

## • 研究论文 •

**黄芩素通过抑制 JAK2/STAT1 通路减轻  $A\beta_{25-35}$  诱导的 PC12 细胞损伤**郑文鸽<sup>1,2</sup>, 周峰<sup>1,2</sup>, 高丽<sup>1\*</sup>, 秦雪梅<sup>1\*</sup>

(1. 山西大学中药现代研究中心, 山西太原 030006; 2. 山西大学化学化工学院, 山西太原 030006)

**摘要:** 本研究旨在探讨黄芩素对  $A\beta_{25-35}$  诱导 PC12 细胞损伤的保护作用及机制。采用  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $A\beta_{25-35}$  损伤 PC12 细胞, 通过细胞形态观察、Hoechst 33342 染色和炎症因子检测考察黄芩素对  $A\beta_{25-35}$  损伤 PC12 细胞的保护作用, 采用 Western blotting 方法检测凋亡相关蛋白半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (cysteiny aspartate specific proteinase 3, caspase-3)、活化型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase-3, cleaved caspase-3)、Janus 激酶 2/信号转导子和转录激活子 1 (Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 1, JAK2/STAT1) 通路相关蛋白及其下游一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 和环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 炎症蛋白的表达, 研究黄芩素的作用机制。结果显示, 黄芩素 ( $80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 能显著抑制  $A\beta_{25-35}$  诱导的 PC12 细胞凋亡和炎症因子 IL-8 和 TNF- $\alpha$  的释放; Western blotting 实验结果显示, 黄芩素能抑制 JAK2 和 STAT1 的磷酸化, 并抑制其下游蛋白 iNOS 和 COX-2 的表达。以上结果表明, 黄芩素能有效抑制 JAK2/STAT1 信号通路, 从而抑制  $A\beta_{25-35}$  诱导的 PC12 细胞损伤。

**关键词:** 黄芩素; PC12 细胞; JAK2/STAT1 信号通路; 炎症反应

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)03-0771-07

**Baicalein reduces  $A\beta_{25-35}$ -induced PC12 cell damage by inhibiting the JAK2/STAT1 pathway**ZHENG Wen-ge<sup>1,2</sup>, ZHOU Feng<sup>1,2</sup>, GAO Li<sup>1\*</sup>, QIN Xue-mei<sup>1\*</sup>

(1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China;

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

**Abstract:** This study investigated the mechanism by which baicalein protected PC12 cells from  $A\beta_{25-35}$ -induced injury. PC12 cells were treated with  $A\beta_{25-35}$  ( $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and the ability of baicalein to prevent apoptosis was investigated by monitoring changes in cell morphology, Hoechst 33342 staining, and measurement of inflammatory factors. Western blotting was used to detect the expression of the apoptosis-related proteins cysteinyl aspartate specific proteinase-3 (caspase-3), cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase-3 (cleaved caspase-3), proteins involved in the Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 1 (JAK2/STAT1) pathway, and downstream inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2). The results show that baicalein ( $80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) can significantly inhibit apoptosis and the release of inflammatory factor IL-8 and TNF- $\alpha$  in  $A\beta_{25-35}$ -treated PC12 cells. Western blotting results showed that baicalein can inhibit the phosphorylation of JAK2 and STAT1 and decrease the expression of downstream iNOS and COX-2, thereby inhibiting the JAK2/STAT1 signaling pathway and preventing  $A\beta_{25-35}$ -induced PC12 cell damage.

**Key words:** baicalein; PC12 cell; JAK2/STAT1 pathway; inflammation

收稿日期: 2020-07-30; 修回日期: 2020-10-12.

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目 (81603319); 山西省面上青年基金项目 (201801D221374); 山西省重点研发计划 (社发领域) 项目 (201903D321216).

\*通讯作者 Tel: 86-351-7018379, E-mail: gaoli87@sxu.edu.cn; qinxm@sxu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-1270

阿尔茨海默症 (Alzheimer's disease, AD) 是常见的中枢神经退行性疾病, 也是造成老年人认知功能障碍的主要原因。 $\beta$ -淀粉样蛋白 (amyloid-protein, A $\beta$ ) 沉积和 Tau 蛋白异常磷酸化被认为是 AD 发生的重要特征。其中, A $\beta$  假说得到了广泛的证据支持, 该假说认为由于 A $\beta$  “漏出”神经细胞, 引起周围的神经元和神经胶质细胞的细胞膜和线粒体膜损伤, 诱发炎症反应和氧化应激, 导致神经纤维缠结, 进而引发 AD。A $\beta$  由淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 分解而来<sup>[1]</sup>, 由无毒的 A $\beta$  单体、具有神经毒性的 A $\beta$  纤维和 A $\beta$  寡聚体聚合组成<sup>[2]</sup>, A $\beta$  的清除是通过非酶促和酶促途径, 如 LDL 受体相关蛋白 1 (low density lipoprotein receptor-related protein 1, LRP1)、P-糖蛋白 (permeability glycoprotein, P-gp) 和各种肽酶等。正常情况下, A $\beta$  的产生和清除存在一个动态平衡<sup>[3]</sup>; 但是在衰老或病理情况下, 大脑中 A $\beta$  的产生和清除的稳态被打破<sup>[4]</sup>, 导致 A $\beta$  积累和老年斑形成<sup>[5]</sup>, 从而引发 AD<sup>[6]</sup>。

A $\beta_{25-35}$  引起 PC12 细胞损伤主要表现在引起细胞凋亡、氧化应激、炎症和神经毒性等方面。研究发现, A $\beta_{25-35}$  可引起 PC12 细胞 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 磷酸化, 上调半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (cysteiny l aspartate specific proteinase 3, caspase-3) 和活化型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (cleaved cysteiny l aspartate specific proteinase-3, cleaved caspase-3) 凋亡相关蛋白的水平<sup>[7]</sup>, 并通过促进 Fas 途径来促进细胞凋亡<sup>[8]</sup>; A $\beta_{25-35}$  通过促进 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1/核因子 E2 相关因子 2/抗氧化反应元件-1 (kelch-like ECH-associated protein 1/nuclear factor erythroid 2-related factor 2/hemo oxygenase-1, Keap1/Nrf2/HO-1) 信号通路引起 PC12 细胞内氧化应激<sup>[9]</sup>, 并增加活性氧 (reactive oxygen species, ROS)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 和线粒体过氧化等氧化损伤<sup>[10]</sup>; A $\beta_{25-35}$  可激活 Janus 激酶/信号转导子和转录激活子 (Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 1, JAK2/STAT1)<sup>[11]</sup> 信号通路引起 PC12 细胞内炎症水平升高, 增加白介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、白介素-8 (interleukin-8, IL-8) 和肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 等促炎性细胞因子的分泌<sup>[12]</sup>; 同时 A $\beta_{25-35}$  也可使 PC12 细胞内的钙调蛋白 (calmodulin, CaM)、钙调蛋白依赖性蛋白激酶激酶 (calmodulin dependent protein kinase kinase, CaMKK)、钙调蛋白依赖性蛋白激酶 IV (calmodulin-dependent protein kinase IV, CaMKIV)、Tau 蛋白表达升高, 引起神经毒性<sup>[13]</sup>。此外, A $\beta_{25-35}$  引起的 PC12 细胞损伤可通过其他途径消除。

例如磷酸肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B, PI3K/Akt)<sup>[14]</sup> 通路的激活可消除 A $\beta_{25-35}$  引起的神经细胞凋亡; 酪氨酸转移 RNA 合成酶-多腺苷酸聚合酶的自动聚 ADP 核糖基化 1-沉默信息调节因子 1 [tyrosyl transfer-RNA synthetase/poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase 1/sirtuin 1, TyrRS-PARP1-SIRT1]<sup>[15]</sup> 信号通路的激活可诱导 PC12 细胞自噬, 减轻神经毒性。

基于天然产物发现改善学习记忆障碍的药物是当前研究的热点。传统中药黄芩最早收录于《神农本草经》, 药用价值高, 历史悠久<sup>[16]</sup>。黄芩素 (baicalein) 是从中药黄芩中提取出来的黄酮类化合物, 具有抗氧化、抗炎、抗菌、抗病毒和清除自由基等作用<sup>[17]</sup>。研究发现, 在 A $\beta_{1-40}$ <sup>[18,19]</sup> 和 A $\beta_{25-35}$ <sup>[20]</sup> 诱导的 AD 大鼠模型中, 黄芩素均能显著改善 AD 大鼠的遗忘和记忆障碍; 在 A $\beta_{25-35}$  损伤的 PC12 细胞中, 黄芩素能够抑制氧化应激从而降低 A $\beta$  毒性反应<sup>[21]</sup>, 表明黄芩素具有改善认知能力和学习记忆能力<sup>[22]</sup>。

课题组前期发现 200 mg·kg<sup>-1</sup> 黄芩素能够改善 D-半乳糖致衰老模型大鼠<sup>[23]</sup> 和快速老化小鼠 SAMP8 的学习记忆障碍<sup>[24]</sup>。通过对 SAMP8 小鼠的大脑皮层进行转录组学研究, 结果表明黄芩素可能通过抑制 JAK2/STAT1 信号通路发挥神经保护作用<sup>[25]</sup>。JAK/STATs 信号通路<sup>[26]</sup> 是众多细胞因子信号转导的共同途径, 广泛参与细胞增殖、分化、凋亡以及炎症等过程, 研究表明<sup>[27]</sup> JAK/STATs 信号通路激活会导致多种炎症反应。

PC12 细胞为小鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞系, 在结构、功能上与神经元有很多相似之处, 与神经元相比又相对容易培养。因此在本研究中, 以 PC12 细胞为研究对象, 以 A $\beta_{25-35}$  损伤 PC12 细胞构建 AD 体外模型, 验证黄芩素的保护作用及对 JAK2/STAT1 信号通路的调节作用。

## 材料

**细胞株** 小鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞 (PC12 细胞) 购自中国科学院细胞研究所 (上海)。

**药物与试剂** 黄芩素 (批号 JZ20150711, 质量分数 > 98%) 购自南京景竹生物科技有限公司; A $\beta_{25-35}$  购自北京 Solarbio 公司; 高糖 DMEM 培养基、胰酶、胎牛血清、IL-8 检测试剂盒、TNF- $\alpha$  检测试剂盒、细胞裂解液、BCA 蛋白浓度检测试剂盒、ECL 显影液、HRP 羊抗兔二抗 (货号: D110058) 购自上海生工生物工程有限公司; 二甲基亚砜 (DMSO)、四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 购自 Sigma 公司; 抗体  $\beta$ -actin (货号: 20536-1-AP)、一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) (货号: 18985-1-AP)、环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2)

(货号: 12375-1-AP)、JAK2 (货号: 17670-1-AP)、STAT1 (货号: 10144-2-AP) 购自 Proteintech 公司; 抗体 p-JAK2 (货号: 3776)、p-STAT1 (货号: 7649)、caspase-3 (货号: 9665)、cleaved caspase-3 (货号: 9664) 购自 Cell Signaling Technology 公司。

**仪器** HF safe1800 生物安全柜、HF 90 CO<sub>2</sub> 培养箱、Neofuge 1600R 台式高速离心机 (Heal Force 公司, 中国); Nikon Eclipse Ti-S 荧光倒置显微镜 (Nikon 公司, 日本); M200 多功能酶标仪 (Tecan 公司, 瑞士); 高速冷冻离心机 (力新仪器上海有限公司, 中国); Mini-PROTEAN Tetra 电泳仪、Mini-Trans-Bolt Cell 半干转印槽、光成像系统 ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad 公司)。

**PC12 细胞的培养** 将 PC12 细胞接种于 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养, 培养基为含 10% 胎牛血清的 DMEM。每 2~3 天传代 1 次, 待细胞生长至对数生长期时进行后续实验。

**分组与给药** 将实验分为空白组、 $A\beta_{25-35}$  组 (20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和黄芩素 (40、60、80  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 组, 部分实验选取黄芩素最佳剂量 80  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  展开。正常组更换 DMEM 无血清培养液,  $A\beta_{25-35}$  组中加入含 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $A\beta_{25-35}$  的 DMEM 无血清培养液, 造模 24 h; 黄芩素给药组先用不同浓度黄芩素预处理 2 h, 再加入终浓度为 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $A\beta_{25-35}$  培养 24 h, 每组设置 3 个复孔。

**细胞形态学观察** 以每毫升  $1\times 10^5$  个的浓度将细胞接种于 6 孔板中, 待细胞生长至对数生长期时, 按“分组与给药”的步骤处理细胞后, 在倒置显微镜下观察细胞形态并进行拍照。

**细胞凋亡检测** 将 PC12 细胞接种于 6 孔板中, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h, 按“分组与给药”的步骤分组给药, 继续培养 24 h。按照 Hoechst 染色试剂盒说明书进行染色, 每孔加入 Hoechst 33342 染色液 500  $\mu\text{L}$ , 室温避光染色 5 min, PBS 洗 2 次, 于倒置荧光显微镜下观察细胞核, 亮蓝色荧光即为凋亡细胞。

**炎症因子检测** 采用双抗体夹心酶联免疫吸附法测定黄芩素对 IL-8 含量的影响。收集培养上清液, 按试剂盒说明书操作, 用酶标仪在 450 nm 处测定各孔吸光值, 根据标准曲线得出相应 IL-8 含量, 每组设置 3 个

复孔, 计算平均值。

**Western blotting 实验** 按照上述分组分别作用 PC12 细胞 24 h, 收集细胞, 并用 PBS 溶液清洗 2~3 次, 加入裂解液 (含有 1% PMSF 和 10% 10 $\times$ 磷酸酶抑制剂复合物), 冰上裂解 30 min 后, 14 000 r $\cdot\text{min}^{-1}$ 、4 °C 离心 15 min, 上清液即为蛋白质提取物。BCA 法测定蛋白含量, 100 °C 蛋白变性 10 min。蛋白上样量为 50  $\mu\text{g}$ , 采用 8% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白, 转膜, 5% 脱脂奶粉/5% BSA 室温摇床封闭 2 h, 加入一抗  $\beta$ -actin (1:1 000)、caspase-3 (1:800)、JAK2 (1:600)、STAT1 (1:800)、p-STAT1 (1:1 000)、p-JAK2 (1:1 000)、iNOS (1:500)、COX-2 (1:1 000), 4 °C 摇床孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 室温摇床孵育辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:10 000), TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 漂洗并滴加显影液后, 再使用 ChemiDoc™ XRS+ 凝胶成像仪对目的条带逐一进行扫描, 使用 Quantity One 软件对结果进行统计分析。

**统计学分析** 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 Graph-Pad Prism 6.0 对实验数据进行统计学分析, 组间比较采用单因素方差分析结合 Dunnett's 检验,  $P < 0.05$  认为有统计学意义。

## 结果

### 1 黄芩素对 $A\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞存活的影响

课题组前期研究<sup>[28]</sup>结果表明,  $A\beta_{25-35}$  能显著性降低 PC12 细胞存活, 其中 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $A\beta_{25-35}$  与 PC12 细胞孵育 24 h 后, 细胞存活率显著下降至空白组的 57.57%; 用不同浓度黄芩素预处理后均能提高细胞存活, 其中 80  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  黄芩素使 PC12 细胞存活显著提高了 20.75%。在此基础上, 观察黄芩素对  $A\beta_{25-35}$  损伤 PC12 细胞形态的影响。结果表明, 与空白组相比,  $A\beta_{25-35}$  组 (20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 细胞数量减少, 且细胞皱缩、变圆, 部分细胞悬浮于培养液中; 而 80  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  黄芩素作用 24 h 后, 能明显增加细胞数量并改善细胞形态, 使其接近于空白组细胞形态 (图 1)。

### 2 黄芩素抑制 $A\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞凋亡

Hoechst 33342 染色结果显示, 空白组细胞核呈现

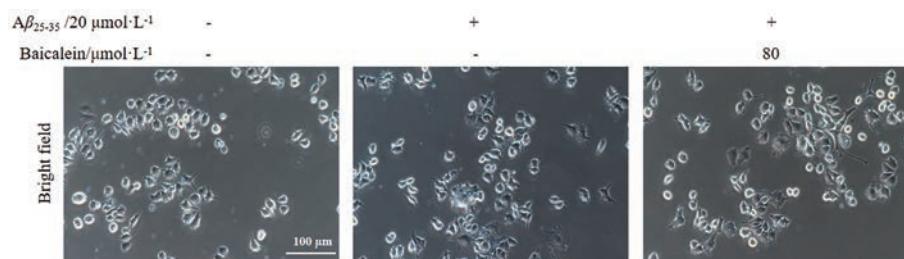


Figure 1 Effects of baicalein on the morphology of PC12 cells injured by  $A\beta_{25-35}$  (200 $\times$ )

弥散均匀微弱的蓝色荧光,表明其凋亡细胞少。 $A\beta_{25-35}$ 组较多细胞呈现出较强的蓝白色荧光,细胞核变小,呈现不规则形状,有些细胞内可见较强的颗粒状荧光,表明细胞凋亡数量明显增多,而给予黄芩素 ( $80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )后,可见荧光减弱,表明黄芩素能够抑制  $A\beta_{25-35}$  诱导的细胞凋亡 (图 2A)。与空白组比较,  $A\beta_{25-35}$  使 caspase-3 和 cleaved caspase-3 水平显著增加;而给予黄芩素能显著降低 caspase-3 和 cleaved caspase-3 水平,说明黄芩素能够抑制 caspase-3 介导的 PC12 细胞凋亡 (图 2B、C)。

### 3 黄芩素抑制 $A\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞炎症因子 IL-8 和 TNF- $\alpha$ 的释放

为了考察黄芩素对  $A\beta_{25-35}$  诱导的 PC12 细胞炎症因子的抑制作用,选取促炎因子 IL-8 和 TNF- $\alpha$  作为检测指标。结果显示,  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $A\beta_{25-35}$  可显著增加 IL-8

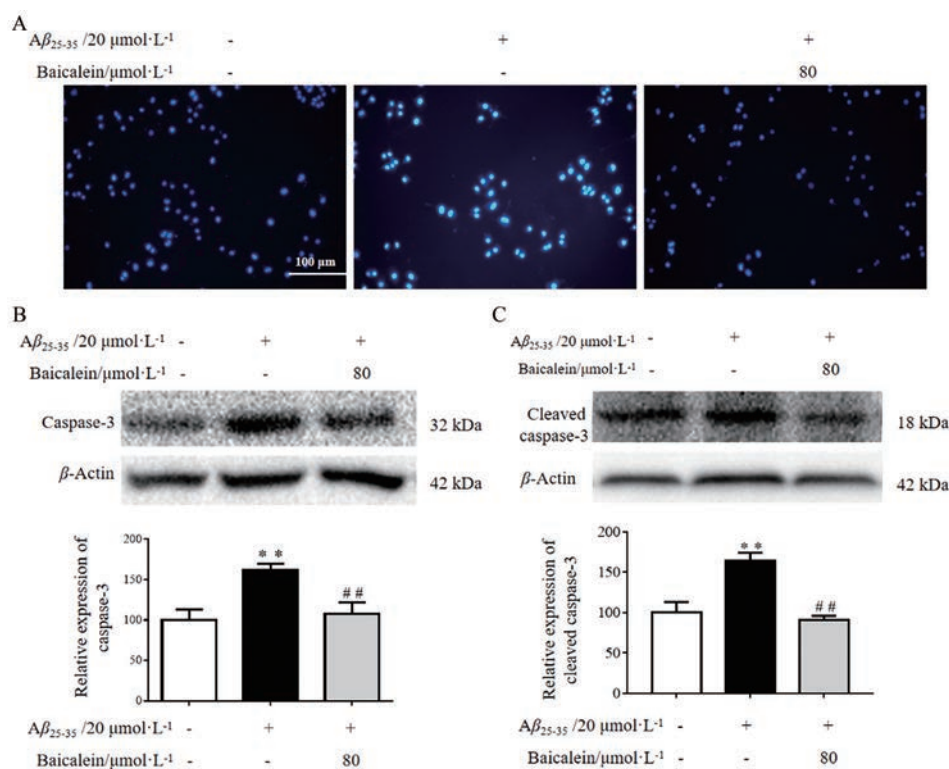
和 TNF- $\alpha$  的释放,而黄芩素能显著抑制  $A\beta_{25-35}$  诱导的 IL-8 和 TNF- $\alpha$  的释放 (图 3)。

### 4 黄芩素阻断 $A\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞 JAK2/STAT1 的活化

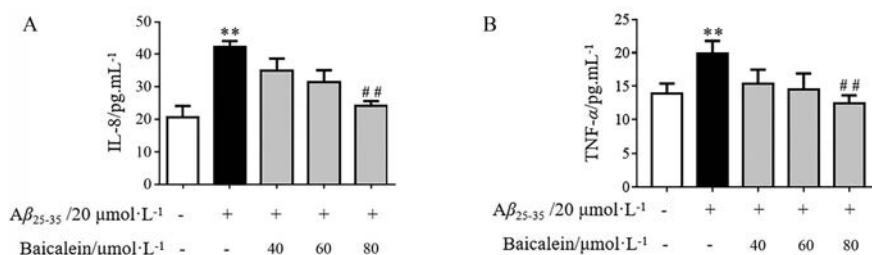
为了考察黄芩素对  $A\beta_{25-35}$  诱导 PC12 细胞 JAK2/STAT1 通路的作用,进行了 Western blotting 检测。结果显示,  $A\beta_{25-35}$  刺激 PC12 细胞 24 h 后, JAK2、STAT1 的磷酸化显著增加,而黄芩素 ( $80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 能显著抑制 JAK2 和 STAT1 的磷酸化 (图 4),表明黄芩素可以显著抑制 JAK2/STAT1 信号通路的活化。

### 5 黄芩素抑制 $A\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞炎症相关蛋白 iNOS 和 COX-2 的表达

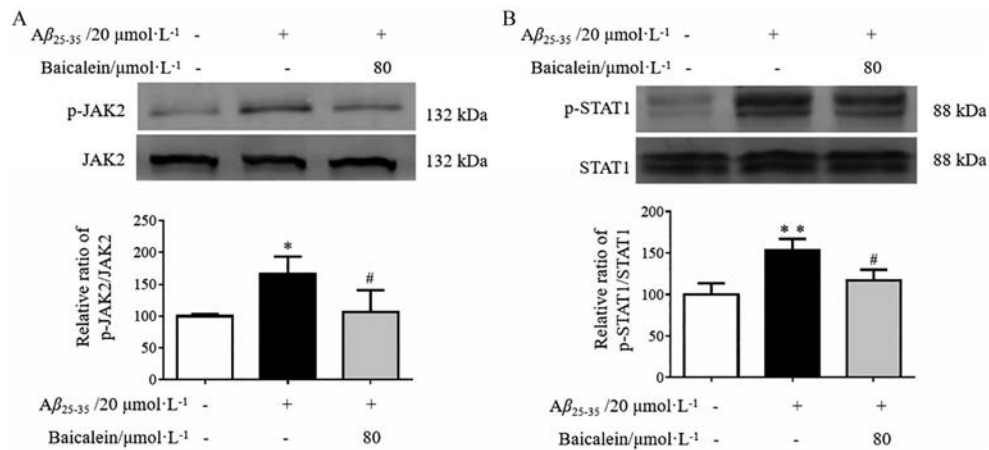
为了验证黄芩素是否可以抑制 JAK/STAT 通路相关炎症蛋白的表达,采用 Western blotting 检测黄芩素对



**Figure 2** Effects of baicalein on apoptosis of PC12 cells injured by  $A\beta_{25-35}$ . A: Hoechst 33342 staining ( $\times 200$ ); B: Cysteiny l aspartate specific proteinase-3 (caspase-3) expression; C: Cleaved cysteiny l aspartate specific proteinase-3 (cleaved caspase-3) expression.  $n = 3, \bar{x} \pm s$ .  $**P < 0.01$  vs control group;  $##P < 0.01$  vs  $A\beta_{25-35}$  group



**Figure 3** The effects of baicalein on inflammatory factors induced by  $A\beta_{25-35}$  in PC12 cells. A: Interleukin-8 (IL-8) level; B: Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) level.  $n = 3, \bar{x} \pm s$ .  $**P < 0.01$  vs control group;  $##P < 0.01$  vs  $A\beta_{25-35}$  group



**Figure 4** Effects of baicalein on the phosphorylation of Janus kinase 2 (JAK2) and signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) in PC12 cells induced by  $A\beta_{25-35}$ .  $n = 3, \bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.05$  vs  $A\beta_{25-35}$  group

iNOS (图 5A) 和 COX-2 蛋白表达的影响 (图 5B)。结果显示,  $A\beta_{25-35}$  能显著增加 iNOS 和 COX-2 蛋白表达, 而黄芩素 (80  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 可显著抑制 iNOS 和 COX-2 蛋白表达。

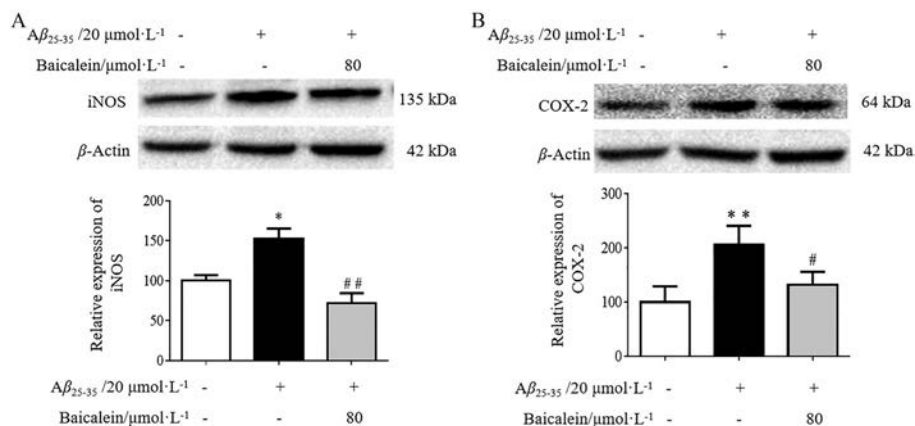
### 讨论

细胞凋亡<sup>[29]</sup>是由基因控制的程序性细胞死亡, 受 Bcl-2 家族、caspase 家族、癌基因和抑癌基因等基因调控。其中, caspases 介导的细胞凋亡是主要的凋亡途径<sup>[30]</sup>。研究表明<sup>[31]</sup>, AD 与神经元细胞凋亡密切相关, 而阻断细胞凋亡的药物可在早期预防神经元细胞死亡<sup>[32]</sup>。本研究发现,  $A\beta_{25-35}$  处理组 caspase-3 和 cleaved caspase-3 的水平升高, 而给予黄芩素 (80  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 后可抑制 caspase-3 和 cleaved caspase-3 的水平, 结合 Hoechst 染色结果, 表明黄芩素可抑制 caspase-3 介导的细胞凋亡。

AD 与炎症反应密切相关<sup>[33]</sup>。 $A\beta$  沉积可诱发炎症反应; 而非甾体类抗炎药可以降低 AD 风险<sup>[34-36]</sup>。通过

对 AD 患者尸检的研究结果发现, 炎症与 AD 病理相关<sup>[37,38]</sup>, 而且在 AD 小鼠大脑皮层中发现处于活化状态的炎症因子<sup>[39]</sup>。促炎细胞因子<sup>[40]</sup> (如 IL-8) 在神经系统的生长发育、分化调节中具有重要作用, 参与一系列生理功能的调节。因此, 抑制炎症可能是治疗许多慢性神经退行性疾病的关键<sup>[41]</sup>。本研究发现, 黄芩素给药后可显著降低炎症因子 IL-8 和 TNF- $\alpha$  释放以及炎症蛋白 iNOS 和 COX-2 的表达, 表明黄芩素抑制  $A\beta_{25-35}$  诱导的 PC12 细胞炎症。

JAK/STATs 信号通路由酪氨酸激酶 JAK 和转录因子 STAT 级联组成, 该通路不仅参与炎症反应, 同时也与细胞损伤、凋亡和氧化应激有关<sup>[42,43]</sup>。JAK/STATs 信号转导失调是各种实体癌和造血系统恶性肿瘤发病的驱动力<sup>[44]</sup>, 也与自身免疫性疾病 (类风湿性关节炎、牛皮癣和炎症性肠病)<sup>[45]</sup> 和过敏性疾病 (哮喘和过敏性鼻炎)<sup>[46]</sup> 的发生有关。Nevado-Holgado 等<sup>[47]</sup> 使用啮齿动物模型和体外模型证明了 JAK/STATs 信号通路异常是 AD 的病因之一。研究表明<sup>[48]</sup>, JAK/STATs 信号通



**Figure 5** The effects of baicalein on the expression levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclo-oxygenase-2 (COX-2) in the PC12 cells induced by  $A\beta_{25-35}$ .  $n = 3, \bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs  $A\beta_{25-35}$  group

路的激活会引起IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 和IL-6等炎症因子释放,并激活下游靶蛋白iNOS和COX-2,使促炎因子释放增多,导致炎症反应发生<sup>[49]</sup>。本研究发现,黄芩素给药后可显著抑制JAK2和STAT1的磷酸化,表明黄芩素可通过JAK2/STAT1通路抑制A $\beta_{25-35}$ 诱导的PC12细胞炎症。

综上所述,本研究结果表明,黄芩素可以有效地抑制A $\beta_{25-35}$ 诱导PC12细胞中JAK2/STAT1信号活化,从而抑制炎症因子IL-8释放和炎性靶蛋白iNOS和COX-2的表达,最终阻断炎症的级联反应。

**作者贡献:** 郑文鹤和周峰负责进行实验和数据分析,完成文章撰写;高丽和秦雪梅负责指导实验思路;所有作者均对本文有所贡献。

**利益冲突:** 无利益冲突。

## References

- [1] Sadigh-Eteghad S, Sabermarouf B, Majdi A, et al. Amyloid-beta: a crucial factor in Alzheimer's disease [J]. *Med Princ Pract*, 2015, 24: 1-10.
- [2] Sardar Sinha M, Ansell-Schultz A, Civitelli L, et al. Alzheimer's disease pathology propagation by exosomes containing toxic amyloid-beta oligomers [J]. *Acta Neuropathol*, 2018, 136: 41-56.
- [3] Shankar GM, Walsh DM. Alzheimer's disease: synaptic dysfunction and A $\beta$  [J]. *Mol Neurodegener*, 2009, 4: 48.
- [4] Harkany T, Abraham I, Timmerman W, et al. Beta-amyloid neurotoxicity is mediated by a glutamate-triggered excitotoxic cascade in rat nucleus basalis [J]. *Eur J Neurosci*, 2000, 12: 2735-2745.
- [5] Qiu C, Kivipelto M, von Strauss E. Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention [J]. *Dialogues Clin Neurosci*, 2009, 11: 111-128.
- [6] Masters CL, Simms G, Weinman NA, et al. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985, 82: 4245-4249.
- [7] Liu JF, Yan XD, Qi LS, et al. Ginsenoside Rd attenuates A $\beta_{25-35}$ -induced oxidative stress and apoptosis in primary cultured hippocampal neurons [J]. *Chem Biol Interact*, 2015, 239: 12-18.
- [8] Zheng Y, You F, Li Q, et al. The effect of genistein on A $\beta_{25-35}$ -induced PC12 cell apoptosis through the JNK-dependent Fas pathway [J]. *Food Funct*, 2016, 7: 4702-4708.
- [9] Cai B, Ye S, Wang Y, et al. Protective effects of genistein on A $\beta_{25-35}$ -induced PC12 cell injury via regulating CaM-CaMKIV signaling pathway [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2018, 43: 571-576.
- [10] Xu J, Zhou L, Weng Q, et al. Curcumin analogues attenuate A $\beta_{25-35}$ -induced oxidative stress in PC12 cells via Keap1/Nrf2/HO-1 signaling pathways [J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 305: 171-179.
- [11] Zhang GL, Zhang WG, Du Y, et al. Edaravone ameliorates oxidative damage associated with A $\beta_{25-35}$  treatment in PC12 cells [J]. *J Mol Neurosci*, 2013, 50: 494-503.
- [12] Diaz A, Limon D, Chávez R, et al. A $\beta_{25-35}$  injection into the temporal cortex induces chronic inflammation that contributes to neurodegeneration and spatial memory impairment in rats [J]. *J Alzheimers Dis*, 2012, 30: 505-522.
- [13] Wang K, Xie M, Zhu L, et al. Ciliary neurotrophic factor protects SH-SY5Y neuroblastoma cells against A $\beta_{1-42}$ -induced neurotoxicity via activating the JAK2/STAT3 axis [J]. *Folia Neuropathol*, 2015, 53: 226-235.
- [14] Cui J, Wang J, Zheng M, et al. Ginsenoside Rg2 protects PC12 cells against  $\beta$ -amyloid<sub>25-35</sub>-induced apoptosis via the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway [J]. *Chem Biol Interact*, 2017, 275: 152-161.
- [15] Deng H, Mi MT. Resveratrol attenuates A $\beta_{25-35}$  caused neurotoxicity by inducing autophagy through the TyrRS-PARP1-SIRT1 signaling pathway [J]. *Neurochem Res*, 2016, 41: 2367-2379.
- [16] Song LL, Meng QG. Study development on pharmacodynamics effect of scutellaria [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med (中华中医药学刊)*, 2008, 13: 53-55.
- [17] Zhou HC, Wang H, Shi K, et al. Hepatoprotective effect of baicalein against acetaminophen-induced acute liver injury in mice [J]. *Molecules*, 2018, 24: 131.
- [18] Lin TS, Tsai HJ, Lee CH, et al. An improved drugs screening system reveals that baicalein ameliorates the A $\beta$ /AMPA/NMDA-induced depolarization of neurons [J]. *J Alzheimers Dis*, 2017, 56: 959-976.
- [19] Wei D, Tang J, Bai W, et al. Ameliorative effects of baicalein on an amyloid- $\beta$  induced Alzheimer's disease rat model: a proteomics study [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2014, 11: 869-881.
- [20] Aghajanzadeh M, Andalib S, Danafar H, et al. The effect of baicalein-loaded Y-shaped miktoarm copolymer on spatial memory and hippocampal expression of DHCR24, SELADIN and SIRT6 genes in rat model of Alzheimer [J]. *Int J Pharm*, 2020, 586: 119546.
- [21] Heo HJ, Kim DO, Choi SJ, et al. Potent inhibitory effect of flavonoids in *Scutellaria baicalensis* on amyloid beta protein-induced neurotoxicity [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52: 4128-4132.
- [22] Gu XH, Xu LJ, Liu ZQ, et al. The flavonoid baicalein rescues synaptic plasticity and memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Behav Brain Res*, 2016, 311: 309-321.
- [23] Duan DD, Wang KX, Zhou YZ, et al. Baicalein exerts beneficial effects in D-galactose-induced aging rats through attenuation of inflammation and metabolic dysfunction [J]. *Rejuvenation Res*, 2017, 20: 506-516.
- [24] Gao L, Li J, Zhou Y, et al. Effects of baicalein on cortical proinflammatory cytokines and the intestinal microbiome in senescence accelerated mouse prone 8 [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2018,

- 9: 1714-1724.
- [25] Li J, Zhou Y, Du G, et al. Integration of transcriptomics and network analysis deciphers the mechanisms of baicalein in improving learning and memory impairment in senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 865: 172789.
- [26] Khanna P, Chua PJ, Bay BH, et al. The JAK/STAT signaling cascade in gastric carcinoma (Review) [J]. *Int J Oncol*, 2015, 47: 1617-1626.
- [27] Arumuggam N, Bhowmick NA, Rupasinghe HP. A review: phytochemicals targeting JAK/STAT signaling and IDO expression in cancer [J]. *Phytotherapy Res*, 2015, 29: 805-817.
- [28] Gao L, Zhou F, Wang KX, et al. Baicalein protects PC12 cells from  $A\beta_{25-35}$ -induced cytotoxicity *via* inhibition of apoptosis and metabolic disorders [J]. *Life Sci*, 2020, 248: 117471.
- [29] Hoi CP, Ho YP, Baum L, et al. Neuroprotective effect of honokiol and magnolol, compounds from *Magnolia officinalis*, on beta-amyloid-induced toxicity in PC12 cells [J]. *Phytother Res*, 2010, 24: 1538-1542.
- [30] Dong XX, Wang Y, Qin ZH. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2009, 30: 379-387.
- [31] Dean DN, Pate KM, Moss MA, et al. Conformational dynamics of specific A $\beta$  oligomers govern their ability to replicate and induce neuronal apoptosis [J]. *Biochemistry*, 2016, 55: 2238-2250.
- [32] Ankarcona M, Winblad B. Biomarkers for apoptosis in Alzheimer's disease [J]. *Int J Geriatr Psychiatry*, 2005, 20: 101-105.
- [33] Kim H, Youn K, Ahn MR, et al. Neuroprotective effect of loganin against  $A\beta_{25-35}$ -induced injury *via* the NF- $\kappa$ B-dependent signaling pathway in PC12 cells [J]. *Food Funct*, 2015, 6: 1108-1116.
- [34] McManus RM, Heneka MT. Role of neuroinflammation in neurodegeneration: new insights [J]. *Alzheimers Res Ther*, 2017, 9: 14.
- [35] McGeer PL, Schulzer M, McGeer EG. Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiologic studies [J]. *Neurology*, 1996, 47: 425-432.
- [36] Anthony JC, Breitner JC, Zandi PP, et al. Reduced prevalence of AD in users of NSAIDs and H2 receptor antagonists: the Cache County study [J]. *Neurology*, 2000, 54: 2066-2071.
- [37] Heppner FL, Ransohoff RM, Becher B. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2015, 16: 358-372.
- [38] Ferreira ST, Clarke JR, Bomfim TR, et al. Inflammation, defective insulin signaling, and neuronal dysfunction in Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Dement*, 2014, 10: S76-S83.
- [39] Rosales-Corral S, Tan DX, Reiter RJ, et al. Kinetics of the neuroinflammation-oxidative stress correlation in rat brain following the injection of fibrillar amyloid-beta onto the hippocampus *in vivo* [J]. *J Neuroimmunol*, 2004, 150: 20-28.
- [40] Turner MD, Nedjai B, Hurst T, et al. Cytokines and chemokines: at the crossroads of cell signalling and inflammatory disease [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1843: 2563-2582.
- [41] McGeer PL, Rogers J, McGeer EG. Inflammation, antiinflammatory agents, and Alzheimer's disease: the last 22 years [J]. *J Alzheimers Dis*, 2016, 54: 853-857.
- [42] Grote K, Luchtefeld M, Schieffer B. JANUS under stress--role of JAK/STAT signaling pathway in vascular diseases [J]. *Vascul Pharmacol*, 2005, 43: 357-363.
- [43] Wincewicz A, Sulkowska M, Rutkowski R, et al. STAT1 and STAT3 as intracellular regulators of vascular remodeling [J]. *Eur J Intern Med*, 2007, 18: 267-271.
- [44] Groner B, von Manstein V. Jak Stat signaling and cancer: opportunities, benefits and side effects of targeted inhibition [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2017, 451: 1-14.
- [45] Banerjee S, Biehl A, Gadina M, et al. JAK-STAT signaling as a target for inflammatory and autoimmune diseases: current and future prospects [J]. *Drugs*, 2017, 77: 521-546.
- [46] Howell MD, Fitzsimons C, Smith PA. JAK/STAT inhibitors and other small molecule cytokine antagonists for the treatment of allergic disease [J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2018, 120: 367-375.
- [47] Nevado-Holgado AJ, Ribe E, Thei L, et al. Genetic and real-world clinical data, combined with empirical validation, nominate JAK-STAT signaling as a target for Alzheimer's disease therapeutic development [J]. *Cells*, 2019, 8: 425.
- [48] Venkatesan T, Choi YW, Lee J, et al. Falcariindiol inhibits LPS-induced inflammation *via* attenuating MAPK and JAK-STAT signaling pathways in murine macrophage RAW 264.7 cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2018, 445: 169-178.
- [49] Qi S, Feng Z, Li Q, et al. Myricitrin modulates NADPH oxidase-dependent ROS production to inhibit endotoxin-mediated inflammation by blocking the JAK/STAT1 and NOX2/p47(phox) pathways [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 9738745.