doi:10.12301/spxb202300139 文章编号:2095-6002(2023)05-0068-08
引用格式:邹存恩,李孟雪,王珂,等. 核桃多酚对皮质酮损伤PC12细胞的作用机制[J]. 食品科学技术学报,2023,41(5):68-75.
ZOU Cunen, LI Mengxue, WANG Ke, et al. Mechanism of walnut polyphenols on PC12 cells injured by corticosterone [J]. Journal of Food Science and Technology, 2023,41(5):68-75.

核桃多酚对皮质酮损伤PC12细胞的作用机制

邹存恩[1,2], 李孟雪[1,2], 王 珂[1,2], 黎 明[3], 安 磊[1,*], 王友升[1,2,*]
(1. 北京工商大学 北京食品营养与人类健康高精尖创新中心/老年营养与健康教育部重点实验室, 北京 100048;
2. 山东凯普菲特生物科技有限公司 日照华伟大健康产业研究院, 山东 日照 276801;
3. 定州市人民医院 临床营养科, 河北 定州 073000)

摘 要:核桃多酚为核桃粕中的生物活性物质,具有重要的开发和应用价值。为探讨核桃多酚的潜在抗抑郁活性,采用皮质酮诱导的大鼠嗜铬瘤(PC12)细胞损伤模型,以细胞活力、细胞凋亡、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)释放量、细胞内钙离子水平评价核桃多酚在皮质酮损伤模型上的作用,并进一步采用蛋白免疫印迹法探讨核桃多酚对皮质酮损伤PC12细胞作用的机制。结果表明:核桃多酚(75、150 μg/mL)预处理可显著逆转皮质酮损伤引起PC12细胞活力降低、细胞凋亡、LDH释放量增加和钙超载,发挥细胞保护作用;此外,核桃多酚可显著逆转皮质酮诱导的PC12细胞中cAMP依赖性蛋白激酶A(cAMP-dependent protein kinase A, PKA)活性降低,并下调cAMP反应原件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB)133位丝氨酸的磷酸化和下游靶蛋白脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)的表达量;进一步应用PKA阻断剂H89预处理消除了核桃多酚对皮质酮诱导的PC12细胞的保护作用,说明增加PKA/CREB/BDNF信号通路活性是核桃多酚发挥抗皮质酮损伤作用必需的。研究结果表明,核桃多酚具有潜在的抗抑郁活性,可能是核桃饮食发挥抗抑郁作用的重要物质基础,其对皮质酮损伤的PC12细胞的保护作用与上调PKA/CREB/BDNF信号通路有关。研究结果旨在探明核桃多酚的潜在抗抑郁活性及机制,并为核桃粕的高值化利用提供理论参考。

关键词:核桃多酚;皮质酮;PC12细胞;压力应激;神经营养通路
中图分类号:TS255.1;TS201.4 **文献标志码**:A

随着生活节奏的加快,人们面临的压力持续增加,慢性压力应激引起的大脑功能受损及疾病状态,如抑郁症等,对人体健康的危害正日益凸显。现有缓解压力应激及抗抑郁治疗的药物大多存在不良反应多、起效慢、效率不高和价格昂贵等缺点。研究表明,营养干预或膳食补充剂在改善情绪和预防相关疾病中可能具有独特优势[1]。

核桃(*Juglans regia* L.),又名胡桃,与腰果、榛

收稿日期:2023-03-13
基金项目:国家自然科学基金面上项目(31471626;31972127)。
Foundation: National Natural Science Foundation of China(31471626;31972127).
第一作者:邹存恩,男,硕士研究生,研究方向为生物活性物质的功能与活性;
并列第一作者:李孟雪,女,硕士研究生,研究方向为生物活性物质的功能与活性。
*通信作者:安 磊,女,副教授,博士,主要从事大脑衰老及压力应激干预方面的研究;
王友升,男,教授,博士,主要从事食品生物工程方面的研究。

子、扁桃并称世界四大干果。自古以来,核桃就被认为是健脑益智的佳品。核桃营养价值极为丰富,核桃仁含有大量多聚不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid,PUFAs)、多酚类成分、蛋白质以及多种矿物质等[2-3]。大量动物和人体实验研究表明,核桃可多方面促进大脑健康[4-6]。美国一项为期 10 年的健康和营养调查研究数据显示,食用核桃的消费者患抑郁症的风险显著低于不食用核桃的消费者(降低 26%),也明显低于食用其他坚果的消费者(降低 8%)[7]。最近的一项随机对照实验显示,为期 8 周的核桃饮食干预可明显改善非抑郁健康年轻男性的心境和情绪[8]。但目前,关于核桃潜在改善心境和抗抑郁的功能组分及作用机制尚不清楚。

应激性生活事件可诱发抑郁症已成为不争的事实。当机体感受应激源时,下丘脑–垂体–肾上腺轴(hypothalamic pituitary adrenal axis,HPA)兴奋性提高,肾上腺分泌的应激激素糖皮质类固醇(glucocorticoids,GC,人类为皮质醇,啮齿类动物为皮质酮)升高,从而动员储能,提高心血管张力、糖代谢等。适当应激反应有利于机体渡过短期恶劣环境,但若机体长期处于不良应激状态,HPA 功能持续亢进,继而导致 GC 水平持续升高,造成对大脑,特别是海马等关键脑区神经元的选择性损伤,被认为是抑郁症发生发展的生理生化基础。体外实验发现,皮质酮可导致类神经细胞如大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞(PC12 细胞)出现损伤和凋亡,模拟应激状态的海马神经元损伤,是目前最常用和最公认的压力应激和抑郁症的体外细胞模型[9]。经典的抗抑郁药和植物有效成分在该模型上表现出很好的细胞保护作用[10-12]。

前期研究发现,摄食质量分数为 6% 和 9% 的核桃饲料 8 周,可显著促进 D-半乳糖脑老化模型大鼠海马环磷酸腺苷(cAMP)反应元件结合蛋白(cAMP-responsive element-binding protein, CREB)的磷酸化及其下游靶蛋白脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)的表达,并上调海马齿状回部位神经元再生[13]。CREB 及其靶蛋白 BDNF 是介导神经营养和神经可塑性的关键分子,CREB 中 133 位点丝氨酸(S133)的磷酸化是激活 CREB 转录活性的关键,cAMP 依赖性蛋白激酶 A (cAMP-dependent protein kinase A, PKA)是调控这一过程的主要激酶,并受到上游二级信使 cAMP 的调控。大量研究证实,PKA/CREB/BDNF 信号是调控海马神经元损伤及保护的关键细胞信号通路[14-16]。本研究团队在研究中证实,核桃多酚可显著逆转 H_2O_2 诱导的人神经母细胞瘤(SH-SY5Y)细胞损伤,并上调 PKA/CREB/BDNF 信号通路活性[17]。但是,核桃多酚对皮质酮所致 PC12 细胞损伤是否具有保护作用,其机制是否与 PKA/CREB/BDNF 信号通路的调控作用有关尚未见相关报道。鉴于此,本研究拟采用皮质酮损伤的 PC12 细胞模型,探讨核桃多酚的细胞保护作用及信号通路机制,希望为揭示核桃多酚的潜在抗抑郁活性及机制,并为核桃粕资源的高值化利用提供参考。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞(PC12 细胞),购自美国细胞培养物收藏中心(ATCC® CRL1721.1™)。

RPMI 1640 培养基,美国 Hyclone 公司;马血清,美国 Biological 公司;胎牛血清,以色列 Biological Industries 公司;胰蛋白酶、青霉素–链霉素双抗,美国 Gibco 公司;H89、皮质酮、2′,7′-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)探针、BDNF 一抗,美国 Sigma 公司;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒、钙离子试剂盒、二苯甲亚胺细胞凋亡(Hoechst 33342)染色试剂盒,碧云天生物技术研究所;3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)、牛血清白蛋白五组分,北京 Biotopped 公司;ECL 显影液,北京全品速生物科技有限公司;β-actin 一抗、p-PKA 底物(substrate)一抗、CREB 一抗,美国 Cell Singal Technology 公司;p-CREB(Ser133) 一抗,德国 Merck 公司;碘化丙啶(propidium iodide,PI),北京兰博利德公司;蛋白质定量试剂盒、羊抗兔二抗、羊抗小鼠二抗,北京普利莱基因技术有限公司。

1.2　仪器与设备

Infinite M1000 PRO 型酶标仪,瑞士 Tecan 公司;Mini-PROTEAN Tetra 型垂直电泳槽、Mini-PROTEAN Tetra 型蛋白转印系统、Universal Hood Ⅲ型显影仪,美国 Bio-Rad;170 liters 型 CO_2 培养箱,德国 Galaxy S 公司;Axiovert 200 型倒置显微镜,蔡司光学仪器上海国际贸易有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 核桃多酚的制备方法及成分鉴定

核桃多酚的制备方法参考本课题组前期研究。脱脂核桃粕经粉碎机粉碎后，过 200 目筛备用。按料液比（g∶mL）1∶50 加入体积分数为 75% 的乙醇搅拌浸提，重复 3 次后合并滤液旋蒸浓缩。浓缩液按 1∶1的体积比用乙酸乙酯萃取 3 次，旋干溶剂得到乙酸乙酯提取物。将提取物依次通过 NKA-9 和 HP-20 大孔吸附树脂进行纯化，洗脱液经 45 ℃ 旋蒸浓缩后，冷冻干燥即得核桃多酚。产物通过UPLC-Q-TOF MS/MS 鉴定成分[17]。

1.3.2 细胞培养

采用 RPMI 1640 培养基，配置成含体积分数为 10% 的马血清、5% 的胎牛血清和 1% 的双抗的完全培养液。在 37 ℃、体积分数为 5% 的 CO_2 细胞培养箱中培养 PC12 细胞。3～4 d 传代 1 次，取对数生长期的细胞进行后续实验。

1.3.3 皮质酮损伤 PC12 细胞模型的建立

将 PC12 细胞按照 1×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔板中，每孔 100 μL 孵育过夜。用无血清培养基配置 100、200、300、400 μmol/L 的皮质酮溶液，与 PC12 细胞共孵育 24 h，每组设置 6 个复孔。培养结束每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 10 μL，37 ℃孵育 4 h 后弃去上清液，每孔加入 100 μL DMSO，振荡 10 min 使结晶充分溶解，用酶标仪检测490 nm 处吸光值。相对细胞活力计算方法见式（1）。

$$\text{相对细胞活力}=\frac{OD(\text{实验})-OD(\text{空白})}{OD(\text{对照})-OD(\text{空白})}\times100\%。\tag{1}$$

式（1）中，OD（实验）为处理后细胞孔中溶液的吸光值，OD（对照）为未处理细胞孔中溶液的吸光值，OD（空白）为 PBS 的吸光值。

1.3.4 核桃多酚预孵育条件下的正常培养 PC12 细胞活力的测定

将 PC12 细胞按照 1×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔板中，每孔 100 μL 孵育过夜。用无血清培养基配制质量浓度为 50、75、100、150 μg/mL 的核桃多酚培养液，加入 96 孔板中，对照组加入无血清培养液，每组 6 个复孔，孵育 24 h。孵育结束采用 MTT 法检测细胞活力变化。

1.3.5 核桃多酚预孵育条件下的皮质酮模型 PC12 细胞活力的测定

将 PC12 细胞按照 1×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔板中，每孔 100 μL 孵育过夜。加入 50、75、100、150 μg/mL 的核桃多酚培养液，对照组和模型组加入无血清培养液，孵育 12 h。12 h 后，弃原培养液，模型组和核桃多酚处理组加入 200 μmol/L 皮质酮（根据 **1.3.3** 中实验结果选用 200 μmol/L 的皮质酮建立慢性应激模型），对照组加入无血清培养液，孵育 24 h。孵育结束用 MTT 法测定细胞活力。

1.3.6 PC12 细胞凋亡检测

将 PC12 细胞按照 1×10^5个/mL 接种于 6 孔板中，孵育过夜。加入质量浓度为 75、150 μg/mL 的核桃多酚溶液，对照组和模型组加入无血清培养液，孵育 12 h。弃原培养液，模型组与核桃多酚处理组加入 200 μmol/L 的皮质酮溶液，孵育 24 h。处理结束后用 PBS 洗涤 1 次，并用质量分数为 4% 的多聚甲醛固定 15 min，之后用 PBS 洗涤 5 min，重复 3 次。用 Hoechst 33342 染色液（原液稀释 100 倍）在 37 ℃下孵育 10 min，PBS 洗涤 5 min，重复 3 次，再用 PI（5 μg/mL）溶液染色 5 min，用 PBS 洗涤 5 min，重复 3 次后，在荧光显微镜下观察并拍照。

1.3.7 LDH 释放水平检测

按照 **1.3.6** 中的方法进行实验，细胞培养结束后，每孔取 1 mL 细胞培养液，离心后取上清液按试剂盒说明书操作，通过测定 LDH 在反应体系中生成的丙酮酸的量来表示 LDH 的活性。用酶标仪检测样品在 450 nm 处的吸光值。按式（2）和式（3）计算培养液中 LDH 活性和相对 LDH 活性。

$$\text{LDH 活性}=\frac{OD(\text{实验})-OD(\text{对照})}{OD(\text{标准})-OD(\text{空白})}\times0.2\times1\,000；\tag{2}$$

$$\text{相对 LDH 活性}=\frac{\text{测定组 LDH 活性}}{\text{对照组 LDH 活性}}\times100\%。\tag{3}$$

式（2）中，OD（实验）为处理后细胞孔中溶液的吸光值，OD（对照）为未处理细胞孔中溶液的吸光值，OD（标准）为标准品的吸光值，OD（空白）为 PBS 的吸光值；LDH 活性，U/L。式（3）中，相对 LDH 活性，%。

1.3.8 细胞内钙离子水平检测

将 PC12 细胞按照 1×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔黑边透明底板，孵育过夜。加入 75、150 μg/mL 的核桃多酚培养液，孵育 12 h。12 h 后，加入含有 200 μmol/L 的皮质酮溶液，孵育 24 h。弃去培养液，加入无血清培养液配制的 5 μmol/L探针溶液，37 ℃ 培养 30 min。用 PBS 洗

涤 3 次除去未装载的探针。采用酶标仪进行双波长检测，激发波长为 340 nm 和 380 nm，发射波长为 510 nm。用 340 nm 和 380 nm 两个荧光波长的比值来表示细胞内的钙离子浓度，最后结果用相对于对照组钙离子浓度的比值表示。

1.3.9　PKA/CREB/BDNF 信号通路活性检测

按照 **1.3.6** 中的方法进行实验，细胞培养结束后，采用蛋白免疫印迹法检测细胞内 PKA/CREB/BDNF 活性或表达量。用含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液在冰上裂解细胞，离心收集蛋白，采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。蛋白样品经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离，采用湿转法将蛋白转至 PVDF 膜上，用质量分数 5% 的脱脂奶粉室温封闭 1 h。再分别加入一抗 p-PKA substrate（1∶2 000）、p-CREB（1∶2 000）、CREB（1∶4 000）、BDNF（1∶4 000）、β-actin（1∶4 000），4 ℃摇床孵育过夜。PBST 缓冲液洗涤 10 min，重复 3 次，加入二抗室温孵育 1 h，PBST 缓冲液再洗涤 10 min，重复 3 次。加入 ECL 化学发光液，并采用凝胶成像仪进行曝光检测，通过 Image J 软件进行分析，以 β-actin 为内参计算相对灰度值，用来表示目标蛋白的表达水平。进行 3 次平行实验。

1.3.10　H89 阻断实验

PC12 细胞种板后过夜培养，加入含有 10 μmol/L 的 PKA 抑制剂 H89 的空白培养液预处理 1 h。加入质量浓度为 75、150 μg/mL 的核桃多酚，另设未经 H89 阻断的加药组，孵育 12 h。弃原培养液，加入含 200 μmol/L 的皮质酮培养液，孵育 24 h，通过 MTT 法测定阻断 PKA 后的细胞活力；另加入质量浓度为 100 μg/mL 的核桃多酚，细胞处理方法与 MTT 法相同。采用蛋白免疫印迹法测定阻断 PKA 后的 PKA/CREB/BDNF 信号通路活性。

1.4　数据处理

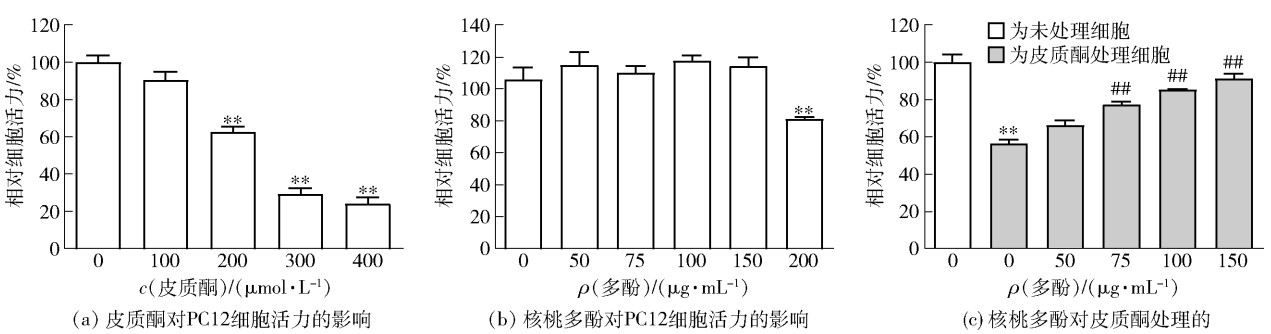
采用 GraphPad Prism 6 软件进行分析，结果以平均值 ± 标准误差（SEM）表示，每个实验结果至少进行 3 次平行实验。多组间比较采用单因素方差分析（one-way ANOVA），组间两两比较采用 Dunnet t 检验，$P < 0.05$ 表示差异显著，$P < 0.01$ 表示差异极显著。

2　结果与分析

2.1　核桃多酚预孵育对皮质酮诱导的 PC12 细胞活力的影响

建立皮质酮诱导的 PC12 细胞损伤模型，模拟压力应激状态时高应激激素水平对大脑神经元损伤状态，实验结果如图 1。由图 1（a）可知，皮质酮作用 24 h 后能够剂量依赖性地诱导 PC12 细胞活力降低。200 μmol/L 皮质酮处理的 PC12 细胞活力下降至对照组的 60% 左右（$P < 0.01$），适宜进行保护作用的评价。因此，确定建立皮质酮损伤细胞模型的条件为 200 μmol/L 皮质酮作用 24 h。

在核桃多酚保护作用实验前，先考察核桃多酚对正常培养的 PC12 细胞的影响。由图 1（b）可见，核桃多酚（50、75、100、150 μg/mL）作用 12 h 对 PC12 细胞活力无明显影响，而较高浓度的核桃多酚（200 μg/mL）显著降低了细胞活力至 80% 左右（$P < 0.01$），提示该浓度对 PC12 细胞存活有害。因此选用 50～150 μg/mL 剂量进行保护作用实验。由图 1（c）可见，与损伤细胞相比，用核桃多酚预处理 12 h，显著提高了皮质酮诱导的 PC12 细胞活力（$P < 0.01$）。核桃多酚质量浓度为 150 μg/mL 时的作用效果最显著（$P < 0.01$）。基于细胞活力的量效



(a) 皮质酮对PC12细胞活力的影响　(b) 核桃多酚对PC12细胞活力的影响　(c) 核桃多酚对皮质酮处理的PC12细胞活力的影响

** 表示与未处理细胞相比，组间数据具有极显著差异（$P < 0.01$）；##表示与仅皮质酮处理细胞相比，组间数据具有极显著差异（$P < 0.01$）。

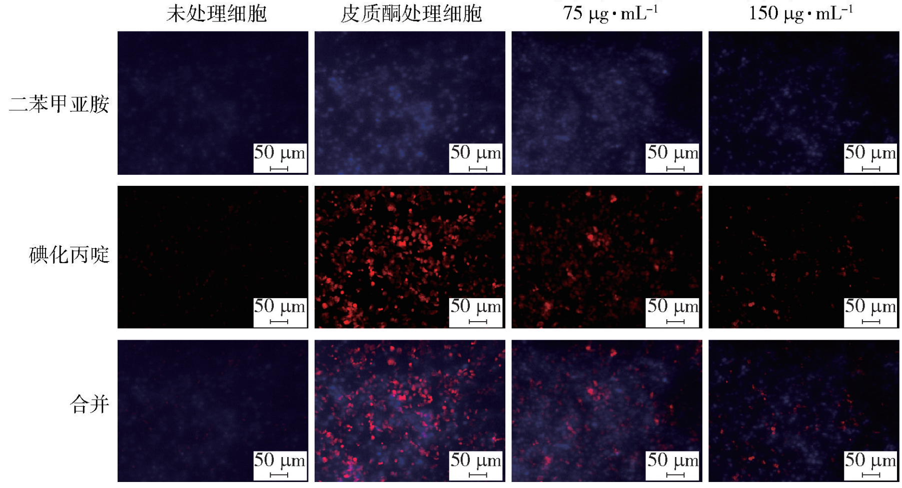
图 1　核桃多酚对皮质酮处理的 PC12 细胞活力的影响

Fig. 1　Effect of walnut polyphenol treatment on viability of corticosterone-treated PC12 cells

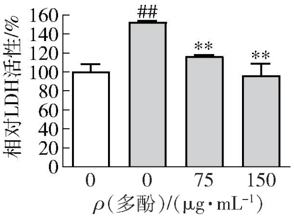
实验结果,后续实验选择代表性有效剂量 75 μg/mL 和 150 μg/mL 开展相关研究。

2.2 核桃多酚预孵育对皮质酮诱导的 PC12 细胞凋亡、LDH 释放及钙离子含量的影响

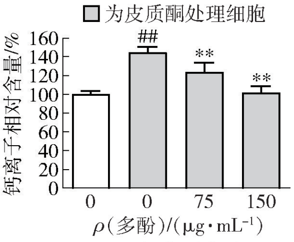
为了进一步评价核桃多酚对皮质酮损伤的 PC12 细胞的保护作用,观察核桃多酚对细胞凋亡、细胞外 LDH 释放量和细胞内钙离子浓度的影响,实验结果见图 2。采用 Hoechst 33342 染色法,通过观察细胞染色质的变化评价细胞凋亡情况。由图 2(a)可知:正常活细胞呈弥散均匀低蓝色荧光,细胞核结构正常;皮质酮处理后,细胞核皱缩、染色质固缩凝聚,呈现出典型的凋亡样形态,发出亮蓝色荧光的凋亡细胞增多,而且晚期凋亡细胞的细胞膜受损,PI 嵌入 DNA 显示浅红色荧光,坏死细胞 DNA 也被 PI 染色,呈现亮红色荧光;75、150 μg/mL 的核桃多酚预处理后细胞核染色质形态正常化,凋亡细胞数量明显降低。LDH 广泛存在于各种细胞中,当细胞膜不再完整或受损时,LDH 就释放到培养基中,因此细胞外 LDH 水平是细胞损伤的重要指标。由图 2(b)可知,皮质酮处理的细胞培养液中,LDH 水平显著升高到对照组的 1.5 倍左右($P<0.01$)。核桃多酚预处理后显著降低了 LDH 的释放。同样的核桃多酚预处理显著降低了由皮质酮导致的细胞内钙离子水平升高[图 2(c)]。这些结果进一步证实了核桃多酚对 PC12 细胞的保护作用。



(a) 核桃多酚预孵育对皮质酮处理的PC12细胞凋亡的影响



(b) LDH释放情况



(c) 钙离子水平

##表示与未处理细胞相比,组间数据具有极显著差异($P<0.01$);** 表示与仅皮质酮处理细胞相比,组间数据具有极显著差异($P<0.01$)。

图 2 核桃多酚预孵育对皮质酮处理的 PC12 细胞凋亡、LDH 释放及钙离子含量的影响

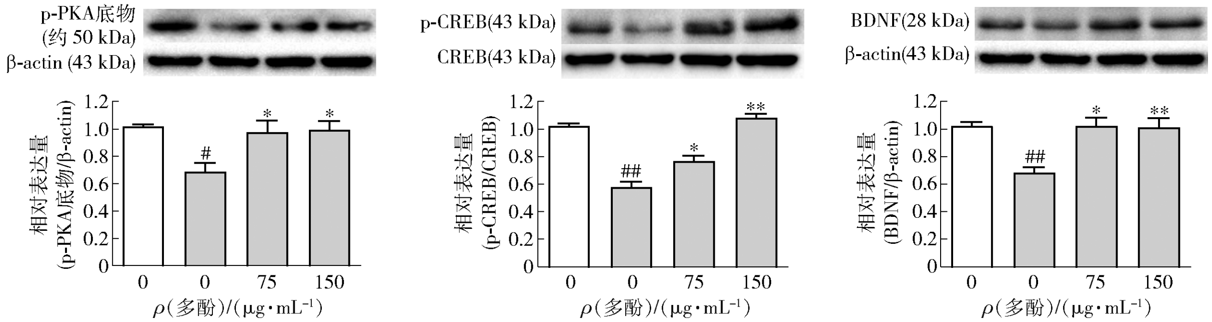
Fig. 2 Effects of walnut polyphenol preincubation on apoptosis, LDH release and calcium ion concentration of corticosterone-treated PC12 cells

2.3 核桃多酚预孵育对皮质酮诱导的 PC12 细胞 PKA/CREB/BDNF 神经营养通路的影响

PKA 是调控 CREB 磷酸化的主要上游激酶,可诱导 CREB 磷酸化而激活 CREB 介导的转录活性。本研究中,应用 PKA 磷酸化底物的抗体来检测 PKA 的活性[18],实验结果见图 3。Western blot 结果[图 3(a)]表明,皮质酮处理显著降低了 PC12 细胞 PKA 磷酸化底物表达,抑制 PKA 的活性($P<0.05$),而核桃多酚(75、150 μg/mL)处理显著上调 PC12 细胞 PKA 活性,并显著增加 CREB Ser133 位点的磷酸化水平[图 3(b)]及其下游蛋白 BDNF 的表达($P<0.01$)[图 3(c)]。这些结果表明,核桃多酚处理显著上调了 PC12 细胞 PKA/CREB/BDNF 神经营养通路,这与前期的研究结果相一致,可能是核桃多酚发挥抗皮质酮损伤的重要机制。

2.4 阻断 PKA 活性对核桃多酚预孵育的皮质酮诱导 PC12 细胞的影响

在确定核桃多酚可显著上调 PKA/CREB/BDNF 信号通路基础上,应用 PKA 特异性抑制剂 H89 (10 μmol/L)预处理 PC12 细胞 1 h,观察核桃多酚对皮质酮诱导的 PC12 细胞活力的影响和阻断效果,实验结果见图 4。图 4(a)显示,单独用 H89 处

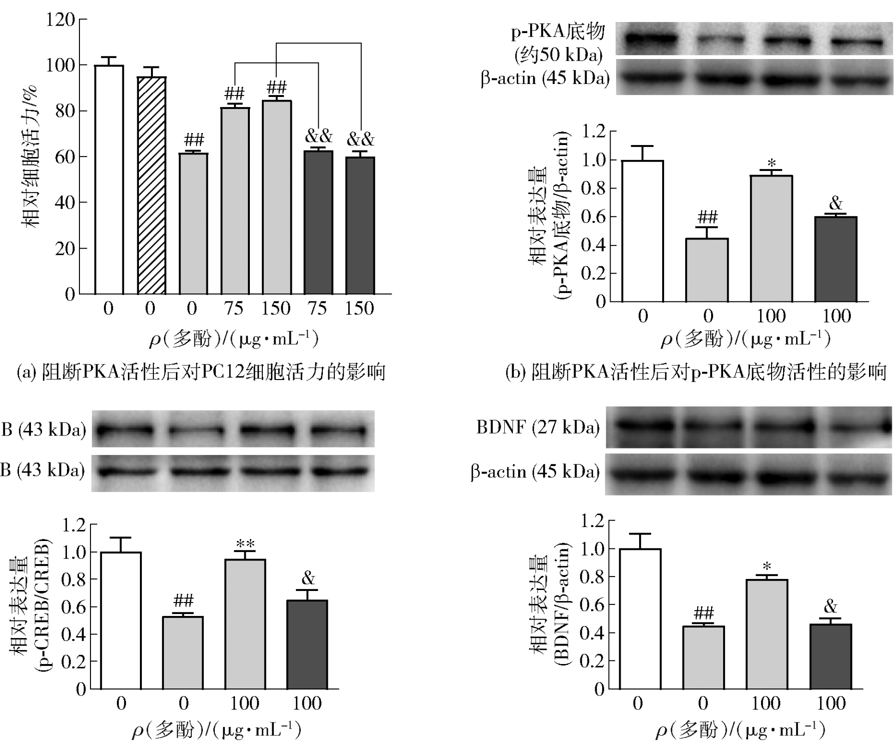


(a) 核桃多酚对p-PKA底物活性的影响　(b) 核桃多酚对p-CREB表达量的影响　(c) 核桃多酚对BDNF表达量的影响

□为未处理细胞,▨为皮质酮处理细胞。#表示与未处理细胞相比,组间数据具有显著差异($P<0.05$),##表示与未处理细胞相比,组间数据具有极显著差异($P<0.01$);*表示与仅皮质酮处理细胞相比,组间数据具有显著差异($P<0.05$),**表示与仅皮质酮处理细胞相比,组间数据具有极显著差异($P<0.01$)。

图 3　核桃多酚对皮质酮处理的 PC12 细胞 PKA/CREB/BDNF 神经营养信号通路的影响

Fig. 3　Effects of walnut polyphenols on PKA/CREB/BDNF neurotrophic signaling pathway in corticosterone-treated PC12 cells



(a) 阻断PKA活性后对PC12细胞活力的影响　(b) 阻断PKA活性后对p-PKA底物活性的影响

(c) 阻断PKA活性后对p-CREB表达量的影响　(d) 阻断PKA活性后对BDNF表达量的影响

□为未处理细胞,▨为皮质酮处理细胞,■为皮质酮与 H89 共处理细胞,▨为仅 H89 处理细胞。##表示与未处理细胞相比,组间数据具有极显著差异($P<0.01$);*表示与仅皮质酮处理细胞相比,组间数据具有显著性差异($P<0.05$),**表示与仅皮质酮处理细胞相比,组间数据具有极显著差异($P<0.01$);&表示与同等剂量多酚处理细胞相比,组间数据具有显著性差异($P<0.05$),&&表示与同等剂量多酚处理细胞相比,组间数据具有极显著差异($P<0.01$)。

图 4　H89 预处理后核桃多酚对皮质酮处理的 PC12 细胞活力和 PKA/CREB/BDNF 信号通路的影响

Fig. 4　Effect of walnut polyphends on cell viability and PKA/CREB/BDNF signal pathway in corticosterone-induced PC12 cells

理不影响 PC12 细胞活力,而用 H89 预处理取消了核桃多酚(75、150 μg/mL)的细胞保护作用。同样,在 H89 作用于 PC12 细胞的情况下,PKA 磷酸化底物、磷酸化 CREB 和 BDNF 表达量上调作用均出现被抑制的现象[图 4(b)、(c)、(d)]。研究结果表明,上调 PKA/CREB/BDNF 通路是核桃多酚改

善皮质酮引发 PC12 细胞损伤作用的关键机制。

3 讨 论

压力应激会引起胞内信号传导及基因表达变化,从而引起特定脑区神经营养障碍,神经可塑性下降。神经营养因子及其信号转导通路失调或改善是抑郁症发生与康复的重要细胞内机制[19]。BDNF 是神经营养因子家族重要成员,是 CREB 的关键下游靶蛋白,BDNF 与其特异性受体酪氨酸激酶受体 B(TrkB)结合后,能够在促进神经元的生长、分化,维持成熟神经元功能和突触可塑性方面发挥重要作用[20]。上调 CREB 活性及其靶蛋白 BDNF 表达水平被认为是抗抑郁剂发挥作用的重要靶标和神经营养机制[21]。

研究表明,膳食多酚的消耗量和抑郁相关症状具有显著的负相关[22]。鞣花单宁(ellagitannins, ETs)和鞣花酸(ellagic acid, EA)是重要的膳食多酚,存在于多种水果、蔬菜和坚果中,研究显示,这些多酚类物质在多种动物模型上表现出良好的抗抑郁活性[23-24],并可显著增加抑郁小鼠海马 BDNF 表达量[25]。核桃中的多酚类化合物主要为鞣花单宁类物质[26],前期研究中我们应用 UPLC/MS 分析本研究中的核桃多酚样品,发现其主要为鞣花单宁或鞣花酸类成分,包括 pedunculagin/casuariin、casuarinin/casuarictin、strictinin/isostrictinin、tellimagrandin I、valoneic acid dilactone、sanguisorbic acid dilactone、glansrin C、glansrin B、praecoxin A/platycariin 和鞣花酸[17],进一步提示核桃多酚及其中的鞣花单宁类成分可能是核桃抗抑郁作用的重要功效组分。

4 结 论

本研究采用皮质酮诱导的 PC12 细胞损伤模型,通过细胞活力、LDH 释放量和钙离子浓度等指标评价核桃多酚的细胞保护作用,并进一步采用蛋白免疫印迹分析与化学阻断方法相结合的方式,探讨核桃多酚细胞保护作用的分子机制。研究结果显示,核桃多酚可显著逆转皮质酮诱导的 PC12 细胞活力降低、细胞凋亡、LDH 释放和钙超载,发挥细胞保护作用,提示核桃多酚具有潜在的抗抑郁活性。进一步的机制研究表明,核桃多酚可显著上调皮质酮损伤 PC12 细胞 PKA/CREB/BDNF 活性或表达,并且这一调控作用是核桃多酚发挥细胞保护作用的关键机制。本研究报道了核桃多酚的潜在抗抑郁活性,但限于体外细胞实验,可进一步采用动物实验评价核桃多酚的抗抑郁活性及神经营养作用。核桃加工的主要产品为核桃油,榨油的同时生成了大量的副产物核桃粕,而核桃多酚是核桃粕中重要的生物活性物质之一。目前核桃粕主要作为饲料或被废弃。对核桃多酚活性及作用机制的研究可望为核桃粕资源高值化利用以及将核桃多酚作为一种抗抑郁功效成分提供理论参考。

参考文献:

[1] MARX W, MOSELEY G, BERK M, et al. Nutritional psychiatry: the present state of the evidence[J]. Proceedings of the Nutrition Society, 2017, 76(4): 427-436.

[2] WANG S, SU G, ZHANG X, et al. Characterization and exploration of potential neuroprotective peptides in walnut (*Juglans regia*) protein hydrolysate against cholinergic system damage and oxidative stress in scopolamine-induced cognitive and memory impairment mice and zebrafish[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(9): 2773-2783.

[3] FENG L, WANG X, PENG F, et al. Walnut protein hydrolysates play a protective role on neurotoxicity induced by D-galactose and aluminum chloride in mice[J]. Molecules, 2018, 23(9): 2-14.

[4] RAJARAM S, VALLS-PEDRET C, COFAN M, et al. The walnuts and healthy aging study (WAHA): protocol for a nutritional intervention trial with walnuts on brain aging[J]. Frontiers in Aging Neuroscience, 2016, 8: 333.

[5] ESSA M M, VIJAYAN R K, CASTELLANO-GONZALEZ G, et al. Neuroprotective effect of natural products against Alzheimer's disease[J]. Neurochemical Research 2012, 37(9): 1829-1842.

[6] WILLIS L M, SHUKITT-HALE B, CHENG V, et al. Dose-dependent effects of walnuts on motor and cognitive function in aged rats[J]. British Journal of Nutrition, 2009, 101(8): 1140-1144.

[7] HOSSEINPOUR-NIAZI S, HOSSEINI S, MIRMIRAN P, et al. Prospective study of nut consumption and incidence of metabolic syndrome: tehran lipid and glucose study [J]. Nutrients, 2017, 9(10): 1056.

[8] PRIBIS P. Effects of walnut consumption on mood in young adults: a randomized controlled trial[J]. Nutrients, 2016, 8(11): 668.

[9] NOH Y, CHEON S, KIM I H, et al. The protective effects of ethanolic extract of clematis terniflora against corticosterone-induced neuronal damage via the AKT and ERK1/2 pathway[J]. BMB Reports, 2018, 51(8): 400-405.

[10] CHEN X, SHEN J, ZHOU Q, et al. Astragaloside VI

ameliorates post-stroke depression via upregulating the NRG-1-mediated MEK/ERK pathway[J]. Pharmaceuticals (Basel), 2022,15(12):1551.

[11] HE X, ZHU Y, WANG M, et al. Antidepressant effects of curcumin and HU-211 coencapsulated solid lipid nanoparticles against corticosterone-induced cellular and animal models of major depression [J]. International Journal of Nanomedicine, 2016,11: 4975-4990.

[12] GAO X, LIU Y, AN Z, et al. Active components and pharmacological effects of cornus officinalis: literature review [J]. Frontiers in Pharmacology, 2021, 12: 633447.

[13] AN L, SUN Y, ZHANG W, et al. Walnut diets up-regulate the decreased hippocampal neurogenesis and age-related cognitive dysfunction in D-galactose induced aged rats[J]. Food & Function, 2018,9(9): 4755-4762.

[14] OIKAWA H, SNG J C. Valproic acid as a microRNA modulator to promote neurite outgrowth[J]. Neural Regeneration Research, 2016,11(10): 1564-1565.

[15] SHIN M S, KIM T W, PARK S S, et al. Long-term surgical and chemical castration deteriorates memory function through downregulation of PKA/CREB/BDNF and c-Raf/MEK/ERK pathways in hippocampus [J]. International Neurourology Journal, 2019, 23 (2): 116-124.

[16] SHIMIZU S, ISHINO Y, TAKEDA T, et al. Antidepressive effects of kamishoyosan through 5-HT1A Receptor and PKA-CREB-BDNF signaling in the hippocampus in postmenopausal depression-model mice [J]. Evidence-based complementary and alternative medicine, 2019,2019(13): 9475384.

[17] AN L, LI M, ZOU C, et al. Walnut polyphenols and the active metabolite urolithin: an improve oxidative damage in SH-SY5Y cells by up-regulating PKA/CREB/BDNF signaling [J]. Food & Function, 2023,14(6):2698-2709.

[18] DIDIER S, SAUVE F, DOMISE M, et al. AMP-activated protein kinase controls immediate early genes expression following synaptic activation through the PKA/CREB pathway[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018,19(12):3716.

[19] DUMAN R S, NAKAGAWA S, MALBERG J. Regulation of adult neurogenesis by antidepressant treatment[J]. Neuropsychopharmacology, 2001,25(6): 836-844.

[20] CASTREN E, MONTEGGIA L M. Brain-derived neurotrophic factor signaling in depression and antidepressant action [J]. Biological Psychiatry, 2021,90(2): 128-136.

[21] BJORKHOLM C, MONTEGGIA L M. BDNF: a key transducer of antidepressant effects[J]. Neuropharmacology, 2016,102: 72-79.

[22] GODOS J, CASTELLANO S, RAY S, et al. Dietary polyphenol intake and depression: results from the mediterranean healthy eating, lifestyle and aging (MEAL) study[J]. Molecules, 2018,23(5):999.

[23] GIRISH C, RAJ V, ARYA J, et al. Evidence for the involvement of the monoaminergic system, but not the opioid system in the antidepressant-like activity of ellagic acid in mice[J]. European Journal of Pharmacology, 2012,682(1-3): 118-125.

[24] DHINGRA D, CHHILLAR R. Antidepressant-like activity of ellagic acid in unstressed and acute immobilization-induced stressed mice [J]. Pharmacological Reports, 2012,64(4): 796-807.

[25] BEDEL H A, KENCEBAY M C, OZBEY G, et al. The antidepressant-like activity of ellagic acid and its effect on hippocampal brain derived neurotrophic factor levels in mouse depression models[J]. Natural Product Research, 2018,32(24): 2932-2935.

[26] REGUEIRO J, SANCHEZ-GONZALEZ C, VALLVERDU-QUERALT A, et al. Comprehensive identification of walnut polyphenols by liquid chromatography coupled to linear ion trap-orbitrap mass spectrometry [J]. Food Chemistry, 2014,152: 340-348.

Mechanism of Walnut Polyphenols on PC12 Cells Injured by Corticosterone

ZOU Cun'en[1,2], LI Mengxue[1,2], WANG Ke[1,2], LI Ming[3], AN Lei[1,*], WANG Yousheng[1,2,*]

(1. *Beijing Advanced Innovation Center for Food Nutrition and Human Health/Key Laboratory of Geriatric Nutrition and Health*, *Beijing Technology and Business University*, *Beijing* 100048, *China*;
2. *Rizhao Huawei Institute of Comprehensive Health Industries*, *Shandong Keepfit Biotech Co Ltd*, *Rizhao* 276801, *China*;
3. *Department of Clinical Nutrition*, *Dingzhou People's Hospital*, *Dingzhou* 073000, *China*)

Abstract: Walnut polyphenols (WP) is an important bioactive substance in defatted walnut and has important development and application value. In order to evaluate the antidepressant effect of WP on

(下转第 122 页)

explore the inhibitory mechanism and structure-activity relationship of flavonoids on α-amylase, the types of inhibition, fluorescence quenching properties, conformational changes, binding force and binding sites of three flavonoids (rutin, quercetin and kaempferol) were investigated in this study. The results showed that kaempferol had the strongest ability to inhibit α-amylase and rutin had the weakest ability to inhibit α-amylase, respectively. The inhibitory effect of flavonoids was attenuated by glycosylation at C3 on the C ring and hydroxylation at C3’ on the B ring. The quenching affinity was enhanced by a glycosyl group at C3 on the C ring and weakened by a hydroxyl group at C3’ on the B ring. Hydrogen bonds and hydrophobic interactions caused the spontaneous binding between the flavonoids and α-amylase, which changed structure and hydrophobic microenvironment of α-amylase, and inhibited α-amylase activity effectively. The purpose of this study was to provide theoretical support for the development and application of hypoglycemic foods rich in flavonoids.

Keywords: flavonoids; α-amylase; structure-activity relationship; inhibition mechanisms; molecular docking

(责任编辑:叶红波)

(上接第 75 页)

corticosterone-induced damage of rat pheochromocytoma (PC12) cells by cell viability, cell apoptosis, leakage of extracellular lactate dehydrogenase, and intracellular calcium level, and investigated its mechanisms by western blotting. The results showed that WP (75, 150 μg/mL) pretreatment could protect cell by significantly reversing the cell viability decrease, cell apoptosis, LDH release increase, and overload of intracellular calcium in PC12 cells treated with corticosterone. In addition, WP significantly increased the activity of cAMP-dependent protein kinase A (PKA), reduced the level of Ser133 phosphorylation of cAMP response element binding protein (CREB) and the expression of downstream target protein brain-derived neurotrophic factor (BDNF), which were decreased by corticosterone treatment. Furthermore, pretreatment with PKA inhibitor H89 abolished the protective effects of WP on corticosterone induced PC12 cells, indicating that up-regulation of PKA/CREB/BDNF neurotrophic signaling pathway was required for WP neuroprotective effects against corticosterone. These results suggested that WP might have potential antidepressant activity and be an important material basis in the antidepressant effect of walnut diet. The cytoprotective effect of WP on PC12 cells was related to the up-regulation of PKA/CREB/BDNF neurotrophic signaling pathway. The research results aimed to explore the potential antidepressant activity and mechanism of walnut polyphenols, and provided theoretical reference for the high-value utilization of walnut meal.

Keywords: walnut polyphenols; corticosterone; PC12 cells; mental stress; neurotrophic pathway

(责任编辑:叶红波 郝一铭)