

甘草查尔酮 A 对神经毒素损伤 PC12 细胞的保护作用 及分子动力学模拟研究

姚娟¹, 刘圆圆², 张敏¹, 刘雪枫^{1*}, 靳晓杰^{1*}

¹甘肃中医药大学药学院; ²甘肃中医药大学基础医学院, 兰州 730000

摘要: 研究甘草查尔酮 A 对神经毒素 6-羟基多巴胺 (6-hydroxydopamine, 6-OHDA) 损伤 PC12 细胞的保护作用并采用分子模拟探究其机制。首先测定甘草查尔酮 A 对体外 ABTS 及 DPPH 自由基的清除活性。其次采用 MTT 法、测定细胞培养基中乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 的含量评价甘草查尔酮 A 对 6-OHDA 损伤 PC12 细胞的保护作用; 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯 (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA) 染色测定甘草查尔酮 A 对 6-OHDA 损伤 PC12 细胞对活性氧的影响; 通过检测各组细胞中总谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 的含量及总抗氧化能力 (total antioxidant capacity, T-AOC) 评价内源性的抗氧化能力; Western blot 分析甘草查尔酮 A 对 Nrf2 总蛋白表达的影响。最后采用分子对接与分子模拟方法从分子层面研究甘草查尔酮 A 作用于 Keap1 蛋白的结合位点及结合能力, 并预测甘草查尔酮 A 的吸收、分布、代谢、排泄和毒性 (absorption, distribution, metabolism, excretion, toxicity, ADMET) 参数。结果表明甘草查尔酮 A 具有显著的体外自由基清除活性; 甘草查尔酮 A 处理 PC12 细胞能显著提高 6-OHDA 损伤环境下 PC12 细胞的活性、清除细胞中的部分活性氧、提高 6-OHDA 损伤环境下 PC12 细胞中总 GSH、SOD 的含量及 T-AOC; Western blot 结果表明甘草查尔酮 A 可提高 Nrf2 总蛋白的表达; 分子对接及分子动力学模拟结果显示甘草查尔酮 A 与 Keap1 可通过共价键稳定结合, ADMET 预测提示甘草查尔酮 A 具有一定的成药潜力。甘草查尔酮 A 对 6-OHDA 损伤的 PC12 细胞具有一定的保护作用, 其机制可能与参与上调生物系统内源性的抗氧化作用相关。

关键词: 甘草查尔酮 A; 氧化损伤; Nrf2; Keap1; 神经保护; ADMET

中图分类号: R285

文献标识码: A

Protective effect and molecular dynamics simulation of licochalcone A on PC12 cells damaged by neurotoxin

YAO Juan¹, LIU Yuan-yuan², ZHANG Min¹, LIU Xue-feng^{1*}, JIN Xiao-jie^{1*}

¹College of Pharmacy, Gansu University of Traditional Chinese Medicine; ²School of Basic Medicine, Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

Abstract: This study investigated the protective effect of licochalcone A (LCA) on PC12 cells damaged by the neurotoxin 6-hydroxy-dopamine (6-OHDA), elucidated its mechanism through molecular simulation. At first, the

study determined the scavenging activity of LCA on ABTS and DPPH free radicals *in vitro*. Secondly, the experiment measured the content of lactate dehydrogenase (LDH) in cell medium and employed the MTT assay to evaluate the protective efficacy of LCA against 6-OHDA-induced damage in PC12 cells. 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) staining was used to determine the effect of LCA on reactive oxygen species in PC12 cells injured by 6-OHDA. The contents of total glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD) and total antioxidant capacity (T-AOC) in each group were detected to evaluate the endogenous antioxidant capacity. The effect of LCA on the expression of Nrf2 protein was analyzed by Western blot. Finally, molecular docking and simulation methods were utilized to study the binding site and ability of LCA on Keap1 protein, and calculate and analysis its absorption, distribution, metabolism, excretion, toxicity (ADMET). The results indicated that LCA possesses significant free radical scavenging activity *in vitro*. Treatment with LCA markedly enhanced PC12 cell viability under 6-OHDA stress, diminished reactive oxygen species production, and elevated GSH, SOD, and T-AOC levels under these conditions. Furthermore, Western blot analysis revealed that LCA treatment increased the expression of total Nrf2 protein. Molecular docking and dynamic simulations confirmed stable covalent bonding between LCA and Keap1 proteins, ADMET prediction suggesting that LCA could be a promising therapeutic agent. These observations suggest that LCA confers protection to PC12 cells damaged by 6-OHDA by modulating endogenous antioxidant responses within biological systems.

Key words: licochalcone A; oxidative damage; Nrf2; Keap1; neuroprotection; ADMET

随着社会老龄化进程的发展，神经退行性疾病的发病率呈指数增长，有研究指出至2024年神经退行性疾病将成为世界第二大死亡原因的疾病^[1]。神经退行性疾病主要包括阿尔茨海默病（Alzheimer's disease, AD）、帕金森病（Parkinson's disease, PD）、多发性硬化症（multiple sclerosis, MS）和肌萎缩侧索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis, ALS）等。目前，临床治疗此类疾病的药物有限，不能从根本上改变原有疾病的进展，并且存在较明显的药物副作用^[2]。而对这些疾病通过手术方法替换垂死或死亡神经元的方法取得成功的几率也非常有限。神经退行性疾病的发生和发展给社会带来了沉重的负担，因此如何防治此类疾病是一个备受关注的社会公共健康问题。

研究表明多种神经退行性疾病的发生与发展都与氧化应激密切相关^[3,4]。当神经细胞受毒素侵袭或置于有害环境中时，会产生过量的活性氧（reactive oxygen species, ROS），大量 ROS 将破坏细胞内的核酸、蛋白质和脂质，从而导致神经细胞氧化损伤。因此，通过调节神经细胞内的氧化还原平衡来保护神经细胞免受氧化应激损伤，值得深入研究。中药是

天然药物研发的宝库，天然产物是防治神经退行性疾病新药发现的源头，具有非常重要的研究价值和应用潜力^[5]。甘草始载于《神农本草经》，为上品，用药史已有两千多年。甘草作为传统中药，具有清热解毒、去痰止咳、补脾益气、缓急止痛、调和诸药的功效，中医临床应用广泛，素有“十方九草”之说。研究表明甘草含有三萜皂苷类、黄酮类、香豆素类、氨基酸、挥发油等多种成分，这些成分具有多种生物学功能，包括抗氧化、抑菌、抗癌、神经保护、降脂、降血糖和抗抑郁等作用。甘草中的查尔酮类成分甘草查尔酮 A (licochalcone A, LCA) 具有抗氧化、抗炎以及抗肿瘤等多种药理活性^[6,7]。本论文将研究 LCA 对 6-羟基多巴胺 (6-hydroxydopamine, 6-OHDA) 诱发氧化应激损伤 PC12 细胞的保护作用及机制，LCA 通过提高 PC12 细胞中一系列抗氧化酶的表达，最终起到神经保护作用。这不仅为神经损伤的防治提供一定的依据，同时还将为补脾益气、清热解毒中药甘草防治氧化应激诱发神经退行性疾病的发展提供基础理论支持。

1 材料与方法

1.1 试验药物

LCA (纯度 \geq 98%，批号 HS1970B1) 购于宝鸡辰光生物科技有限责任公司，细胞实验用时溶解于 DMSO 中， -20°C 冰箱保存。

1.2 细胞

PC12 细胞 (中科院上海细胞库)。

1.3 试剂

胎牛血清 (杭州四季清生物工程材料有限公司，批号 ST-SJQ131129)；DMEM 高糖培养液 (HyClone 公司，批号 P11965092)；噻唑蓝 (MTT) (Sigma-Aldrich 公司，批号 ST-0793052)；总谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、总抗氧化能力 (total antioxidant capacity, T-AOC)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所，批号分别为 20221116、20230309、20221205、20230217)；2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯 (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA) (上海碧云天生物技术有限公司，批号 S0033S)；6-OHDA (上海麦克林生化科技股份有限公司，批号 C1004185)；兔抗 Nrf2 多克隆抗体 (Abcam，批号 00145457)；GAPDH 抗体 (生工生物工程股份有限公司，批号 D110016-0100)。

1.4 仪器

Forma 371CO₂ 细胞培养箱 (Thermo Revco); IX53 倒置荧光显微镜 (Olympus); LDZX-50KBS 立式压力蒸汽灭菌器 (上海申安); Epoch 全波长酶标仪 (Bio-TEK); PowerPac 300 电泳仪 (Bio-Rad); ImageQuant LAS 4000 凝胶成像系统 (GE Healthcare)。

1.5 方法

1.5.1 LCA 对 ABTS 及 DPPH 自由基的影响

配置 ABTS 及 DPPH 自由基试液^[8], 通过预实验初步确定 LCA 体外自由基清除的大致浓度后, 取 LCA 样品溶液 250 μL 加 ABTS 或 DPPH 试液 250 μL 于 1.5 mL 的离心管中, 设 6 个重复, 震荡, 避光静置 10 min。随后吸取 200 μL 于 732 nm 波长下测定 ABTS 自由基的吸光度值, 517 nm 波长下测定 DPPH 自由基的吸光度值, 计算 LCA 对 ABTS 及 DPPH 自由基的清除效果。

1.5.2 MTT 法检测 LCA 对 6-OHDA 损伤 PC12 细胞活性的影响

将 PC12 细胞种于 96 孔板中 (2×10⁴ 个/孔), LCA (0、2.5、5、10 μmol/L) 作用 24 h 后除去含有药物的培养基, 更换含 200 μmol/L 6-OHDA 培养基继续培养 24 h, 每孔加入 10 μL 5 g/L 的 MTT, 在 37 °C 孵育 4 h 后加入 100 μL 三联溶解液孵育过夜, 待沉淀完全溶解后用酶标仪测定 570 nm 处的吸光度 (A), 以设定的空白对照调零, 扣除培养基对吸光值的影响, 以不加药物正常培养的细胞作为对照组 (control, Con), 6-OHDA (200 μmol/L) 作用 PC12 细胞 24 h 为模型组 (model, Mod), 2.5、5、10 μmol/L 的 LCA 分别作用 24 h 后更换含 200 μmol/L 6-OHDA 培养基继续培养 24 h 的细胞为 LCA 低 (L-LCA) 浓度、LCA 中 (M-LCA) 浓度、LCA 高 (H-LCA) 浓度组。计算 LCA 对 6-OHDA 损伤 PC12 细胞活性的影响, 根据所测吸光度值按公式 (1) 计算细胞存活率 (R)。

$$R = [(A_2 - A_0) / (A_1 - A_0)] \times 100\% \quad (1)$$

式中: A_0 、 A_1 、 A_2 分别为空白组、对照组和测试组的吸光值。

1.5.3 LCA 对 PC12 细胞培养基中 LDH 含量的影响

96 孔板中接种 PC12 细胞 (2×10⁴ 个/孔), 然后加入不同浓度的 LCA 培养 24 h。随后用含 200 μmol/L 的 6-OHDA 的培养基继续培养 24 h, 依试剂盒说明书测定培养基上清液中 LDH 含量。

1.5.4 DCFH-DA 染色检测 LCA 对 PC12 细胞中 ROS 的影响

12 孔板中接种 PC12 细胞, 细胞贴壁融合率约为 50% 时加入 LCA 培养 24 h, 随后用含 6-OHDA (200 μmol/L) 的培养基继续培养 24 h, 弃培养基, 细胞继续用含 10 μmol/L

DCFH-DA 的培养基于 37 °C 孵育 30 min, 荧光显微镜下照相记录。

1.5.5 LCA 对 PC12 细胞总 GSH、SOD 含量和 T-AOC 影响的检测

将 PC12 细胞接种于 60 mm 培养皿中, 贴壁后 LCA 作用 24 h, 更换含 200 $\mu\text{mol/L}$ 6-OHDA 培养基继续培养 24 h, 收集细胞并裂解, 依试剂盒说明书测定总 GSH、SOD 的含量及 T-AOC。

1.5.6 Western blot 检测 LCA 对 PC12 细胞 Nrf2 蛋白表达的影响

PC12 细胞用 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 LCA 处理 6、12、18、24 h 后收集细胞, 用 PBS 洗涤细胞, 加入 RIPA 裂解液提取细胞中的总蛋白, 使用考马斯亮蓝定量蛋白并将蛋白浓度调整一致, 加上样缓冲液并变性蛋白。制备 SDS-PAGE 凝胶进行电泳, 总蛋白上样量为 20 μg , 将分离的蛋白转移至 PVDF 膜上, 然后用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h。PVDF 膜与一抗 Nrf2 (1:1 000) 和 GAPDH (1:2 000) 在 4 °C 下孵育过夜, 然后用二抗 (1:4 000) 在室温下孵育 1 h。蛋白显色发光后用 Image-Pro Plus 6.0 分析蛋白质条带灰度, 以 GAPDH 为内参蛋白, 计算目的蛋白的相对表达水平。

1.5.7 共价对接

在 RCSB-PDB (www.pdbus.org) 中搜索下载 Nrf2 负调控蛋白 Keap1 的 X 射线晶体结构, PDB 编码为 4L7B, 采用 Schrodinger2020 软件的蛋白质预处理工具 Protein Preparation Wizard 对其进行分析和预处理, 包括删去自带配体、加氢及分配相关电荷; 根据蛋白的结构特点与迈克尔加成反应的原理, 预测小分子结合位点位于 VAL514、VAL561、GLY367、CYS513、VAL512、GLY511、ALA510、THR560、ILE559、GLY558、LEU557 氨基酸残基附近的空腔内, 由此确定活性区域的中心坐标。在 TCMSP 中下载 LCA 的化学结构, 小分子化合物 3D 结构在 Schrodinger2020 软件采用 Ligand preparation 模块进行能量优化, 采用 OPLS_2005 力场得到相应的低能构象。

使用 Schrodinger2020 软件包中的 CovDock 模块进行共价对接计算, 先以已确定的活性区域为中心定义活性口袋, 然后以结合口袋周围的 CYS513 作为共价对接的反应残基, 选择对接反应为 Michael Addition, 其余参数默认。

1.5.8 分子动力学模拟

Keap1 蛋白与 LCA 进行分子动力学模拟, 模拟过程使用 Desmond 2020 软件对复合物进行加氢操作, 将蛋白-配体复合物周围建立边长为 1 nm 的 TIP3P 周期性显性水模型的立方体水盒子, 加入 0.15 mol/L 氯化钠模拟体内水的渗透压环境。使用 Desmond 缺省设置程

序实现体系能量最小化和体系弛豫过程。短程静电相互作用阈值为 0.9 nm，利用 Particle Mesh E-wald 方法计算长程静电相互作用，使用 SHAKE 键长限制算法来限制所有共价键。在等温等压系综中周期边界条件下进行分子动力学模拟。温度耦合方法是 Nose-Hoover，压力为 100 kPa，模拟积分步长设置为 1.2 fs，经过 2 ns 的预平衡后，进行 50 ns 的分子动力学模拟，每 50 ps 进行一次轨迹记录，总计记录 1 000 帧。计算主链碳原子的均方根偏差（root mean square deviation, RMSD），并进行图形分析，以监测蛋白质-配体复合物在溶剂中的稳定性。在模拟过程中，持续监测蛋白质与配体的相互作用。

1.5.9 ADMET 预测

使用 ProTox-II 数据平台和 Schrödinger 软件的 QikProp 模块对活性成分进行吸收、分布、代谢、排泄和毒性（absorption, distribution, metabolism, excretion, toxicity, ADMET）参数计算，预测类药五原则（RO5）、人体口服吸收的百分比（%HOA）、脑-血分配系数（QPlg BB）、中枢活性（CNS）、口服半数致死量（LD₅₀）、毒性等级及肝毒性等性质。

1.5.10 统计学处理

数据采用 SPSS 22.0 进行统计，单因素方差分析多组样本间的差异， $P < 0.05$ 为有显著差异，有统计学意义。

2 结果

2.1 LCA 对 ABTS 及 DPPH 自由基的影响

LCA 对 ABTS 及 DPPH 自由基的清除效果如图 1 所示，在实验浓度范围内，LCA 对 ABTS 及 DPPH 具有显著的清除作用（ $P < 0.01$ ），并且具有浓度依赖性。

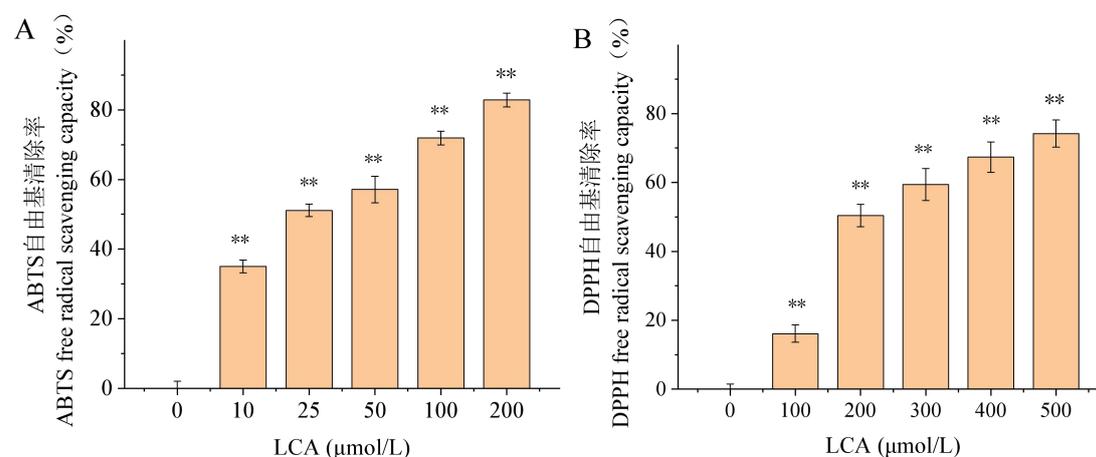


图 1 LCA 对自由基的清除活性 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Free radical scavenging capacity of LCA ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

注：与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比，** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with 0 $\mu\text{mol/L}$ group, ** $P < 0.01$.

2.2 LCA 对 6-OHDA 损伤 PC12 细胞活性及培养基 LDH 渗出率的影响

采用前期的研究结果使用 200 $\mu\text{mol/L}$ 6-OHDA 干预 PC12 细胞 24 h 作为损伤模型进行后期研究^[9]。随后通过检测细胞活力观察 LCA 能否保护 PC12 细胞免受 6-OHDA 诱导的损伤，结果如图 2A 所示，LCA 处理细胞均可明显提高 6-OHDA 损伤环境下 PC12 细胞的存活率。LDH 是细胞内的一种活性酶，当细胞损伤时，细胞内的 LDH 会渗漏，导致细胞培养基中存在较多的 LDH，测定培养基中 LDH 的含量能反应细胞损伤的程度。如图 2B 所示，与 Con 组相比，200 $\mu\text{mol/L}$ 6-OHDA 损伤 PC12 细胞 24 h 后，Mod 组细胞培养基中 LDH 含量显著升高 ($P < 0.01$)，LCA 处理 PC12 细胞 24 h，能显著降低 6-OHDA 损伤 PC12 细胞培养基中 LDH 的含量，并且具有浓度依赖关系。

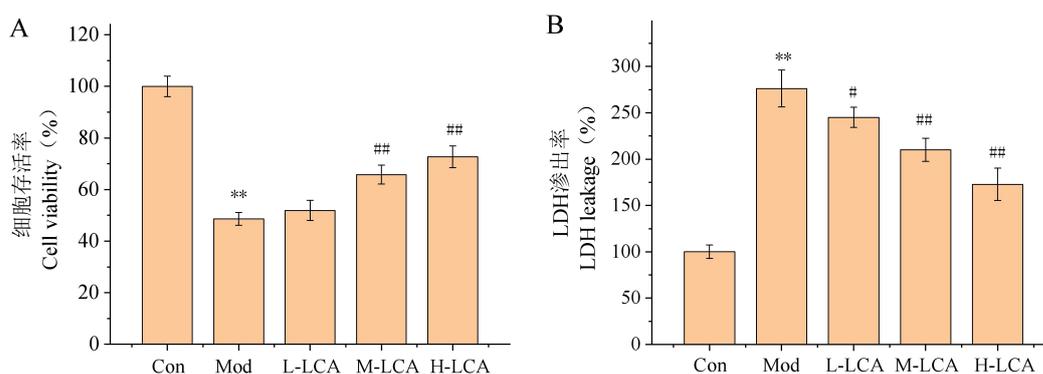


图 2 LCA 对 6-OHDA 损伤 PC12 细胞活性及培养基 LDH 渗出率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2. The effect of LCA on the activity of PC12 cells injured by 6-OHDA and LDH leakage rate of medium ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

注：与 Con 组比较，** $P < 0.01$ ；与 Mod 组比较，# $P < 0.01$ ，## $P < 0.01$ ，下同。

Note: Compared with Con group, ** $P < 0.01$; Compared with the Mod group, # $P < 0.01$, ## $P < 0.01$, the same below.

2.3 LCA 对 6-OHDA 损伤 PC12 细胞活性氧的影响

DCFH-DA 是一种具有细胞渗透性的非荧光探针。进入细胞后，DCFH-DA 会被细胞内的酯酶脱乙酰基转变为非荧光物质 DCFH，随后 DCFH 可快速与 ROS 反应转变为高亮度化合物 DCF。因此通过 DCFH-DA 染色可以观察细胞内 ROS 的变化。如图 3 所示，荧光显微镜观察结果表明，Con 组细胞 ROS 的水平较低，而将 PC12 细胞用 6-OHDA 刺激 24 h 后可导致细胞内 ROS 的水平增高，LCA 具有较好的清除作用。

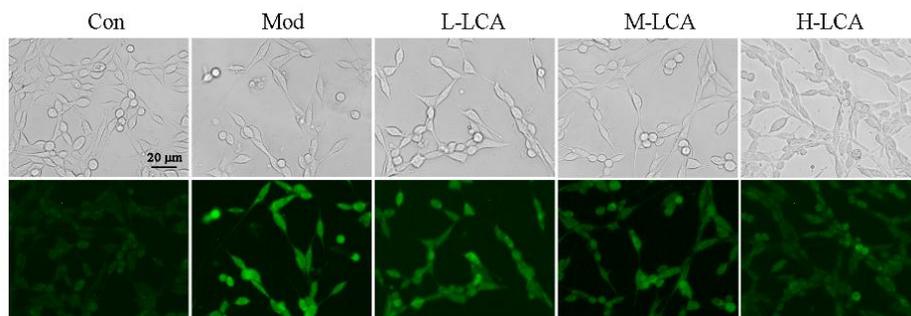


图3 LCA对6-OHDA损伤PC12细胞活性氧的影响

Fig. 3 Effect of LCA on ROS in PC12 cells damaged by 6-OHDA

2.4 LCA对6-OHDA诱导PC12细胞总GSH、SOD含量和T-AOC的影响

总GSH、SOD含量和T-AOC与氧化应激水平密切相关，因此检测其变化可反应细胞内的氧化应激水平。通过测定各组细胞中总GSH、SOD含量及T-AOC，结果如表1所示，与Con组相比，Mod组细胞中总GSH、SOD含量及T-AOC显著降低 ($P < 0.01$)。而LCA作用细胞后均能不同程度地提高6-OHDA诱导下PC12细胞中总GSH、SOD的含量及T-AOC，并且具有一定的浓度依赖关系。

表1 LCA对6-OHDA损伤PC12细胞总GSH、SOD含量和T-AOC的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effects of LCA on total GSH, SOD and T-AOC in PC12 cells injured by 6-OHDA ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Group	GSH (mg/mL)	SOD (kU/g)	T-AOC (mmol/g)
Con	15.63±1.70	56.52±3.65	8.35±1.10
Mod	6.82±0.92**	30.39±2.40**	5.13±0.41**
L-LCA	7.74±1.69	33.17±2.96	5.97±0.46 [#]
M-LCA	8.21±0.93 ^{##}	35.56±4.11 [#]	6.36±0.67 ^{##}
H-LCA	9.78±1.41 ^{##}	41.67±3.84 ^{##}	6.92±0.50 ^{##}

2.5 LCA对PC12细胞Nrf2蛋白表达的影响

如图4所示，与0 h组相比，10 μmol/L LCA作用PC12细胞后，细胞内Nrf2蛋白表达增高，这种作用24 h内一直持续，并具有显著差异 ($P < 0.01$)。

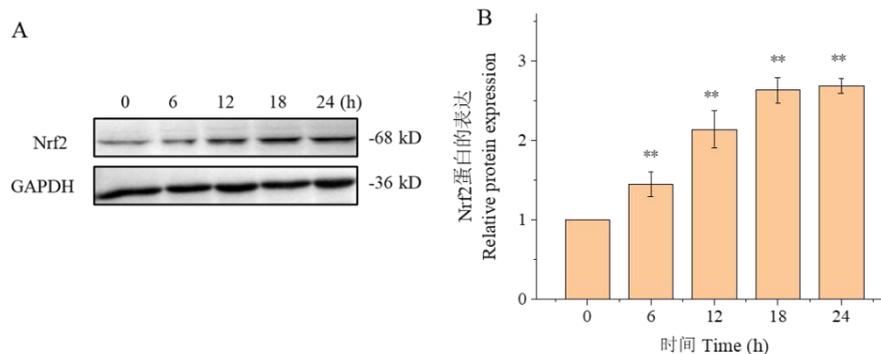


图 4 LCA 对 PC12 细胞总 Nrf2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of LCA on total Nrf2 protein expression in PC12 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注：与 0 h 组相比，** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with 0 h group, ** $P < 0.01$.

2.6 共价对接

Keap1 是 Nrf2 的一个负调控剂，共价修饰 Keap1 会使其构象变化，诱发 Keap1-Nrf2 解离，进而激活 Nrf2。共价对接结果如图 5 所示，LCA 可以与 Keap1 的 CYS513 形成共价键，与 VAL514、THR560、GLY367、VAL606、VAL420 形成氢键，与 VAL514、VAL606、VAL420 形成疏水相互作用。说明 LCA 对 Keap1 具有较好的共价修饰作用。

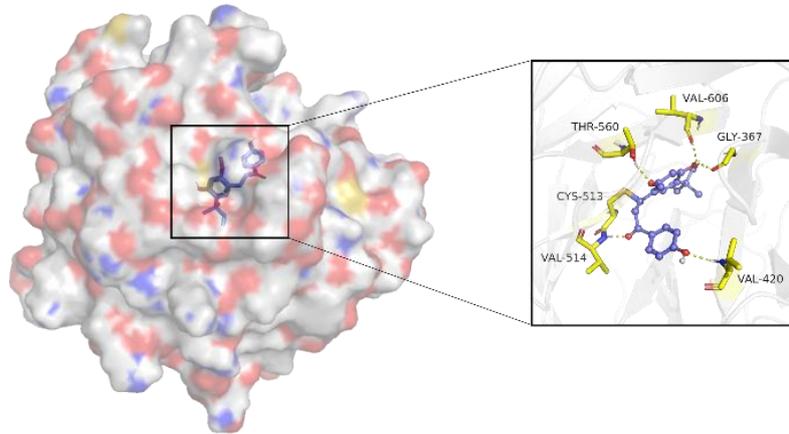


图 5 Keap1-LCA 结合模式图

Fig. 5 The combination model of Keap1-LCA

2.7 分子动力学模拟

在确定 LCA 与 Keap1 结合的基础上，应用分子动力学模拟技术可进一步探究 LCA 与 Keap1 共价结合的稳定性，RMSD 用于测量特定框架中选定原子相对于参考框架的平均位移变化，监测蛋白质的 RMSD 可以在整个模拟过程中深入了解其结构构象，可以监测蛋白质与配体的相互作用。如图 6 所示，LCA 与 Keap1 复合物蛋白的 RMSD 图显示在 10 ns 处收敛，平均 RMSD 值为 0.13 nm。蛋白质与配体的相互作用可分为四种类型：氢键、疏水相互作用、离子键和水分子桥。在整个模拟过程中，LCA 可以和 GLY367、VAL420、VAL467、VAL514、THR560、VAL561、VAL606 等残基形成氢键；和 VAL418、VAL467、CYS513、ILE559、VAL561、VAL606、VAL608 等残基产生疏水相互作用，和 GLY367、VAL369、VAL420、VAL467、VAL606 等残基形成水分子桥；和 GLN563、ARG326、HIS516 等残基形成离子键。分析每帧复合物的构象结果，发现 LCA 与 Keap1 可通过共价

键稳定结合。

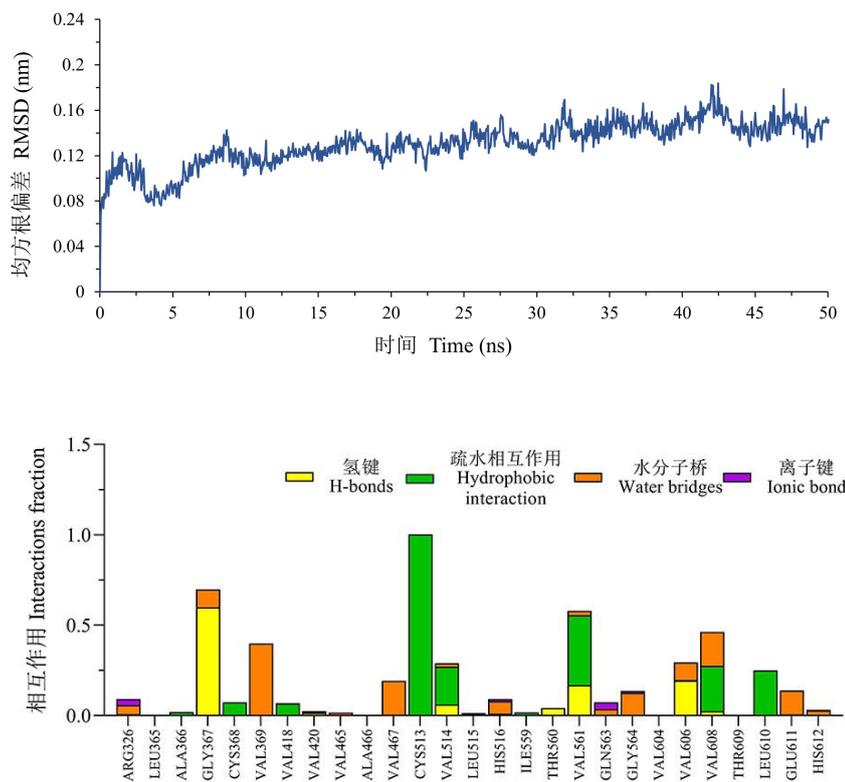


图 6 LCA 与 Keap1 的分子动力学模拟结果图

Fig.6 Molecular dynamics simulation results of LCA with Keap1 protein.

2.8 药代动力学特征

本研究使用 ProTox-II 数据平台和 QikProp 对上述 LCA 进行 ADMET 参数计算。结果显示 LCA 的 RO5 预测值为 0 (可接受范围: 最大值 4); %HOA 预测值为 3 (可接受范围: 0~100), 预测 QPlogBB 和 CNS 数据为-1.215 (可接受范围: -3.0~1.2) 和-2 (可接受范围: -2 为无活性, +2 有活性), 显示 LCA 透过血脑屏障的能力较低; 毒性等级预测结果显示安全等级为 IV 级 (I 级: 吞咽致命 $LD_{50} \leq 5$; II 级: 吞咽致命 $5 < LD_{50} \leq 50$; III 级: 吞咽有毒 $50 < LD_{50} \leq 300$; IV 级: 吞咽有害 $300 < LD_{50} \leq 2000$; V 级: 吞咽可能有害 $2000 < LD_{50} \leq 5000$; VI 级: 无毒 $LD_{50} > 5000$), 无肝毒性。

3 讨论与结论

自由基清除剂在人们日常生活及医疗卫生保健中均扮演着重要的角色。目前已有不少便捷高效的方法可用于测定化合物的体外自由基清除活性, 比较常用的是 ABTS 和 DPPH 自由基清除法。通过测定 LCA 对 ABTS 和 DPPH 的清除效果, 结果发现 LCA 具有较好的体外 ABTS 及 DPPH 自由基清除活性, 提示 LCA 可作为体外自由基清除剂进行进一步的开

发。

由氧化应激诱发的神经退行性疾病因缺乏有效的药物以及临床治疗方式的限制，目前尚未取得较好的治疗效果，因此研发新型高效低毒的药物备受关注。现代医学理论认为，Nrf2 是细胞内调控细胞氧化还原平衡的一个重要因子，细胞内抗氧化因子的表达依赖于 Nrf2 的激活，目前发现的 Nrf2 激活剂基本都是 Keap1-Nrf2 相互作用的间接抑制剂，它们可与 Keap1 半胱氨酸上的巯基通过氧化或烷基化形成共价加合物，进而抑制 Nrf2 的泛素化，诱导抗氧化和细胞保护酶的表达以抵御氧化应激损伤^[10]。因此，通过抵御氧化应激，提高机体内源性抗氧化功能以防治神经退行性疾病不失为一种极具潜力的策略。基于与 Keap1-Nrf2 相互作用的小分子抑制剂的化学结构，以及与半胱氨酸巯基作用的性质，目前公认的可与 Keap1-Nrf2 相互作用的化合物包括：迈克尔反应受体分子、具有氧化性的酚和醌类、异硫氰酸酯类、二硫醚和二烯丙基硫化物等^[11]。查尔酮是一类存在于多种植物中的开链黄酮类化合物，结构主链由两个苯环通过 3 个碳原子的 α ， β -不饱和羰基连接，可与 Keap1 上的活性巯基发生迈克尔加成反应，理论上可激活 Nrf2，且研究表明不少查尔酮类化合物如索法酮和异甘草素可以通过激活 Keap1-Nrf2-ARE 途径，诱导细胞保护蛋白的表达。LCA 也是甘草中典型的一个查尔酮类化合物，结构中含有 α ， β -不饱和酮结构，提示 LCA 可能具有潜在的激活 Nrf2 的作用。

PC12 细胞为大鼠嗜铬细胞瘤细胞株，最初来源于受照射的大鼠肾上腺髓质的可移植嗜铬细胞瘤，因其具有独特的神经元样特征，在神经科学系统研究中广泛使用^[12]。多巴胺是大脑中的一种神经递质，当多巴胺能神经元的数量减少时，残余的多巴胺能神经元的代谢活动会代偿性增强，这种增强的代谢活动会使自由基的生成增多^[13]。6-OHDA 是一种多巴胺神经递质的羟基化类似物，能够对多巴胺能神经元造成氧化应激损伤，导致多巴胺神经元变性，广泛应用于神经损伤的造模^[14]。为了验证 LCA 是否对氧化应激损伤的神经细胞具有保护作用，我们采用 6-OHDA 损伤的 PC12 细胞模型进行实验。通过检测细胞活力及细胞培养基中 LDH 的活性来发现 LCA 能提高 6-OHDA 损伤环境下 PC12 细胞的活力，在一定程度上能保护 PC12 细胞免受神经毒素的损伤。其次，通过测定 LCA 对 6-OHDA 诱导环境下 PC12 细胞中 ROS 生成的影响，结果发现 LCA 可清除 PC12 细胞中的部分 ROS，证明 LCA 的保护作用或许与氧化应激相关。为明确 LCA 抵御 6-OHDA 诱导 PC12 损伤的作用是否与增强细胞内的抗氧化酶及功能有关，我们检测了总 GSH、SOD 的含量及 T-AOC，结果发现这类指标均有增强，说明 LCA 在细胞内可能促使内源性抗氧化因子再生，具有提高

细胞抵御氧化应激的作用。Nrf2 是细胞内调控抗氧化因子表达的一个重要因子，通过 Western blot 实验发现 LCA 可增强细胞中 Nrf2 蛋白的表达，说明 LCA 可激活 Nrf2。Nrf2 的激活包括依赖 Keap1 的途径与非依赖 Keap1 的途径。研究最为广泛的是依赖于 Keap1 的途径，因此本研究采用分子对接与分子模拟的方法研究了 LCA 与 Keap1 的相互作用，结果表明 LCA 可与 Keap1 通过共价键稳定结合。

在探究 LCA 激活 Nrf2 的基础上，进行代谢及毒性预测对于进一步开发化合物具有重要意义。有研究利用 UPLC-MS/MS 对 LCA 在大鼠体内的药代动力学进行了研究，发现 LCA 在大鼠体内的生物利用度较差，主要通过肝脏的首过效应代谢^[15]。将 LCA 制备成纳米载体和脂质体可以提高其生物利用度^[16]。随着药物化学和药剂学的不断发展，有关 LCA 的成药性研究也会逐步得到完善。目前甘草被列入药食同源目录，广泛应用于食品和医药行业，我们的研究可为了解 LCA 在生物体内的有益作用提供基础，并为进一步开发 LCA 作为一种潜在的神经保护剂提供思路。

参考文献

- 1 Korovesis D,Rubio-Tomás T,Tavernarakis N.Oxidative stress in age-related neurodegenerative diseases:an overview of recent tools and findings[J].Antioxidants,2023,12:131.
- 2 Szeto JY,Lewis SJ.Current treatment options for Alzheimer's disease and Parkinson's disease dementia[J].Curr Neuropharmacol,2016,14:326-338.
- 3 Osama A,Zhang J,Yao J,et al.Nrf2:a dark horse in Alzheimer's disease treatment[J].Ageing Res Rev,2020,64:101206.
- 4 Sumien N,Cunningham JT,Davis DL,et al.Neurodegenerative disease:roles for sex,hormones,and oxidative stress[J].Endocrinology,2021,162:bqab185.
- 5 Huang DR,Cheng YM,Feng ZH,et al.Research progress of natural active ingredients against Alzheimer's disease based on target mechanisms[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2023,35:1808-1819.
- 6 Li MT,Xie L,Jiang HM,et al.Role of Licochalcone A in potential pharmacological therapy:a review[J].Front Pharmacol,2022,13:878776.
- 7 Olloquequi J,Ettcheto M,Cano A,et al.Licochalcone A:a potential multitarget drug for Alzheimer's disease treatment[J].Int J Mol Sci,2023,24:14177.
- 8 Yao J,Lin J,Wu PA,et al.Protective effect of Sanqi extract on 6-OHDA-injured PC12 cells based on antioxidation study[J].Pharmacol Clin Chin Mater Med(中药药理与临床),2022,38:115-119.
- 9 Hou YN,Li XM,Peng SJ,et al.Lipoamide ameliorates oxidative stress via induction of Nrf2/ARE signaling pathway in PC12 cells[J].J Agric Food Chem,2019,67:8227-8234.
- 10 Nakamura Y,Miyoshi N.Electrophiles in foods:the current status of isothiocyanates and their chemical biology[J].Biosci Biotechnol Biochem,2010,74:242-255.
- 11 Cheng MJ,Guo J,Liu J,et al.Research progress of Nrf2 and natural product-oriented Nrf2 activator[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2021,33:165-177.
- 12 Grau CM,Greene LA.Use of PC12 cells and rat superior cervical ganglion sympathetic neurons as models for neuroprotective assays relevant to Parkinson's disease[J].Methods Mol Biol,2012,846:201-211.
- 13 Kiessling CY,Lanza K,Feinberg E,et al.Dopamine receptor cooperativity synergistically drives

dyskinesia, motor behavior, and striatal GABA neurotransmission in hemiparkinsonian rats[J]. *Neuropharmacology*, 2020, 174: 108138.

- 14 Wang TT, Ye X, Bian W, et al. Allopregnanolone modulates GABAAR-dependent CaMKII δ and BDNF to protect SH-SY5Y cells against 6-OHDA-induced damage[J]. *Front Cell Neurosci*, 2022, 16: 882351.
- 15 Li T, Ye W, Huang B, et al. Determination and pharmacokinetic study of echinatin by UPLC-MS/MS in rat plasma[J]. *J Pharmaceut Biomed*, 2019, 168: 133-137.
- 16 Liu J, Zhu ZA, Yang YH, et al. Preparation, characterization, pharmacokinetics, and antirenal injury activity studies of licochalcone A-loaded liposomes[J]. *J Food Biochem*, 2022, 46: e14007.

收稿日期: 2024-06-11 接受日期:

基金项目: 甘肃省自然科学基金(21JR1RA270); 2022年陇原青年创新创业人才(个人)项目

*通信作者 Tel: 86-0931-5161171; E-mail: askxf@163.com, jinlovedream@163.com