

罗汉果苷 V 对多巴胺能神经元炎症损伤的保护作用

蒋德旗*, 梁瑞兰, 刘珂, 梁焕葵, 陈锦璐, 陈泓睿, 蒋丽林

玉林师范学院生物与制药学院 广西农产资源化学与生物技术重点实验室, 玉林 537000

摘要: 研究罗汉果苷 V (mogroside V, Mog V) 对小胶质细胞激活所致多巴胺能神经元炎症损伤的保护作用及相关机制。多巴胺能神经元 MN9D 细胞与小胶质细胞 BV-2 在 Transwell 共培养, 添加脂多糖激活小胶质细胞建立体外炎症损伤模型。将 MN9D 细胞分为对照组、模型组、Mog V 组, 其中 Mog V 组细胞在模型组基础上, 添加 50 $\mu\text{mol/L}$ Mog V 作用 48 h。流式细胞术检测细胞凋亡和细胞周期分布, JC-1 法检测线粒体膜电位变化, 酯化钙黄绿素与氯化钴共孵育法分析线粒体膜通透性转运孔的开放情况, 利用荧光探针 DCFH-DA 分析细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平, Western blot 检测蛋白表达情况。结果显示, 与对照组比较, 炎症损伤使模型组多巴胺能神经元 MN9D 细胞的凋亡率明显升高, S 期细胞比例明显降低, 线粒体膜电位明显下降, 线粒体膜通透性转运孔开放和 ROS 生成增多, SIRT3、超氧化物歧化酶 2 (superoxide dismutase 2, SOD₂) 及 Bcl-2 蛋白表达明显减少, Bax、Caspase-3 蛋白表达显著增加, 组间比较差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$); 与模型组比较, Mog V 处理则使 Mog V 组多巴胺能神经元的凋亡率降低, S 期细胞比例增加, 线粒体膜电位上升, 线粒体膜通透性转运孔开放和 ROS 生成减少, SIRT3、SOD₂ 及 Bcl-2 蛋白表达显著增多, Bax、Caspase-3 蛋白表达明显减少, 组间比较差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。以上结果表明, Mog V 能够抑制小胶质细胞激活所致多巴胺能神经元的细胞凋亡和周期阻滞, 对炎症损伤具有一定的缓解作用, 机制可能与其促进 SIRT3 表达改善线粒体功能有关。

关键词: 罗汉果苷 V; 多巴胺能神经元; 炎症; SIRT3; 活性氧

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2024)11-1931-08

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.11.013

Protective effect of mogroside V on inflammatory damage of dopaminergic neurons

JIANG De-qi*, LIANG Rui-lan, LIU Ke, LIANG Huan-kui, CHEN Jin-lu, CHEN Hong-rui, JIANG Li-lin

Guangxi Key Laboratory of Agricultural Resources Chemistry and Biotechnology, College of Biology and Pharmacy of Yulin Normal University, Yulin 537000, China

Abstract: This study aims to investigate the protective effects of mogroside V (Mog V) in dopaminergic neurons against the inflammatory damage caused by microglia activation and its related mechanism. Dopaminergic neurons (MN9D cells) and microglia (BV-2 cells) were co-cultured in Transwell plate, and lipopolysaccharide was added to activate microglia to establish an inflammatory model *in vitro*. MN9D cells were divided into the control group, model group and Mog V group. MN9D cells in the Mog V group were treated with 50 $\mu\text{mol/L}$ Mog V for 48 h based on the model group. Flow cytometry was used to test cell apoptosis rate and cell cycle distribution, JC-1 method was used to detect the changes in mitochondrial membrane potential, and the opening of mitochondrial permeability transition pores (mPTP) was analyzed by co-incubation of calcein-AM and CoCl₂. Fluorescent probe DCFH-DA was used to analyze the intracellular reactive oxygen species (ROS) levels and Western blot was used to test protein levels. The results showed that, compared with those of control group, inflammatory injury significantly increased the cell apoptosis rate, reduced the proportion of S-phase cells and mitochondrial membrane potential, increased the mPTP opening and ROS generation, decreased the protein expression of SIRT3, superoxide dismutase 2 (SOD₂) and Bcl-2, and significantly increased the protein expression of Bax and Caspase-3 of dopaminergic neuron MN9D cells in the

model group, and the differences between the two groups were statistically significant (all $P < 0.05$). Compared with the model group, Mog V treatment decreased the apoptosis rate of dopaminergic neurons, increased the proportion of S-phase cells and mitochondrial membrane potential, reduced the mPTP opening and ROS production, significantly increased the protein levels of SIRT3, SOD₂ and Bcl-2, and significantly decreased the protein levels of Bax and Caspase-3 of MN9D cells in the Mog V group, and the differences between the two groups were statistically significant (all $P < 0.05$). The above results indicate that Mog V can inhibit the apoptosis and cell cycle arrest of dopaminergic neurons induced by microglia activation, and alleviate the neuroinflammatory injury to some extent. The mechanism may be related to its promotion of SIRT3 protein expression and improvement of mitochondrial function.

Key words: mogroside V; dopaminergic neuron; inflammation; sirtuin 3; reactive oxygen species

帕金森病的发病率仅次于阿尔茨海默病,为第二大神经退行性疾病。中脑多巴胺能神经元丢失为其主要病理特征,帕金森病发病机制复杂,其中胶质细胞过度活化诱发的氧化应激与炎症损伤是导致神经元死亡的重要因素之一^[1]。目前,探索促进多巴胺能神经元生存的有效成分和相应靶点已成为该领域研究热点。药食两用植物罗汉果广泛种植于广西等地区,被广泛用于药膳和中药材,其有效成分罗汉果昔 V (mogroside V, Mog V) 为从罗汉果果实提取物分离出来的一种三萜糖苷,通常用作天然甜味剂。现代药理学研究表明 Mog V 具有抗氧化应激、抗炎、抗糖尿病等多种功能活性^[2,3]。研究发现 Mog V 还具有一定的神经保护作用,如 Mog V 对皮质酮诱导的 PC12 神经细胞损伤具有保护作用,还能显著降低海马神经细胞的氧化应激损伤和凋亡水平,此外, Mog V 预处理可缓解抑郁症状,并显著降低炎症因子水平^[4]; Mog V 显著抑制脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的小胶质细胞中促炎症因子的产生,对 LPS 引发的神经毒性起到保护作用^[5]。本研究 Mog V 对小胶质细胞激活所致多巴胺能神经元炎症损伤的保护作用及相关机制,以期对帕金森病治疗药物研制和罗汉果活性成分在功能性食品开发中的应用提供更多理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

罗汉果昔 V (上海阿拉丁生化科技公司,纯度 $\geq 98\%$,批号:M426693);氯化钴 (CoCl₂) (美国 Sigma 公司,纯度 97%,批号:232696);脂多糖 (美国 Sigma 公司,纯度 $\geq 99\%$,批号:SMB00704);DMEM 培养基 (美国 Gibco 公司,批号:8121043);胎牛血清 (美国 Gibco 公司,批号:678506);酯化钙黄绿素 (calcein-AM) (美国 Santa Cruz Biotechnology 公司,批号:sc-203865);Transwell 细胞培养插件 (美国 Corning 公司);SIRT3、超氧化物歧化酶 2 (superoxide dismutase

2, SOD₂) 抗体 (英国 Abcam 公司,批号分别为: ab189860、ab68155);Bax (批号:AG1208)、Bcl-2 (批号:AF6285)、Caspase-3 (批号:AF0081)、GAPDH 抗体 (批号:AF1186) 和相关二抗、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (批号:C1062L)、JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒 (批号:C2006) (上海碧云天生物技术公司);BCA 蛋白含量检测试剂盒 (批号:KGB2101-500)、细胞周期检测试剂盒 (批号:KGA9101-100)、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒 (批号:KGA7308-100)、蛋白 Marker (批号:KGB3105) (江苏凯基生物公司);小鼠小胶质细胞 BV-2 细胞 (国家模式与特色实验细胞资源库);小鼠中脑多巴胺能神经元 MN9D 细胞 (广州吉妮欧生物科技有限公司)。

1.2 仪器

Hera cell 150 CO₂ 恒温培养箱 (美国 Heraeus 公司);Centrifuge 5424 R 高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司);蛋白电泳仪与转膜仪 (美国 Bio-Rad 公司);IX 71 荧光显微镜 (日本 Olympus 公司);JW-CJ-1F 超净工作台 (苏州净化设备厂);FACSCalibur 流式细胞仪 (美国 BD 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

小鼠 MN9D 细胞在添加 10% 胎牛血清 (foetal bovine serum, FBS) 和 1% 双抗的高糖 DMEM 培养基中,并在 37 °C、5% CO₂、100% 饱和湿度的培养箱中培养,每 2 d 更换 1 次细胞培养基。BV-2 细胞也使用含 10% FBS 的 DMEM 培养基,培养方法与 MN9D 细胞相同。

1.3.2 炎症损伤细胞共培养模型建立

将处理后的 MN9D 细胞接种于六孔板,位于 Transwell 共培养体系下层, BV-2 细胞置于该体系上层培养,并添加浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS 刺激。两种细胞被 0.4 μm 聚碳酸酯滤膜物理分隔,但 LPS 活化

的小胶质细胞释放的炎症因子可通过膜孔对下层的多巴胺能神经元造成一定的损伤。

1.3.3 试验分组

根据 MN9D 细胞处理情况分为对照组 (control, Con)、模型组 (model, Mod)、Mog V 组 (Mog V)。其中对照组为 MN9D 细胞与 BV-2 细胞共培养 48 h; 模型组为 MN9D 细胞与 BV-2 细胞共培养, 并添加 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 处理 48 h; Mog V 组为 MN9D 细胞与 BV-2 细胞共培养, 同时添加 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 和 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ Mog V 处理 48 h。

1.3.4 流式细胞术检测细胞凋亡率

取对数增殖期的 MN9D 细胞, 以 5×10^4 个/孔的密度接种于 24 孔板中, 细胞分组和处理同上。胰酶消化收集细胞, 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 清洗 2 次。参照 Annexin V-FITC/碘化丙啶细胞凋亡试剂盒说明书依次加入 Annexin V-FITC 和碘化丙啶, 室温避光孵育 15 min, 冰浴避光放置, 置流式细胞仪上检测 3 组细胞凋亡率。

1.3.5 流式细胞术检测细胞周期分布

各组细胞处理后, 胰酶消化离心收集细胞沉淀, 用 100 μL 预冷的 PBS 重悬细胞, 加 1 mL 预冷的 70% 乙醇, 轻轻混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜, 收集细胞沉淀, 再加入 0.5 mL 浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的碘化丙啶染色工作液, 轻轻混匀, 室温避光孵育 30 min, 随后冰浴避光放置待检, 流式细胞仪上机检测。

1.3.6 JC-1 法检测线粒体膜电位

各组细胞处理后, 收集细胞铺 12 孔板继续培养 6 h, 根据试剂盒说明书每孔添加 200 μL 终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 JC-1 工作液, 放于细胞培养箱中 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 20 min, 染色后用 PBS 漂洗, 使用荧光显微镜观察, 分析红绿荧光强度。JC-1 红/绿荧光强度比值越小, 线粒体去极化程度越大, 线粒体膜电位降低。

1.3.7 酯化钙黄绿素与氯化钴共孵育法分析线粒体膜通透性转运孔的开放程度

各组细胞处理后, 收集细胞铺 12 孔板继续培养 6 h, 线粒体 MitoTracker Red 染色液用无血清培养基稀释为终浓度 250 nmol/L, 每孔添加 300 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 45 min; 孵育完成后用 PBS 漂洗, 每孔再添加用无血清培养基稀释好的 calcein-AM 染色液, CoCl_2 和 calcein-AM 工作浓度均为 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 轻轻混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 15 min; 孵育完成后用 PBS 漂洗, 使用荧光显微镜观察, 分析绿色荧光强度。绿色

荧光强度越大, 线粒体膜通透性转运孔开放数量越少, 细胞生存状态越好。

1.3.8 细胞内 ROS 水平分析

各组细胞处理后, 弃上清保留贴壁细胞, DCFH-DA 使用无血清培养液稀释, 每孔加入 1 mL 终浓度为 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 DCFH-DA, 放于细胞培养箱中 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 30 min, 用无血清细胞培养液洗涤细胞 3 次后, 收集细胞, 荧光强度使用多功能酶标仪分析。

1.3.9 Western blot 检测蛋白表达情况

分别提取各组细胞总蛋白, 采用 BCA 试剂盒进行蛋白定量后行蛋白电泳, 电泳结束后采用湿转法将目的蛋白转移到聚偏二氟乙烯膜上, 放入 5% 脱脂奶粉的封闭液中室温封闭 2 h, 封闭结束后洗膜缓冲液 (tris-buffered saline tween, TBST) 洗 3 次。根据目的蛋白分子量大小裁膜, 分别加入封闭液稀释的 SIRT3、SOD₂、Bax、Bcl-2、Caspase-3 抗体和内参 GAPDH 抗体, 稀释比例均为 1:1000, 冰箱 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜, 次日 TBST 洗 3 次, 室温添加相应二抗孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次, 膜放于电化学发光液中反应, 用 X 胶片在暗室中感光、显影、定影。采用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析蛋白条带灰度值, 目的蛋白的表达水平以目的蛋白条带灰度值与内参 GAPDH 条带灰度值的比值表示。

1.4 统计处理

统计分析使用 SPSS 20.0 版软件, 作图采用 GraphPad Prism 6 软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 3 组比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 Mog V 对炎症损伤神经细胞凋亡的影响

如图 1 所示, 模型组中 MN9D 神经细胞在炎症损伤的作用下, 其凋亡率明显高于对照组 ($P < 0.05$); 经 Mog V 处理后, Mog V 组多巴胺能神经元的细胞凋亡率则显著低于模型组 ($P < 0.05$)。以上结果说明, 小胶质细胞过度激活诱导的炎症损伤促进 MN9D 细胞凋亡, 这与课题组前期研究结果一致^[6], Mog V 处理可抑制这一过程, 减轻神经元损伤。

2.2 Mog V 对炎症损伤神经细胞周期的影响

细胞周期检测结果如图 2 所示, 与对照组比较, 炎症损伤模型组多巴胺能神经元 G1 期细胞比例明

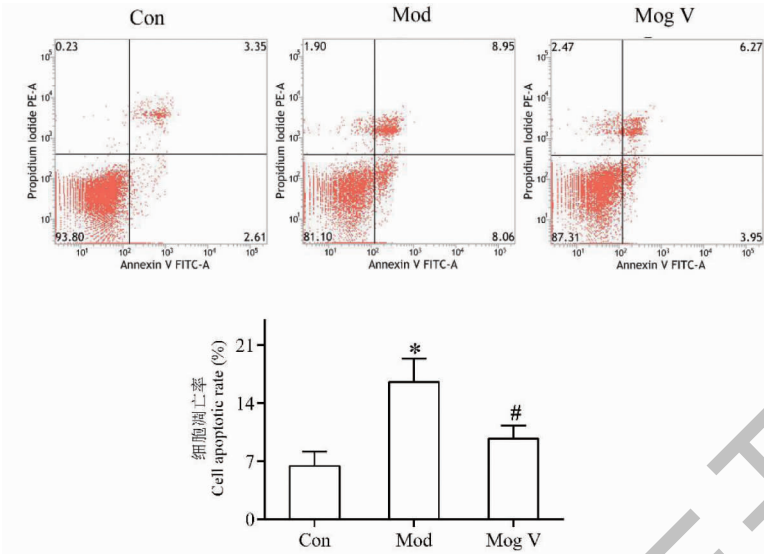


图1 Mog V 对炎症损伤 MN9D 神经细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of Mog V on cell apoptosis rate in inflammation-injured MN9D neurons ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,与模型组比较,# $P < 0.05$,下同。Note:Compared with Con,* $P < 0.05$;Compared with Mod,# $P < 0.05$,the same below.

显增大,S 期细胞比例明显减小(均 $P < 0.05$),G2 期细胞比例组间比较差异不显著($P > 0.05$);与模型组比较,Mog V 组多巴胺能神经元 G1 期细胞比例则明显变小,S、G2 期细胞比例则明显变大(均 $P <$

0.05)。以上结果表明,小胶质细胞激活诱导共培养 MN9D 细胞的周期阻滞于 G1 期,抑制细胞增殖,添加 Mog V 处理后,S、G2 期细胞数量增多,促进细胞周期进程。

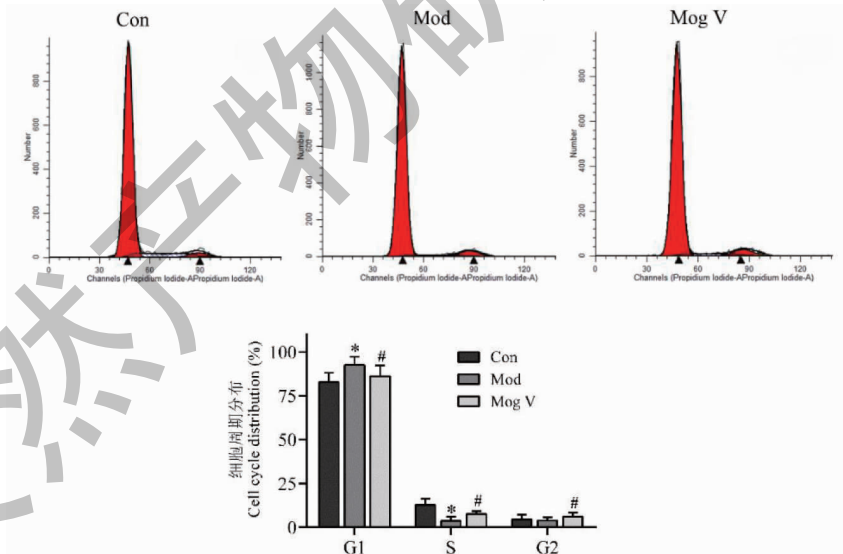


图2 Mog V 对炎症损伤 MN9D 细胞周期分布的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of Mog V on cell cycle distribution of MN9D cells damaged by inflammation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.3 Mog V 对炎症损伤神经细胞凋亡相关蛋白表达的影响

为研究 Mog V 神经保护作用机制,对线粒体凋亡信号通路的关键蛋白表达情况进行分析。结果如图 3 所示,与对照组比较,炎症损伤使模型组多巴胺

能神经元 MN9D 细胞的 Bax 及 Caspase-3 蛋白表达显著增多、Bcl-2 蛋白表达明显减少,差异比较均具有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,Mog V 处理使 Mog V 组 MN9D 细胞的 Bax 及 Caspase-3 蛋白水平明显降低、Bcl-2 蛋白水平显著升高,差异比较

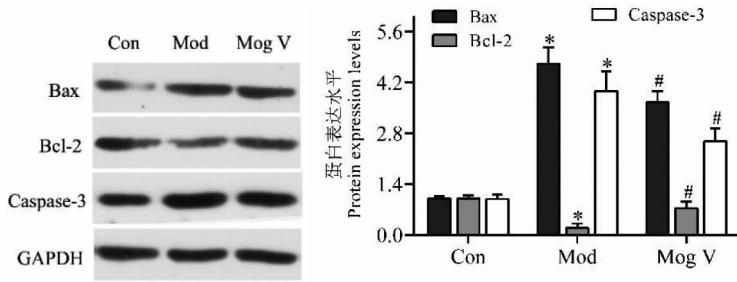


图3 Mog V 对炎症损伤 MN9D 细胞凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of Mog V on apoptosis-associated proteins level in inflammatory MN9D cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.4 Mog V 对炎症损伤神经细胞线粒体膜电位的影响

线粒体膜电位与细胞凋亡关系密切,膜电位下降促进细胞凋亡。如图 4 所示,炎症损伤使模型组多巴胺能神经元 MN9D 细胞的 JC-1 红/绿荧光强度

比值明显小于对照组 ($P < 0.05$),提示线粒体膜电位下降;Mog V 处理使 Mog V 组多巴胺能神经元的 JC-1 红/绿荧光强度比值明显大于模型组 ($P < 0.05$),提示线粒体膜电位获得一定程度提升。以上结果说明,Mog V 减少细胞凋亡与其提高线粒体膜电位有关。

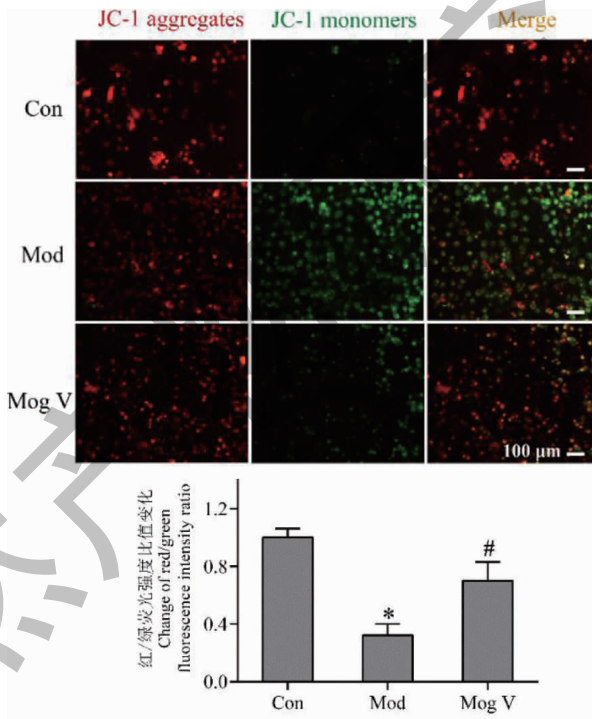


图4 Mog V 对炎症损伤 MN9D 神经细胞线粒体膜电位的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of Mog V on mitochondrial membrane potential in inflammation-injured MN9D neurons ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.5 Mog V 对炎症损伤神经细胞线粒体膜通透性转运孔开放的影响

线粒体膜通透性转运孔在细胞生存和凋亡中扮演重要角色,为进一步探究 Mog V 的线粒体改善功能,对线粒体膜通透性转运孔开放情况进行检测,转运孔开放越多,细胞凋亡越严重。如图 5 所示,模型

组中 MN9D 细胞在炎症损伤的作用下,绿色荧光强度明显弱于对照组细胞 ($P < 0.05$),提示线粒体膜通透性转运孔开放数量增多;Mog V 组中 MN9D 细胞经 Mog V 处理后的绿色荧光强度明显强于模型组细胞 ($P < 0.05$),提示线粒体膜通透性转运孔开放数量则明显减少。

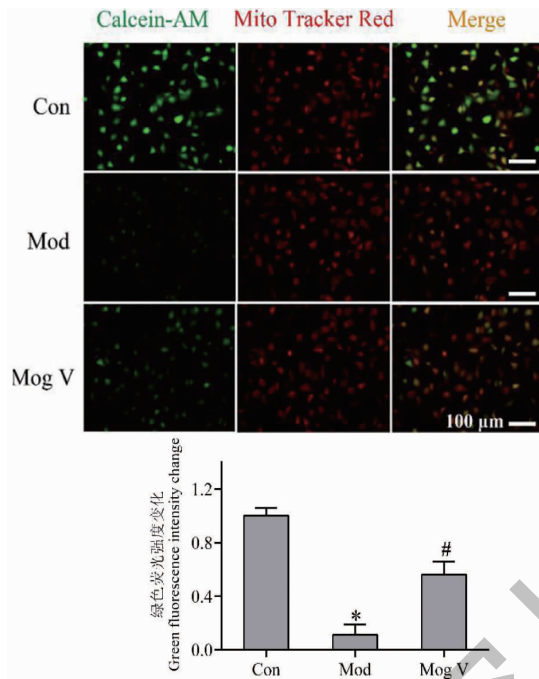


图5 Mog V 对炎症损伤 MN9D 神经细胞线粒体膜通透性转运孔开放的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Effect of Mog V on the mitochondrial membrane permeability transition pore opening in inflammatory MN9D neurons ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.6 Mog V 对炎症损伤神经细胞 SIRT3 表达及 ROS 生成的影响

如图 6、图 7 所示,与对照组比较,模型组中 MN9D 细胞在炎症损伤的作用下,SIRT3 与 SOD₂ 蛋白表达明显减少、ROS 生成明显增多(均 $P <$

0.05);与模型组比较,Mog V 处理则使 Mog V 组 MN9D 细胞的 SIRT3 与 SOD₂ 蛋白表达显著增加、ROS 生成显著减少(均 $P <$ 0.05)。以上结果表明,Mog V 的神经保护作用可能与其调节 SIRT3-SOD₂-ROS 通路有关。

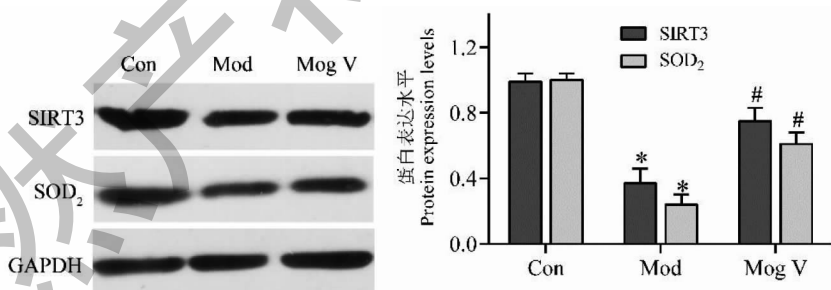


图6 Mog V 对炎症损伤 MN9D 细胞 SIRT3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 Effect of Mog V on SIRT3 protein level in inflammation-damaged MN9D cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3 讨论与结论

本研究发现 Mog V 可减少小胶质细胞活化诱发的神经元凋亡和细胞周期阻滞,改善炎症条件下的多巴胺能神经元生存状态。文献报道,Mog V 及其代谢物 11-oxo-mogrol 预处理可通过促进神经突起生长、抑制细胞凋亡和 Ca²⁺ 释放的机制防止非竞争性 N-甲基-D-天门冬氨酸受体拮抗剂诱导的神经

元损伤^[7]。Mog V 可减轻鱼藤酮诱导的神经毒性,抑制帕金森病动物模型大脑黑质部位的多巴胺能神经元死亡^[8]。Mog V 还可促进糖尿病大鼠下颌骨成骨细胞的增殖^[9]。给予 Mog V 预处理小鼠胰岛 β 细胞株 MIN6 细胞后,过氧化氢诱导的细胞增殖抑制和细胞凋亡增加均得到明显的逆转^[10],以上结果为本研究结论提供支持。

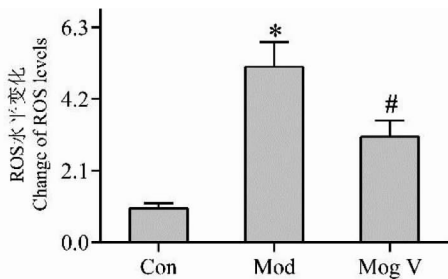


图7 Mog V 对炎症损伤 MN9D 细胞 ROS 生成的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 7 Effect of Mog V on ROS generation in inflammation-damaged MN9D cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

线粒体功能障碍是导致细胞凋亡的主要原因。研究表明, Mog V 可改善 H9c2 心肌细胞氧糖剥夺损伤的线粒体能量代谢, 抑制线粒体膜电位丧失, 抑制线粒体膜通透性转运孔的开放, 促进线粒体生物合成, 抑制其分裂, 促进线粒体自噬及融合, 维持其结构和功能稳定^[11]。Mog V 处理可减少 LPS 诱导的猪卵母细胞线粒体功能障碍和早期凋亡^[12]。补充 Mog V 消除过氧化氢处理的卵母细胞线粒体功能异常导致的膜电位下降, 从而抑制细胞凋亡^[13]。本研究发现 Mog V 对多巴胺能神经元具有一定的线粒体保护作用, Mog V 可逆转小胶质细胞激活导致的线粒体膜电位下降、线粒体膜通透性转运孔开放增加。研究指出, Mog V 预处理胰岛 β 细胞株 MIN6 细胞, 可恢复过氧化氢下调的 Bcl-2 蛋白表达^[10]。本研究发现 Mog V 抑制凋亡的机制也与其上调 Bcl-2 蛋白表达有关, 此外, 还发现 Mog V 可通过下调 Bax 和 Caspase-3 蛋白表达抵抗神经炎症。

SIRT3 为线粒体蛋白, 可通过减轻氧化应激与炎症损伤、改善线粒体功能等在神经细胞损伤中发挥重要的抵抗作用^[14], 已成为多种天然产物活性成分发挥作用的靶点^[15,16]。SIRT3 对帕金森病多巴胺能神经元损伤具有一定的保护作用^[17], 课题组前期研究也发现 SIRT3 过表达可缓解胶质细胞激活诱发的多巴胺能神经元炎症损伤^[18], 故寻找药物分子调控其表达对于多巴胺能神经元介导的神经疾病治疗将具有重要的意义, 如淫羊藿苷通过上调 SIRT3 表达抵抗鱼藤酮诱导的多巴胺能神经元丢失^[19]。SOD₂ 为 SIRT3 下游靶标基因, 可被其调节激活, 进而降低 ROS 水平^[20]。研究指出 Mog V 可降低 PM2.5 诱导的猪肺泡巨噬细胞内 ROS 水平^[21], 还可降低过氧化氢处理的小鼠皮肤成纤维细胞中

ROS 水平, 同时伴有 SOD₂ 和过氧化氢酶活性的升高^[22]。多项研究证实 Mog V 可上调 SIRT3 同家族成员 SIRT1 的表达, 两者在抗氧化应激和炎症损伤方面具有很多相似之处。如 Mog V 通过上调心肌细胞 SIRT1 表达改善线粒体功能, 减轻心肌缺血再灌注损伤^[11]; 补充 Mog V 可增加卵母细胞氧化应激相关基因 SIRT1 和 SOD₂ 的 mRNA 表达, 降低胞内 ROS 水平并增强线粒体功能, 进而促进卵母细胞体外成熟^[23]。本研究结果显示, Mog V 可上调多巴胺能神经元 SIRT3、SOD₂ 蛋白表达, 从而减少胶质细胞活化诱发的 ROS 生成, Mog V 抵抗神经炎症所致神经元凋亡的作用机制可能与 SIRT3 上调改善线粒体功能有关, 但详细分子机制有待更进一步研究阐明。此外, 课题组前期研究已发现 LPS 单独作用于多巴胺能神经元 MN9D 细胞, 可使 MN9D 细胞凋亡增多、线粒体膜电位下降、SIRT3、SOD₂ 及 Bcl-2 蛋白表达减少, 表现出一定的神经元炎症损伤作用^[6], 故本研究试验没有设置 LPS 单独作用 MN9D 细胞组。

综上所述, Mog V 能够抑制小胶质细胞激活所致多巴胺能神经元的细胞凋亡和周期阻滞, S/G2 期细胞比例增加, 对神经炎症损伤具有一定的缓解作用, 作用机制可能与其恢复线粒体膜电位、促进 SIRT3/SOD₂ 蛋白表达、减少线粒体膜通透性转运孔开放和 ROS 生成有关。这些发现可为帕金森病的药物治疗提供新的思路, 同时也为 Mog V 的进一步开发利用提供参考。

参考文献

- 1 Kalyanaraman B, Cheng G, Hardy M. Gut microbiome, short-chain fatty acids, alpha-synuclein, neuroinflammation, and ROS/RNS: Relevance to Parkinson's disease and therapeutic implications [J]. Redox Biol, 2024, 71: 103092.
- 2 Han M, Liu H, Liu G, et al. Mogroside V alleviates inflammation response by modulating miR-21-5P/SPRY1 axis [J]. Food Funct, 2024, 15: 1909-1922.
- 3 Li Y, Zou L, Li T, et al. Mogroside V inhibits LPS-induced COX-2 expression/ROS production and overexpression of HO-1 by blocking phosphorylation of AKT1 in RAW264.7 cells [J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2019, 51: 365-374.
- 4 Liu H, Du Y, Liu LL, et al. Anti-depression-like effect of mogroside V is related to the inhibition of inflammatory and oxidative stress pathways [J]. Eur J Pharmacol, 2023, 955: 175828.

- 5 Liu Y, Zhang B, Liu J, et al. Mogroside V alleviates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation via inhibition of TLR4-MyD88 and activation of AKT/AMPK-Nrf2 signaling pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021 : 5521519.
- 6 Jiang DQ, Ma YJ, Wang Y, et al. Microglia activation induces oxidative injury and decreases SIRT3 expression in dopaminergic neuronal cells [J]. *J Neural Transm (Vienna)*, 2019, 126 : 559-568.
- 7 Ju P, Ding W, Chen J, et al. The protective effects of mogroside V and its metabolite 11-oxo-mogrol of intestinal microbiota against MK801-induced neuronal damages [J]. *Psychopharmacology*, 2020, 237 : 1011-1026.
- 8 Luo H, Peng C, Xu X, et al. The protective effects of mogroside V against neuronal damages by attenuating mitochondrial dysfunction via upregulating Sirtuin3 [J]. *Mol Neurobiol*, 2022, 59 : 2068-2084.
- 9 Luo YC, Zhong XX, Li H. Effect of mogroside V on the proliferation and differentiation of osteoblasts under the diabetic condition through Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Chin J Hosp Pharm (中国医院药学杂志)*, 2022, 42 : 781-785.
- 10 Han MJ, Wang J, Liu GX, et al. Mogroside V inhibits H₂O₂-induced oxidative damage in MIN6 cells by PI3K/AKT pathway [J]. *Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报)*, 2022, 38 : 1363-1368.
- 11 Li H. Mechanism of mogroside V in alleviating myocardial ischemia-reperfusion injury by regulating mitochondrial quality control by up-regulating Sirt1 [D]. Liaoning: China Medical University (中国医科大学), 2023.
- 12 Yan K, Cui K, Nie J, et al. Mogroside V protects porcine oocytes from lipopolysaccharide-induced meiotic defects [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9 : 639691.
- 13 Pan C, Chen J, Chen Y, et al. Mogroside V ameliorates the oxidative stress-induced meiotic defects in porcine oocytes *in vitro* [J]. *Reprod Toxicol*, 2022, 111 : 148-157.
- 14 Hao K, Chen F, Xu S, et al. The role of SIRT3 in mediating the cognitive deficits and neuroinflammatory changes associated with a developmental animal model of schizophrenia [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2024, 130 : 110914.
- 15 Lambona C, Zwergel C, Valente S, et al. SIRT3 activation a promise in drug development? New insights into SIRT3 biology and its implications on the drug discovery process [J]. *J Med Chem*, 2024, 67 : 1662-1689.
- 16 Yuan L, Ji JH, Li MY. Effect of luteolin on Th17/Treg immune balance in mice with ulcerative colitis by regulating SIRT3/AMPK/mTOR signaling pathway [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2023, 35 : 1144-1153.
- 17 Shen Y, Wu Q, Shi JS, et al. Regulation of SIRT3 on mitochondrial functions and oxidative stress in Parkinson's disease [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 132 : 110928.
- 18 Jiang DQ, Zang QM, Jiang LL, et al. SIRT3 expression alleviates microglia activation-induced dopaminergic neuron injury through the mitochondrial pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2022, 24 : 662.
- 19 Zeng R, Wang X, Zhou Q, et al. Icariin protects rotenone-induced neurotoxicity through induction of SIRT3 [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2019, 379 : 114639.
- 20 Li F, Ye C, Wang X, et al. Honokiol ameliorates cigarette smoke-induced damage of airway epithelial cells via the SIRT3/SOD2 signalling pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2023, 27 : 4009-4020.
- 21 Shen J, Shen D, Tang Q, et al. Mogroside V exerts anti-inflammatory effects on fine particulate matter-induced inflammation in porcine alveolar macrophages [J]. *Toxicol In Vitro*, 2022, 80 : 105326.
- 22 Mo Q, Fu H, Zhao D, et al. Protective effects of mogroside V on oxidative stress induced by H₂O₂ in skin fibroblasts [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2021, 15 : 4901-4909.
- 23 Nie J, Sui L, Zhang H, et al. Mogroside V protects porcine oocytes from *in vitro* ageing by reducing oxidative stress through SIRT1 upregulation [J]. *Ageing (Albany NY)*, 2019, 11 : 8362-8373.