

丁苯酞调节PI3K/Akt/CREB信号通路对顺铂诱导的PC12细胞炎症和凋亡的影响



姚梦圆, 温敏, 黄正元, 陈鹏, 周本宏

武汉大学人民医院药学部 (武汉 430060)

【摘要】目的 基于磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B/cAMP 反应元件结合蛋白 (PI3K/Akt/CREB) 通路探究丁苯酞对顺铂诱导大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤 (PC12) 细胞损伤的保护作用及机制。方法 将不同浓度的丁苯酞及顺铂细胞培养液作用于 PC12 细胞, 采用 CCK-8 法检测细胞活性, 根据 CCK-8 考察结果将后续实验分为空白对照组、顺铂组 (50 $\mu\text{mol/L}$)、丁苯酞低、中、高剂量组 (25、50、100 $\mu\text{mol/L}$), 采用 ELISA 试剂盒检测细胞内白细胞介素 -6 (IL-6) 及白细胞介素 -1 β (IL-1 β) 水平, TUNEL 染色检测细胞凋亡情况, Western blotting 法检测 PI3K/Akt/CREB 通路相关蛋白 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、CREB、p-CREB 的表达情况。结果 与顺铂组相比, 丁苯酞可不同程度地提高 PC12 细胞活力, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$)。ELISA 结果显示, 与对照组相比, 顺铂可显著升高 IL-6 及 IL-1 β 水平 ($P<0.05$); 与顺铂组相比, 丁苯酞可降低 IL-6 及 IL-1 β 的水平, 其中高剂量组差异有统计学意义 ($P<0.05$)。TUNEL 结果显示, 与对照组相比, 顺铂组显著增加 PC12 细胞凋亡率 ($P<0.05$); 丁苯酞给药后, 细胞凋亡的程度明显降低 ($P<0.05$)。Western blotting 结果显示, 与对照组相比, 顺铂组 PC12 细胞的 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 和 p-CREB/CREB 蛋白水平降低, 其中 p-Akt/Akt 和 p-CREB/CREB 蛋白水平差异有统计学意义 ($P<0.05$); 与顺铂组相比, 丁苯酞各剂量组 PC12 细胞的 p-PI3K/PI3K、中、低剂量组的 p-Akt/Akt 和中剂量组的 p-CREB/CREB 蛋白水平显著提高 ($P<0.05$)。结论 丁苯酞可通过 PI3K/Akt/CREB 信号通路提高 PC12 细胞存活率, 减轻细胞炎症抑制细胞凋亡, 对顺铂诱导神经细胞毒性起保护作用。

【关键词】 丁苯酞; 神经保护; 细胞凋亡; 化疗相关认知障碍; PC12 细胞

【中图分类号】 R965

【文献标识码】 A

The effect of butylphthalide regulating the PI3K/Akt/CREB signaling pathway on cisplatin-induced inflammation and apoptosis in PC12 cells

YAO Mengyuan, WEN Min, HUANG Zhengyuan, CHEN Peng, ZHOU Benhong

Department of Pharmacy, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

Corresponding author: ZHOU Benhong, Email: benhongzh@whu.edu.cn

【Abstract】Objective To investigate the protective effect and mechanism of butylphthalide on cisplatin-induced cell injury in rat adrenal medullary pheochromocytoma (PC12) based on phosphatidylinositol-3-kinase/Akt/cAMP response element binding protein (PI3K/Akt/CREB) pathway. Methods Different concentrations of butylphthalide and cisplatin cell culture medium

DOI: 10.12173/j.issn.2097-4922.202502073

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31770381)

通信作者: 周本宏, 博士, 教授, 博士研究生导师, Email: benhongzh@whu.edu.cn

<https://yxqy.whuzhmedj.com>

were applied to PC12 cells, and the cell activity was detected by CCK-8 method. According to the results of CCK-8 investigation, the subsequent experiments were divided into the blank control group, the cisplatin group (50 $\mu\text{mol/L}$), and low, medium and high dose groups of butylphthalate (25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$). ELISA kit was used to detect the levels of intracellular interleukin-6 (IL-6) and interleukin-1 β (IL-1 β), TUNEL staining was used to detect apoptosis, and the expressions of PI3K/Akt/CREB pathway-related proteins PI3K, p-PI3K, Akt, p-Akt, CREB and p-CREB were detected by Western blotting. **Results** Compared with the cisplatin group, butylphthalate could increase the viability of PC12 cells to varying degrees, but the difference was not statistically significant ($P>0.05$). The ELISA results showed that compared with the control group, cisplatin could significantly increase the levels of IL-6 and IL-1 β ($P<0.05$); compared with the cisplatin group, butylphthalate could reduce the levels of IL-6 and IL-1 β , with a statistically significant difference in the high-dose group ($P<0.05$). The TUNEL results showed that compared with the control group, the cisplatin group significantly increased the apoptosis rate of PC12 cells ($P<0.05$); after administration of butylphthalate, the degree of cell apoptosis was significantly reduced ($P<0.05$). Western blotting results showed that compared with the control group, the p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt, and p-CREB/CREB protein levels of PC12 cells in the cisplatin group were reduced, with statistically significant differences in p-Akt/Akt and p-CREB/CREB protein levels ($P<0.05$); compared with the cisplatin group, the p-PI3K/PI3K in all dose groups, p-Akt/Akt in the medium and low dose groups, and p-CREB/CREB protein levels in the medium dose group of PC12 cells were significantly increased ($P<0.05$). **Conclusion** Butylphthalate can improve the survival rate of PC12 cells, reduce cell inflammation, inhibit apoptosis, and play a protective role in cisplatin-induced neurocytotoxicity through PI3K/Akt/CREB signaling pathway.

【Keywords】 Butylphthalate; Neuroprotection; Apoptosis; Chemotherapy-related cognitive impairment; PC12 cells

化疗相关认知障碍 (chemotherapy-related cognitive impairment, CRCI) 也称为化疗脑, 是一种发生在化疗期间或者化疗结束后认知功能减退的副作用症状^[1], 其认知缺陷主要表现在记忆、注意力和执行功能等方面^[2], CRCI 是许多肿瘤患者化疗后必须面对的重要问题^[3]。恶性肿瘤化疗可引起脑部变化和认知障碍, 导致 CRCI 发生^[4]。CRCI 是接受化疗的患者面临的一个重大问题, 在缺乏标准治疗的情况下, CRCI 的发病率正在逐年增加, 其严重降低了患者的生活质量。尽管 CRCI 已引起临床足够重视, 但其发生机制尚未完全明确, 仅能予以抗抑郁药、抗痴呆药、抗氧化剂等药物对症处理且作用局限、单一, 故而积极探索安全且有效的药物干预方法成为当前研究的方向。

顺铂是一种广泛用于治疗癌症患者的化疗药物, 其可通过破坏 DNA^[5]、抑制 DNA 合成和有丝分裂、诱导细胞凋亡等途径^[6] 诱导中枢神经系统神经毒性^[7], 继而产生认知障碍^[8]。许多研究报道, 顺铂可加速促炎细胞因子的释放^[9], 如白细胞介素 (interleukins, ILs), 这些细胞

因子参与氧化应激、线粒体损伤、神经元凋亡、神经递质失调和海马神经发生的抑制, 导致学习记忆认知障碍^[10]。因此本研究使用顺铂诱导认知障碍。

丁苯酞是一种有机物, 化学式为 $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_2$, 又称芹菜甲素, 为油状液体, 有芹菜香味^[11], 是中国自主研发用于治疗缺血性脑卒中的药物, 可抗脑缺血和抗老年痴呆。丁苯酞作为一种具有神经保护作用的化合物, 已被证明在缺血性脑卒中和阿尔茨海默病中具有显著的抗炎和抗氧化作用^[12]。然而, 其在 CRCI 中的作用机制尚未得到充分研究。丁苯酞常被用于治疗脑梗, 具有改善微循环、抗血小板、抗炎抗氧化和神经保护作用。既往研究显示, 丁苯酞可改善卒中后认知障碍, 并通过减少炎症和氧化应激来促进卒中后的认知恢复^[13]。最近的研究发现, 丁苯酞可以减轻早期脑损伤和迟发性神经功能障碍。这些研究提示丁苯酞具有一定的神经保护作用。本研究利用顺铂建立大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤 (PC12) 细胞凋亡模型, 探究丁苯酞的神经保护机制, 为其临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

HERAcell 160i CO₂ 培养箱和 400R 台式水平低温离心机购自美国 Thermo 公司；EnSight 酶标仪（美国 Perkin Elmer 公司）；DYY-7C 蛋白电泳仪（北京六一生物科技有限公司）；ChemiDoc Touch 化学发光仪（美国 Bio-Rad 公司）；DM40008/DFC450C 荧光显微镜（美国 Leica 公司）。

1.2 主要药品与试剂

丁苯酞（石药集团恩必普药业有限公司，批号：5182208002，纯度 99.80%）；顺铂（美国 MCE 公司，货号：HY-17394，纯度 99.70%）；二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide, DMSO，北京索莱宝科技有限公司，货号：D8371-50 mL）；PBS 缓冲液（货号：G4202）、RIPA 裂解液（批号：G2002）、50×Cocktail 蛋白酶抑制剂（批号：G2006）、磷酸化蛋白酶抑制剂（批号：G2007）、苯甲基磺酰氟（批号：G2008）、CCK-8 试剂盒（批号：G4103）、电化学发光（electrochemiluminescence, ECL）试剂盒（批号：G2014）和辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase, HRP）标记山羊抗兔免疫球蛋白 G（immunoglobulin G, IgG，批号：GB23303）均购自武汉赛维尔生物科技有限公司；RPMI Medium 1640 培养基（美国 Gibco 公司，货号：11875093）；胎牛血清（浙江天杭生物科技有限公司，货号：11011-8611）；0.25% 胰蛋白酶（美国赛默飞世尔科技有限公司，货号：25200056）；青霉素-链霉素溶液（武汉普诺赛生命科技有限公司，货号：180121）；IL-6（批号：ELK1158）和 IL-1 β （批号：ELK1272）检测试剂盒购自武汉科鹿生物；TUNEL 试剂盒（武汉伊莱瑞特生物科技有限公司，批号：AK19611）；磷脂酰肌醇 3 激酶（phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K，批号：YP-Ab-14915）和 p-PI3K（批号：YP-Ab-14485）购自杭州臻优品生物科技有限公司；cAMP 反应元件结合蛋白（cAMP response element binding protein, CREB，武汉三鹰生物技术有限公司，批号：22081-1-AP）；蛋白激酶 B（Akt，批号：A18120）、p-Akt（批号：AP1208）和 p-CREB（批号：AP1421）均购自艾比玛特生物医药（上海）有限公司；无水乙

醇（国药集团化学试剂有限公司）；多色预染蛋白 Marker（上海雅酶生物医药科技有限公司，批号：WJ102L）。

1.3 细胞株

PC12 细胞由上海复旦大学细胞典藏中心提供。

1.4 方法

1.4.1 样品制备

①完全培养基配制：按照 RPMI-1640 培养基：胎牛血清：双抗（100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素）=9:1:0.1 的比例配制完全培养基，配置好的培养基于 4℃ 冰箱保存使用。

②顺铂溶液配制：称取一定量顺铂固体粉末，使用适量 DMSO 配制为 500 mmol/L 的母液，用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤，后分装为若干管避光保存于 4℃ 冰箱中，使用时用配置好的完全培养基稀释至特定浓度使用。

③丁苯酞溶液配制：吸取一定量的丁苯酞油状液体与适量 DMSO 溶液配制成 100 mmol/L 的母液，使用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤，后分装为若干管保存于 4℃ 冰箱中，使用时用配置好的完全培养基稀释至特定浓度使用。

1.4.2 PC12 细胞培养及损伤模型建立

①收集处于对数生长期、生长状态良好的 PC12 细胞，PBS 清洗后采用全自动细胞计数仪进行计数，计数完成后将 PC12 细胞按照 1×10^5 个/mL 的密度接种于 96 孔板中，每孔各加入 100 μ L。为防止培养基挥发对实验结果造成影响，在实验组周围一圈无溶液的孔中每孔加入 200 μ L PBS 溶液，于 37℃、5% CO₂ 培养箱中继续培养，待细胞长满孔底约 80% 即可给药。

②按照 0、5、10、25、50、100、250、500 μ mol/L 的浓度分组给与丁苯酞，每组设置 6 个复孔，给药完成后于 37℃、5% CO₂ 培养箱中继续培养 24 h。按照 0、5、10、25、50、100、250、500、1 000 μ mol/L 的浓度分组给与顺铂，每组设置 6 个复孔，给药完成后于 37℃、5% CO₂ 培养箱中继续培养 24 h。按照 0、10、25、50、100、250、500 μ mol/L 的浓度分组给与丁苯酞，每组设置 6 个复孔，给药完成后于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 1 h，培养完成后吸出培养基，PBS 洗去残余丁苯酞药液；各孔均加入浓度为 50 μ mol/L 的顺铂完全培养基 100 μ L，于同样条件下继续培养 24 h；另设不加丁苯酞和顺铂的对照组。

③再培养 24 h 后，弃去各孔中原有培养基，每孔加入 100 μL PBS 清洗残余顺铂药液，清洗结束后，吸出 PBS 溶液，于每孔加入含有 10 μL CCK-8 工作液的空白培养基，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中避光孵育 1~2 h。

④使用酶标仪测定 450 nm 处各孔吸光度 (OD) 值，并按下式计算细胞存活率：

细胞存活率 (%) = (给药组 OD 值 - 空白组 OD 值) / (对照组 OD 值 - 空白组 OD 值) \times 100%

1.4.3 检测 PC12 细胞 IL-6 及 IL-1 β 水平

按照“1.4.2”项下培养分组进行筛选的浓度确定后，将后续实验分为空白对照组、顺铂组 (50 $\mu\text{mol/L}$)、丁苯酞低、中、高剂量组 (25、50、100 $\mu\text{mol/L}$)，收集各组 PC12 细胞后 200 \times g 离心 5 min，取其上清，按照试剂盒说明书操作步骤，采用多功能酶标仪检测 450 nm 波长处各组 OD 值，计算 IL-6 及 IL-1 β 的含量。

1.4.4 TUNEL 染色检测 PC12 细胞凋亡水平

由于顺铂可以直接引起 DNA 双链断裂，TUNEL 染色能够通过标记 DNA 断裂点，直观显示凋亡细胞；此外，由于 PC12 细胞属于贴壁细胞，为避免因消化步骤导致假阳性，本文选择 TUNEL 染色进行检测凋亡。按照“1.4.3”项分组，将 PC12 细胞接种于 24 孔板中制备细胞爬片，置于培养箱中培养 24 h 至细胞贴壁；随后进行顺铂 + 丁苯酞联合干预处理，其中丁苯酞提前 1 h 预处理，顺铂 + 丁苯酞给药结束后继续培养 24 h；取出爬片后，室温下用 4% 多聚甲醛固定 20 min，PBS 漂洗 3 次。每孔加入 50 μL TUNEL 反应液，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30~60 min，再用 PBS 洗涤 1~2 次；最后以 50% 甘油封片，荧光显微镜下观察并拍照，统计阳性细胞比例，相对荧光强度比值 = 绿色荧光 / 蓝色荧光。

1.4.5 Western blotting 法检测 PC12 细胞内凋亡相关蛋白水平

PI3K/Akt 通路 与 细胞 存活、增殖 有关，Akt 激活后可以磷酸化下游靶点 CREB，进而调控抗凋亡基因的表达，本文旨在研究细胞存活机制及丁苯酞抑制顺铂诱导细胞凋亡和炎症是否通过激活 PI3K/Akt/CREB 通路，故本文未做 B 淋巴细胞瘤-2 基因相关 X 蛋白 (B-cell lymphoma-2-associated X protein, Bax) 相关蛋白检测，而是选择 PI3K/Akt/CREB 信号通路。按照“1.4.3”项分组，给药后进行蛋白提取。每个培养皿加入

150 μL 裂解液充分裂解，200 \times g 离心 5 min 后取上清，采用双辛可宁酸法 (bicinchoninic acid assay, BCA) 测定蛋白浓度并定量，取 20 μg 蛋白样品进行上样；通过 12% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 电泳分离蛋白后，采用湿转法将蛋白转移至活化聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜，随后用快速封闭液封闭 20 min；之后加入一抗 PI3K (稀释比例 1 : 1 000)、p-PI3K (稀释比例 1 : 1 000)、Akt (稀释比例 1 : 2 000)、p-Akt (稀释比例 1 : 1 000)、CREB (稀释比例 1 : 5 000)、p-CREB (稀释比例 1 : 1 000)；4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育过夜后，使用 1 \times TBST 漂洗，随后加入兔二抗 (稀释比例 1 : 3 000) 室温孵育 2 h；TBST 再次漂洗后，采用化学发光法显影，并通过 Image J 软件分析条带灰度值，计算目标蛋白的相对表达水平。

1.5 统计学分析

通过 Graph Pad Prism 软件对结果进行统计学分析并作图。符合正态分布数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，数据进行方差齐性检验，组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)，两两比较采用 LSD- t 检验， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 丁苯酞对顺铂诱导损伤 PC12 细胞存活率的影响

如图 1 所示，丁苯酞对 PC12 细胞存活率影响不大，当丁苯酞给药浓度到达 100 $\mu\text{mol/L}$ 时，与对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$) 相比 PC12 细胞存活率显著升高 ($P < 0.05$)。

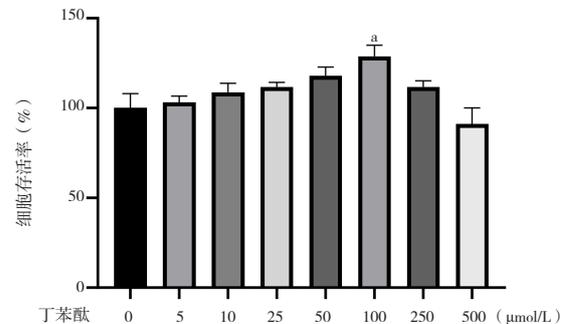


图1 不同浓度丁苯酞对PC12细胞活力的影响 ($n=6$)

Figure 1. Effect of different concentrations of butylphthalide on the viability of PC12 cells ($n=6$)

注：与对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$) 相比， $^{\circ}P < 0.05$ 。

如图 2 所示, 顺铂造模后细胞活力明显下降, 其中 50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度与对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$) 相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 故选择该浓度进行造模。

如图 3 所示, 与对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$) 相比, 顺铂组 PC12 细胞活力显著降低 ($P < 0.05$); 与顺铂组相比, 丁苯酞各浓度组均可不同程度地提高 PC12 细胞存活率, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 其中, 丁苯酞低剂量组 (25 $\mu\text{mol/L}$) 的细胞存活率提高了约 27%, 这提示丁苯酞对 PC12 细胞有保护作用, 故后续实验选用浓度为 25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 的丁苯酞进行考察。

2.2 丁苯酞对顺铂诱导损伤PC12细胞内IL-6及IL-1 β 水平的影响

如图 4 所示, 顺铂使 PC12 细胞内 IL-6 和 IL-1 β 水平显著升高 ($P < 0.05$), 丁苯酞治疗后 IL-6 和 IL-1 β 水平降低, 其中丁苯酞高剂量组与顺铂组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.3 丁苯酞对顺铂诱导损伤PC12细胞凋亡的影响

如图 5 所示, 与对照组相比, 顺铂组的相对荧光强度比值显著上升 ($P < 0.05$), 提示细胞凋亡, 而丁苯酞给药后, 低、中、高剂量组的相对荧光强度显著下降 ($P < 0.05$), 细胞凋亡的程度降低。

2.4 丁苯酞可通过PI3K/Akt/CREB通路改善PC12细胞损伤

如图 6 所示, 顺铂组 PC12 细胞的 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 和 p-CREB/CREB 蛋白水平低于对照组, 其中 p-Akt/Akt 和 p-CREB/CREB 蛋白

水平差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 相比于顺铂组, 丁苯酞各剂量组 PC12 细胞的 p-PI3K/PI3K、中、低剂量组的 p-Akt/Akt 和中剂量组的 p-CREB/CREB 蛋白水平显著提高 ($P < 0.05$)。

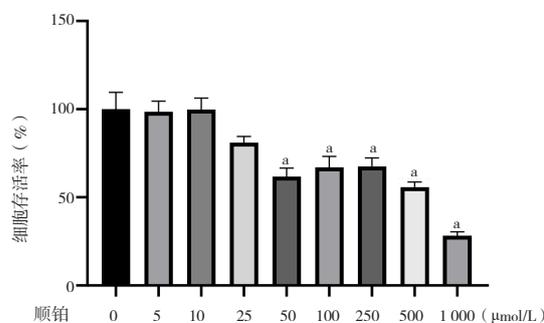


图2 不同浓度顺铂对PC12细胞活力的影响 ($n=6$)
Figure 2. Effect of different concentrations of cisplatin on the viability of PC12 cells ($n=6$)

注: 与对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$) 相比, ^a $P < 0.01$ 。

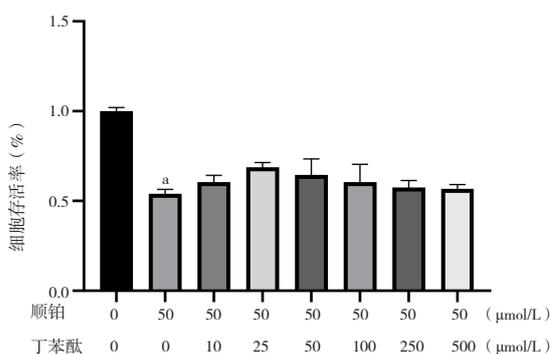


图3 不同浓度丁苯酞对顺铂诱导损伤PC12细胞存活率的影响 ($n=6$)
Figure 3. Effect of different concentrations of butylphthalide on the viability of cisplatin-induced PC12 cells ($n=6$)

注: 与对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$) 相比, ^a $P < 0.01$ 。

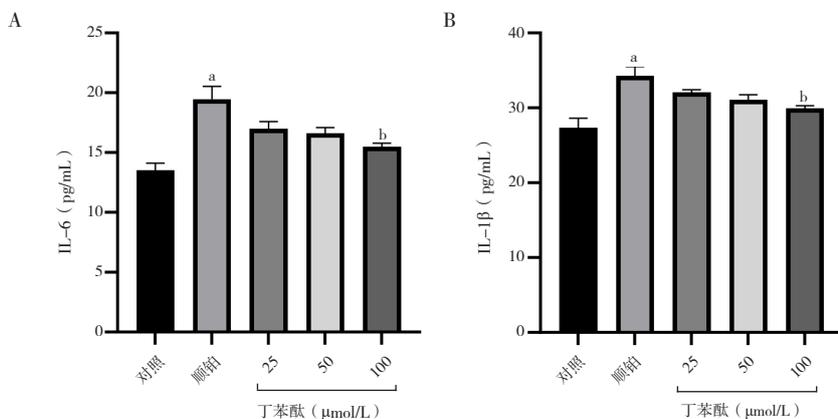


图4 丁苯酞对顺铂诱导损伤PC12细胞炎症因子IL-6和IL-1 β 的影响 ($n=3$)

Figure 4. Effect of butylphthalide on cisplatin-induced damage to PC12 cell inflammatory cytokines IL-6 and IL-1 β ($n=3$)

注: A. IL-6; B. IL-1 β ; 与对照组相比, ^a $P < 0.01$; 与顺铂组相比, ^b $P < 0.05$ 。

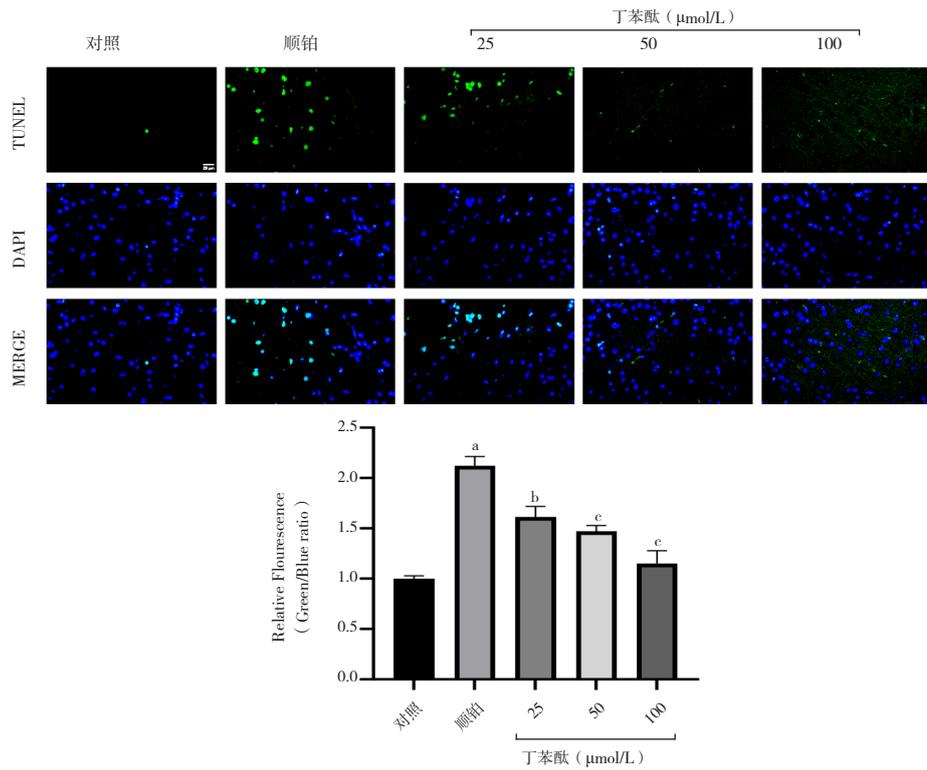


图5 丁苯酞对顺铂诱导损伤PC12细胞细胞凋亡的影响 ($n=3$)

Figure 5. Effect of butylphthalide on apoptosis of cisplatin-induced injured PC12 cells ($n=3$)

注: 与对照组相比, ^a $P < 0.01$; 与顺铂组相比, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$ 。

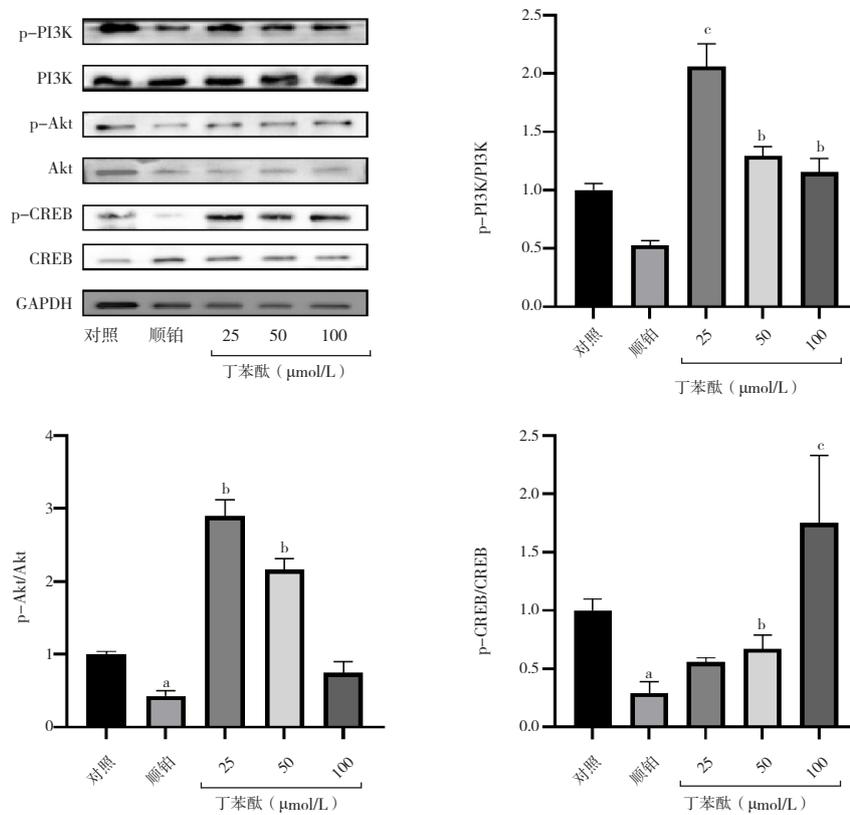


图6 丁苯酞对顺铂诱导损伤PC12细胞PI3K/Akt/CREB信号通路的影响 ($n=3$)

Figure 6. Effect of butylphthalide on PI3K/Akt/CREB signaling pathway in cisplatin-induced damage to PC12 cells ($n=3$)

注: 与对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与顺铂组相比, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$ 。

3 讨论

PC12 细胞被广泛用于体外神经系统疾病的研究,本研究通过构建顺铂诱导的 PC12 细胞损伤模型,探讨了丁苯酞通过调节 PI3K/Akt/CREB 信号通路对炎症反应和细胞凋亡的影响,研究结果从细胞活力、炎症因子释放及凋亡水平等多个维度证实了丁苯酞的神经保护作用,研究发现其机制可能与激活 PI3K/Akt/CREB 通路密切相关。

CCK-8 结果显示,丁苯酞在高浓度时细胞存活率更高,这可能与丁苯酞独特的药理特性有关,如其抗氧化作用在低浓度保护细胞,而高浓度时可能因为更强的抗氧化效果或激活特定通路促进细胞存活。顺铂显著降低 PC12 细胞存活率,而丁苯酞预处理可剂量依赖性逆转这一效应,提示其具有保护 PC12 细胞免受顺铂毒性的潜力,这一结果为后续探讨机制提供了基础。

顺铂可通过诱导 DNA 损伤和神经炎症导致神经元凋亡,神经炎症是顺铂神经毒性的关键特征。研究表明,炎症与 CRCI 密切相关^[14],并且可能是引起 CRCI 的重要原因^[15],可能被用作预测 CRCI 的标志物。炎症与药物细胞毒性相结合,会改变血脑屏障的结构和完整性,使细胞因子更易穿过并影响皮质完整性,从而导致 CRCI^[16]。在小鼠^[17]和阿尔茨海默病患者^[18]的研究中发现,IL-6 和 IL-1 β 水平异常会造成认知障碍,其与情景记忆功能密切相关,在 CRCI 的发展中具有重要作用,IL-6 和 IL-1 β 作为促炎细胞因子,其过度释放可激活胶质细胞并加剧 PC12 细胞损伤,因此,抑制炎症^[19]可能是预防和减轻顺铂引起的认知障碍的潜在策略。本研究发现丁苯酞可显著抑制顺铂诱导的 IL-6 和 IL-1 β 上调,表明其可能通过抗炎作用减轻 PC12 细胞损伤。

细胞凋亡在学习记忆障碍中起着重要的作用^[20],凋亡程度与认知障碍程度呈正相关。顺铂能够通过激活凋亡途径诱导细胞死亡,本研究通过 TUNEL 染色验证了顺铂模型中 PC12 细胞凋亡指数较正常组较高,而丁苯酞组治疗后凋亡情况得到抑制,进一步证明丁苯酞对顺铂诱导 PC12 细胞凋亡的保护作用。

PI3K/Akt/CREB 信号通路和炎症、细胞凋亡

密切相关^[21]。研究表明,PI3K 信号通路可以促进细胞存活^[22],介导炎症^[23],并且参与中枢神经系统的细胞凋亡,PI3K 被激活后,可以使细胞膜上的磷脂酰基醇磷酸化,继而生成磷脂酰基醇三磷酸,实现 Akt 的完全活化^[24]。而 Akt 是 PI3K 下游的主要蛋白效应因子,是最重要的凋亡抑制蛋白之一,Akt 磷酸化后可激活神经保护作用。PI3K/Akt 是调控神经元生长、存活的关键信号通路^[25],一方面可以调控促凋亡、抗凋亡基因的表达来抑制细胞凋亡,另一方面还可以促进 CREB 的磷酸化,p-CREB 的形成使 CREB 与其相对应的启动子区域相连,进而诱导 cAMP 反应元件基因的表达,同时还能促进脑源性神经营养因子的表达,在神经元再生及学习记忆等方面有着重要的调节作用。顺铂可通过 DNA 损伤、炎症生成等诱导细胞凋亡,通常伴随 PI3K/Akt 信号抑制(促凋亡)和 CREB 活性降低(抗凋亡减弱)。为了更进一步探索丁苯酞对顺铂诱导 PC12 细胞的保护作用机制,本文采用 Western blotting 法检测 PC12 细胞中 PI3K/Akt/CREB 信号通路的蛋白表达情况。结果表明,顺铂组 PC12 细胞的 p-PI3K、p-Akt 和 p-CREB 蛋白水平均低于对照组。经丁苯酞预处理给药后,p-PI3K、p-Akt 和 p-CREB 蛋白水平均有所提高,其中 p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 蛋白水平随丁苯酞浓度升高而降低,与 CCK-8 结果一致,而 p-CREB/CREB 蛋白水平随丁苯酞浓度增加而升高,与 CCK-8 结果相反,正常情况下,Akt 可间接激活 CREB,但在此实验中,丁苯酞可能解耦 Akt 与 CREB 的联系,使 CREB 可能通过非 PI3K/Akt 依赖途径被丁苯酞激活,这可能需要通过后续通路进行验证。以上结果表明,丁苯酞可以上调 PC12 细胞 PI3K/Akt/CREB 通路蛋白表达,对顺铂诱导的 PC12 细胞损伤起保护作用。Western blotting 结果表明,丁苯酞可以上调 PC12 细胞 PI3K/Akt/CREB 通路蛋白表达,对顺铂诱导的 PC12 细胞损伤起保护作用。

综上所述,丁苯酞可显著增加因顺铂诱导致死细胞的存活率、抑制炎症和细胞凋亡,并可通过 Akt/CREB/脑源性神经营养因子细胞起到减轻细胞损伤的作用,从而保护神经系统。与以往研究相比,本研究揭示了丁苯酞通过 PI3K/Akt/CREB 信号通路减轻顺铂诱导的神经细胞损伤,为丁苯酞的神经保护作用提供了新的理论支持,

发现其在神经系统疾病治疗中具有潜在应用价值, 这些发现为进一步探究丁苯酞的作用机制及其活性成分奠定了实验基础。

参考文献

- 曹帅男, 陈飞, 戴真煜. 乳腺癌化疗相关认知障碍患者的脑结构及静息态功能 MRI 研究进展 [J]. 磁共振成像, 2023, 14(12): 121–126. [Cao SN, Chen F, Dai ZY. Research progress of brain structure and resting-state functional MRI in patients with breast cancer chemotherapy-related cognitive impairment[J]. Chinese Journal of Magnetic Resonance Imaging, 2023, 14(12): 121–126.] DOI: [10.12015/issn.1674-8034.2023.12.021](https://doi.org/10.12015/issn.1674-8034.2023.12.021).
- Botelho R, Philpot RM. Ovariectomy and estradiol supplementation prevents cyclophosphamide and doxorubicin induced spatial memory impairment in tumor bearing MMTV-PyVT mice[J]. eNeuro, 2024; 11(9): ENEURO.0206–24.2024. DOI: [10.1523/ENEURO.0206-24.2024](https://doi.org/10.1523/ENEURO.0206-24.2024).
- Ma Y, Chai W, Bu D, et al. Toward better understanding and management of chemobrain: the potential utilities of the MemTrax memory test[J]. BMC Womens Health, 2024, 24(1): 406. DOI: [10.1186/s12905-024-03251-4](https://doi.org/10.1186/s12905-024-03251-4).
- Wang QL, Xu HY, Wang Y, et al. Clinical study of chemotherapy-related cognitive impairment in patients with non-Hodgkin lymphoma[J]. World J Psychiatry, 2024, 14(7): 1062–1067. DOI: [10.5498/wjp.v14.i7.1062](https://doi.org/10.5498/wjp.v14.i7.1062).
- Wang X, Zhou Y, Wang D, et al. Cisplatin-induced ototoxicity: from signaling network to therapeutic targets[J]. Biomed Pharmacother, 2023, 157: 114045. DOI: [10.1016/j.biopha.2022.114045](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.114045).
- 李乐, 吴启鹏, 江振洲. 化疗药物引发肿瘤转移的现象及机制探讨 [J]. 中南药学, 2022, 20(8): 1861–1866. [Li L, Wu QP, Jiang ZZ. Tumor metastasis induced by chemotherapeutic drugs and mechanism[J]. Central South Pharmacy, 2022, 20(8): 1861–1866.] DOI: [10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.026](https://doi.org/10.7539/j.issn.1672-2981.2022.08.026).
- Dasari S, Njiki S, Mbemi A, et al. Pharmacological effects of cisplatin combination with natural products in cancer chemotherapy[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(3): 1532. DOI: [10.3390/ijms23031532](https://doi.org/10.3390/ijms23031532).
- Koronyo-Hamaoui M, Gaire BP, Frautschy SA, et al. Editorial: role of inflammation in neurodegenerative diseases[J]. Front Immunol, 2022, 13: 958487. DOI: [10.3389/fimmu.2022.958487](https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.958487).
- Abudalo R, Gammoh O, Altaber S, et al. Mitigation of cisplatin-induced cardiotoxicity by Isorhamnetin: mechanistic insights into oxidative stress, inflammation, and apoptosis modulation[J]. Toxicol Rep, 2024, 12: 564–573. DOI: [10.1016/j.toxrep.2024.05.003](https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2024.05.003).
- 张丽虹, 江沛, 李焕德, 等. 癌症治疗对海马神经元生成的影响及其与认知功能和抑郁症间的关系 [J]. 中南药学, 2015, 13(2): 162–165. [Zhang LH, Jiang P, Li HD, et al. Effect of cancer treatment on hippocampal neurons: implications for cognitive function and depression[J]. Central South Pharmacy, 2015, 13(2): 162–165.] DOI: [10.7539/j.issn.1672-2981.2015.02.014](https://doi.org/10.7539/j.issn.1672-2981.2015.02.014).
- Liu X, Ma Y, Wang Y, et al. Effects of NBP injection on the inflammatory response, oxidative stress response and vascular endothelial function in patients with ACI: a systematic review and meta-analysis[J]. Medicine (Baltimore), 2023, 102(10): e33226. DOI: [10.1097/MD.00000000000033226](https://doi.org/10.1097/MD.00000000000033226).
- Tan TYC, Lim XY, Norahmad NA, et al. Neurological applications of celery (Apium graveolens): a scoping review[J]. Molecules, 2023, 28(15): 5824. DOI: [10.3390/molecules28155824](https://doi.org/10.3390/molecules28155824).
- Zhang H, Wang L, Yang Y, et al. DL-3-n-butylphthalide (NBP) alleviates poststroke cognitive impairment (PSCI) by suppressing neuroinflammation and oxidative stress[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 987293. DOI: [10.3389/fphar.2022.987293](https://doi.org/10.3389/fphar.2022.987293).
- Du J, Zhang A, Li J, et al. Doxorubicin-induced cognitive impairment: the mechanistic insights[J]. Front Oncol, 2021, 11: 673340. DOI: [10.3389/fonc.2021.673340](https://doi.org/10.3389/fonc.2021.673340).
- Duivon M, Lequesne J, Di Meglio A, et al. Inflammation at diagnosis and cognitive impairment two years later in breast cancer patients from the Canto-Cog study[J]. Breast Cancer Res, 2024, 26(1): 93. DOI: [10.1186/s13058-024-01850-5](https://doi.org/10.1186/s13058-024-01850-5).
- Ren X, St Clair DK, Butterfield DA. Dysregulation of cytokine mediated chemotherapy induced cognitive impairment[J]. Pharmacol Res, 2017, 117: 267–273. DOI: [10.1016/j.phrs.2017.01.001](https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.01.001).
- Braida D, Sacerdote P, Panerai AE, et al. Cognitive function in young and adult IL (interleukin)-6 deficient mice[J]. Behav Brain Res, 2004, 153(2): 423–429. DOI: [10.1016/j.bbr.2003.12.018](https://doi.org/10.1016/j.bbr.2003.12.018).
- Harrell ER, Bui C, Newman SD, et al. A mixed-effects model of associations between interleukin-6 and hippocampal volume[J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2022, 77(4): 683–688. DOI: [10.1093/gerona/glab313](https://doi.org/10.1093/gerona/glab313).
- Yang R, Chang Q, Meng X, et al. Prognostic value of systemic immune-inflammation index in cancer: a Meta-analysis[J]. J Cancer, 2018, 9(18): 3295–3302. DOI: [10.7150/jca.25691](https://doi.org/10.7150/jca.25691).
- Wang XX, Zhang B, Xia R, et al. Inflammation, apoptosis and autophagy as critical players in vascular dementia[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(18): 9601–9614. DOI: [10.26355/eurrev_202009_23048](https://doi.org/10.26355/eurrev_202009_23048).
- Deng Q, Liang JQ, Gao CH, et al. Effects of electroacupuncture on the PI3K/Akt/CREB signaling pathway and hippocampal neuronal apoptosis in diabetic cognitive impairment rats[J]. Zhen Ci Yan Jiu, 2024, 49(3): 265–273. DOI: [10.13702/j.1000-0607.20230732](https://doi.org/10.13702/j.1000-0607.20230732).
- Xu F, Na L, Li Y, et al. Roles of the PI3K/AKT/mTOR signalling pathways in neurodegenerative diseases and tumours[J]. Cell Biosci, 2020, 10(1): 54. DOI: [10.1186/s13578-020-00416-0](https://doi.org/10.1186/s13578-020-00416-0).

- 23 Sun K, Luo J, Guo J, et al. The PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in osteoarthritis: a narrative review[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2020, 28(4): 400–409. DOI: [10.1016/j.joca.2020.02.027](https://doi.org/10.1016/j.joca.2020.02.027).
- 24 He Y, Sun MM, Zhang GG, et al. Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 425. DOI: [10.1038/s41392-021-00828-5](https://doi.org/10.1038/s41392-021-00828-5).
- 25 Zheng Y, Zhang X, Zhang R, et al. Inflammatory signaling

pathways in the treatment of Alzheimer's disease with inhibitors, natural products and metabolites (Review)[J]. *Int J Mol Med*, 2023, 52(5): 111. DOI: [10.3892/ijmm.2023.5314](https://doi.org/10.3892/ijmm.2023.5314).

收稿日期: 2025 年 02 月 24 日 修回日期: 2025 年 03 月 31 日
本文编辑: 钟巧妮 李 阳