

丁苯酞对帕金森病细胞模型的保护作用及机制

张鑫¹, 郭宝娟², 徐慧鑫¹, 沈玉珍¹, 杨晓帆³, 杨旭芳¹, 陈培¹

<https://doi.org/10.12307/2025.917>

投稿日期: 2024-09-10

采用日期: 2024-11-26

修回日期: 2024-12-30

在线日期: 2025-01-13

中图分类号:

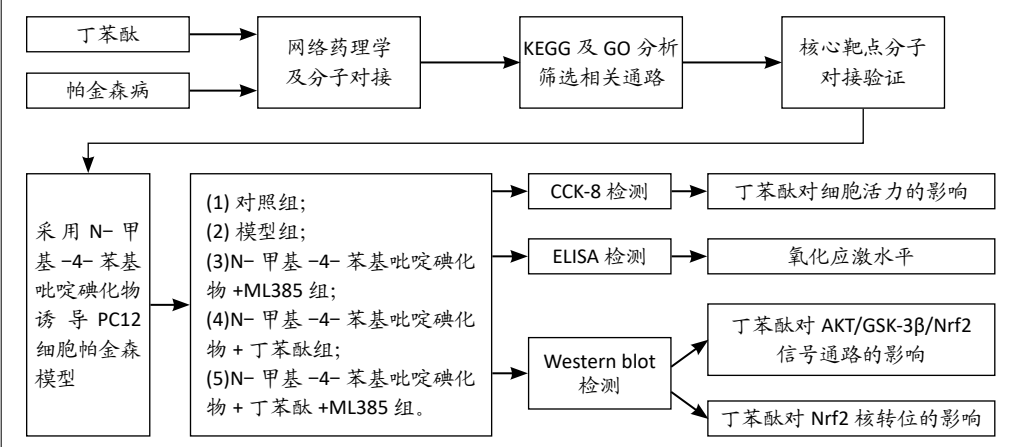
R459.9; R319; R741.05

文章编号:

2095-4344(2025)30-06466-08

文献标识码: B

文章快速阅读: 丁苯酞在帕金森病中的保护机制



文题释义:

帕金森病: 也常被称为“震颤麻痹”，是一种神经系统退行性疾病，主要病因是由于黑质多巴胺能神经元的退化和死亡，可能与遗传、环境因素及神经系统老化等多种因素有关。

丁苯酞: 是芹菜籽中的一种化学成分，具有重建微循环、保护线粒体功能、抑制氧化应激和神经元凋亡等多种药理作用。研究表明，丁苯酞能够通过抗氧化、抗炎和改善脑微循环等机制保护多巴胺能神经元，但丁苯酞在改善帕金森病中的具体机制尚不清楚。

摘要

背景: 丁苯酞具有抗氧化和抗炎作用，有研究证实其在帕金森病中具有保护作用，但具体机制尚不清楚。

目的: 通过网络药理学、分子对接及细胞实验探讨丁苯酞的保护机制。

方法: ①网络药理学、分子对接实验: 利用数据库筛选丁苯酞的作用靶点及帕金森病靶点，取交集后构建交集靶点蛋白互作网络并筛选核心靶点，对核心靶点进行GO和KEGG通路富集分析，将目标靶点蛋白与丁苯酞进行分子对接验证。②细胞验证: 将第6代PC12细胞分6组培养: 对照组使用常规培养基培养，模型组采用N-甲基-4-苯基吡啶碘化物诱导帕金森病模型，ML385抑制剂组在诱导帕金森病模型的基础上加入核因子E2相关因子2抑制剂ML385，丁苯酞治疗组在诱导帕金森病模型的基础上加入丁苯酞，丁苯酞联合ML385处理组在诱导帕金森病模型的基础上加入丁苯酞与ML385，丁苯酞组使用单独含丁苯酞的常规培养基培养，检测细胞增殖、细胞内还原型谷胱甘肽和丙二醛水平以及蛋白激酶B/糖原合酶激酶3β/核因子E2相关因子2(AKT/GSK-3β/Nrf2)信号通路的蛋白表达。

结果与结论: ①筛选出药物与疾病靶点的交集靶点共52个，核心靶点包括基质金属蛋白酶9、GSK-3β等，涉及磷脂酰肌醇3-激酶/AKT、氧化应激相关信号通路; 丁苯酞与GSK-3β的分子对接结合能为-18.27 kJ/mol，表明丁苯酞与GSK-3β具有一定的结合能力。②与模型组相比，丁苯酞治疗组PC12细胞活性与还原型谷胱甘肽水平升高($P < 0.05$)，丙二醛水平降低($P < 0.05$)，p-AKT、p-GSK-3β、Nu-Nrf2和T-Nrf2蛋白表达升高($P < 0.05$); 与丁苯酞组相比，丁苯酞联合ML385处理组PC12细胞活性与还原型谷胱甘肽水平降低($P < 0.05$)，丙二醛水平升高($P < 0.05$)，Nu-Nrf2和T-Nrf2蛋白表达降低($P < 0.05$)。③结果表明，丁苯酞可通过AKT/GSK-3β/Nrf2信号通路抑制氧化应激、改善细胞活性，对N-甲基-4-苯基吡啶碘化物诱导的帕金森细胞模型具有保护作用。

关键词: 网络药理学; 分子对接; 帕金森病; 丁苯酞; 氧化应激; 信号通路; 工程化组织构建

Protective effects and mechanisms of 3-N-butylphthalide in Parkinson's disease cell models

Zhang Xin¹, Guo Baojuan², Xu Huixin¹, Shen Yuzhen¹, Yang Xiaofan³, Yang Xufang¹, Chen Pei¹

¹Department of Pathophysiology, School of Basic Medicine, Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157011, Heilongjiang Province, China; ²Department of Pathology, Baotou Mongolian Medicine and Traditional Chinese Medicine Hospital, Baotou 014000, Inner Mongolia Autonomous Region, China; ³Department of Rehabilitation Medicine, Hongqi Hospital Affiliated to Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157011, Heilongjiang Province, China
Zhang Xin, MS, Department of Pathophysiology, School of Basic Medicine, Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157011, Heilongjiang Province, China

¹牡丹江医科大学基础医学院病理生理学教研室，黑龙江省牡丹江市 157011; ²包头市蒙医中医医院病理科，内蒙古自治区包头市 014000;

³牡丹江医科大学附属红旗医院康复医学科，黑龙江省牡丹江市 157011

第一作者: 张鑫，男，1999年生，山东省泰安市人，汉族，硕士，主要从事神经退行性疾病的发病机制及治疗研究。

共同第一作者: 郭宝娟，女，1997年生，内蒙古自治区包头市人，汉族，硕士，主要从事神经退行性疾病的发病机制及治疗研究。

通讯作者: 陈培，女，副教授，硕士生导师，牡丹江医科大学基础医学院病理生理学教研室，黑龙江省牡丹江市 157011

<https://orcid.org/0009-0006-8605-3040>(张鑫); <https://orcid.org/0000-0002-1084-7366>(郭宝娟)

基金资助: 黑龙江省省属高校基本科研业务费科研项目(2023-KYYWF-0936)，项目负责人: 陈培

引用本文: 张鑫, 郭宝娟, 徐慧鑫, 沈玉珍, 杨晓帆, 杨旭芳, 陈培. 丁苯酞对帕金森病细胞模型的保护作用及机制[J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(30):6466-6473.



Guo Baojuan, MS, Department of Pathology, Baotou Mongolian Medicine and Traditional Chinese Medicine Hospital, Baotou 014000, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Zhang Xin and Guo Baojuan contributed equally to this article.

Corresponding author: Chen Pei, Associate professor, Master's supervisor, Department of Pathophysiology, School of Basic Medicine, Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157011, Heilongjiang Province, China

Abstract

BACKGROUND: D1-3-n-butylphthalide has antioxidant and anti-inflammatory effects and has been explored to have protective role in Parkinson's disease, but the underlying mechanisms are unknown.

OBJECTIVE: To investigate the protective effect of D1-3-n-butylphthalide by the approach of network pharmacology, molecular docking, and cellular experimental validation.

METHODS: (1) Network pharmacology and molecular docking: The database was used to screen the targets of D1-3-n-butylphthalide and Parkinson's disease. The intersection was taken from the construction of the target protein interaction network, and then screen the core targets. The GO and KEGG pathway enrichment was used to further analyze the core targets. The interaction between the target proteins and D1-3-n-butylphthalide was verified by molecular docking. (2) Cell validation: The passage 6 PC12 cells were divided into six groups for culture. The control group was cultured with conventional culture medium. The model group was cultured with N-methyl-4-phenylpyridinium iodide to induce Parkinson's disease model. The ML385 inhibitor group was added with nuclear factor E2-related factor 2 inhibitor ML385 on the basis of inducing Parkinson's disease model. The D1-3-n-butylphthalide treatment group was added with butylphthalide on the basis of inducing Parkinson's disease model. The D1-3-n-butylphthalide combined with ML385 treatment group was added with D1-3-n-butylphthalide and ML385 on the basis of inducing Parkinson's disease model. The D1-3-n-butylphthalide group was cultured with conventional culture medium containing butylphthalide alone. Cell proliferation, intracellular reduced glutathione and malondialdehyde levels, and protein expression of protein kinase B/glycogen synthase kinase 3 β /nuclear factor E2-related factor 2 (AKT/GSK-3 β /Nrf2) signaling pathway were detected.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) A total of 52 targets were screened for the intersection of drugs and disease targets, and the core targets including the matrix metalloproteinase 9 and GSK-3 β were involved the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT and oxidative stress-related signaling pathways. The molecular docking binding energy of D1-3-n-butylphthalide and GSK-3 β was -18.27 kJ/mol, which indicated that D1-3-n-butylphthalide had a good binding ability with GSK-3 β . (2) Compared with the model group, the PC12 cell activity and reduced glutathione level in the D1-3-n-butylphthalide treatment group were increased ($P < 0.05$), the malondialdehyde level was decreased ($P < 0.05$), and the expression of p-AKT, p-GSK-3 β , Nu-Nrf2, and T-Nrf2 proteins was increased ($P < 0.05$). Compared with the D1-3-n-butylphthalide group, the PC12 cell activity and reduced glutathione level in the D1-3-n-butylphthalide combined with ML385 treatment group were decreased ($P < 0.05$), the malondialdehyde level was increased ($P < 0.05$), and the expression of Nu-Nrf2 and T-Nrf2 proteins was decreased ($P < 0.05$). (3) These results demonstrate that D1-3-n-butylphthalide can inhibit oxidative stress and improve cell activity through the AKT/GSK-3 β /Nrf2 signaling pathway, and has a protective effect on the Parkinson's cell model induced by N-methyl-4-phenylpyridinium iodide.

Key words: network pharmacology; molecular docking; Parkinson's disease; D1-3-n-butylphthalide; oxidative stress; signaling pathway; engineered tissue construction

Funding: Basic Scientific Research Business Expense Project of Provincial Colleges and Universities in Heilongjiang, No. 2023-KYYWF-0936 (to CP)

How to cite this article: ZHANG X, GUO BJ, XU HX, SHEN YZ, YANG XF, YANG XF, CHEN P. Protective effects and mechanisms of 3-N-butylphthalide in Parkinson's disease cell models. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2025;29(30):6466-6473.

0 引言 Introduction

帕金森病是一种常见的神经系统退行性疾病, 据调查显示, 2015 年全球帕金森病患者约为 690 万, 预计到 2040 年将增加至约 1 290 万, 其发病率持续上升^[1]。目前对帕金森病的治疗方法包括手术、药物及物理治疗等, 但上述手段仅能延缓疾病的进展, 无法达到根治目的。因此, 迫切需要进一步研究帕金森病的发病机制, 以探索更有效的干预策略、减缓帕金森病的疾病进程, 从而改善帕金森病患者的生活质量。

帕金森病的发病机制涉及免疫激活、神经炎症、线粒体功能障碍以及溶酶体功能异常等方面, 但具体机制尚未完全明了^[2-3]。蛋白激酶 B(protein kinase B, PKB/AKT)/ 糖原合酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase 3 beta, GSK-3 β)/ 核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 信号通路在抗氧化应激中发挥关键作用。AKT 是一种重要的信号转导分子, 其激活不仅能够促进细胞存活和代谢, 还能使 GSK-3 β 磷酸化并失活, 从而阻止 β -TrCP 蛋白与 Nrf2 结构域 Neh6 的结合, 阻止 Nrf2 的降解, 促进 Nrf2 转移至细胞核并增加抗氧化酶水平, 减少氧化应激对神经细胞的损伤^[4]。

Nrf2 作为细胞中的主要抗氧化转录因子, 能够感知氧化应激并调控抗氧化酶的表达, 如超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶和血红素氧合酶 1, 这些酶

在防止细胞损伤中发挥着重要作用^[5]。因此, AKT/GSK-3 β /Nrf2 信号通路的有效激活可提升神经细胞的抗氧化能力, 降低氧化应激引发的细胞损伤, 从而在帕金森病的防治中发挥潜在的保护作用。

丁苯酞是芹菜籽中的一种化学成分, 具有重建微循环、保护线粒体功能、抑制氧化应激和神经元凋亡等多种药理作用。目前, 丁苯酞已被应用于治疗缺血性脑卒中, 特别是在脑卒中发作后的早期阶段, 可以有效减少脑缺血区的损伤、促进神经功能的恢复^[6-9]; 此外, 丁苯酞在心力衰竭、脑损伤和糖尿病的保护作用可能与磷脂酰肌醇 3-激酶 /AKT/Nrf2 信号通路相关^[10-12]。因此, 此次研究拟结合网络药理学及分子对接技术, 通过体外实验探讨丁苯酞在帕金森病细胞模型中的作用及其与 AKT/GSK-3 β /Nrf2 信号通路的关系, 为丁苯酞在帕金森病防治中的应用提供新的药理学依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 网络药理学、分子对接及随机对照细胞实验。

1.2 时间及地点 实验于 2023 年 9 月至 2024 年 8 月在牡丹江医科大学基础医学院形态学实验研究室完成。

1.3 材料 大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞 PC12(高分化型) 购于上海酶研生物科技有限公司 (Cat.No:CC-Y3027); 丁苯酞购于中国食品药品检定研究所; RPMI-1640 培养基、胎

牛血清购于南京森贝伽生物科技公司；N-甲基-4-苯基吡啶碘化物(MPP⁺)购于中国阿拉丁生化科技公司；ELISA试剂盒、CCK-8试剂盒，购于北京普利莱基因技术有限公司；兔抗大鼠p-AKT、AKT、p-GSK-3 β 、GSK-3 β 、T-Nrf2、Nu-Nrf2、GAPDH、增殖细胞核抗原抗体购于Affinity生物；IgG山羊抗兔抗体购于北京中杉金桥生物技术有限公司；Nrf2抑制剂ML385购于MedChemExpress(MCE)。

1.4 方法

1.4.1 网络药理学与分子对接实验

丁苯酞作用靶点的筛选：以“D1-3-n-butylphthalide”为关键词，在PubChem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)中检索获得丁苯酞2D结构的SDF格式文件。在PharmMapper数据库(<https://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>)上传丁苯酞2D结构收集靶点，设置筛选条件为“normalized fit score ≥ 0.5 ”。利用Uniprot数据库(<https://www.uniprot.org/>)将药物靶点名称转化为基因名称。

帕金森病相关靶点的筛选：分别在GeneCards数据库(<https://www.disgenet.org/>)、DisGeNET数据库(<https://www.disgenet.org/>)、CTD数据库(<https://ctdbase.org/>)以“Parkinson's disease”进行检索并收集帕金森病相关靶点。筛选条件设置如下：GeneCards数据库(Relevance score ≥ 10)、DisGeNET数据库(Score_gda ≥ 0.01)、CTD数据库(Inference Score ≥ 40)。对CTD、DisGeNET、GeneCards数据库的帕金森病相关靶点与丁苯酞潜在药物靶点取交集，获得丁苯酞治疗帕金森病的潜在共有靶点。

蛋白质互作网络分析：将潜在共有靶点导入STRING数据库(<https://cn.string-db.org/>)，构建关键蛋白互作网络。参数设置：物种(Homo Sapiens)，其他设置为默认值。结果通过Cytoscape 3.10.1进行可视化网络分析，然后利用MCODE算法进行拓扑分析，获得药物治疗疾病的核心靶点。

KEGG及GO富集分析：将得到的核心基因导入David数据库(<https://david.ncicrf.gov/>)进行KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)及GO(Gene ontology)富集分析。其中GO富集分析包括细胞组分、分子功能、生物过程分析， $P < 0.05$ 代表富集效果显著。最后将关键图表通过微生信(<https://david.ncicrf.gov/>)作图进行可视化处理。

分子对接：首先通过Pubchem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)获取丁苯酞的小分子2D结构，并通过MOE 2019软件使其能量最小化。从RCSB蛋白结构数据库(<http://www.rcsb.org/>)获取目标靶点蛋白的3D结构，通过MOE 2019软件去除多余的配体及水分子。最后进行丁苯酞与目标靶点分子对接并计算结合能。

1.4.2 细胞实验

实验分组：选取第6代PC12细胞，分6组培养：对照组使用单纯的培养基(含体积分数10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素的RPMI1640培养基)培养24 h，模型组使用含1 mmol/L N-甲基-4-苯基吡啶碘化物的培养基培养24 h(诱导帕金森病模型)^[13]，ML385抑制剂组使用含5 μ mol/L ML385^[14]、1 mmol/L N-甲基-4-苯基吡啶碘化物的培养基共同培养24 h，丁苯酞治疗组使用含1 mmol/L N-甲基-4-苯基吡啶碘化物培养基培养24 h后更换为含20 μ mol/L丁苯酞的培养基培养4 h^[15]，丁苯酞联合ML385处理组使用含1 mmol/L N-甲基-4-苯基吡啶碘化物的培养基培养24 h后更换为含5 μ mol/L ML385、20 μ mol/L丁苯酞的培养基共同培养4 h，丁苯酞组使用单独含20 μ mol/L丁苯酞的培养基培养24 h。6组均置于37 $^{\circ}$ C恒温培养箱内。

CCK-8法检测细胞活力：将第6代PC12细胞接种于96孔板中，细胞密度为 5×10^3 /孔，按照实验组处理(对照组、模型组、ML385抑制剂组、丁苯酞治疗组、丁苯酞联合ML385处理组)。处理结束后，每孔加入10 μ L CCK-8试剂置于培养箱中孵育2 h，用酶标仪在 $\lambda=450$ nm条件下测吸光度值，计算细胞存活率。细胞存活率=[(实验孔-空白孔)/(对照孔-空白孔)] $\times 100\%$ ，空白孔仅加入单纯的培养基，未加入细胞。

ELISA检测丙二醛、还原型谷胱甘肽水平：将第6代PC12细胞接种于6孔板中，细胞密度为 10×10^5 /孔，按照实验组处理(对照组、模型组、ML385抑制剂组、丁苯酞治疗组、丁苯酞联合ML385处理组)。处理结束后，2 000-3 000 r/min离心20 min，收集上清于新的无菌管中，按照ELISA试剂说明书步骤，使用酶标仪在450 nm波长处测定各孔吸光度值，计算丙二醛、还原型谷胱甘肽水平。

Western blot检测AKT/GSK-3 β /Nrf2信号通路蛋白表达：将第6代PC12细胞接种于6孔板中，细胞密度为 1×10^5 /孔，按照实验组处理，处理结束后，检测模型组与丁苯酞治疗组AKT、p-AKT、p-GSK-3 β 、GSK-3 β 、T-Nrf2蛋白表达，检测对照组、模型组、ML385抑制剂组、丁苯酞治疗组、丁苯酞联合ML385处理组、丁苯酞组T-Nrf2、Nu-Nrf2蛋白表达。每孔加入RIPA裂解液，提取胞内总蛋白质，采用BCA法测定蛋白浓度，以SDS-PAGE电泳分离蛋白，将蛋白转移至PVDF膜，用5%脱脂牛奶室温封闭60-120 min，加入一抗AKT、p-AKT、p-GSK-3 β 、GSK-3 β 、T-Nrf2、Nu-Nrf2、增殖细胞核抗原、GAPDH(稀释比例均为1:1 000)于4 $^{\circ}$ C孵育过夜，加入二抗室温孵育1 h，使用ECL发光试剂盒进行显影。采用Image J 1.46软件测定灰度值并对条带进行分析。

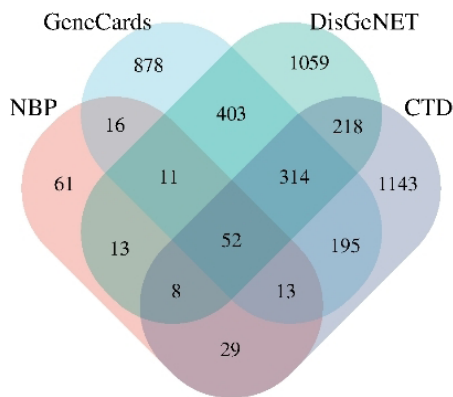
1.5 主要观察指标 丁苯酞治疗帕金森病的核心靶点；丁

苯酐与核心靶点 GSK-3 β 的结合能力; 各组 PC12 细胞活力、细胞内丙二醛与还原型谷胱甘肽水平、细胞内 AKT/GSK-3 β /Nrf2 信号通路相关蛋白表达。

1.6 统计学分析 采用 Graphpad prism 7.0 软件分析数据, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较使用 t 检验, 多组间采用单因素方差分析进行数据分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。该文统计学方法已经牡丹江医科大学生命科学院生物信息学教研室生物统计学专家崔荣军教授审核。

2 结果 Results

2.1 药物靶点、疾病靶点以及交集靶点的筛选 筛选后得到丁苯酐靶点 203 个, 获取帕金森病相关靶点, 其中 CTD 数据库中共获得 1 972 个帕金森病相关蛋白, DisGeNET 中共获得 2 078 个帕金森病相关靶点, GeneCards 中共获得 1 882 个帕金森病相关靶点。利用韦恩图将丁苯酐 203 个靶点基因和 3 个帕金森病数据库所得基因取交集, 共得到 52 个作用靶点 (图 1)。



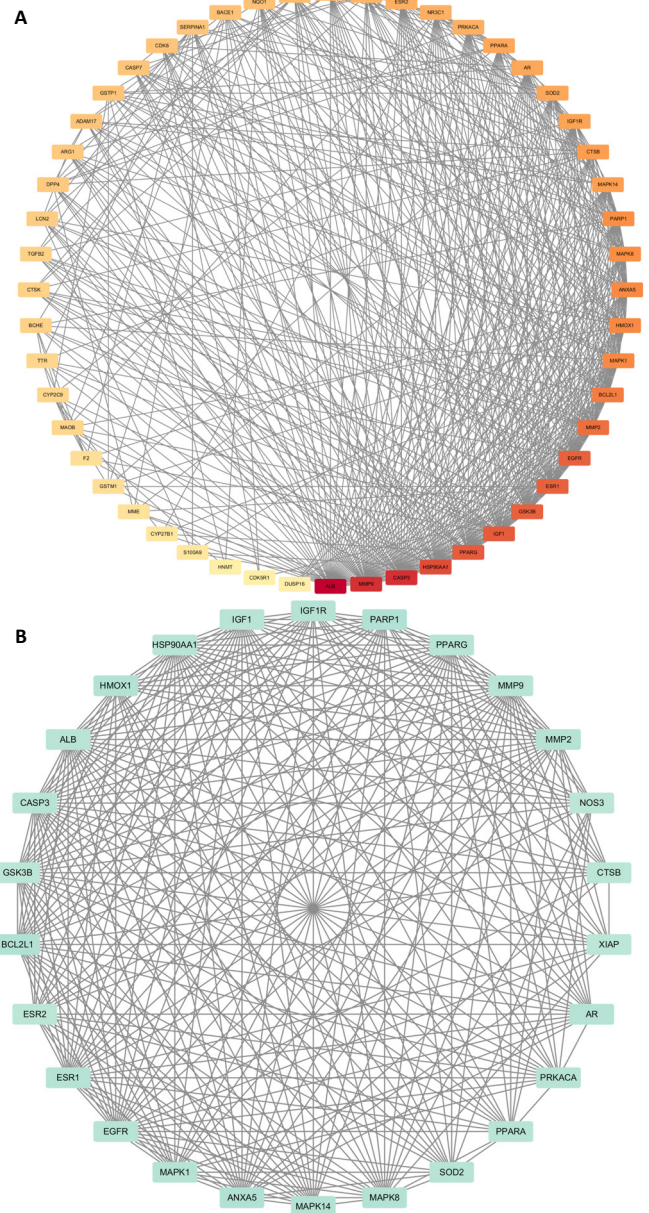
图注: NBP 代表获得的丁苯酐药物靶点; CTD、DisGeNET、GeneCards 代表 3 个数据库中共获得的帕金森病相关靶点。

图 1 | 丁苯酐 - 帕金森病靶点韦恩图

Figure 1 | Venn diagram of D1-3-n-butylphthalide-Parkinson's disease targets

2.2 药物 - 疾病 - 靶点网络构建并筛选核心靶点 将 52 个共有基因建立药物潜在靶点的蛋白质互作网络, 并导入 Cytoscape_v 3.10.1 软件, 利用 MCODE 算法筛选出核心靶点共 26 个, 包括基质金属蛋白酶 9、GSK-3 β 等 (图 2)。

2.3 KEGG 及 GO 富集分析结果 将 26 个核心靶点进行 KEGG 与 GO 富集分析, 进一步了解帕金森病相关的通路及功能, 将 KEGG 和 GO 富集分析中排名前 10 的结果绘制成气泡图, KEGG 结果主要富集于磷脂酰肌醇 3- 激酶 / AKT 等信号通路 (图 3A)。GO 分析结果显示, 生物过程主要包括对蛋白质磷酸化、氧化应激等反应 (图 3B), 分子功能主要包括 DNA 结合转录因子活性、蛋白质结合、蛋白激酶结合等 (图 3C), 细胞组分主要包括线粒体及细胞核等 (图 3D)。

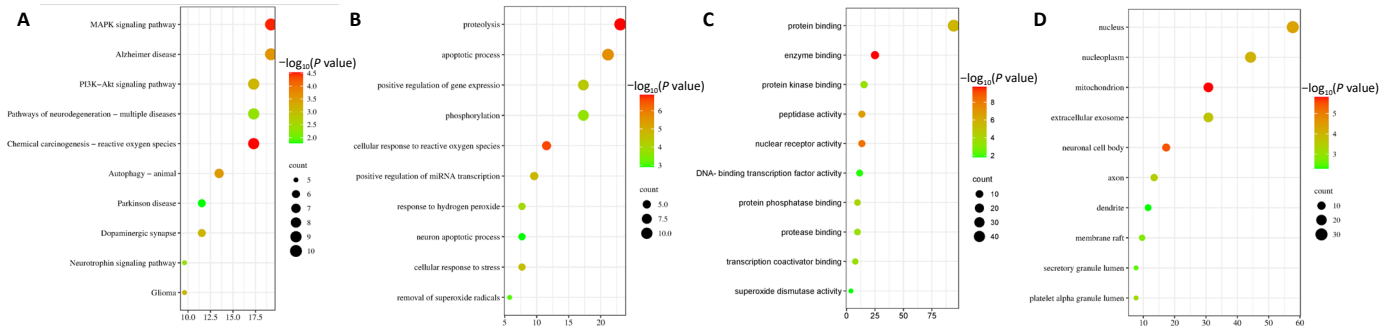


图注: 图 A 为丁苯酐治疗帕金森的潜在作用靶点共 52 个, 颜色越深, degree 值越高; B 为 MCODE 算法筛选出核心靶点共 26 个。

图 2 | 丁苯酐治疗帕金森病蛋白质互作网络图

Figure 2 | Protein-protein interaction network diagram of D1-3-n-butylphthalide treatment for Parkinson's disease

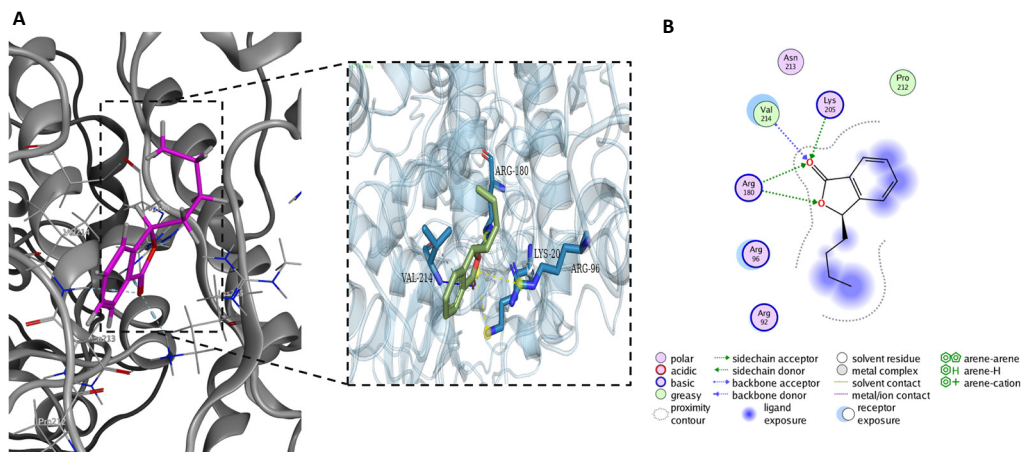
2.4 分子对接结果 利用 PDB 数据库筛选得到 GSK-3 β 的 3D 结构 (PDB ID:4AFJ), 与丁苯酐进行分子对接, 结果显示丁苯酐与 GSK-3 β 的结合口袋形成了合适的空间互补, 关键氨基酸包括 Arg180、Val214、Lys205。在结合口袋内, 丁苯酐与 GSK-3 β 的氨基酸残基 Val214 形成疏水相互作用力, 丁苯酐与 GSK-3 β 氨基酸残基 Arg180、Lys205 形成盐桥 (图 4)。一般认为当结合能 < 0 kJ/mol 时, 说明配体和受体可自发结合; 结合能 < -12.552 kJ/mol 时, 说明配体和受体具有一定的结合能力; 当结合能 < -29.288 kJ/mol 时, 说明配体和受体具有较强烈的结合能力^[16-17]。丁苯酐与 GSK-3 β 的结合能为 -18.27 kJ/mol, 表明丁苯酐与



图注：图 A 为 KEGG 富集分析；B-D 分别为 GO 功能富集分析中的生物过程、分子功能与细胞组分；图中圆点大小代表该项目所富集的基因数目，圆点越大所富集的基因数目越多，颜色深浅代表 P 值，颜色越深 P 值越小。

图 3 | 丁苯酞 - 帕金森病核心靶点 KEGG 通路及 GO 功能富集分析

Figure 3 | KEGG pathway and GO function enrichment analysis of D1-3-n-butylphthalide-Parkinson's disease core targets



图注：图 A 为丁苯酞 - GSK-3 β 残基互作 3D 视图；B 为丁苯酞 - GSK-3 β 残基互作 2D 视图。

图 4 | 丁苯酞与糖原合酶激酶 3 β (GSK-3 β) 的分子对接结构展示图

Figure 4 | Molecular docking structure of D1-3-n-butylphthalide and glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β)

GSK-3 β 具有一定的结合能力。

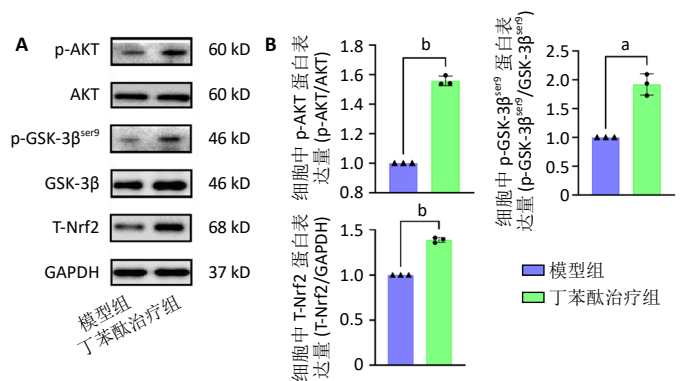
2.5 细胞实验验证结果

2.5.1 丁苯酞对帕金森病细胞模型 AKT/GSK-3 β /Nrf2 信号通路的影响 Western blot 检测结果显示，与模型组相比，丁苯酞治疗组 p-AKT、p-GSK-3 β 和 T-Nrf2 蛋白相对表达均高于模型组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)，见图 5。

2.5.2 丁苯酞调控 AKT/GSK-3 β -Nrf2 信号通路对帕金森病细胞模型活性的影响 CCK-8 检测结果表明，与对照组相比，模型组细胞活性显著下降 ($P < 0.001$)；与模型组相比，ML385 抑制剂组细胞活性显著下降 ($P < 0.001$)，丁苯酞治疗组细胞活性明显升高 ($P < 0.001$)；与丁苯酞治疗组相比，丁苯酞联合 ML385 处理组细胞活性显著下降 ($P < 0.01$)，见图 6。

2.5.3 丁苯酞调控 AKT/GSK-3 β -Nrf2 信号通路对帕金森病细胞模型氧化损伤的影响 与对照组相比，模型组还原型谷胱甘肽水平降低 ($P < 0.05$)，丙二醛水平升高 ($P < 0.05$)；与模型组相比，丁苯酞治疗组还原型谷胱甘肽水平升高 ($P < 0.05$)，丙二醛水平降低 ($P < 0.05$)；与丁苯酞治疗组相比，丁苯酞联合 ML385 处理组还原型谷胱甘肽水平降低 ($P < 0.05$)，丙二醛水平升高 ($P < 0.05$)，见图 7。

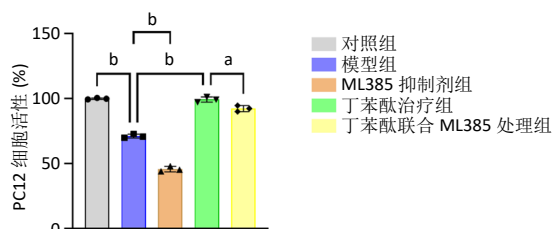
2.5.4 丁苯酞对帕金森病细胞模型 Nrf2 蛋白表达的影响 Western blot 检测结果显示，与对照组相比，模型组 T-Nrf2



图注：图 A 为 Western blot 检测 AKT/GSK-3 β /Nrf2 信号通路相关蛋白表达免疫印迹图；B 为蛋白表达定量分析。 $^aP < 0.05$ ， $^bP < 0.01$ 。GSK-3 β ：糖原合酶激酶 3 β ；Nrf2：核因子 E2 相关因子 2。

图 5 | 模型组与丁苯酞治疗组 PC12 细胞中 AKT/GSK-3 β /Nrf2 信号通路相关蛋白的表达

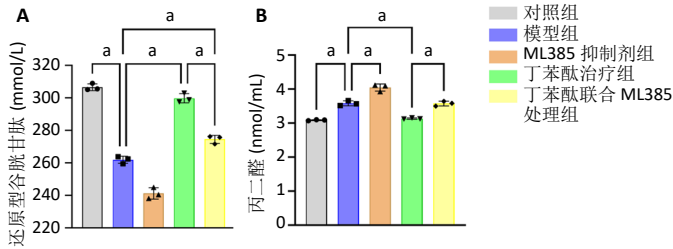
Figure 5 | Expression of proteins related to AKT/GSK-3 β /Nrf2 signaling pathway in PC12 cells in the model group and D1-3-n-butylphthalide treatment group



图注： $^aP < 0.01$ ， $^bP < 0.001$ 。

图 6 | 各组 PC12 细胞存活率的比较

Figure 6 | Comparison of PC12 cell survival rates in each group

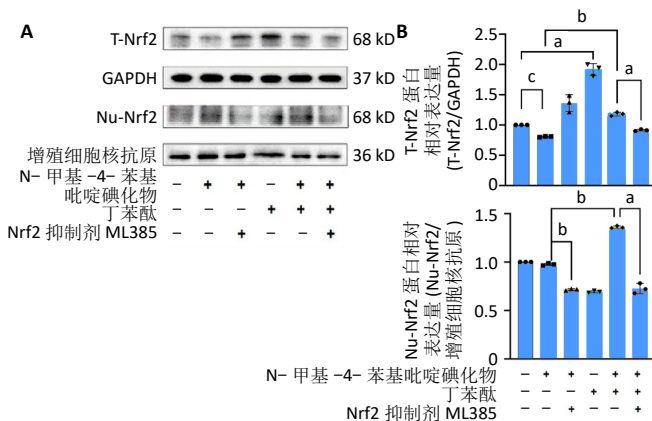


图注：图 A 为还原型谷胱甘肽水平；B 为丙二醛水平。^a $P < 0.05$ 。

图 7 | 各组 PC12 细胞还原型谷胱甘肽和丙二醛水平的比较

Figure 7 | Comparison of reduced glutathione and malondialdehyde levels in PC12 cells of each group

蛋白表达降低 ($P < 0.001$)，丁苯酞组、丁苯酞治疗组 T-Nrf2 蛋白表达升高 (P 均 < 0.05)；与模型组相比，丁苯酞治疗组 T-Nrf2 和 Nu-Nrf2 蛋白表达升高 (P 均 < 0.01)，ML385 抑制剂组 Nu-Nrf2 蛋白表达降低 ($P < 0.01$)；与丁苯酞治疗组相比，丁苯酞联合 ML385 处理组 T-Nrf2 和 Nu-Nrf2 蛋白表达均降低 (P 均 < 0.05)，见图 8。



图注：Nrf2 为核因子 E2 相关因子 2。图 A 为 Western blot 检测 T-Nrf2 和 Nu-Nrf2 蛋白表达免疫印迹图；B 为 T-Nrf2 和 Nu-Nrf2 蛋白表达定量分析。^a $P < 0.05$ ，^b $P < 0.01$ ，^c $P < 0.001$ 。

图 8 | 各组 PC12 细胞 T-Nrf2 和 Nu-Nrf2 蛋白表达的比较

Figure 8 | Comparison of T-Nrf2 and Nu-Nrf2 protein expressions in PC12 cells of each group

3 讨论 Discussion

Nrf2 是细胞中最重要的转录因子之一，在细胞应对氧化应激和维持氧化还原平衡中扮演关键角色。Nrf2 的调控涉及到 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1/Nrf2/ARE、磷脂酰肌醇 3-激酶/AKT/GSK-3 β /Nrf2、c-Jun 氨基末端激酶/Nrf2 和核因子 κ B 等多种信号转导通路^[18]。据报道，Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1 是调节 Nrf2 转录活性的主要蛋白^[19]。在正常生理条件下，Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1 通过构象改变与 Nrf2 的 Neh2 结构域结合，促进 Nrf2 的泛素化，最终导向蛋白酶体降解^[18, 20]。GSK-3 β 对 Nrf2 调控机制的研究较少，但 GSK-3 β 对 Nrf2 的调控同样具有重要意义，有研究指出 GSK-3 β 通过磷酸化 Nrf2 的 Neh6 结构域促进 Nrf2 与 E3 泛素连接酶 β -TrC 结合，最终

通过泛素-蛋白酶体途径降解 Nrf2^[19]。当机体在应激条件下暴露于有毒化合物以及活性氧后，Nrf2 信号通路会被激活，KEAP1 或 β -TrCP 介导泛素-蛋白酶体途径中断，Nrf2 从 KEAP1 或 β -TrCP 的结合中释放出来并转运到细胞核，与抗氧化反应原件 ARE 结合，从而激活 Nrf2 依赖性基因，促进抗氧化酶和抗氧化蛋白的表达^[5]。除此之外，Nrf2 通路还参与调控衰老、细胞凋亡、铁死亡、线粒体稳态等多种生理过程，因此靶向该通路是当前研究的热点^[21-23]。有关脑卒中、帕金森病、阿尔茨海默病等神经系统疾病的研究表明，通过 Nrf2 激活剂靶向激活 Nrf2 通路可以起到保护神经元，预防或治疗相关疾病的作用^[20, 24-26]。AKT/GSK-3 β 是调节 Nrf2 通路的重要部分，AKT 可以磷酸化调节 GSK-3 β 的活性，促进 GSK-3 β 的磷酸化，同时 GSK-3 β 又可调节 Nrf2 的降解，因此 AKT/GSK-3 β 调节 Nrf2 通路具有重要意义^[27-28]。

在帕金森病的研究中，丁苯酞作为一种潜在的治疗药物引起了广泛关注，近年来的研究表明，丁苯酞具有显著的神经保护作用，尤其是在缓解帕金森病相关的神经损伤方面显示了良好前景^[29-30]。此次实验系统性地探讨了丁苯酞在帕金森病治疗中的潜在机制，首先利用网络药理学进行筛选，获得丁苯酞与帕金森病相关的 52 个交集靶点，并构建了药物-疾病-靶点的蛋白质互作网络，结果显示 GSK-3 β 在丁苯酞的作用机制中可能起关键作用。KEGG 和 GO 富集分析结果显示，丁苯酞的核心靶点主要富集于磷脂酰肌醇 3-激酶/AKT 等信号通路，参与氧化应激等生物过程。有研究证实，磷脂酰肌醇 3-激酶/AKT 信号转导失调与帕金森病的发病机制有关，在帕金森病患者死后的多巴胺能神经元和帕金森病模型中 p-AKT 水平较低^[31-32]。GSK-3 β 是 AKT 重要底物，受 AKT 调节，参与糖原合成等重要过程，也有实验证明在鱼藤酮诱导的帕金森病模型中减轻神经元损伤和运动功能障碍与 AKT/GSK-3 β 有关^[33]。另有研究表明，激活 AKT 可使 GSK-3 β 发生磷酸化并促进转录因子 Nrf2 入核，这一过程与氧化应激和神经变性相关^[34-35]。Nrf2 是氧化应激反应中的关键因子，能激活抗氧化酶的表达，有研究指出激活 Nrf2 能够抑制氧化损伤，与帕金森病的发生发展关系密切^[36-37]。

分子对接结果显示丁苯酞与 GSK-3 β 的结合能为 -18.3 kJ/mol，表明丁苯酞与 GSK-3 β 具有一定的结合能力。为了进一步证实丁苯酞可能调控 AKT/GSK-3 β /Nrf2 信号通路对帕金森病模型发挥保护作用的猜想，此次研究采用高分化的 PC12 细胞进行实验，Western blot 检测表明，与模型组相比，丁苯酞显著升高了 p-AKT、p-GSK-3 β 、T-Nrf2 的蛋白表达，提示丁苯酞可以促进 AKT 和 GSK-3 β 的磷酸化，进而激活 AKT/GSK-3 β /Nrf2 信号通路。CCK-8 和 ELISA 检测表明，丁苯酞提高 N-甲基-4-苯基吡啶碘化物诱导

PC12 细胞的细胞活性,降低氧化应激标志物丙二醛水平并提高抗氧化标志物还原型谷胱甘肽水平,但使用 Nrf2 抑制剂 ML385 后逆转了实验结果,说明丁苯酞可以通过 AKT/GSK-3 β /Nrf2 信号通路发挥抗氧化的能力、改善 PC12 细胞活性。通过 Western blot 检测进一步探究丁苯酞调控 AKT/GSK-3 β /Nrf2 信号通路对帕金森病模型的影响,实验结果表明,与模型组相比,丁苯酞治疗能够促进 Nu-Nrf2 的表达,而使用 Nrf2 抑制剂 ML385 后逆转了这一结果,提示丁苯酞极有可能活化了 Nrf2 通路并促进 Nrf2 的核转位,进而促进抗氧化酶的表达。综上所述,丁苯酞可能通过调节 N-甲基-4-苯基吡啶碘化物诱导的 PC12 细胞 AKT 和 GSK-3 β 的磷酸化,进而阻止 Nrf2 的降解,促进 Nrf2 的核转位,最终促进还原型谷胱甘肽等抗氧化酶的表达,降低细胞氧化应激水平,改善细胞活力。

既往研究表明,姜黄素、槲皮素、白藜芦醇等多酚类药物可以调控 Nrf2 信号通路保护神经元,预防神经退行性疾病^[38-39]。有研究指出丁苯酞作为一种多酚类化合物,能够调控磷脂酰肌醇 3-激酶/AKT、Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1/Nrf2 等信号通路发挥神经保护作用。也有实验表明,丁苯酞对 N-甲基-4-苯基吡啶碘化物诱导的 PC12 细胞具有保护作用,但具体分子作用机制尚不明确^[40-41]。CHEN 等^[40]通过小鼠血管性痴呆模型研究发现,丁苯酞通过激活磷脂酰肌醇 3-激酶/AKT 信号通路显著改善小鼠脑组织氧化应激水平、炎症反应及细胞凋亡标志物表达。LIU 等^[42]研究发现,丁苯酞可以通过激活 Nrf2 信号通路来减少偏头痛小鼠模型的氧化应激和炎症反应。与以往研究一致,此次研究结果进一步表明,丁苯酞的神经保护作用是通过调控 AKT/GSK-3 β /Nrf2 信号通路进而增强细胞抗氧化应激的能力。

此次研究创新性地探讨了丁苯酞通过调控 AKT/GSK-3 β /Nrf2 信号通路抑制氧化应激、改善细胞活性的机制,为帕金森病的治疗和药物研发提供了科学依据。但该研究仍有一些局限性:①由于采用高分化的 PC12 细胞进行实验,这种细胞模型虽然能够模拟神经元的部分特性,但与真实的神经系统环境相比仍有一定差异。未来的研究需要使用更多种类的神经元细胞模型,如鼠原代神经细胞、人多巴胺能神经元或诱导多能干细胞模型,以更准确地反映丁苯酞在神经元中的作用。②缺乏具体的动物实验数据,尚无法全面验证丁苯酞在更复杂生物体中的效果和机制。因此,未来的研究需要在动物模型中进一步验证并探索丁苯酞在生物体内的作用机制。③丁苯酞在体外实验中显示出良好的神经保护作用,但其长期使用对人体的安全性仍需进一步评估。在充分了解丁苯酞的体内作用机制和安全性后,未来的研究需要进行临床前研究,以评估其在临床上的可行性和潜在治疗效果。

作者贡献: 张鑫负责课题实验设计、数据整理与文章撰写,郭宝娟负责课题实验和数据收集,徐慧鑫和沈玉珍负责数据分析与统计,杨晓帆负责课题设计,杨旭芳负责资料查阅及理论指导,陈培负责基金支持、课题指导和审查。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 该文章撰写遵守了国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- [1] DORSEY ER, BLOEM BR. The Parkinson Pandemic—A Call to Action. *JAMA Neurol.* 2018;75(1):9.
- [2] INGELSSON M. Alpha-Synuclein Oligomers-Neurotoxic Molecules in Parkinson's Disease and Other Lewy Body Disorders. *Front Neurosci.* 2016;10:408.
- [3] SCHAPIRA AH. Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2008;7(1):97-109.
- [4] ZHANG L, GUO Z, WANG Y, et al. The protective effect of kaempferol on heart via the regulation of Nrf2, NF- κ B, and PI3K/Akt/GSK-3 β signaling pathways in isoproterenol-induced heart failure in diabetic rats. *Drug Dev Res.* 2019;80(3):294-309.
- [5] CHEN N, HU M, JIANG T, et al. Insights into the molecular mechanisms, structure-activity relationships and application prospects of polysaccharides by regulating Nrf2-mediated antioxidant response. *Carbohydr Polym.* 2024;333:122003.
- [6] SHAN HUANG S, ZHOU B, XIAN ZENG G, et al. Neuroprotective effect and mechanism of butylphthalide after cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *Folia Neuropathol.* 2021;59(2):131-142.
- [7] ZHAO F, LUO Y. Potential Protective Effect of DL-3-n-butylphthalide on Chronic Cerebral Ischemia Brain Injury. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2022;21(9):734-737.
- [8] HUANG Y, PAN L, WU T. Improvement of cerebral ischemia-reperfusion injury by L-3-n-butylphthalide through promoting angiogenesis. *Exp Brain Res.* 2021;239(1):341-350.
- [9] LI F, MA Q, ZHAO H, et al. L-3-n-Butylphthalide reduces ischemic stroke injury and increases M2 microglial polarization. *Metab Brain Dis.* 2018;33(6):1995-2003.
- [10] NIU XL, JIANG X, XU GD, et al. DL-3-n-butylphthalide alleviates vascular cognitive impairment by regulating endoplasmic reticulum stress and the Shh/Ptch1 signaling-pathway in rats. *J Cell Physiol.* 2019;234(8):12604-12614.
- [11] BAI M, PAN CL, JIANG GX, et al. Effects of butylphthalide on oxidative stress and inflammatory response in rats with myocardial infarction through Akt/Nrf2 signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2019;23(21):9642-9650.
- [12] WANG BN, WU CB, CHEN ZM, et al. DL-3-n-butylphthalide ameliorates diabetes-associated cognitive decline by enhancing PI3K/Akt signaling and suppressing oxidative stress. *Acta Pharmacol Sin.* 2021;42(3):347-360.

- [13] LIU T, WANG P, YIN H, et al. Rapamycin reverses ferroptosis by increasing autophagy in MPTP/MPP+ induced models of Parkinson's disease. *Neural Regen Res.* 2023;18(11):2514-2519.
- [14] FANG Y, ZHENG Y, GAO Q, et al. Activation of the Nrf2/Keap1 signaling pathway mediates the neuroprotective effect of Perillyl alcohol against cerebral hypoxic-ischemic damage in neonatal rats. *Redox Rep.* 2024; 29(1):2394714.
- [15] CHEN N, ZHOU Z, LI J, et al. 3-n-butylphthalide exerts neuroprotective effects by enhancing anti-oxidation and attenuating mitochondrial dysfunction in an in vitro model of ischemic stroke. *Drug Des Dev Ther.* 2021;42(3):347-360.
- [16] 白延璐, 张阔, 张宇, 等. 基于网络药理学和分子对接技术探究百合固金汤在肺结核治疗中的作用 [J]. *解剖科学进展*, 2024,30(6): 593-598.
- [17] 韩泽璐, 沈丽萍, 姜怡, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 联合网络药理学和分子对接技术探讨益气养阴方治疗非小细胞肺癌的潜在作用机制 [J]. *新中医*, 2024,56(20):156-168.
- [18] MURAKAMI S, KUSANO Y, OKAZAKI K, et al. NRF2 signalling in cytoprotection and metabolism. *Br J Pharmacol.* 2023. doi: 10.1111/bph.16246.
- [19] BRACKHAN M, ARRIBAS-BLAZQUEZ M, LASTRES-BECKER I. Aging, NRF2, and TAU: A Perfect Match for Neurodegeneration? *Antioxidants (Basel).* 2023;12(8):1564.
- [20] WANG J, CAO Y, LU Y, et al. Recent progress and applications of small molecule inhibitors of Keap1-Nrf2 axis for neurodegenerative diseases. *Eur J Med Chem.* 2024;264:115998.
- [21] ANANDHAN A, CHEN W, NGUYEN N, et al. α -Syn overexpression, NRF2 suppression, and enhanced ferroptosis create a vicious cycle of neuronal loss in Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med.* 2022; 192:130-140.
- [22] AMOROSO R, MACCALLINI C, BELLEZZA I. Activators of Nrf2 to Counteract Neurodegenerative Diseases. *Antioxidants.* 2023;12(3):778.
- [23] YAN R, LIN B, JIN W, et al. NRF2, a Superstar of Ferroptosis. *Antioxidants.* 2023;12(9): 1739.
- [24] MAYER C, RIERA-PONSATI L, KAUPPINEN S, et al. Targeting the NRF2 pathway for disease modification in neurodegenerative diseases: mechanisms and therapeutic implications. *Front Pharmacol.* 2024;15: 1437939.
- [25] SAHA S, BUTTARI B, PROFUMO E, et al. A Perspective on Nrf2 Signaling Pathway for Neuroinflammation: A Potential Therapeutic Target in Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *Front Cell Neurosci.* 2021;15:787258.
- [26] WANG L, ZHANG X, XIONG X, et al. Nrf2 Regulates Oxidative Stress and Its Role in Cerebral Ischemic Stroke. *Antioxidants.* 2022;11(12):2377.
- [27] LEKSHMI VS, ASHA K, SANICAS M, et al. PI3K/Akt/Nrf2 mediated cellular signaling and virus-host interactions: latest updates on the potential therapeutic management of SARS-CoV-2 infection. *Front Mol Biosci.* 2023;10:1158133.
- [28] MANNING BD, TOKER A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell.* 2017;169(3):381-405.
- [29] 胡琪, 陶雪, 蒋敏, 等. 丁苯酞治疗帕金森病研究进展 [J]. *医药导报*, 2023,42(2):203-207.
- [30] 谷伟, 孙梓旭, 孙光宁, 等. 丁苯酞联合重复经颅磁刺激治疗对帕金森病患者认知功能和脑血流动力学的影响 [J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2024,27(5):573-577.
- [31] MALAGELADA C, JIN ZH, GREENE LA. RTP801 is induced in Parkinson's disease and mediates neuron death by inhibiting Akt phosphorylation/activation. *J Neurosci.* 2008;28(53):14363-14371.
- [32] FAHMY MI, KHALAF SS, ELRAYESS RA. The neuroprotective effects of alpha lipoic acid in rotenone-induced Parkinson's disease in mice via activating PI3K/AKT pathway and antagonizing related inflammatory cascades. *Eur J Pharmacol.* 2024;980:176878.
- [33] ARAB HH, SAFAR MM, SHAHIN NN. Targeting ROS-Dependent AKT/GSK-3 β /NF- κ B and DJ-1/Nrf2 Pathways by Dapagliflozin Attenuates Neuronal Injury and Motor Dysfunction in Rotenone-Induced Parkinson's Disease Rat Model. *ACS Chem Neurosci.* 2021;12(4): 689-703.
- [34] ROJO AI, SAGARRA MR, CUADRADO A. GSK-3 β down-regulates the transcription factor Nrf2 after oxidant damage: relevance to exposure of neuronal cells to oxidative stress. *J Neurochem.* 2008;105(1): 192-202.
- [35] YE Z, LI C, LIU S, et al. DL-3-n-butylphthalide activates Nrf2, inhibits ferritinophagy, and protects MES23.5 dopaminergic neurons from ferroptosis. *Chem Biol Interact.* 2023;382:110604.
- [36] LIU HB, LI QY, ZHANG XD, et al. The neuroprotective effects of Galectin-1 on Parkinson's Disease via regulation of Nrf2 expression. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2022;26(2):623-636.
- [37] NIU Y, ZHANG J, DONG M. Nrf2 as a potential target for Parkinson's disease therapy. *J Mol Med (Berl).* 2021;99(7):917-931.
- [38] GHAFOURI-FARD S, SHOOREI H, BAHROUDI Z, et al. Nrf2-Related Therapeutic Effects of Curcumin in Different Disorders. *Biomolecules.* 2022;12(1):82.
- [39] MORATILLA-RIVERA I, SÁNCHEZ M, VALDÉS-GONZÁLEZ J A, et al. Natural Products as Modulators of Nrf2 Signaling Pathway in Neuroprotection. *Int J Mol Sci.* 2023;24(4):3748.
- [40] CHEN Y, WU T, LI H, et al. DL-3-n-Butylphthalide Exerts Dopaminergic Neuroprotection Through Inhibition of Neuroinflammation. *Front Aging Neurosci.* 2019;11:44.
- [41] LUO R, ZHU L, ZENG Z, et al. DL-butylphthalide inhibits rotenone-induced oxidative stress in microglia via regulation of the Keap1/Nrf2/HO-1 signaling pathway. *Exp Ther Med.* 2021;21(6):597.
- [42] LIU Y, GONG Z, ZHAI D, et al. Unveiling the therapeutic potential of DL-3-n-butylphthalide in NTG-induced migraine mouse: activating the Nrf2 pathway to alleviate oxidative stress and neuroinflammation. *J Headache Pain.* 2024;25(1):50.

(责任编辑: ZLJ, GW, ZN, QY)