

茯苓酸对冈田酸诱导 PC12 细胞损伤的保护作用

崔 婧, 孙宁宁, 王战伟, 王 晶, 时东方*
(长春师范大学科技创新研究院 中心实验室 长春 130031)

摘要 目的:通过细胞实验探究茯苓酸对冈田酸(OA)诱导的 PC12 细胞损伤的保护作用及其机制。方法:利用 40 nmol/L 的 OA 建立 PC12 细胞损伤模型,以不同质量浓度茯苓酸(10,15,20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)为保护剂,检测细胞存活率,LDH 释放,细胞内 Ca^{2+} 浓度和 Caspase-3 活性。利用 western blot 检测 bax 和 p-taus202 蛋白的表达。结果:与对照组比较,40 nmol/L OA 使 PC12 细胞的活性降低至 $(64\pm 3.6)\%$ ($P<0.01$),LDH 释放量增加至 $(141.3\pm 3.1)\%$,细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 浓度为 $(178.3\pm 13.2)\%$ 和 Caspase-3 活性升高至 $(257.0\pm 22.8)\%$ ($P<0.01$);与模型组比较,50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 茯苓酸可以使 PC12 细胞的存活率提高至 $(90.5\pm 3.3)\%$ ($P<0.01$);降低 LDH 释放量至 $(117.5\pm 3.8)\%$, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 浓度至 $(123.5\pm 5.2)\%$ 和降低 Caspase-3 活性至 $(120.0\pm 4.1)\%$ ($P<0.01$)。Western blot 检测结果显示,OA 上调 bax 的表达,上调 p-taus202 的表达;与对照组相比,茯苓酸可以下调由 OA 导致的 bax 和 p-taus202 的蛋白表达上升 ($P<0.01$)。结论:茯苓酸对 OA 诱导的 PC12 细胞具有保护作用,其机制与抑制 tau 蛋白的过度磷酸化有关。

关键词 阿尔茨海默症;茯苓酸;PC12 细胞;冈田酸;Tau 蛋白

文章编号 1009-7848(2024)09-0114-08 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.09.011

茯苓是多孔菌科茯苓属真菌茯苓 (*Poria cocos* (Schw.) Wolf) 的干燥菌核,又称为松柏芋、云苓、玉灵等^[1]。茯苓性平味甘,归心、肺、脾、肾经,具有渗湿利水、益脾和胃及安神养神的功效^[2],是重要的药食同源原料。茯苓的主要活性成分是多糖、三萜和甾体,还含蛋白质、氨基酸、脂肪酸等其它成分^[3],具有抗肿瘤、增强免疫力以及抗衰老的作用^[4-5]。茯苓酸(Pachymic acid,PA)是茯苓中重要三萜成分之一,具有抗炎、抗癌、胰岛素样和抗衰老等活性^[6-10]。近年来,茯苓酸的神经损伤调节作用逐渐被关注。Shah 等^[11]发现,茯苓酸通过 GABA 能系统,增强戊巴比妥诱导的啮齿动物睡眠行为。Pang 等^[12]报道茯苓酸对脑 I/R 损伤和神经元凋亡有明显的神经保护作用,其机制可能与激活 PI3K/Akt 信号通路有关。然而,茯苓酸对冈田酸(OA)诱导神经元损伤的保护作用尚未见研究报道。

阿尔茨海默病(Alzheimer disease,AD),是一种多发于中老年人的神经系统退行性疾病。根据 2022 年《阿尔茨海默症事实和数据》的报告预计,

2060 年患者数量将达到 1.38 亿^[13]。AD 的三大病理学特征为 β -淀粉样蛋白(Amyloid- β ,A β)沉积形成老年斑,Tau 蛋白的过度磷酸化形成神经原纤维缠结(neurofibrillarytangles,NFT)和神经元丢失^[14]。在 AD 发病过程中 Tau 蛋白异常磷酸化是出现一系列神经毒性反应的中心环节。相关研究表明,Tau 蛋白的磷酸化发生在 AD 早期,因此,寻找可调节 Tau 蛋白磷酸化的药物有益于治疗 AD^[15]。冈田酸(Okadaic acid,OA)是由共生于冈田软海绵和隐瓜海绵中的利马原甲藻所产生的一类长链脂肪酸,可引起的神经毒性,与 tau 蛋白的异常磷酸化有关,可促进 AD 样病理特征^[16]。OA 被广泛应用于 AD 模型的研究中。本研究利用 OA 诱导 PC12 细胞建立 AD 细胞模型,通过测定不同指标,探究茯苓酸对 PC12 细胞的保护作用,为茯苓酸的开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

PC12 细胞,中国科学院上海生命科学研究所以生化与细胞所;茯苓酸(HPLC $\geq 98\%$)和冈田酸(HPLC $\geq 95\%$),上海源叶;MTT,美国 Sigma 公司;DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)、胎牛血清、双抗(青霉素 10 kU/mL,链霉素 10 mg/

收稿日期:2023-09-28

基金项目:吉林省自然科学基金项目(20230101194JC);
吉林省教育厅项目(JJKH20230910KJ)

第一作者:崔婧,女,博士,副教授

通信作者:时东方 E-mail: shidongfang@ccsfu.edu.cn

mL)和胰酶,美国 Hyclone 公司;Caspase-3 检测试剂盒、钙离子荧光探针 (Flou-3 AM),上海碧云天;bax、p-taus202 和 β -actin 抗体,英国 Abcam 公司。

1.2 仪器与设备

倒置显微镜,德国 Leica;CO₂ 培养箱,德国 Eppendorf Galaxy;多功能酶标仪,上海美谷分子仪器有限公司;分析天平,Sartorius BS223S,德国赛多利斯;电泳仪,北京六一生物科技有限公司;TANON5200 全自动化学发光分析系统,上海天能科技有限公司;超净台,美国 Labconco。

1.3 方法

1.3.1 PC12 细胞培养及传代 将液氮中保存的 PC12 细胞取出,迅速放入 37 °C 温水中,溶解,然后转移到 6 cm 培养皿中,再加入 4 mL 细胞培养基(DMEM 培养基 90 mL、10 mL 胎牛血清及 1 mL 双抗),吹打均匀,放入 37 °C 的 CO₂ 培养箱内,贴壁培养。待长势良好后进行细胞实验。

1.3.2 AD 细胞模型的建立 将 PC12 细胞接种于 96 孔板中,接种密度为 1×10^5 个/mL,接种量为 100 μ L。在 CO₂ 培养箱中,恒温培养 24 h,分别加入不同浓度的 OA (10, 20, 40, 80 nmol/L),继续培养 24 h。培养结束后,用 MTT 法检测细胞活性。每孔加入 10 μ L 的 5 mg/mL 的 MTT,孵育 4 h,弃掉培养基,再每孔加入 100 μ L 的 DMSO,振荡 10 min,充分溶解甲瓞结晶,用多功能酶标仪上在 490 nm 波长测 OD 值,按下式计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{\text{OD}_{\text{试验组}}}{\text{OD}_{\text{对照组}}} \times 100 \quad (1)$$

1.3.3 茯苓酸对 OA 诱导的 PC12 细胞活性的影响 用茯苓酸(质量浓度 25, 50, 100 μ g/mL)预处理 PC12 细胞 24 h,然后加入 OA (40 nmol/L),继续培养 24 h。通过形态学观察和 MTT 法评价茯苓酸对 OA 诱导的神经毒性的抑制作用。培养结束后,使用倒置相差显微镜 (Leica, Wetzlar, Germany)观察并记录细胞形态。MTT 法检测细胞活性。

1.3.4 细胞内 Ca²⁺浓度检测 细胞培养方法同 1.3.3 节。培养结束后,用培养基将 Fluo-3 AM 稀释为 0.5 μ mol/L,37 °C 孵育 30 min 进行荧光探针装载,弃掉孔内液体,洗涤,再孵育 30 min 使之完

全转变为 Fluo-3。使用多功能酶标仪,在 490 nm 处测定吸光度值。

1.3.5 Caspase-3 活性检测 细胞培养方法同 1.3.3 节。将细胞培养液移至离心管中,胰酶消化 PC12 细胞,然后收集到相应的细胞培养液中。4 °C,600 \times g 离心 5 min 收集细胞,去除上清,避免细胞被吸出。用 PBS 洗涤一次,弃上清。每 2×10^6 个细胞加入 100 μ L 裂解液,重悬细胞,冰浴裂解 15 min,4 °C 16 000 \times g 离心 15 min,将上清转移到新的离心管中,用于 Caspase-3 活性检测。

1.3.6 Western-blot 检测蛋白的表达 细胞培养结束后,收集细胞,BCA (bicinchoninic acid)法测蛋白浓度。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,采用湿法转移到聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上,5%脱脂奶粉封闭 2 h。加入一抗 bax、p-Tau(s202)或 β -actin,4 °C 过夜, TBST 洗涤 3 次,每次 10 min;加入二抗,孵育 1.5 h, TBST 洗涤 3 次,每次 10 min;用化学发光剂显影,在凝胶成像系统下拍照。

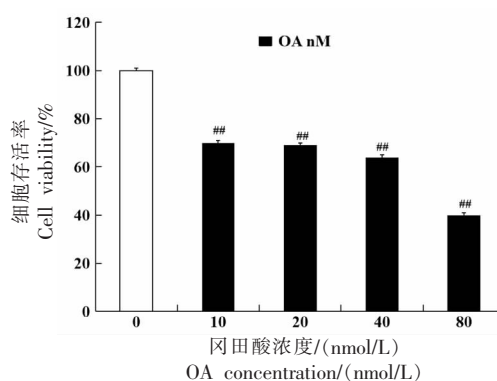
1.4 数据统计与处理

试验指标均以平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 16.0 软件进行数据统计分析。

2 结果

2.1 AD 细胞模型的建立

用 MTT 法检测不同浓度 OA 对 PC12 细胞的损伤。结果如图 1 所示,随 OA 浓度的升高,PC12 细胞的活性逐步下降。当 OA 的浓度为 10 和 20



注:数据以均数 \pm 标准差表示($n=5$);##:与对照组比较 $P < 0.01$ 。

图 1 OA 对 PC12 细胞活性的影响

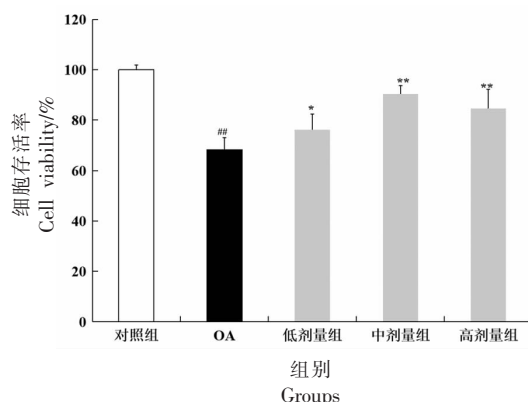
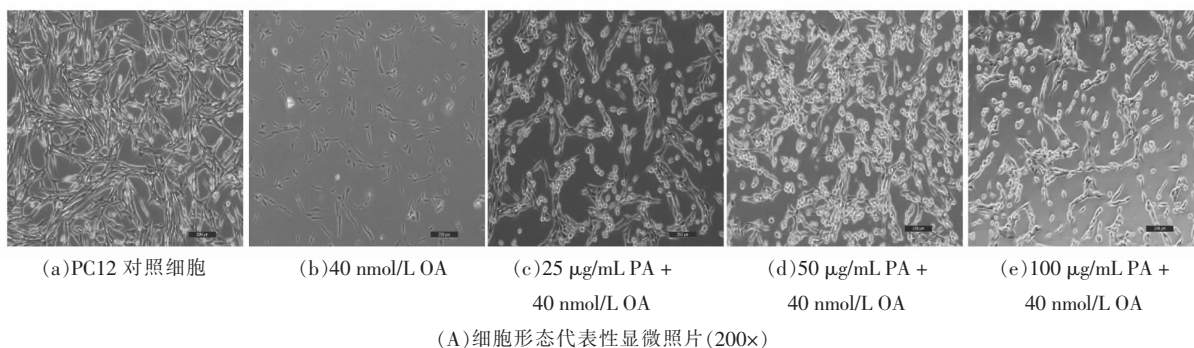
Fig.1 Effects of OA on PC12 cell activity

nmol/L时,PC12细胞的活性在70%左右;当OA浓度为40 nmol/L时,PC12细胞的活性为(64±3.6)%;当OA浓度为80 nmol/L时,PC12细胞的活性为40%左右。因此,在后续建立AD细胞损伤模型中,选用40 nmol/L浓度的OA。

2.2 茯苓酸对OA诱导PC12损伤的活性影响

与对照组相比,模型组的PC12细胞肿胀且数

量明显减少。PA(25,50,100 μg/mL)预处理组细胞形态得到改善(图2A)。MTT法结果显示,与对照组相比,模型组细胞活力显著下降至(68.3±4.7)%($^{##}P<0.01$);当用PA(25,50,100 μg/mL)预处理PC12细胞时,细胞活力分别提高到(76.2±6.2)%、(90.5±3.3)%和(84.6±7.6)% (图2b)。这说明茯苓酸对OA诱导的PC12细胞具有保护作用。



(B)MTT试验,PA对OA诱导的PC12细胞活力变化的影响

注:数据以均数±标准差表示(n=5);##:与对照组相比 $P<0.01$;与OA模型组比较,* $P<0.05$ 和** $P<0.01$ 。

图2 茯苓酸对OA诱导的PC12细胞的影响

Fig.2 Effects of pachymic acid on OA-induced changes in PC12 cell viability

2.3 茯苓酸对OA诱导的PC12细胞的LDH释放的影响

与对照组相比,用40 nmol/L OA处理PC12细胞,LDH释放量增加至(141.3±3.1)%。PA(25,50,100 μg/mL)显著降低OA导致的毒性,LDH释放分别降低至(137.3±2.8)%、(17.5±3.8)%和(124.6±4.0)% (图3)。

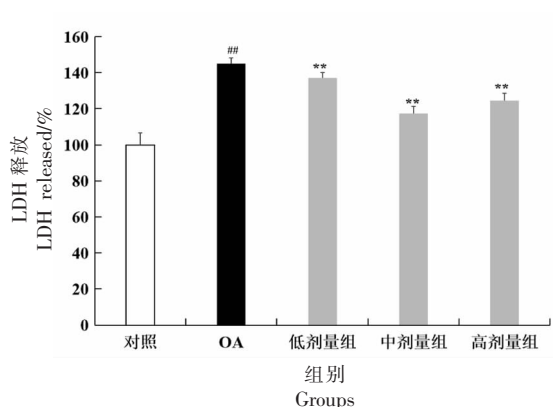
2.4 茯苓酸对OA诱导的PC12细胞的钙离子浓度影响

结果如图4所示,与对照组相比,OA模型组PC12细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 明显高于正常对照组($^{##}P<0.01$),

表明细胞内 Ca^{2+} 超载;茯苓酸预处理组,PC12细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 较OA模型组均有明显下降($^{**}P<0.01$)。当茯苓酸质量浓度为15 μg/mL时,与OA模型组相比钙离子荧光强度差异性最明显。说明茯苓酸能降低OA导致的PC12细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度增加。

2.5 茯苓酸对OA诱导的PC12细胞的Caspase-3活性影响

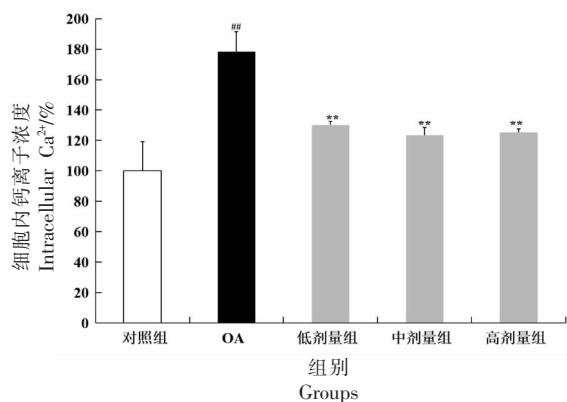
结果如图5所示,与对照组相比,OA显著增加PC12的Caspase-3活性($^{##}P<0.01$);与模型组相比,茯苓酸可以降低由OA导致的PC12细胞Caspase-3活性增加($^{**}P<0.01$)。这说明茯苓酸可



注:数据以均数±标准差表示(n=5);##:与对照组比较 $P<0.01$; ** :与 OA 模型组比较 $P<0.01$ 。

图 3 茯苓酸对 OA 诱导的 PC12 细胞 LDH 释放的影响

Fig.3 Effects of pachymic acid on LDH leakage in OA-treated PC12 cells



注:数据以均数±标准差表示(n=5);##:与对照组比较 $P<0.01$; ** :与 OA 模型组比较 $P<0.01$ 。

图 4 茯苓酸对 OA 诱导的 PC12 细胞的钙离子浓度影响

Fig.4 Effects of pachymic acid on intracellular calcium concentrations ($[Ca^{2+}]_i$) in OA-treated PC12 cells

能是通过降低 PC12 细胞的 Caspase-3 活性,影响 PC12 细胞活性,从而保护 OA 损伤的 PC12 细胞。

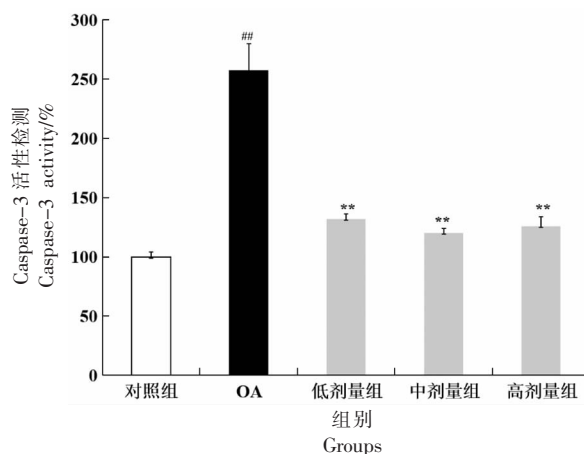
2.6 茯苓酸对 OA 诱导的 PC12 细胞内 bax 和 p-Tau 蛋白表达的影响

Western-blot 检测蛋白的表达,结果如图 6 所示。与对照组比较,40 nmol/L OA 处理 PC12 细胞后,bax 的表达明显升高($P<0.01$);与模型组相比,茯苓酸种和高剂量组使 bax 的表达降低($P<0.01$)。与对照组相比,40 nmol/L OA 处理 PC12 细胞后,p-tau_{s202} 蛋白的表达显著上调($P<0.01$);与模型组相比,茯苓酸使 tau-s₂₀₂ 蛋白的表达下降($P<0.01$)。

3 讨论

茯苓较强的适应能力,野生资源分布广泛,中国是茯苓主产区,产量约占世界总产量的 70%^[17]。茯苓具有免疫调节、抗肿瘤、抗炎、抗衰老和调节泌尿系统等多种功效,在药品、食品、化妆品等领域均有应用。茯苓的主要化学成分为茯苓酸、茯苓醇和齿孔酸^[18]。茯苓酸通过 PI3K/Akt 信号通路对脑缺血/再灌注损伤具有神经保护作用^[19]。但是,茯苓酸对 OA 诱导的 PC12 细胞诱导是否具有保护作用尚不清楚。因此,本文采用 OA 处理 PC12 细胞建立 AD 细胞模型,用多指标考察茯苓酸对 OA 损伤的神经细胞的保护作用。

OA 可以诱导 SH-SY5Y 细胞和培养的神经元

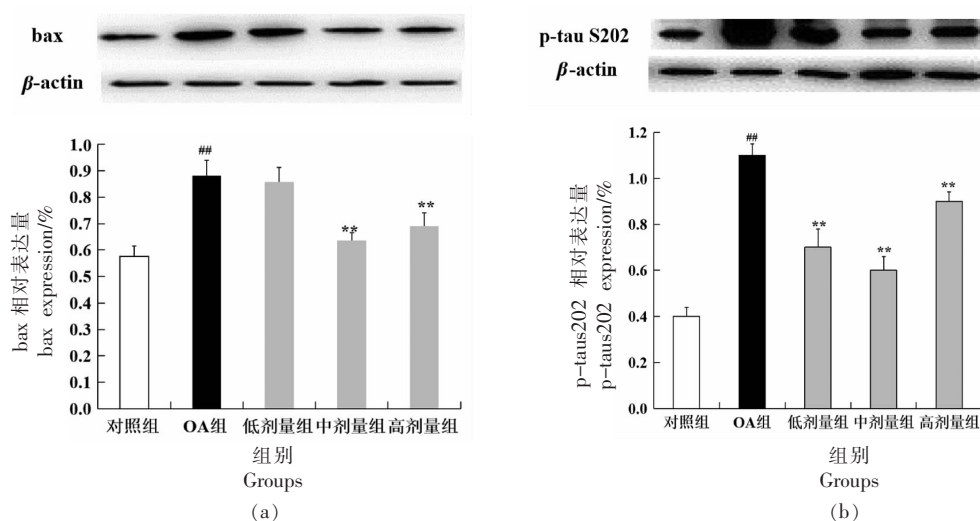


注:数据以均数±标准差表示(n=5);##:与对照组比较 $P<0.01$; ** :与 OA 模型组比较 $P<0.01$ 。

图 5 茯苓酸对 OA 诱导的 PC12 细胞的 Caspase-3 活性影响

Fig.5 Effects of pachymic acid caspase-3 activation in OA-treated PC12 cells

细胞的神经毒性,导致类似 AD 的病理特征^[20]。冈田酸还可以诱导神经元细胞骨架改变,导致细胞死亡^[21]。本研究表明,OA 对 PC12 细胞有明显的神经毒性,降低 PC12 细胞活力;茯苓酸预处理可以改善 PC12 细胞形态,提高 PC12 细胞的活力。乳酸脱氢酶是存在于大多数细胞中的可溶性胞质酶,在毒理学和临床化学中被广泛用作诊断细胞、组织和器官损伤的生物标志物。OA 可增加 U-937 细胞和 Vero 细胞中 LDH 的释放^[22-23]。本研究结果



注:数据以均数±标准差表示(n=3);##:与对照组比较 P<0.01;** :与 OA 模型组比较 P<0.01。

图 6 茯苓酸对 OA 诱导的 PC12 细胞 bax(A)和 p-tau(B)蛋白表达的影响

Fig.6 Effects of pachymic acid on the expression of bax(A)and p-tau(B) in OA-treated PC12 cells

表明,OA 会导致 PC12 细胞的 LDH 释放增加,而茯苓酸可以减少 LDH 的释放。据报道,Ca²⁺内流会引起线粒体功能障碍,最终导致细胞凋亡^[24];Ca²⁺失调,形成了“衰老和 AD 的钙假说”^[25-26]。在 OA 模型中发现了 AD 样的病理改变,如神经元凋亡、Ca²⁺超载、脑能量代谢异常和脑源性神经营养因子减少^[27-29]。本试验结果表明,OA 导致 PC12 细胞内 Ca²⁺增加,茯苓酸会抑制 OA 的这种作用,这说明茯苓酸通过抑制钙离子超载保护 PC12 细胞。

Caspase 级联和 bax 家族成员是凋亡信号转导的关键介质。Caspase-3 是凋亡发生的标志酶,Caspase-3 介导的蛋白剪切是细胞凋亡分子机制的重要组成部分^[30]。在 OA 诱导的细胞凋亡过程中,Caspase-3 起重要作用^[31]。bax 是 BCL-2 基因家族中细胞凋亡促进基因^[32]。在健康细胞的细胞质中,bax 多以非活性单体形式存在,在凋亡细胞的线粒体中则形成寡聚体^[33-34]。bax 蛋白在线粒体应激诱导的细胞凋亡中起关键作用,上调 bax 蛋白的表达,可引起线粒体外膜的透化,触发细胞线粒体膜中凋亡中间体的释放,并与 Bcl-2 等抑凋亡蛋白拮抗,最终促进细胞凋亡^[35-36]。Li 等^[37]报道,冈田酸可以上调 p53 和 bax 的表达,而对 Bcl-2 的表达没有影响。本试验结果显示,与对照组相比,OA 显著增加 PC12 的 Caspase3 活性,不同浓度的茯苓酸均可以降低由 OA 导致的 PC12 细胞

Caspase3 活性增加;OA 使 bax 表达上调,茯苓酸显著降低 bax 的表达。

OA 能诱导大鼠脑中 Tau 蛋白的过度磷酸化和神经元死亡,并与 bax 蛋白相关^[38]。Tau 是微管相关蛋白家族的一员,在微管蛋白单体组装成微管构成神经元微管网络的过程中起着重要作用^[39-40]。异常磷酸化的 Tau 蛋白是 AD 的主要神经病理学标志之一^[41]。Tau 蛋白有 40 多个可能的磷酸化位点,磷酸化受几种激酶和磷酸酶的调控^[42-43]。Chou 等^[44]研究发现 OA 增加 NEURO-2a 和 SY-SY5Y 神经元中 Tau 蛋白在 Ser202/Thr205 和 Ser262 位点的磷酸化。20 nmol/L OA 作用 48 h 可增强 Tau 蛋白在 Ser404 或 Ser202 位点的磷酸化^[45]。本试验结果显示,OA 使 PC12 细胞种 Tau 蛋白在 Ser202 位点发生过度磷酸化,茯苓酸可以下调 OA 导致的 p-taus202 蛋白升高因此,茯苓酸抑制 OA 导致的 PC12 细胞凋亡,可能与抑制 tau 蛋白过度磷酸化有关。

综上所述,茯苓酸可以抑制 OA 导致的 PC12 细胞损伤,可能与抑制 Tau 蛋白过度磷酸化有关。具体茯苓酸抗 OA 导致的 PC12 细胞损伤机制还需进一步深入研究。本研究结果为寻找防治 AD 药物提供新资源,为利用天然药物抗 AD 提供了新思路。

参 考 文 献

- [1] 徐德宏, 谭朝阳, 郑慧, 等. 茯苓功效成分茯苓酸的研究进展[J]. 食品科学, 2022, 43(7): 273-280.
XU D H, TAN C Y, ZHENG H, et al. Research progress of pachymic acid, an effective component of *Poria cocos* (Schw.) Wolf[J]. Food Science, 2022, 43(7): 273-280.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2020年版): 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 251-252.
Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (2020)[M]. Beijing: The Medicine Science and Technology Press of China, 2020: 251-252.
- [3] NIE A, CHAO Y H, ZHANG X, et al. Phytochemistry and pharmacological activities of Wolf *Poria cocos* (F.A. Wolf)[J]. Front Pharmacol, 2020, 11(9): 505249
- [4] SUN Y. Biological activities and potential health benefits of polysaccharides from *Poria cocos* and their derivatives[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 68(7): 131-134.
- [5] 崔仙红, 张鹏, 朱笛. 茯苓三萜类化合物药理活性研究进展[J]. 中国药物经济学, 2019, 14(12): 123-125.
CUI X H, ZHANG P, ZHU D. Advances in pharmacological activities of triterpenoids in *Poria cocos* [J]. Chinese Pharmacoeconomics, 2019, 14(12): 123-125.
- [6] HUANG Y C, CHANG W L, HUANG S F, et al. Pachymic acid stimulates glucose uptake through enhanced GLUT4 expression and translocation[J]. Eur J Pharmacol, 2010, 648(1/2/3): 39-49.
- [7] GINER E M, MANEZ S, RECIO M C, et al. *In vivo* studies on the anti-inflammatory activity of pachymic and dehydrotumulosic acids[J]. Planta Medica, 2000, 66(3): 221-227.
- [8] LING H, ZHANG Y, NG K Y, et al. Pachymic acid impairs breast cancer cell invasion by suppressing nuclear factor- κ B-dependent matrix metalloproteinase-9 expression[J]. Breast Cancer Res Treat, 2011, 126(3): 609-620.
- [9] MA J, LIU J, LU C, et al. Pachymic acid induces apoptosis via activating ROS-dependent JNK and ER stress pathways in lung cancer cells[J]. Cancer Cell Int, 2015, 15(8): 78.
- [10] LEE S G, KIM M M. Pachymic acid promotes induction of autophagy related to IGF-1 signaling pathway in WI-38 cells[J]. Phytomedicine, 2017, 36(12): 82-87.
- [11] SHAH V K, CHOI J J, HAN J Y, et al. Pachymic acid enhances pentobarbital-induced sleeping behaviors via GABAA-ergic systems in mice[J]. Biomol Ther, 2014, 22(4): 314-320.
- [12] PANG Y Q, ZHU S Z, PEI H T. Pachymic acid protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by the PI3K/Akt signaling pathway[J]. Metabolic Brain Disease, 2020, 35(4): 673-680.
- [13] 2022 Alzheimer's disease facts and figures. Alzheimers Dement, 2022, 18(4): 700-789.
- [14] SHI Y C, ZHANG H, SONG Q, et al. Development of novel 2-aminoalkyl-6-(2-hydroxyphenyl)pyridazin-3(2H)-one derivatives as balanced multifunctional agents against Alzheimer's disease[J]. Eur J Med Chem, 2022, 230(2): 11409.
- [15] 齐越, 王亚斌, 李纪彤, 等. 益智聪明汤对 $A\beta_{(25-35)}$ 致阿尔茨海默病小鼠模型 Tau 蛋白影响[J]. 中国公共卫生, 2018, 34(1): 63-66.
QI Y, WANG Y B, LI J T, et al. Effect of Yizhi Congming Tang on Tau protein in $A\beta_{(25-35)}$ -induced Alzheimer's disease mice model[J]. Chinese Journal of Public Health, 2018, 34(1): 63-66.
- [16] KAMAT P K, RAI S, NATH C. Okadaic acid induced neurotoxicity: An emerging tool to study Alzheimer's disease pathology[J]. Neurotoxicology, 2013, 37(7): 163-172.
- [17] 刘顺才, 吴琪, 邢鹏, 等. 茯苓种质资源的研究进展综述[J]. 食药菌, 2017, 25(3): 171-175.
LIU S C, WU Q, XING P. Review on the research progress of *Poria cocos* germplasm resources[J]. Em-mushroom, 2017, 25(3): 171-175.
- [18] KIM Y J, LIM H S, KIM B Y, et al. Quantitative analysis and biological efficacies regarding the neuroprotective and antineuroinflammatory actions of the herbal formula jodeungsan in HT22 hippocampal cells and BV-2 microglia [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2017, 2017(12): 6360836.
- [19] PANG Y Q, ZHU S Z, PEI H T. Pachymic acid protects against cerebral ischemia/reperfusion injury

- by the PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Metabolic Brain Disease*, 2020, 35(4): 673–680.
- [20] ZHANG J, CHENG Y, ZHANG J T. Protective effect of (-) clausenamide against neurotoxicity induced by okadaic acid and beta-amyloid peptide25–3[J]. *Yao Xue Xue Bao*, 2007, 42(9): 935–942.
- [21] ARIAS C, SHARMA N, DAVIES P, et al. Okadaic acid induces early changes in microtubule-associated protein 2 and tau phosphorylation prior to neurodegeneration in cultured cortical neurons[J]. *J Neurochem*, 1993, 61(2): 673–682.
- [22] RAVINDRAN J, GUPTA N, AGRAWAL M, et al. Modulation of ROS/MAPK signaling pathways by okadaic acid leads to cell death via, mitochondrial mediated caspase-dependent mechanism[J]. *Apoptosis*, 2011, 16(2): 145–161.
- [23] RAORÉ A, BONINI M, DANO S D, et al. Synergistic effects of some metals contaminating mussels on the cytotoxicity of the marine toxin okadaic acid [J]. *Arch Toxicol*, 1999, 73(6): 289–295.
- [24] EATON D L, KLAASSEN C D. Effect of microsomal enzyme inducers on carrier-mediated transport systems in isolated rat hepatocytes[J]. *W.B. Saunders*, 1979, 208(3): 381–385.
- [25] BEGLEY J G, DUAN W, CHAN S, et al. Altered calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in cortical synaptic compartments of presenilin-1 mutant mice[J]. *J Neurochem*, 1999, 72(3): 1030–1039.
- [26] MATTSON M P, CHENG B, DAVIS D, et al. Beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity[J]. *J Neurosci*, 1992, 12(2): 376–389.
- [27] XU A H, YANG Y, SUN Y X, et al. Exogenous brain-derived neurotrophic factor attenuates cognitive impairment induced by okadaic acid in a rat model of Alzheimer's disease[J]. *Neural Regen Res*, 2018, 13(12): 2173–2181.
- [28] JIANG W, LUO T, LI S, et al. Quercetin protects against okadaic acid-induced injury via MAPK and PI3K/Akt/ GSK3 β signaling pathways in HT22 hippocampal neurons[J]. *PLoS ONE*, 2016, 11(4): e0152371.
- [29] WEI Y P, YE J W, WANG X, et al. Tau-induced Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase-IV activation aggravates nuclear tau hyperphosphorylation[J]. *Neurosci Bull*, 2018, 34(2): 261–269.
- [30] HSIAO K, CHAPMAN P, NILSEN S, et al. Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice[J]. *Science*, 1996, 274(5284): 99–102.
- [31] LI D W C, XIANG H, MAO Y W, et al. Caspase-3 is actively involved in okadaic acid-induced lens epithelial cell apoptosis[J]. *Exp Cell Res*, 2001, 266(2): 279–291.
- [32] OLTVAI Z N, MILLIMAN C L, KORSMEYER S J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homology, bax, that accelerates programmed cell death [J]. *Cell*, 1993, 74(4): 609–619.
- [33] PARIKH N, KOSHY C, DHAYABARAN V, et al. The N-terminus and alpha-5, alpha-6 helices of the pro-apoptotic protein bax, modulate functional interactions with the anti-apoptotic protein Bcl-xL [J]. *BioMed Central*, 2007, 8(1): 427–434.
- [34] 俞睿, 祝美珍, 刘倩菁, 等. 清脑益元汤对脑缺血损伤大鼠缺血侧皮质区神经细胞凋亡及凋亡相关蛋白 Bcl-2, bax 表达的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2021, 41(4): 825–830.
- YU R, ZHU M Z, LIU Q J, et al. Effect of Qingnao Yiyuan decoction on neuronal apoptosis and expression of apoptosis-related proteins Bcl-2 and Bax in ischemic cortex of rats with cerebral ischemia injury[J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2021, 41(4): 825–830.
- [35] 董雅洁, 高维娟. bcl-2, bax, caspase-3 在细胞凋亡中的作用及其关系[J]. *中国老年学杂志*, 2012, 32(21): 4828–4830.
- DONG Y J, GAO W J. Roles of bcl-2, bax and caspase-3 in apoptosis and their relationship [J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2012, 32(21): 4828–4830.
- [36] 钟小兰, 班努·库肯, 景江新. 过表达 bax 抑制剂 1 通过抑制线粒体通透性转换孔开放及细胞凋亡减轻心肌缺血再灌注损伤[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2021, 29(3): 222–231.
- ZHONG X L, BANNU K, JING J X. Overexpression of Bax inhibitor-1 reduces myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening and apoptosis [J]. *Chin J Arterioscler*, 2021, 29(3): 222–231.
- [37] LI D W, FASS U, HUIZAR I, et al. Okadaic acid-induced lens epithelial cell apoptosis requires inhibition of phosphatase-1 and is associated with

- induction of gene expression including p53 and bax [J]. *Eur J Biochem*, 1998, 257(2): 351–361.
- [38] CHEN L Q, WEI J S, LEI Z N, et al. Induction of Bcl-2 and bax was related to hyperphosphorylation of tau and neuronal death induced by okadaic acid in rat brain[J]. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 2005, 287(2): 1236–1245.
- [39] MARTIN L, LATYPOVA X, WILSON C M, et al. Tau protein phosphatases in Alzheimer's disease: The leading role of PP2A[J]. *Ageing Res Rev*, 2013, 12(1): 39–49.
- [40] MEDINA M, AVILA J. New perspectives on the role of tau in Alzheimer's disease. Implications for therapy[J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 88(4): 540–547.
- [41] GESCHWIND D H. Tau phosphorylation, tangles, and neurodegeneration: the chicken or the egg[J]. *Neuron*, 2003, 40(3): 457–460.
- [42] MIYASAKA T, SATO S, TATEBAYASHI Y, et al. Microtubule destruction induces tau liberation and its subsequent phosphorylation[J]. *FEBS Lett*, 2010, 584(14): 3227–3232.
- [43] ANDO K, MARUKO-OTAKE A, OHTAKE Y, et al. Stabilization of microtubule-unbound tau via tau phosphorylation at Ser262/356 by Par-1/MARK contributes to augmentation of AD-related phosphorylation and A β 42-induced tau toxicity[J]. *PLoS Genet*, 2016, 12(3): e1005917.
- [44] CHOU C H, YANG C R. Neuroprotective studies of evodiamine in an okadaic acid-induced neurotoxicity [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(10): 5347.
- [45] ZHAO L, XIAO Y, WANG X L, et al. Original research: Influence of okadaic acid on hyperphosphorylation of tau and nicotinic acetylcholine receptors in primary neurons[J]. *Exp Biol Med*, 2016, 241(16): 1825–1833.

Protective Effect of Pachymic Acid on Okadaic Acid-induced Neurotoxicity in PC12 Cells

Cui Jing, Sun Ningning, Wang Zhanwei, Wang Jing, Shi Dongfang*

(*Institute of Innovation Science & Technology, Central Laboratory, Changchun Normal University, Changchun 130031*)

Abstract Objective: To investigate the protective effects of pachymic acid on okadaic acid (OA)-induced neurotoxicity in PC12 cells and identify a potential mechanism. Methods: Pachymic acid (10, 15, 20 $\mu\text{g/mL}$) was used as protective drugs to protect PC12 cells injured by OA (40 nmol/L). Cell viability, LDH release, intracellular Ca^{2+} concentration and caspase-3 activity were detected. The levels of bax and p-tau202 were detected by western blotting. Results: Compared with the control group, PC12 cells treated with 40 nmol/L OA significantly decreased the viability to (64 \pm 3.6)% ($P<0.01$), increased the release of LDH to (141.3 \pm 3.1)% increased intracellular Ca^{2+} concentration to (123.5 \pm 5.2)% and caspase-3 activity to (257.0 \pm 22.8)% ($P<0.01$); compared with the model group, 50 $\mu\text{g/mL}$ pachymic acid significantly increased cell viability to (90.5 \pm 3.3)% ($P<0.01$), decreased LDH release to (117.5 \pm 3.8)%, decreased $[\text{Ca}^{2+}]_i$ to (123.5 \pm 5.2)% and reduced caspase-3 activity to (120.0 \pm 4.1)% ($P<0.01$). Western blot results confirmed that OA increased the protein expression of bax and p-tau202, pachymic acid down-regulated the expression of bax and p-tau202. Conclusion: the protective effect of pachymic acid against OA-induced apoptosis in PC12 cells was related to the inhibition of tau hyperphosphorylation.

Keywords Alzheimer's disease; pachymic acid; PC12 cells; okadaic acid; Tau