激水平。应用 DCFH-DA 和 MitoSOX 荧光探针检测细胞内活性氧自由基 (ROS) 和线粒体内超氧化物水平, 应用 JC-1 检测线粒体膜电位变化。Western blot 和免疫荧光测定细胞中沉默信息调节因子 2 相关酶 1 (silent mating type information regulation 2 homolog 1, Sirt1) 和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅助激活因子 1 α (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α , PGC-1 α) 的蛋白表达, 并且采用 Western blot 对凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 的表达进行检测。500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MPP⁺ 损伤导致 SH-SY5Y 细胞存活率显著降低为 52.46%, LDH 释放量显著增加至 417.63%。5 和 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ISO 通过增加 Sirt1 和 PGC-1 α 的表达, 减轻 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤, 降低 LDH 释放, 显著减少 MPP⁺ 诱导的细胞总 ROS 增加, 降低线粒体内超氧化物水平, 抑制线粒体膜电位下降, 其细胞存活率分别增加到 61.61% 和 67.55%。此外, ISO 能够降低 MPP⁺ 损伤所致 Bax 升高, 抑制 Bcl-2 的降低, 抑制 MPP⁺ 引起的 SH-SY5Y 细胞凋亡。而 ISO 所介导的细胞凋亡抑制, 能够被 Sirt1 特异性抑制剂 Sirtinol 所逆转。ISO 通过激活 Sirt1/PGC-1 α 信号途径, 减轻氧化应激损伤, 抑制细胞凋亡, 发挥神经细胞保护作用。

关键词: 异鼠李素; 沉默信息调节因子 2 相关酶 1; 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅助激活因子 1 α ; 神经保护
中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)11-1976-06

Isorhamnetin activates Sirt1/PGC-1 α signaling pathway to inhibit MPP⁺-induced SH-SY5Y cell injury

ZHANG Wen¹, SONG Jun-ke¹, ZHU Xiao-yu², YANG Hai-guang¹, ZHOU Qi-meng¹,
XU Qi-tai^{2*}, DU Guan-hua^{1*}

(1. State Key Laboratory of Bioactive Substances and Functions of Natural Medicines, Beijing Key Laboratory of Drug Target and Screening Research, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 2. Hainan Green Areca Technology Development Co. LTD., Ding'an 571200, China)

Abstract: We studied the protective effect and mechanism of isorhamnetin (ISO) on 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)-induced SH-SY5Y cells injury. MPP⁺-induced SH-SY5Y cell injury model was established, and cell viability was measured by MTT and LDH methods. The activity of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in cells were determined to investigate the level of oxidative stress. DCFH-DA and

收稿日期: 2019-03-25; 修回日期: 2019-04-24.

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程 (2017-I2M-1-010); 海南省重大科技计划资助项目 (ZDKJ2016003).

*通讯作者 Tel: 15808969016, E-mail: xuqitai@vip.sina.com;

Tel: 86-10-63165184, E-mail: dugh@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0205

MitoSOX fluorescence probes were used to detect the levels of intracellular reactive oxygen species (ROS) and mitochondria superoxide, respectively. JC-1 fluorescence probe was used to detect the changes of mitochondrial membrane potential. Western blot and immunofluorescence methods were used to determine the expressions of Sirt1 and PGC-1 proteins, as well as the expression levels of apoptosis-related proteins Bax and Bcl-2. MPP⁺ at the dose of 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ significantly reduced SH-SY5Y cells viability to 52.46% and increased LDH release to 417.63%. ISO at 5 and 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ significantly increased the expression of Sirt1 and PGC-1 α , inhibited LDH release, reduced intracellular ROS and mitochondria superoxide, inhibited the decline of mitochondrial membrane potential and increased cell viability to 61.61% and 67.55%. In addition, ISO could downregulate the expression of Bax and upregulate the expression of Bcl-2 to reduce cell apoptosis. ISO-mediated inhibition of apoptosis could be reversed by Sirt1 specific inhibitor Sirtinol. Through activating Sirt1/PGC-1 α signaling pathway, ISO could reduce oxidative stress injury and inhibit cell apoptosis to protect cells from MPP⁺ injury.

Key words: isorhamnetin; silent mating type information regulation 2 homolog 1; peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α ; neuroprotection

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是一种以黑质多巴胺能神经元变性缺失为主要特征的神经退行性疾病^[1]。氧化应激在帕金森病的发病机制中起着至关重要的作用^[2,3]。活性氧的产生 (reactive oxygen species, ROS) 超过细胞抗氧化能力时, 会发生氧化应激损伤, 过度的氧化应激会引发一系列病理生理反应。ROS 参与帕金森病等神经退行性疾病的发生和发展, 抗氧化药物有望用于帕金森病的治疗^[4]。

沉默信息调节因子 2 相关酶 1 (silent mating type information regulation 2 homolog 1, Sirt1) 是依赖于烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的组蛋白脱乙酰化酶, 在氧化应激中起重要作用^[5-7]。Sirt1 可使多种蛋白脱乙酰化, 调节细胞内氧化应激、凋亡和衰老等过程^[8]。过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅助激活因子 1 α (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α , PGC-1 α) 是 Sirt1 去乙酰化底物, 参与线粒体生物合成及能量代谢等通路的调节^[9-11]。线粒体是细胞产生 ROS 的主要来源, 去乙酰化的 PGC-1 α 可刺激线粒体生物合成, 因此, Sirt1/PGC-1 α 信号通路在细胞防御氧化应激和线粒体功能障碍中发挥重要作用。

异鼠李素 (isorhamnetin, ISO) 是一种黄酮类化合物, 广泛存在于多种植物的花、果实和叶子中。研究表明, ISO 具有多种药理学活性, 能够抑制 NF- κ B 信号通路发挥抗炎作用^[12], 能够清除自由基, 减轻氧化应激造成的心肌细胞损伤^[13]。然而, ISO 能否通过 Sirt1/PGC-1 α 信号通路抑制 1-甲基-4-苯基吡啶离子 (1-methyl-4-phenylpyridinium, MPP⁺) 诱导的 SH-SY5Y 细胞氧化损伤, 未见报道。因此, 本实验建立 MPP⁺ 损伤 SH-SY5Y 细胞模型, 探讨 ISO 对 MPP⁺ 损伤 SH-SY5Y 细胞的保护作用及机制, 为帕金森病等神经退行性疾病的治疗提供新的思路。

材料与方法

试剂 异鼠李素购自上海源叶生物科技有限公司。人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 购自中国医学科学院基础医学研究所。Dulbecco's modified eagle medium: nutrient mixture F-12 (DMEM/F12) 培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐 (2',7'-dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA) 和红色线粒体超氧化物荧光探针 (MitoSOX red mitochondrial superoxide indicator, MitoSOX) 均购自 Thermo Scientific 公司。MPP⁺、Hoechst 33258、Sirtinol、N-乙酰半胱氨酸 (N-acetylcysteine, NAC) 和 MTT 均购自 Sigma 公司; 乳酸脱氢酶检测试剂盒 (LDH cytotoxicity assay kit, LDH) 和线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1 mitochondrial membrane potential assay kit, JC-1) 均购自碧云天生物技术公司。超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 试剂盒和谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。Sirt1、PGC-1 α 、 β -actin、Bax、Bcl-2 抗体和 anti-rabbit IgG (H+L), F(ab')₂ fragment、anti-mouse IgG (H+L), F(ab')₂ fragment 荧光二抗均购自 Cell Signaling Technology 公司。Goat anti-rabbit IgG 和 Goat anti-mouse IgG 均购自江苏康为世纪生物科技有限公司。

细胞培养 用含 10% 胎牛血清, 100 $\text{u}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素和 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 链霉素的 DMEM/F12 培养液, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度条件下培养 SH-SY5Y 细胞。

MTT 检测细胞存活率 正常对照组细胞始终使用完全培养基孵育。加药组给予不同浓度 ISO 预孵育 2 h, 之后损伤组加入 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MPP⁺, 孵育 24 h 后吸除培养液, 每孔加入 100 μL MTT 工作液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 4 h 后吸除 MTT, 每孔加入 100 μL DMSO 溶解结晶后, 490 nm 处测定吸光度。

LDH 释放率检测 实验终点, 取细胞上清, 应用碧云天生物技术公司提供的检测试剂盒测定 LDH 释放, 具体操作按照说明书进行。

细胞活性氧的检测 实验终点, 倾去培养液, PBS 洗涤 1 次, 加入 DCFH-DA 和 Hoechst 33258, 避光孵育 30 min 后 PBS 洗涤 3 次, 应用高内涵细胞分析系统进行检测。

线粒体膜电位检测 实验终点, 倾去培养液, PBS 洗涤 1 次, 加入含 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Hoechst 33258 的 JC-1 染色工作液, 避光孵育 20 min 后用染色缓冲液洗涤 2 次。最终加入 $100 \mu\text{L}$ 培养基, 应用高内涵细胞分析系统进行检测。

SOD 和 GSH-Px 活性测定 实验终点, 收集细胞上清液, 根据南京建成科技有限公司提供的试剂盒, 测定 SOD 和 GSH-Px 活性。

Western blot 检测蛋白表达 实验终点, 磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗涤 1 次, 加入蛋白裂解液后冰上裂解 30 min, 提取细胞总蛋白。加入 loading buffer 后沸水浴 10 min。采用等量上样, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 之后转印至聚偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride, PVDF)。将转印后的 PVDF 膜置于 5% 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 封闭 2 h 后分别用稀释后的 Sirt1、PGC-1 α 、Bax、Bcl-2 和 β -actin 抗体 4°C 孵育过夜。接下来用 Tris 缓冲盐溶液 (Tris buffered saline Tween, TBST) 洗涤 3 次, 再置于稀释后对应种属二抗中室温孵育 2 h, 最终 TBST 洗涤 3 次后显色成像。

免疫荧光检测 Sirt1、PGC-1 α 蛋白表达 实验终点, 吸除原培养液, PBS 洗涤 1 次, 加入多聚甲醛固定; PBS 洗涤 1 次, 加入 0.3% Triton-100 透化; PBS 洗涤 1 次, 加入 5% BSA 封闭; 之后加入稀释后的 Sirt1 和 PGC-1 α 抗体孵育过夜; 回收抗体后用 PBS 洗涤 3 次, 然后加入对应的荧光二抗稀释液, 避光孵育 1.5 h; PBS 洗涤 3 次后加入 Hoechst 33258 避光孵育 30 min; 最后 PBS 洗涤 1 次, 置于高内涵分析仪进行检测。

统计学处理 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 对于统计学差异分析, 使用 GraphPad Prism version 7.0 (GraphPad Software, CA, USA) 软件中 one-way ANOVA (Tukey's post hoc test) 方法进行统计处理。 $P < 0.05$ 表示具有显著的统计学差异。

结果

1 ISO 减轻 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤

如图 1A 所示, 与正常对照组相比, $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MPP⁺ 作用后 SH-SY5Y 细胞存活率降低为正常对照组的

的 52.46%, 5 和 $15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ISO 及 $5 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 抗氧化阳性药 NAC 能够显著提高细胞存活率, 细胞存活率分别为正常对照组的 61.61%、67.55% 和 63.39% ($P < 0.05$ 、 $P < 0.001$ 和 $P < 0.05$)。LDH 检测同样证实了 ISO 对 SH-SY5Y 细胞的保护作用, 如图 1B 所示, MPP⁺ 损伤后 SH-SY5Y 细胞中 LDH 释放量显著增加 ($P < 0.001$), 5 和 $15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ISO 及 $5 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NAC 均能够显著抑制 MPP⁺ 诱导的 LDH 释放 ($P < 0.05$)。

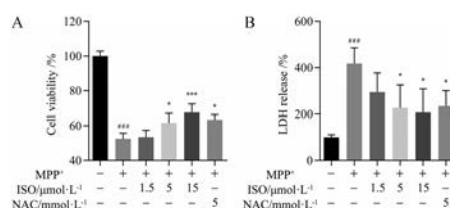


Figure 1 The effects of isorhamnetin (ISO) on SH-SY5Y cell viability. A: Cell viability was determined using MTT assay; B: LDH release was detected by the LDH cytotoxicity assay kit. $n = 4$, $\bar{x} \pm s$. ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs MPP⁺ group. NAC: *N*-Acetylcysteine; LDH: Lactate dehydrogenase; MPP⁺: 1-Methyl-4-phenylpyridinium

2 ISO 增加 MPP⁺ 损伤 SH-SY5Y 细胞中 SOD 和 GSH-Px 的活性

如图 2 所示, 与对照组相比, MPP⁺ 损伤 SH-SY5Y 细胞模型组 SOD 和 GSH-Px 活性显著降低 ($P < 0.001$)。5 和 $15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ISO 预处理能够显著提高 SH-SY5Y 细胞中 SOD 的活性 ($P < 0.01$, $P < 0.001$), 以及 GSH-Px 的活性 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

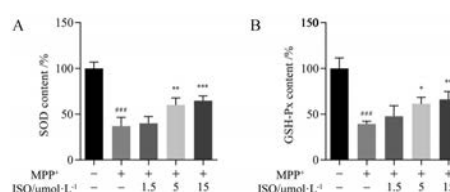


Figure 2 Effects of ISO on the activities of superoxide dismutase (SOD, A) and glutathione peroxidase (GSH-Px, B). $n = 4$, $\bar{x} \pm s$. ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs MPP⁺ group

3 ISO 降低 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞活性氧和线粒体超氧化物产生

采用 ROS 特异性荧光探针 DCFH-DA 对 MPP⁺ 损伤 SH-SY5Y 细胞后, 细胞内 ROS 的生成量进行检测。如图 3A 和 B 所示, $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MPP⁺ 损伤后模型组 SH-SY5Y 细胞中 ROS 释放量显著增加 ($P < 0.001$), 而 5 和 $15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ISO 预处理均能显著降低 MPP⁺ 损伤引起的 ROS 释放 ($P < 0.01$, $P < 0.001$)。采用线粒体超氧

化物荧光探针 MitoSOX, 对 MPP⁺ 损伤 SH-SY5Y 细胞后线粒体内超氧化物水平进行检测。如图 3A 和 C 所示, MPP⁺ 损伤模型组细胞线粒体中 MitoSOX 荧光强度显著高于正常对照组 ($P < 0.001$), 5 和 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ISO 能够显著降低线粒体中超氧化物水平 ($P < 0.001$)。

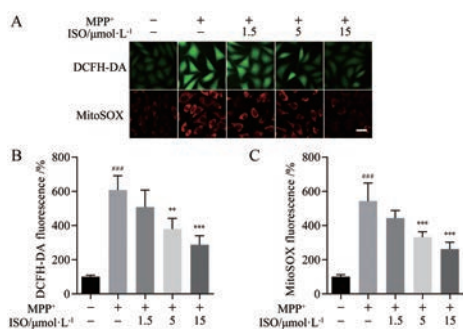


Figure 3 The effects of ISO on the MPP⁺ induced cellular reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial superoxide production. A: Representative images of DCFH-loaded and MitoSOX-loaded SH-SY5Y cells; B: Quantitative analysis of the production of DCFH-DA; C: Quantitative analysis of the production of MitoSOX. $n = 4$, $\bar{x} \pm s$. ### $P < 0.001$ vs control group; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs MPP⁺ group. Scale bar = 20 μm . DCFH-DA: 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate; MitoSOX: MitoSOXTM red mitochondrial superoxide indicator

4 ISO 减缓 MPP⁺ 损伤 SH-SY5Y 细胞线粒体膜电位下降

如图 4 所示, 与正常对照组相比, MPP⁺ 损伤 SH-SY5Y 细胞后线粒体膜电位显著降低 ($P < 0.001$), 红色荧光转变为绿色。ISO (5 和 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 可显著抑制 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤, 减缓线粒体膜电位下降 ($P < 0.05$, $P < 0.001$)。

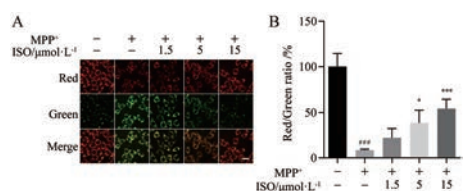


Figure 4 ISO increased mitochondrial membrane potential in SH-SY5Y cells after MPP⁺ injury. A: Representative double immunofluorescent staining for JC-1; B: ISO increased the ratio of red and green fluorescence intensity. $n = 4$, $\bar{x} \pm s$. ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs MPP⁺ group. Scale bar = 20 μm

5 ISO 提高 SH-SY5Y 细胞中 Sirt1 和 PGC-1 α 的蛋白表达

采用 Western blot 和免疫荧光检测 ISO 对 SH-SY5Y 细胞中 Sirt1/PGC-1 α 信号通路的影响。如图 5

所示, 与正常对照组相比, MPP⁺ 损伤 SH-SY5Y 细胞模型组中 Sirt1 和 PGC-1 α 蛋白水平显著降低 ($P < 0.001$)。与模型组相比, ISO 预孵育能够显著提高 Sirt1 和 PGC-1 α 的表达水平。Sirt1 特异性抑制剂 Sirtinol 能够部分阻断 ISO 引起的 Sirt1 和 PGC-1 α 蛋白水平升高。

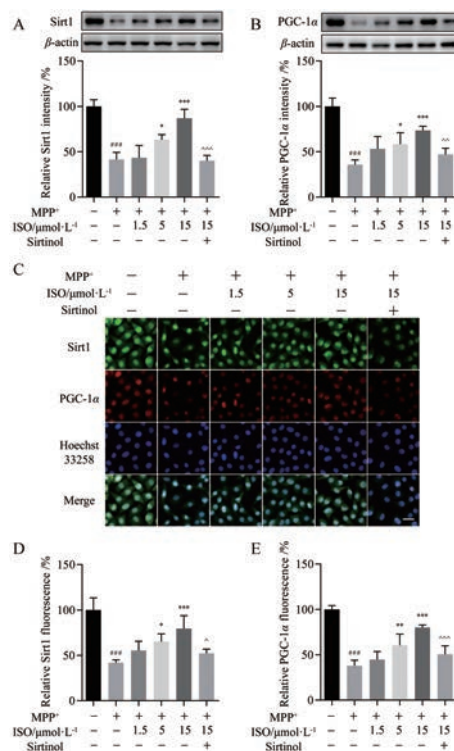


Figure 5 The effects of ISO on silent mating type information regulation 2 homolog 1 (Sirt1) and peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α) levels in MPP⁺-injured SH-SY5Y cells. A: Sirt1 levels detected by Western blot; B: PGC-1 α levels detected by Western blot; C: Sirt1 and PGC-1 α levels detected by immunofluorescence; D: The quantitative analysis of Sirt1 fluorescence; E: The quantitative analysis of PGC-1 α fluorescence. $n = 4$, $\bar{x} \pm s$. ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs MPP⁺ group; ^ $P < 0.05$, ^^ $P < 0.01$, ^^ $P < 0.001$ vs 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ISO group. Scale bar = 20 μm

6 ISO 抑制 MPP⁺ 损伤引起的 SH-SY5Y 细胞凋亡

采用 Western blot 法对凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 的表达情况进行检测。如图 6 所示, 与正常对照组比较, MPP⁺ 损伤导致 SH-SY5Y 细胞抗凋亡蛋白 Bcl-2 显著降低, 促凋亡蛋白 Bax 表达明显增加。ISO 能够显著降低 MPP⁺ 导致的 Bax 表达升高, 抑制 Bcl-2 的降低, 抑制细胞凋亡, 而 ISO 所介导的细胞凋亡抑制能够被 Sirt1 特异性抑制剂 Sirtinol 所逆转。

讨论

1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶 (1-methyl-4-phenyl-

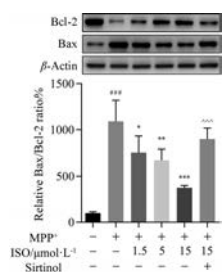


Figure 6 The effects of ISO on the expression of Bax and Bcl-2. β -Actin served as the loading control. $n = 4$, $\bar{x} \pm s$. $###P < 0.001$ vs control group; $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ vs MPP⁺ group; $^^P < 0.001$ vs 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ISO group

1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP) 是一种神经毒素, 可经 B 型单胺氧化酶转换为 MPP⁺, MPP⁺通过多巴胺转运体被转运到细胞内, 并被多巴胺能神经元内的线粒体吸收, 通过抑制线粒体电子传递复合物破坏细胞内氧化磷酸化过程, 最终影响细胞内能量消耗和自由基产生, 引起氧化应激损伤。SH-SY5Y 细胞是具有多巴胺能特性的神经瘤细胞。研究表明, ISO 具有较好的抗肿瘤、降血脂、抗氧化等药理学活性^[14-17]。本实验采用 MPP⁺处理 SH-SY5Y 诱导细胞损伤, 研究 ISO 对 MPP⁺损伤 SH-SY5Y 细胞的保护作用。通过检测细胞活力, 发现 ISO 能够提高 MPP⁺损伤后 SH-SY5Y 细胞存活率。LDH 检测进一步证实了 ISO 的保护作用, 与 MPP⁺损伤模型组相比, ISO 预处理后 LDH 释放量显著降低。并且, ISO 能够增加 SOD 和 GSH-Px 的活性, 抑制 MPP⁺损伤导致的细胞内活性氧和线粒体超氧化物增加, 减缓 SH-SY5Y 细胞线粒体膜电位下降。以上结果表明, ISO 对 MPP⁺损伤的 SH-SY5Y 细胞具有明显的保护作用。

激活 Sirt1 在阿尔茨海默病和帕金森病等神经退行性疾病的治疗中表现出良好作用^[18-20]。Sirt1 的激活, 可以促进 PGC-1 α 活化, 进而抑制氧化应激损伤, 改善线粒体功能。为了明确 ISO 对 MPP⁺损伤 SH-SY5Y 细胞的保护机制, 本实验通过加入 Sirt1 特异性抑制剂 Sirtinol 后采用 Western blot 和免疫荧光的方法, 考察 Sirt1/PGC-1 α 信号通路是否参与 ISO 对 SH-SY5Y 的保护作用。实验结果表明, ISO 通过 Sirt1/PGC-1 α 信号途径减弱 MPP⁺诱导的 SH-SY5Y 细胞中氧化损伤。Sirtinol 能够部分阻断 ISO 引起的 Sirt1 和 PGC-1 α 蛋白表达升高。抗凋亡蛋白 Bcl-2 和促凋亡蛋白 Bax 是线粒体凋亡途径的关键参与者。在本实验中, 通过 ISO 预处理可以逆转 MPP⁺损伤模型组中 Bcl-2 蛋白水平降低和 Bax 表达增加, 调节 Bcl-2 和 Bax 表达平衡, 抑制细胞凋亡, 而 ISO 所介导的细胞凋亡抑制, 能够被 Sirt1

特异性抑制剂 Sirtinol 所逆转。

综上所述, ISO 通过提高细胞存活率, 降低 LDH 释放, 清除细胞氧自由基和线粒体超氧化物, 减缓线粒体膜电位下降, 发挥 SH-SY5Y 细胞的保护作用。ISO 对 MPP⁺损伤后 SH-SY5Y 细胞的保护作用, 可能是通过激活 Sirt1/PGC-1 α 信号通路实现的。

References

- [1] Cookson MR, Bandmann O. Parkinson's disease: insights from pathways [J]. *Hum Mol Genet*, 2010, 19: R21-R27.
- [2] Wu DM, Han XR, Wen X, et al. Salidroside protection against oxidative stress injury through the Wnt/beta-catenin signaling pathway in rats with Parkinson's disease [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46: 1793-1806.
- [3] Li C, Tang B, Feng Y, et al. Pinostrobin exerts neuroprotective actions in neurotoxin-induced Parkinson's disease models through Nrf2 induction [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66: 8307-8318.
- [4] Ouyang L, Zhang L, Liu B. Autophagy pathways and key drug targets in Parkinson's disease [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 9-17.
- [5] Shekhar S, Yadav Y, Singh AP, et al. Neuroprotection by ethanolic extract of *Syzygium aromaticum* in Alzheimer's disease like pathology via maintaining oxidative balance through SIRT1 pathway [J]. *Exp Gerontol*, 2018, 110: 277-283.
- [6] Liu N, Chen J, Gao D, et al. Astaxanthin attenuates contrast agent-induced acute kidney injury *in vitro* and *in vivo* via the regulation of SIRT1/FOXO3a expression [J]. *Int Urol Nephrol*, 2018, 50: 1171-1180.
- [7] Wang G, Yao J, Li Z, et al. miR-34a-5p inhibition alleviates intestinal ischemia/reperfusion-induced reactive oxygen species accumulation and apoptosis via activation of SIRT1 signaling [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2016, 24: 961-973.
- [8] Chen HY, Geng M, Hu YZ, et al. Effects of baicalin against oxidative stress injury of SH-SY5Y cells by up-regulating SIRT1 [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2011, 46: 1039-1044.
- [9] Wang Q, Li L, Li CY, et al. SIRT3 protects cells from hypoxia via PGC-1 α - and MnSOD-dependent pathways [J]. *Neuroscience*, 2015, 286: 109-121.
- [10] Wu L, Wang Q, Guo F, et al. Activation of FoxO1/PGC-1 α prevents mitochondrial dysfunction and ameliorates mesangial cell injury in diabetic rats [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2015, 413: 1-12.
- [11] Fu B, Zhao J, Peng W, et al. Resveratrol rescues cadmium-induced mitochondrial injury by enhancing transcriptional regulation of PGC-1 α and SOD2 via the Sirt3/FoxO3a pathway in TCMK-1 cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 486: 198-204.

- [12] Kim SY, Jin CY, Kim CH, et al. Isorhamnetin alleviates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in BV2 microglia by inactivating NF- κ B, blocking the TLR4 pathway and reducing ROS generation [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 43: 682-692.
- [13] Zhao TT, Yang TL, Gong L, et al. Isorhamnetin protects against hypoxia/reoxygenation-induced injury by attenuating apoptosis and oxidative stress in H9c2 cardiomyocytes [J]. *Gene*, 2018, 666: 92-99.
- [14] Wei J, Su H, Bi Y, et al. Anti-proliferative effect of isorhamnetin on HeLa cells through inducing G₂/M cell cycle arrest [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15: 3917-3923.
- [15] Shi H, He J, Li X, et al. Isorhamnetin, the active constituent of a Chinese herb *Hippophae rhamnoides* L, is a potent suppressor of dendritic-cell maturation and trafficking [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 55: 216-222.
- [16] Qi F, Sun JH, Yan JQ, et al. Anti-inflammatory effects of isorhamnetin on LPS-stimulated human gingival fibroblasts by activating Nrf2 signaling pathway [J]. *Microb Pathog*, 2018, 120: 37-41.
- [17] Lee MS, Kim Y. Effects of isorhamnetin on adipocyte mitochondrial biogenesis and AMPK activation [J]. *Molecules*, 2018, 23: 1853.
- [18] Maiese K. SIRT1 and stem cells: in the forefront with cardiovascular disease, neurodegeneration and cancer [J]. *World J Stem Cells*, 2015, 7: 235-242.
- [19] Martin A, Tegla CA, Cudrici CD, et al. Role of SIRT1 in autoimmune demyelination and neurodegeneration [J]. *Immunol Res*, 2015, 61: 187-197.
- [20] Donmez G, Outeiro TF. SIRT1 and SIRT2: emerging targets in neurodegeneration [J]. *EMBO Mol Med*, 2013, 5: 344-352.