獐牙菜对皮质酮诱导PC12细胞损伤的保护作用

何志勇[1a],盛望龙[1b],盛冠麟[2],李竣[1b],黄先菊[1b*]

(1 中南民族大学 a.实验教学与工程训练中心、创新创业学院; b.药学院,湖北 武汉,430074; 2 鄂州职业大学,湖北 鄂州,436000)

摘 要 通过构建PC12细胞损伤模型,探究獐牙菜(*Swertia bimaculata*,SB)水提物对神经细胞的保护作用及潜在分子作用机制,旨在为獐牙菜的开发与利用提供理论依据.使用皮质酮(corticosterone,CORT)诱导PC12细胞损伤模型,MTT法检测细胞活力,以丁螺环酮(BUS)为阳性对照,ELISA法测定各组细胞内cAMP水平,qRT-PCR法检测各组细胞*PKA*、*CREB*、*BDNF*和*5-HT1AR* mRNA的表达,探究SB对PC12细胞损伤的保护效应.结果表明:SB能显著减轻CORT引起的PC12细胞损伤,上调神经再生关键信号通路(PKA-CREB-BDNF)和五羟色胺1A受体(*5-HT1AR*)mRNA水平,以及细胞内cAMP水平.说明SB通过调节cAMP/PKA-CREB-BDNF信号通路和促进*5-HT1AR*的转录水平,对CORT诱导的PC12细胞损伤具有神经保护作用.

关键词 焦虑障碍;獐牙菜;神经细胞

中图分类号 R285.5 **文献标志码** A **文章编号** 1672-4321(2026)04-0477-06

doi:10.20056/j.cnki.ZNMDZK.20260706

Protective effect of *Swertia bimaculata* on corticosterone induced damage to PC12 cells

He Zhiyong[1a],Sheng Wanglong[1b],Sheng Guanlin[2],Li Jun[1b],Huang Xianju[1b*]

(1 South-Central Minzu University, a. Experimental Teaching and Engineering Training Center and Innovation (Entrepreneurship College); b. School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan 430074, Hubei China; 2 Ezhou Vocational University, Ezhou 436000, Hubei China)

Abstract To investigate the effects and potential molecular mechanisms of water extracts of *Swertia bimaculata* (SB) on nervous system cells by constructing PC12 cell injury models *in vitro*, in order to provide theoretical basis for the utilization of Swertia. An *in vitro* cellular model of anxiety disorders was constructed using corticosterone (CORT) to induce PC12 cell injury to investigate the potential molecular mechanisms underlying the protective effects of aqueous extracts of SB on neuronal cells. Cell viability was detected by MTT assay. Buspirone (BUS) was used as positive control to explore the protective effect of SB on PC12 cells. ELISA kit was used to measure intracellular cAMP level in each group. The mRNA expression of *PKA*、*CREB*、*BDNF* and *5-HT1AR* was detected by qRT-PCR. The results indicated that SB significantly attenuated CORT-induced PC12 cell injury and up-regulated key signalling pathways for nerve regeneration (PKA-CREB-BDNF) and *5-HT1AR* mRNA levels, as well as intracellular cAMP levels. In conclusion, the present study revealed that SB was neuroprotective against CORT-induced PC12 cell injury by modulating the cAMP/PKA-CREB-BDNF signaling pathway and promoting the transcriptional level of 5-HT1AR.

Keywords anxiety disorder; *Swertia bimaculata*; nervous system cells

獐牙菜属植物全球现有170多种植物,我国现存约80种,目前药用种类约有40种,主要分布于我国云南、西藏和四川等西南地区[1].《晶珠本草》中记载獐牙菜属植物性味苦寒[2],该属大多具有清热、解

收稿日期 2024-07-18

***通信作者** 黄先菊(1972-),女,教授,博士,研究方向:民族药物药理学和毒理学,E-mail:xianju@mail.scuec.edu.cn

基金项目 湖北省重点研发计划项目(2024BBB033);湖北省国际合作基地(SH2311)

毒、利胆、退黄、保肝和健胃等功效,用于治疗黄疸型肝炎、肝硬化、肝腹水和胆囊炎等各种肝胆疾病,以及扁桃体、肠、肺、骨髓等器官的炎症[3-4]. 目前獐牙菜作为主药或配伍参与多种方剂的使用,临床上常用的有二十五味獐牙菜丸、八味獐牙菜丸、四味藏茵陈汤和八味獐牙菜散等[5]. 獐牙菜属的化学成分主要分为:呫酮及其苷类、黄酮及其苷类、环烯醚萜及其苷类、三萜及其苷类[1]. 其特征成分獐牙菜苦苷具有保肝、降糖、调脂、抗炎和免疫调节、抑制中枢神经、镇痛镇静等作用[6]. 獐牙菜苷具有抗肝纤维化、保肝作用、骨保护作用、抗炎、抑制黑色素合成、抗肿瘤、心脏保护、脑神经保护和降糖等作用[7-8].

机体处于焦虑障碍和应激反应时,可激活HPA轴,促进糖皮质激素的大量分泌(如皮质酮,Corticosterone,CORT),作用于中枢神经系统的糖皮质激素受体,造成神经组织和细胞损伤,诱导焦虑障碍的发展与发生[9-10]. 大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤PC12细胞是一个常用的神经细胞株,其细胞膜上有丰富的糖皮质激素受体,由于容易获取,增殖较快,具有神经细胞的普遍特征的优点,是目前广泛应用离子通道、受体、神经递质等神经生理学和神经药理学研究领域的神经细胞系[11]. 因此,根据PC12细胞株特点,以高浓度CORT诱导PC12细胞损伤可以模拟体外焦虑障碍神经细胞损伤状态[12].

本研究使用CORT诱导PC12细胞损伤,构建体外焦虑障碍细胞模型,评价SB水提物对神经细胞保护作用的潜在分子机制,为獐牙菜防治焦虑障碍提供进一步的研究依据.

1 材料与方法

1.1 药物及制备

獐牙菜于2021年9月采自湖北恩施新塘乡,经中南民族大学刘虹博士鉴定为獐牙菜 *Swertia bimaculata* ,凭证标本保存于中南民族大学标本馆(编号:HSN5396). 獐牙菜水提物制备方法如下:粉碎全草过65目筛后,称取药粉240 g,在蒸馏水中浸泡24 h(液料比8∶1),在80 ℃下煎煮3次,每次3 h,得到水煎液. 过滤后在55 ℃下旋转蒸发,得浓缩浸膏并用塑料薄膜密封,置于-80℃冰箱中冷冻24 h后真空冷冻干燥48 h,获得水提物干燥粉末44 g. 提取物得率为18.33%,1 g干粉相当于5.45 g生药. 精密称取适量SB、BUS和CORT样品,用完全培养基溶解后稀释到相应的工作浓度,现用现配.

1.2 实验细胞

PC12细胞(大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤细胞),由武汉大学中国典型培养物保藏中心提供.

1.3 主要试剂与仪器

胎牛血清(FBS)(杭州天杭);RPMI-1640基础培养基(美国Gibco);胰蛋白酶(Biofrox);双抗(青霉素-链霉素)(北京敖擎);二甲基亚砜(DMSO)(国药集团);盐酸丁螺环酮、皮质酮(上海笛柏);TRNzol Universal(天根生化);ABScript Ⅱ I RT Master Mix for qPCR试剂盒、2X Universal SYBR Green Fast qPCR Mix(爱博泰克);噻唑蓝(MTT)(兰杰柯);cAMP ELISA试剂盒(广州艾尔吉). CO_2培养箱,(HF151/212型,香港立康);PCR扩增仪(TC1000-G型,美国赛洛捷克);实时荧光定量PCR仪(ABI7500 fast型,美国赛默飞);全波长酶标仪(A-5082型,瑞士TECAN);倒置显微镜(重庆奥特);高速离心机(DM0412S型,美国SCILOGEX).

1.4 实验方法

1.4.1 PC12细胞培养和药物安全剂量范围的探索

用10%体积含量胎牛血清+1%体积含量青霉素-链霉素+89%体积含量RPMI-1640培养基培养PC12细胞,放置于37 ℃,5% CO_2饱和湿度的培养箱中,当细胞生长融合至80%时进行传代,选取处于对数生长期的细胞进行试验. 药物安全剂量范围的筛选:将PC12细胞以5×10^4个/孔的密度接种于96孔板中,置于37 ℃、5% CO_2饱和湿度的培养箱中过夜后,弃去细胞上清液,分别按照0、12.5、50、100和200 μg·mL^{-1}浓度梯度加入SB和BUS进行给药,每孔200 μL,作用24 h后MTT法测定细胞活力.

1.4.2 CORT造模浓度的筛选

用完全培养基将PC12细胞浓度调整为5×10^4/mL,置于96孔板中,每孔加入50 μL细胞悬浮液+50 μL完全培养基,在37 ℃、5% CO_2饱和湿度的培养箱中过夜后,弃去细胞上清液,将PC12细胞暴露于0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mmol·L^{-1} CORT溶液下作用24 h,MTT法检测细胞活力,以确定合适的造模条件.

1.4.3 实验设计分组

根据1.4.1药物安全剂量范围的探索结果选择0.2 mmol·L^{-1} CORT诱导PC12细胞建立神经细胞损伤模型,实验设计分为5组:正常对照组(normal control,NC):只用RPMI-1640完全培养基进行处理;模型对照组(Model Control,MC):0.2 mmol·L^{-1} CORT进行处理;湖北产獐芽菜全草水提物低剂量组(SB-L)

组(0.2 mmol·L^{-1} CORT+25 μg·mL^{-1} SB);湖北产獐芽菜全草水提物高剂量组(SB-H)组(0.2 mmol·L^{-1} CORT+50 μg·mL^{-1} SB);丁螺环酮(BUS)组(0.2 mmol·L^{-1} CORT+25 μg·mL^{-1} BUS). 将处于对数生长期的PC12细胞消化离心、稀释到相应的浓度后用于实验,各组按照相应的药物种类和浓度同时给药,作用24 h后测定相应的指标.

1.4.4　MTT法检测细胞活力

细胞经分组处理24 h后,吸弃上清,每孔加入50 μL DMEM+20 μL MTT(5 mg·mL^{-1}),4 h后吸弃上清液,每孔加入150 μL DMSO,使用酶标仪在490 nm波长处测定吸光度值,计算细胞活力.

1.4.5　cAMP含量的测定

按实验分组进行给药24 h后,收集PC12细胞上清液用以检测环磷酸腺苷(cAMP)的含量;根据cAMP ELISA试剂盒说明书操作,在450 nm处波长下检测其吸光度并计算其浓度.

1.4.6　qRT-PCR检测相关基因

以*GAPDH*为参照基因,采用qRT-PCR检测依赖cAMP的蛋白激酶(cAMP-dependent protein kinase, PKA)、环磷腺苷效应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB)、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)和5-羟色胺1A受体(Serotonin1A receptor, 5-HT1AR)mRNA水平. 首先将PC12细胞以1×10^5/mL浓度接种于6孔板中,按照1.4.3进行给药24 h后弃去细胞上清液,PBS清洗2遍后,然后使用TRNzol试剂提取PC12细胞总RNA,再对总RNA进行逆转录. 最后通过qRT-PCR仪检测相关基因的水平,涉及引物序列见表1. $2^{-\Delta\Delta CT}$法计算基因相对表达量.

表1　qRT-PCR引物序列

Tab. 1　qRT-PCR Primer Sequences

Gene name	Primer sequences 5′-3′
GAPDH	F:ATGGGTGTGAACCACGAGA
	R:CAGGGATGATGTTCTGGGCA
5-HT1AR	F:GCTCATTGGCTTTCTCATCTCC
	R:TTTCCACCTTCTTGACCGTCTT
BDNF	F:AGGTCTGACGACGACATCACT
	R:CTTCGTTGGGCCGAACCTT
CREB	F:TGGAGCCGAGAACCAGCAGAG
	R:GAGTTACGGTGGGAGCAGATGATG
PKA	F:CTAAAGCAGATCGAGCACACTC
	R:GCCACCAGCTACATACTCCA

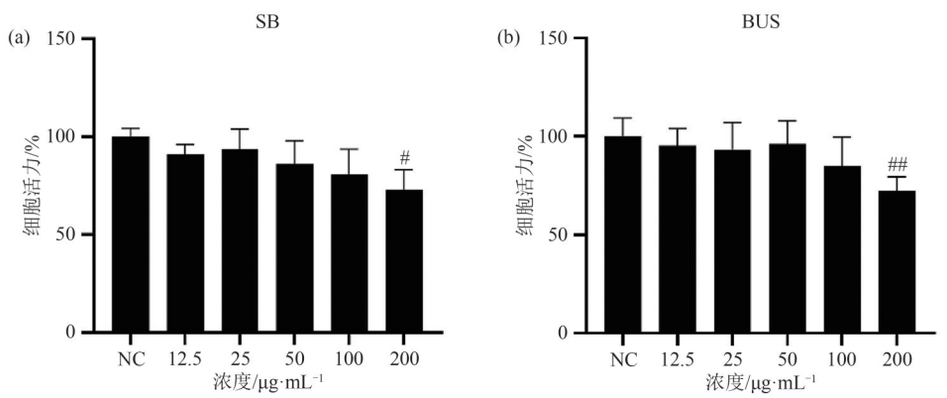
1.4.7　统计分析

实验数据使用GraphPad Prism 8软件进行统计分析. 数据以平均值±标准差(mean±SD)表示. 统计学方法采用ANOVA分析,P<0.05为具有统计学显著差异.

2　结果与讨论

2.1　獐牙菜对CORT诱导的PC12细胞的细胞存活率的影响

与NC组相比,当SB浓度逐渐增加到100 μg·mL^{-1}时SB不具有细胞毒性,而SB浓度增加到200 μg·mL^{-1}后,PC12细胞的存活率显著降低(P<0.05;图1(a));当阳性对照组BUS浓度逐渐增加到100 μg·mL^{-1}时BUS不具有细胞毒性,而BUS浓度增加到200 μg·mL^{-1}后,PC12细胞的存活率显著降低(P<0.01;图1(b)). 在确保药物安全剂量范围下,最终确定SB-L、SB-H和BUS各组给药浓度为分别为25 μg·mL^{-1}、50 μg·mL^{-1}和25 μg·mL^{-1}.



与NC组相比,$^{\#}P$<0.05,$^{\#\#}P$<0.01.

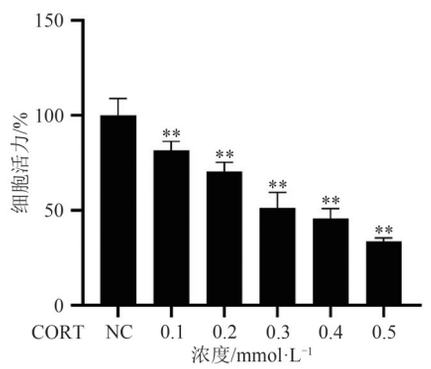
(a) 不同浓度SB对PC12细胞的影响;(b) 不同浓度BUS对PC12细胞的影响

图1　SB和BUS对PC12细胞活力的影响(n=5)

Fig. 1　Effects of SB and BUS on the viability of PC12 cells (n=5)

2.2 CORT诱导PC12细胞损伤模型

BDNF调节突触可塑性影响突触和神经元存活,通过参与各种细胞过程,如CRS诱导的情绪障碍中HPA轴的调节[13-14]. HPA轴与焦虑障碍之间具有密切关系,过度应激导致HPA轴的激活后,其血浆中CORT水平显著升高,导致海马区树突收缩[15]. 此外,CORT促进兴奋性氨基酸的释放,间接调节Glu和γ-GABA的释放,影响多种精神障碍疾病(如焦虑症、抑郁症)的发生、发展[16]. 实验结果显示(图2),与NC组相比,CORT对PC12细胞的损伤程度与浓度成正比关系,0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mmol·L^{-1}CORT作用于PC12细胞24 h后,细胞存活率均明显下降,其中0.2 mmol·L^{-1}CORT对PC12细胞的损伤率约为70%(P<0.01),表明较高剂量CORT可引起神经细胞的损害. 因此,本研究采用0.2 mmol·L^{-1}CORT对PC12细胞进行干预24 h,模拟焦虑障碍神经细胞损伤状态.



与NC组相比,**P<0.01.

图2 CORT诱导PC12细胞损伤模型的造模浓度筛选(n=5)

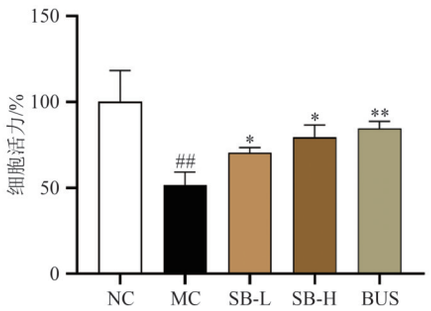
Fig. 2 Selection of modeling concentration for CORT induced PC12 cell injury model (n=5)

2.3 獐牙菜对CORT诱导的PC12细胞损伤的活力评估

实验结果显示(图3),与NC组相比,MC组有明显差异性(P<0.01);25 μg·mL^{-1}和50 μg·mL^{-1} SB对0.2 mmol·L^{-1} CORT诱导的PC12细胞具有保护和增殖作用,且与MC组比较有明显差异(P<0.05). 其作用与阳性对照药BUS一致.

2.4 獐牙菜对CORT诱导的PC12细胞中cAMP水平的影响

cAMP作为机体内传递信息的"第二信使",具有调节体内物质代谢、激素分泌和神经可塑性等作用,参与包括突触信息传递等体内多种生理和病理过程. 当单胺类神经递质与GPCRs结合后激活cAMP,cAMP能增强中枢神经系统PKA的活性,活化后的

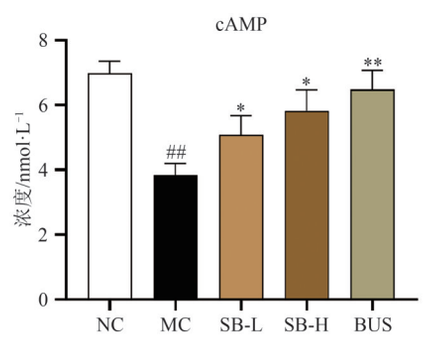


与NC组相比,##P<0.01;与MC组相比,*P<0.05,**P<0.01.

图3 SB-L、SB-H对0.2 mmol·L^{-1}皮质酮诱导的PC12细胞活力的影响(n=5)

Fig. 3 Effects of SB-L and SB-H on the viability of PC12 cells induced by 0.2 mmol·L^{-1}corticosterone (n=5)

PKA磷酸化转录因子CREB. CREB参与细胞信号转导,具有调控多种神经系统机能的能力[17]. 而活化后的CREB进一步对下游生长因子BDNF表达进行调控,从而发挥神经保护作用[18]. Geng[19]等采用慢性束缚建立焦虑障碍大鼠模型,发现其海马和前额叶皮质中cAMP和PKA浓度,CREB和BDNF mRNA水平显著降低,经郁合欢胶囊治疗后逆转了这种情况并有效改善了大鼠焦虑样行为. CORT诱导的PC12细胞中cAMP水平(图4)ELISA检测结果表明:与NC组相比,MC组有明显差异性(P<0.01);与MC组相比,SB-L和SB-H对0.2 mmol·L^{-1} CORT诱导的PC12细胞内cAMP水平显著下降(P<0.05),能不同程度地提高细胞内cAMP水平. 其作用与阳性对照药BUS一致.



与NC组相比,##P<0.01;与MC组相比,*P<0.05,**P<0.01.

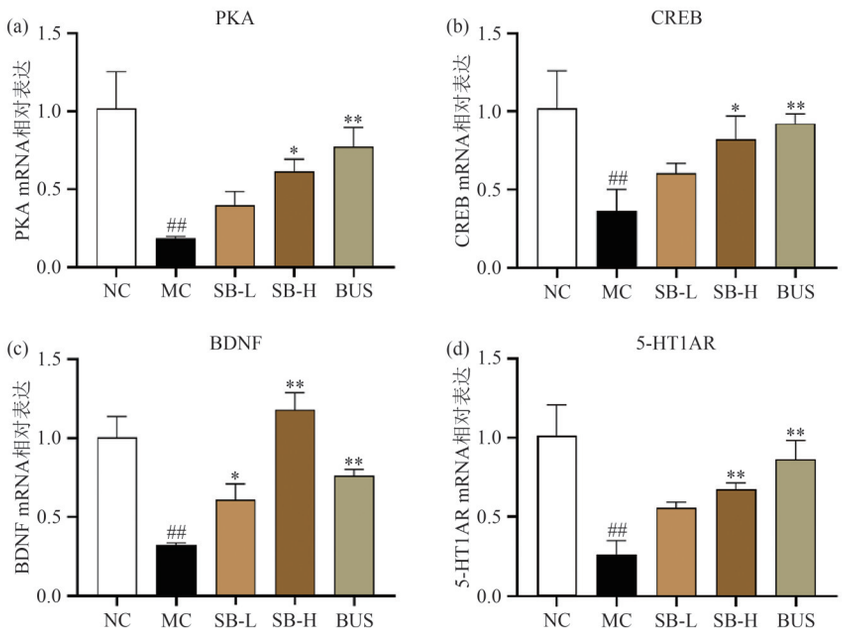
图4 SB-L、SB-H对0.2 mmol·L^{-1}皮质酮诱导的PC12细胞内cAMP水平的影响(n=5)

Fig. 4 Effects of SB-L and SB-H on cAMP levels in PC12 cells induced by 0.2 mmol·L^{-1} corticosterone (n=5)

2.5 獐牙菜对PKA、CREB、BDNF和5-HT1AR mRNA水平的影响

5-HT1AR作为一种典型的G蛋白偶联受体,参与调节cAMP/PKA-CREB-BDNF信号通路. 在5-HT1AR敲除模型的研究中,患有5-HT1AR缺乏症的动物表

现出更高水平的焦虑[20]. BUS能激活突触前部分5-HT1AR，临床上常用于治疗焦虑障碍[21]. q-RT PCR结果（图5）显示，与NC组相比，MC组有明显差异性（P<0.01）；0.2 mmol·L^{-1} CORT组PC12细胞中的*PKA*、*CREB*、*BDNF*和*5-HT1AR*的mRNA水平较NC组显著下调（P<0.01）. 与MC组相比，SB-L和SB-H均能不同程度提高*PKA*、*CREB*、*BDNF*和*5-HT1AR*转录水平（P<0.05或P<0.01）. 其作用与阳性对照药BUS一致. SB-H和BUS不同程度地上调*5-HT1AR* mRNA水平，提示其可能通过激动5-HT1AR发挥缓解焦虑障碍.



与NC组相比，$^{\#\#}P$<0.01；与MC组相比，$^{*}P$<0.05，$^{**}P$<0.01.

图5　SB-L、SB-H对0.2 mmol·L^{-1} CORT诱导的PC12细胞内PKA、CREB、BDNF和5-HT1AR mRNA水平的影响（n=3）

Fig. 5　Effects of SB-L and SB-H on PKA, CREB, BDNF and 5-HT1AR mRNA levels in PC12 cells induced by 0.2 mmol·L^{-1} CORT (n=3)

3　结语

采用皮质酮（CORT）诱导PC12细胞损伤模型，发现了CORT诱导PC12细胞的损伤程度呈剂量依赖性，而SB能够一定程度上缓解CORT造成的损伤作用，促进细胞增殖，且高剂量组效果与阳性对照BUS相当. SB和BUS都能不同程度提高*PKA*、*CREB*、*BNDF*和*5-HT1AR* mRNA转录水平和胞内cAMP浓度，表明SB能够有效保护CORT诱导的PC12细胞损伤，其途径可能与作用cAMP/PKA-CREB-BDNF信号通路有关. SB能够促进5-HT1AR的转录水平. 本研究探讨了獐牙菜属植物缓解焦虑障碍的作用及分子作用机制，为獐牙菜属植物的开发利用提供了一定的理论依据.

参　考　文　献

[1] 何旭，陈美华，金莉莉，等. 中国獐牙菜属植物化学成分与药理作用研究进展[J]. 人参研究，2022，34(4)：45-53.

[2] 蒂玛尔·丹增彭措，毛继祖. 晶珠本草[M]. 上海：上海科学技术出版社，2012.

[3] 李冬梅，肖怀，刘光明. 獐牙菜属植物研究进展[J]. 大理学院学报，2007，6(2)：77-80.

[4] 杨永昌，何廷农，卢生莲，等. 藏药志[M]. 青海人民出版社，1991.

[5] 俄仓巴·卓玛东珠，刘海青. 藏药“蒂达”品种整理[J]. 中药材，1996(10)：494－496.

[6] 陈康，吴涛，宋红萍. 獐牙菜苦苷的药理作用研究进展[J]. 现代药物与临床，2016，31(10)：1684-1688.

[7] 刘杜霞，高小敏，仝敏，等. 獐牙菜苷的药理作用及其机制研究进展[J]. 中华中医药学刊，2022，40(2)：115-119.

[8] 李钰，黄先菊，全志文，等. 土家药獐牙菜苦寒性味量化评价[J]. 中南民族大学学报（自然科学版），2025，44(2)：188-192.

[9] Kinlein S A, Phillips D J, Keller C R, et al. Role of corticosterone in altered neurobehavioral responses to acute stress in a model of compromised hypothalamic-pituitary-adrenal axis function[J]. Psychoneuroendocrinology, 2019,

102: 248-255.

[10] Nishi M. Effects of early-life stress on the brain and behaviors: Implications of early maternal separation in rodents[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(19): 7212

[11] Mao Q Q, Zhong X M, Feng C R, et al. Protective effects of paeoniflorin against glutamate-induced neurotoxicity in PC12 cells via antioxidant mechanisms and Ca^{2+} antagonism [J]. Cellular and Molecular Neurobiology, 2010, 30(7): 1059-1066.

[12] Gao M, Zhou H, Li X. Curcumin protects PC12 cells from corticosterone-induced cytotoxicity: Possible involvement of the ERK1/2 pathway[J]. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 2009, 104(3): 236-240.

[13] Notaras M, Van Den Buuse M. Neurobiology of BDNF in fear memory, sensitivity to stress, and stress-related disorders[J]. Molecular Psychiatry, 2020, 25(10): 2251-2274.

[14] Naert G, Ixart G, Maurice T, et al. Brain-derived neurotrophic factor and hypothalamic-pituitary-adrenal axis adaptation processes in a depressive-like state induced by chronic restraint stress[J]. Molecular and Cellular Neuroscience, 2011, 46(1): 55-66.

[15] Mcewen B S. Stress-induced remodeling of hippocampal CA3 pyramidal neurons [J]. Brain Research, 2016, 1645: 50-54

[16] Hill M N, Mcewen B S. Involvement of the endocannabinoid system in the neurobehavioural effects of stress and glucocorticoids [J]. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 2010, 34(5): 791-797.

[17] Aksoy H, Ergun T, Akkiprik M, et al. The impact of antipsoriatic treatment on serum pro-BDNF, BDNF levels, depression, anxiety scores, and quality of life[J]. Dermatologic Therapy, 2021, 34(2):14872.

[18] You M, Pan Y, Liu Y, et al. Royal jelly alleviates cognitive deficits and β-amyloid accumulation in APP/PS1 mouse model via activation of the cAMP/PKA/CREB/BDNF pathway and inhibition of neuronal apoptosis[J]. Frontiers in Aging Neuroscience, 2019, 10: 428.

[19] Geng X, Wu H, Li Z, et al. Jie-Yu-He-Huan capsule ameliorates anxiety-like behaviours in rats exposed to chronic restraint stress via the cAMP/PKA/CREB/BDNF signalling pathway[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2021, 2021(1): 1703981.

[20] Olivier B, Pattij T, Wood S J, et al. The 5-HT 1A receptor knockout mouse and anxiety [J]. Behavioural Pharmacology, 2001, 12(6): 439-450.

[21] Celada P, Bortolozzi A, Artigas F. Serotonin 5-HT1A receptors as targets for agents to treat psychiatric disorders: Rationale and current status of research[J]. CNS Drugs, 2013, 27(9): 703-716.

(责编&校对 姚春娜)