

研究论文

黄芪甲苷对神经毒素损伤PC12细胞的保护作用
及分子模拟研究刘圆圆¹ 彭婷² 靳晓杰² 刘永琦^{1*} 姚娟^{2*}¹甘肃中医药大学基础医学院, 兰州 730000; ²甘肃中医药大学药学院, 兰州 730000

摘要 该文研究了黄芪甲苷(Astragaloside A, AS-IV)对神经毒素6-羟多巴胺(6-hydroxydopamine, 6-OHDA)损伤PC12细胞的保护作用, 并通过分子模拟探究其机制。使用6-OHDA建立PC12细胞损伤模型, 通过检测细胞增殖率, 培养基上清中乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)的释放量, 细胞凋亡, 细胞内超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、总谷胱甘肽(glutathione, GSH)的活性, 总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC), 细胞中核转录因子E2相关因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)蛋白的表达情况, 评估AS-IV对PC12细胞的保护作用及机制。将化合物对接至Nrf2的负性调节蛋白Kelch样ECH相关蛋白1(Kelch-like ECH-associated protein-1, Keap1)上, 并建立“化合物-靶点”复合物的分子动力学模拟体系, 进一步研究其相互作用模式。结果显示, 与6-OHDA模型组比较, 25、50 $\mu\text{mol/L}$ AS-IV可以显著提高6-OHDA损伤后细胞的增殖率, 降低LDH的含量, 抑制细胞凋亡, 并上调总GSH、T-AOC的水平及SOD的活力, 提高细胞内总Nrf2的表达水平, 上调细胞核Nrf2及下调细胞质Nrf2的表达。将AS-IV对接至Nrf2的负性调节蛋白Keap1上, 对接打分为-7.03 kcal/mol, 并且复合物体系在50 ns的模拟时间中保持平稳, 蛋白质构象稳定。结果表明, AS-IV可以减轻氧化应激所致的PC12细胞损伤, 提高细胞的内源性抗氧化能力, 其作用机制可能与转录因子Nrf2的激活有关。

关键词 神经退行性疾病; 氧化应激; 黄芪甲苷; Keap1-Nrf2; 分子对接; 分子动力学模拟

Protective Effect and Molecular Simulation of Astragaloside A on PC12
Cells Damaged by NeurotoxinLIU Yuanyuan¹, PENG Ting², JIN Xiaojie², LIU Yongqi^{1*}, YAO Juan^{2*}¹Basic Medical College, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;²College of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

Abstract This paper proved the protective effect of AS-IV (Astragaloside A) on PC12 cells damaged by

收稿日期: 2023-10-10

接受日期: 2024-01-26

国家自然科学基金(批准号: 82104370)、甘肃省自然科学基金(批准号: 21JR1RA270)和甘肃省高等学校产业支撑计划(批准号: 2022CYZC-54)资助的课题

*通信作者。Tel: 0931-5161171, E-mail: liuyongqi73@163.com; Tel: 13893680513, E-mail: yaojuan05@163.com

Received: October 10, 2023

Accepted: January 26, 2024

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82104370), the Natural Science Foundation of Gansu Province (Grant No.21JR1RA270) and the Gansu Province Higher Education Industry Support Plan (Grant No.2022CYZC-54)

*Corresponding authors. Tel: +86-931-5161171, E-mail: liuyongqi73@163.com; Tel: +86-13893680513, E-mail: yaojuan05@163.com

the neurotoxin 6-OHDA (6-hydroxydopamine) and explored its mechanism through molecular simulation. The cell damage model of PC12 was established by 6-OHDA. This study examined cell proliferation rate, the release of LDH (lactate dehydrogenase), cell apoptosis, activity of SOD (superoxide dismutase), GSH (glutathione), level of T-AOC (total antioxidant capacity) and Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) protein expression in cells to explore the protective effect of AS-IV on PC12 cells and its mechanism. The compound was docked to Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein-1), a negative regulatory protein of Nrf2, and the molecular dynamics simulation system of the “compound target” complex was established to further study its interaction mode. The results showed that compared with 6-OHDA model group, 25, 50 $\mu\text{mol/L}$ AS-IV could significantly increase the proliferation rate of cells after 6-OHDA injury, reduce the content of LDH, inhibit apoptosis, up-regulate the levels of total GSH, T-AOC and SOD activity, and increase the expression of total Nrf2 in cells. The expression of nuclear Nrf2 was up-regulated and cytoplasm Nrf2 was down-regulated. AS-IV was docked to Keap1, the negative regulatory protein of Nrf2, with a docking score of -7.03 kcal/mol, and the complex system remained stable in the simulation time of 50 ns, and the protein conformation was stable. The results showed that AS-IV could reduce the damage of PC12 cells induced by oxidative stress and improve the endogenous antioxidant capacity of PC12 cells, which might be related to the activation of transcription factor Nrf2.

Keywords neurodegenerative diseases; oxidative stress; Astragaloside A; Keap1-Nrf2; molecular docking; molecular dynamics simulation

在人口老龄化的发展趋势下,近年来神经退行性疾病的发病率不断上升,这类疾病如亨廷顿病(Huntington's disease, HD)、帕金森病(Parkinson's disease, PD)、阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)等的发生与发展给家庭和社会均带来严重的负担。氧化应激与各种神经退行性疾病的发生与进展密切相关,大脑内神经元由于其耗氧量高、具有大量不饱和脂肪酸,并且在整个生命周期内再生能力有限,极易受到氧化应激的影响^[1]。活性氧(reactive oxygen species, ROS)被认为是一种重要的自由基,它可以影响各种神经退行性疾病的病理机制及其发展,过多的ROS可以破坏细胞的氧化还原反应,导致脂质过氧化、DNA链断裂、细胞结构和功能改变,神经元功能衰退以及细胞死亡等^[2]。核转录因子E2相关因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)是生物体内调控氧化还原反应的一个重要因子, Kelch样ECH相关蛋白1(Kelch-like ECH-associated protein-1, Keap1)是E3泛素连接酶的底物识别亚单位,在蛋白质的泛素化修饰中起重要作用^[3],在非应激条件下,细胞质中Keap1与Nrf2紧密结合,将其保留在细胞质中以进行泛素化和蛋白酶体降解,Keap1中的活性半胱氨酸残基(如Cys151、Cys257、Cys273、Cys297等^[4-5])影响着Nrf2和Keap1之间的蛋

白-蛋白相互作用(protein-protein interaction, PPI),抑制Keap1和Nrf2的PPI会阻碍泛素蛋白酶体系统(ubiquitin proteasome system, UPS)对Nrf2的降解,导致新形成的Nrf2聚集并易位到细胞核中,在小肌肉腱膜纤维肉瘤(small musculo-aponeurotic fibrosarcoma, sMaf)蛋白的帮助下,结合抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)的启动子区域,诱导保护性因子包括过氧化氢酶(catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)和NAD(P)H:醌氧化还原酶1[NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1, NQO1]等的表达^[6]。所以,抑制Nrf2和Keap1的PPI被认为是一种有前途的策略,可以提高机体的内源性抗氧化能力,抵御氧化应激损伤^[7]。目前,研究发现了可直接抑制Keap1-Nrf2 PPI的抑制剂,如ZJ01^[8]、RA839^[9]、紫檀芪^[10]等,相比于通过修饰半胱氨酸残基上巯基的共价抑制剂,Keap1-Nrf2 PPI的直接抑制剂规避了共价反应存在的脱靶效应,有可能发展成为防治神经退行性疾病更加安全、有效的药物^[11],因此,进一步探究Keap-Nrf2的PPI及其机制具有广阔的应用前景。

HD、PD、AD等神经退行性疾病一直以来都具有发病率高、致残率高和死亡率高等特点,然而

目前仍缺乏有效的临床药物;因此,寻找毒副作用小、疗效更好的药物是亟待解决的问题。从中草药中提取的天然制剂,已成为发现候选药物和药物先导结构的重要来源。甘肃道地药材黄芪以“补脾第一要药”而著称,黄芪可通过益气以活血、化痰,提高机体抵御外邪的能力,并升清降浊,滋养髓海,作为天然药物,黄芪对神经系统疾病有很好的防治作用^[12-13]。现代研究表明黄芪具有抗氧化、抗衰老、改善脑微循环等药理作用^[14]。黄芪甲苷(Astragaloside A, AS-IV)是黄芪中的主要活性物质,也是黄芪药材质量控制的标准^[15]。AS-IV在中枢神经系统中的作用已被广泛报道,HOU等^[16]认为AS-IV可通过抑制内质网应激介导的内皮细胞凋亡,有效保护血脑屏障,抑制大鼠脑缺血/再灌注诱导的血脑屏障通透性的病理性增加;GE等^[17]发现AS-IV可以调节lincRNA-p21/C/EBP同源蛋白(C/EBP homologous protein, CHOP)信号通路,抑制神经元凋亡;另外,AS-IV能改善行为和神经化学缺陷,研究者们通过不同的细胞模型、小鼠皮层神经元损伤模型和小鼠坐骨神经损伤模型,揭示了其在AD、PD、脑缺血和自身免疫性脑脊髓炎中的防治作用^[18]。而AS-IV是否可以直接抑制Keap1-Nrf2的PPI,激活Nrf2-ARE信号通路,上调保护性因子的表达,以减轻神经细胞的氧化应激损伤,是本研究以期阐释的科学问题,因此,本研究展开了一系列相关实验,旨在为AS-IV及神经保护剂的进一步研究提供参考和依据。

1 材料与方法

1.1 实验药物与试剂

AS-IV(批号: HS19515A7)购自宝鸡辰光生物科技有限公司。DMEM高糖培养液(批号: PYJ-00016)、ECL化学发光底物试剂盒(批号: WP20005)、HRP偶联羊抗兔IgG(H+L)抗体(批号: 31458)、胎牛血清(批号: 10100147)购自美国ThermoFisher公司。胰蛋白酶-EDTA消化液(货号: S310JV)购自上海源培生物科技股份有限公司。6-OHDA(批号: M7825)购自美国Abmole公司。噻唑蓝(MTT)(批号: M8180)、5×考马斯亮蓝G-250(批号: PC0015)购自北京索莱宝科技有限公司。乳酸脱氢酶检测试剂盒(批号: A020-2-2)、总谷胱甘肽测定试剂盒(批号: A061-1-2)、超氧化物歧化酶测定试剂盒(批号: A001-3-2)、总抗氧化能力测定试剂盒(批号: A015-2-1)购自南京建成

生物工程研究所。Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒(批号: C1062S)、RIPA裂解液(批号: P0013B)、PMSF(批号: ST506)、抗Lamin B1兔源性单克隆抗体(批号: AF1408)购自上海碧云天生物技术有限公司。SDS-PAGE上样缓冲液(批号: CW0027)购自康为世纪生物科技有限公司。细胞核蛋白/胞质蛋白抽提试剂盒(批号: C510001-0050)、抗GAPDH兔源性多克隆抗体(批号: D110016-0100)购自上海生工生物工程有限公司。抗Nrf2兔源性多克隆抗体(批号: 41255-1)购自美国Signalway Antibody公司。

1.2 细胞

大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞(PC12细胞)(批号: CL-0481)购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.3 仪器

二氧化碳培养箱(型号: SKYJH-1112)购自美国ThermoFisher公司。酶标仪(型号: Epoch)购自美国BioTek公司。激光共聚焦显微镜(型号: IX81)购自日本Olympus公司。蛋白印迹电泳仪(型号: Power Pac Universal)、凝胶成像分析系统(型号: Chemi Doc XRS)购自美国Bio-Rad公司。

1.4 方法

1.4.1 MTT法检测细胞活性 将细胞以 2×10^4 个/孔铺在96孔板中,加入不同浓度的AS-IV后,再分别培养12、24、48 h,氧化应激损伤模型采用200 $\mu\text{mol/L}$ 的6-OHDA干预细胞24 h,参照的是课题组前期的研究结果^[19],实验分为空白对照组、6-OHDA损伤模型组、6-OHDA+AS-IV低剂量组和6-OHDA+AS-IV高剂量组。干预完成后,每孔加入10 μL 的MTT(5 g/L),4 h后再加入100 μL 的三联溶解液(10% SDS、5%异丁醇、0.1%盐酸),将96孔板置于37 °C避光环境中孵育过夜,次日,在酶标仪上测定波长为570 nm处的吸光度(D)值,并计算细胞增殖率。

1.4.2 LDH含量的测定 将对数生长期的PC12细胞接种于60 mm的培养皿中,加入含有AS-IV(25、50 $\mu\text{mol/L}$)的培养基作用24 h,然后更换为含200 $\mu\text{mol/L}$ 的6-OHDA的培养基继续培养24 h,细胞培养基上清液中LDH含量的测定根据检测试剂盒说明书操作。

1.4.3 对细胞凋亡的影响 将PC12细胞培养于共聚焦专用小皿中,加入25、50 $\mu\text{mol/L}$ 的AS-IV处理细胞24 h,然后用PBS洗涤细胞,根据说明加入染色试剂后,室温下避光孵育20 min,在488 nm和568 nm波长下使用激光共聚焦显微镜观察细胞的荧光染色

情况, 给细胞拍照。

1.4.4 对GSH、SOD和T-AOC的影响 将细胞均匀地铺在60 mm的培养皿里, 待细胞贴壁后, 加入25、50 $\mu\text{mol/L}$ 的AS-IV, 24 h后更换为含有200 $\mu\text{mol/L}$ 6-OHDA的培养基继续作用24 h, 然后收集细胞, 并提取细胞中的蛋白质, 定量蛋白浓度并将其调整为一致, 总GSH、T-AOC含量和SOD活性的检测根据试剂盒说明书操作。

1.4.5 对总Nrf2表达的影响 取对数生长期的细胞, 并将其铺于60 mm的培养皿里, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育过夜待细胞贴壁后, 加入25、50 $\mu\text{mol/L}$ 的AS-IV培养24 h, 收集细胞, 提取细胞中的蛋白质, 考马斯亮蓝法定量蛋白浓度, 并调一致。电泳, 转膜后, 在室温下封闭2 h, 分别加入对应的一抗(稀释比例1:800)并在4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。第二日, 使用TBST洗膜, 室温下孵育二抗(稀释比例1:5 000) 2 h, 洗膜, 最后滴上ECL化学发光液, 用凝胶成像分析系统可视化蛋白条带并通过灰度值定量蛋白的相对表达水平。

1.4.6 对细胞质和细胞核中Nrf2表达的影响 取对数生长期的细胞, 并将其铺于60 mm的培养皿里, 过夜待细胞贴壁后, 加入50 $\mu\text{mol/L}$ 的AS-IV分别作用细胞2、4、8 h后, 收集细胞, 根据试剂盒说明提取细胞质蛋白和细胞核蛋白, 考马斯亮蓝法定量蛋白浓度后, 电泳, 转膜, 孵育抗体, 并使用凝胶成像系统分析蛋白表达情况。

1.4.7 分子对接 从蛋白质数据库(protein Data Bank, PDB)中获得了Keap1-Nrf2蛋白的X射线晶体结构(PDB ID:2FLU)^[20-21]。Schrödinger中的PrepWiz模块用于受体蛋白的预处理, 添加氢原子并利用OPLS3e力场分配质子化状态和部分电荷。预测小分子结合位点位于Keap1与Nrf2的结合口袋上, 对接盒子大小设为10 $\text{\AA}$ ×10 $\text{\AA}$ ×10 $\text{\AA}$, 中心坐标 $x=5.53$, $y=7.12$, $z=-1.34$, 位于Keap1晶体结构中P1、P2、P3、P4、P5五个子口袋附近^[22]。LigPrep模块用于化合物结构的优化, 化合物相应的低能构象在OPLS3e力场下完成, 生成三维结构, 并将生成的构象能量最小化。使用Glide的标准精度方法(standard precision, SP)进行分子对接, Epik28以pH值为7.0±2.0为条件分配电离状态并进行对接计算。

1.4.8 分子动力学模拟 为了进一步研究Keap1与AS-IV结合的稳定性, 优化相互作用, 对分子对接后的复合物进行50 ns的分子动力学模拟。本研究使

用GROMACS 2018程序的pdb2gmx模块产生蛋白的拓扑参数^[23]。蛋白和所有复合物体系都使用gromos54a7力场^[24]。合并蛋白和小分子化合物的坐标文件, 构建复合物体系, 准备下一步的分子动力学模拟。将复合物置于边长为10 $\text{\AA}$ 的TIP3P周期性显性水模型的立方体水盒子, 在体系中加入 Na^+ 和 Cl^- 使体系呈电中性。使用最陡下降法进行5 000步能量最小化, 避免体系中原子任何不合理的接触。在NPT系综中周期边界条件下进行模拟, 温度耦合方法是Nose-Hoover, 模拟温度为300 K, 压力为1.0 bar。最后, 在不受任何限制的情况下, 进行50 ns的长时间动力学模拟。模拟积分步长设置为2 fs。经过2 ns的预平衡后, 进行50 ns的正式模拟, 每10 ps进行一次轨迹记录, 总计记录5 000帧, 整个过程中持续检测蛋白质与配体的相互作用。在50 ns的分子动力学模拟结束后, 使用GROMACS 2018程序自带的gmrms、gmrmsf、gmgyrate、gmxbond模块计算每个体系的均方根偏差(root mean square deviation, RMSD)、每个氨基酸残基的均方根波动(root mean square fluctuation, RMSF)、回旋半径(radius of gyration, Rg)和氢键(hydrogen bond, H-bond)。

1.4.9 结合自由能计算 靶点与化合物之间的亲和力常用配体-受体的结合自由能表示, 其数值越小则结合所需的能量越低^[25], 所以, 计算结合自由能可以为药物设计提供一定的理论基础与参考意义。分子力学泊松玻尔兹曼表面积(molecular mechanics-poisson bolzmann surface area, MM-PBSA)是一种计算蛋白质-配体复合物结合自由能的通用方法, 广泛应用于计算多种蛋白质-配体相互作用的结合自由能。取复合物运动轨迹的最后5 ns作为取样的数据来源, 在轨迹中每隔10 ps取一帧结合构象进行分析。

1.4.10 药代动力学预测 Schrödinger软件中的QikProp模块和ProTox-II数据平台^[26]用于ADMET参数计算, 预测化合物在中枢神经系统的作用级别(level of action in central nervous system, CNS)、化合物与人结合蛋白的结合常数(binding constant to human binding protein, $Q\text{PlogKhsa}$)、辛醇和水中的分配系数(partition coefficient between octanol and water, $Q\text{PlogPo/w}$)、饱和水溶液中溶解度的对数(the logarithm of solubility in saturated aqueous solution, $Q\text{PlogS}$)、阻断HERG K^+ 通道的 IC_{50} 的对数值(the logarithm of IC_{50} that blocks the HERG K^+ channel, $Q\text{PlogHERG}$)、具有反应性

的功能基团数(number of reactive functional groups, #rtvFG)、PM3计算的离子化势(PM3 calculated ionization potential, IP)、口服半数致死量(median lethal dose, LD₅₀)、毒性分级(toxicity class)等参数。

1.4.11 统计学处理 实验原始数据采用SPSS 17.0软件整理分析与统计, Graphpad Prism 9.0软件用于绘图, 单因素方差分析用于组间比较, 当 $P<0.05$ 时, 则认为组间的差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 AS-IV对PC12细胞增殖能力的影响

首先, 通过MTT实验, 评估了AS-IV对细胞活性的影响, 如图1A所示, 根据预实验结果, 本研究选择AS-IV的干预条件为25、50 $\mu\text{mol/L}$ 并作用细胞24 h。如图1B所示, 氧化应激模型组细胞增殖明显被抑制, 25 $\mu\text{mol/L}$ AS-IV干预细胞可提高氧化应激损伤环

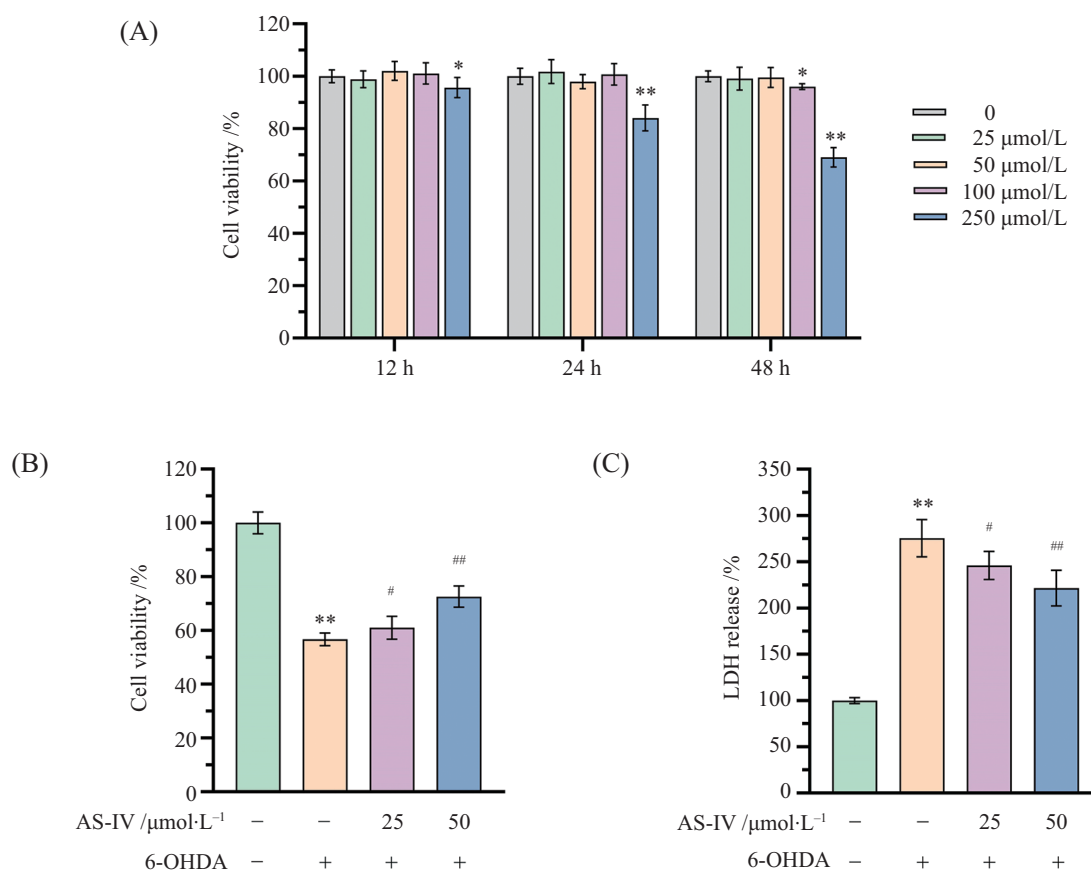
境下PC12细胞的增殖率($P<0.05$), 当AS-IV浓度达到50 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞存活率约提高20%($P<0.01$)。

2.2 AS-IV对6-OHDA干预后细胞培养基中LDH含量的影响

为了确认MTT的结果, 随后测定了培养基中LDH的含量。结果如图1C所示, 相比于空白对照组, 氧化应激模型组的LDH含量显著升高($P<0.01$), AS-IV处理后使培养基中LDH的含量显著的降低, 相比于模型组, 25 $\mu\text{mol/L}$ AS-IV使LDH含量降低10.7%($P<0.05$), 50 $\mu\text{mol/L}$ 可以使LDH含量降低19.6%($P<0.01$)。

2.3 AS-IV可减轻6-OHDA诱导的PC12细胞凋亡

为了进一步探讨AS-IV对6-OHDA诱导PC12细胞凋亡相关的生物学意义, 使用Annexin V-FITC/PI双染法检测细胞凋亡的情况, Annexin V可以和外翻到细胞膜外侧的磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine,

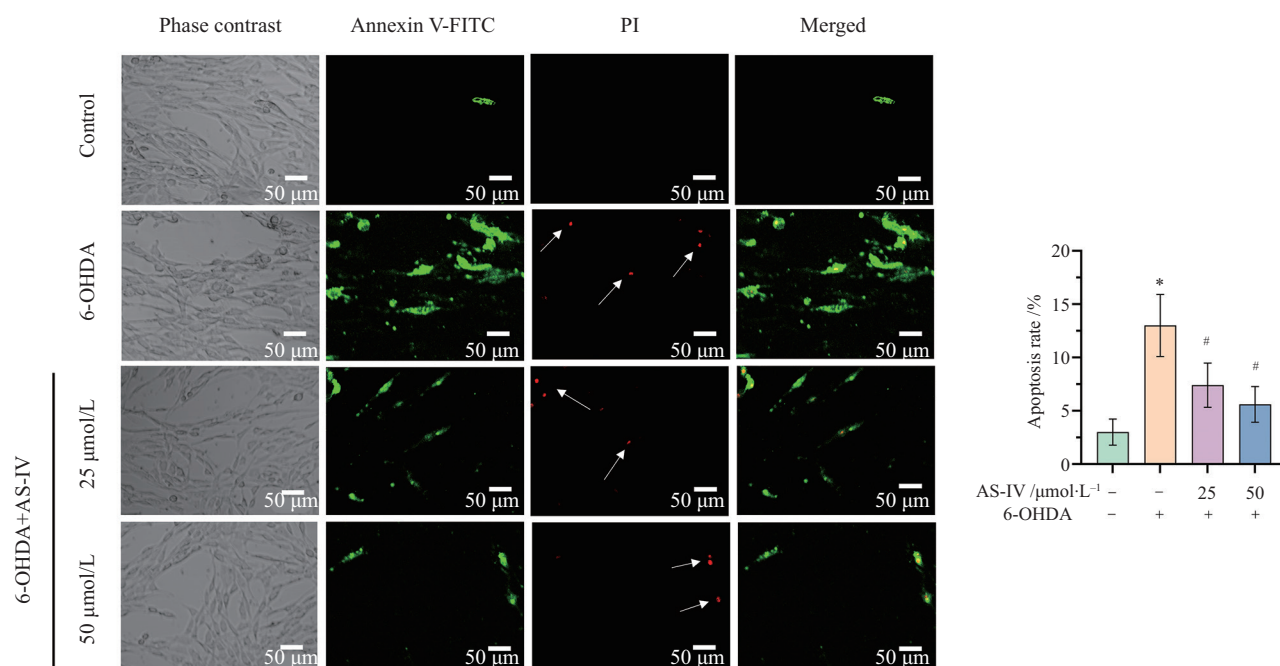


A: AS-IV对细胞活性的影响; B: AS-IV对6-OHDA干预后细胞活性的影响; C: AS-IV对6-OHDA干预后细胞培养基中LDH含量的影响。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与空白对照组比较。# $P<0.05$, ## $P<0.01$, 与6-OHDA模型组相比较。

A: the effect of AS-IV on cell activity; B: the effect of AS-IV on cell activity after 6-OHDA intervention; C: the effect of AS-IV on LDH content in cell medium after 6-OHDA intervention. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with blank control group. # $P<0.05$, ## $P<0.01$ compared with 6-OHDA model group.

图1 AS-IV对PC12细胞活性及培养基中LDH的影响

Fig.1 Effects of AS-IV on PC12 cell activity and LDH in medium

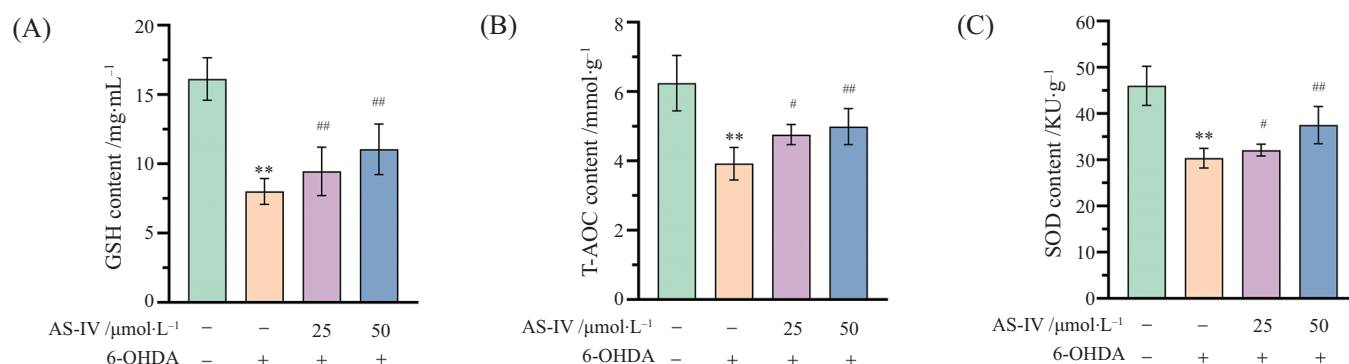


* $P < 0.05$, 与空白对照组比较。# $P < 0.05$, 与6-OHDA模型组相比较。白色箭头所指为凋亡晚期或坏死细胞。

* $P < 0.05$ compared with blank control group. # $P < 0.05$ compared with 6-OHDA model group. The white arrows indicate late apoptotic or necrotic cells.

图2 AS-IV对6-OHDA诱导的PC12细胞凋亡的影响

Fig.2 Effect of AS-IV on 6-OHDA-induced apoptosis of PC12 cells



A: 各组细胞总GSH含量的变化; B: 各组细胞T-AOC含量的变化; C: 各组细胞SOD活力的变化。** $P < 0.01$, 与空白对照组比较。# $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, 与6-OHDA模型组相比较。

A: the change of total GSH content in each group; B: the change of T-AOC content in each group; C: the change of SOD activity in each group.

** $P < 0.01$ compared with blank control group. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ compared with 6-OHDA model group.

图3 AS-IV对PC12细胞中总GSH、T-AOC含量和SOD活力的影响

Fig.3 Effects of AS-IV on total GSH, T-AOC content and SOD activity in PC12 cells

PS)结合, 用绿色荧光探针FITC标记的Annexin V即可检测到早期凋亡的细胞; PI则可以染色凋亡晚期或坏死细胞, 发出红色荧光。实验结果如图2所示, 与空白对照组相比, 模型组的绿色荧光显著增强, 红色荧光略有增强, 而25、50 $\mu\text{mol/L}$ AS-IV干预后, 荧光强度显著减弱, 说明AS-IV可以发挥神经保护效应, 使细胞免于凋亡($P < 0.05$)。

2.4 AS-IV对6-OHDA损伤的PC12细胞中总GSH、T-AOC含量和SOD活力的影响

氧化应激与细胞损伤及凋亡密切相关, 前面的研究表明AS-IV可以发挥神经保护作用, 接下来, 为了评估其对内源性抗氧化系统的影响, 测定了细胞内总GSH、T-AOC水平和SOD的活性。如图3A所示, 相比于空白对照组, 氧化应激模型组总GSH活

性显著下降($P<0.01$), 而AS-IV干预能明显提高细胞中总GSH的含量, 相比于模型组, 25 $\mu\text{mol/L}$ AS-IV可以使总GSH的活性提高18.1%($P<0.01$), 50 $\mu\text{mol/L}$ 可以使其活性提高38%($P<0.01$)。如图3B所示, 与空白对照组相比, 模型组T-AOC水平显著下降, 而相比于模型组, 25 $\mu\text{mol/L}$ AS-IV可以使T-AOC水平提高21.4%($P<0.05$), 50 $\mu\text{mol/L}$ 可以使其水平提高27.2%($P<0.01$)。如图3C所示, 模型组SOD活性较空白对照组显著降低, 而与模型组相比, 25 $\mu\text{mol/L}$ AS-IV可以使SOD活性提高5.7%($P<0.05$), 50 $\mu\text{mol/L}$ 可以使其活性提高31.5%($P<0.01$)。

2.5 AS-IV对总Nrf2表达的影响

以上研究表明, AS-IV可以提高抗氧化酶的活性, 增强内源性抗氧化系统的防御能力, 为探究AS-IV上调抗氧化因子的表达与Nrf2是否有关, 采用Western blot的研究方法测定细胞内总Nrf2的含量。如图4所示, 50 $\mu\text{mol/L}$ AS-IV可以显著上调PC12细胞中Nrf2的表达($P<0.05$), 说明AS-IV可以作为Nrf2的激活剂, 使Nrf2在细胞内积累。

2.6 AS-IV可以促进Nrf2的核易位

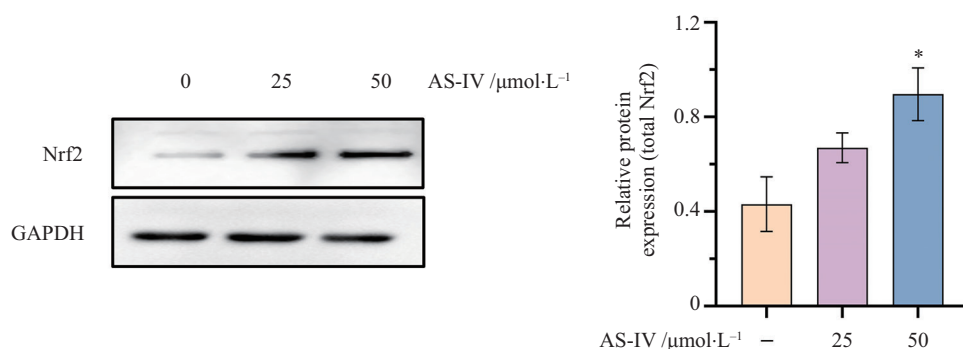
通过Nrf2依赖途径诱导细胞保护酶的表达需要Nrf2转运到细胞核。通过Western blot分析继续研究AS-IV是否能促进Nrf2从细胞质向细胞核的易位。如图5所示, 50 $\mu\text{mol/L}$ 的AS-IV干预后, 随着时间的推移, 细胞质中的Nrf2随着其在细胞核中的不断上升而逐渐下降, 表明Nrf2从细胞质逐渐转移到细胞核中。这些结果说明AS-IV可以使Nrf2在细胞核内积累, 促进了其与靶基因启动子区域ARE的结合, 并启动了随后抗氧化相关基因的转录和翻译。

2.7 AS-IV干扰Keap1与Nrf2之间的相互作用

Keap1的结合腔可分为P1、P2、P3、P4、P5五个子口袋。由Ser508、Phe478、Ile461、Arg483、Arg415和Gly462组成的P1具有较高的正电荷, P2子口袋由Ser363、Arg380、Asn382和Asn414组成, 也带正电, P3子口袋由Gly509、Ala556、Ser555、Ser602、Gly603和Gly571组成, 这些小的残基使得这个口袋对空间位阻很敏感。与P1和P2不同, P4和P5子口袋是疏水性的, 其中P4子口袋由TYR525、GLN530、SER555组成; TYR334、SER602、PHE577和TYR572组成了P5口袋^[27]。如图6所示, 通过对Keap1-AS-IV、Keap1-Nrf2的结合模式进行分析, 发现AS-IV可以与P2子口袋的Ser363、Arg380形成氢键, 与P3、P4、P5口袋的Ala556、TYR525、TYR572、PHE577、TYR334形成疏水相互作用, 对接打分为-7.03 kcal/mol。而Nrf2 ETGE肽可以与P1、P2、P3、P4、P5五个子口袋中的SER508、ARG483、ARG415、SER363、ARG380、ASN382、SER555、GLN530、TYR334、SER602形成氢键相互作用。由于AS-IV与Nrf2占据了Keap1中相似的结合口袋, 因此AS-IV可能是通过与Nrf2竞争结合Keap1, 而发挥抗氧化作用的。

2.8 分子动力学模拟

为了进一步验证Keap1与AS-IV结合的稳定性, 将Keap1-AS-IV复合物与空载蛋白进行了50 ns的分子动力学模拟。RMSD通常用于评估系统的动态稳定性, 表征两个分子的距离和构象差异的整体度量。如图7A所示, 复合物与空载蛋白的主链C α 原子的RMSD波动幅度相似, 推断配体没有偏离初始Kelch结合口袋, 平均值分别为0.111 018 nm、0.111 58 nm, 复

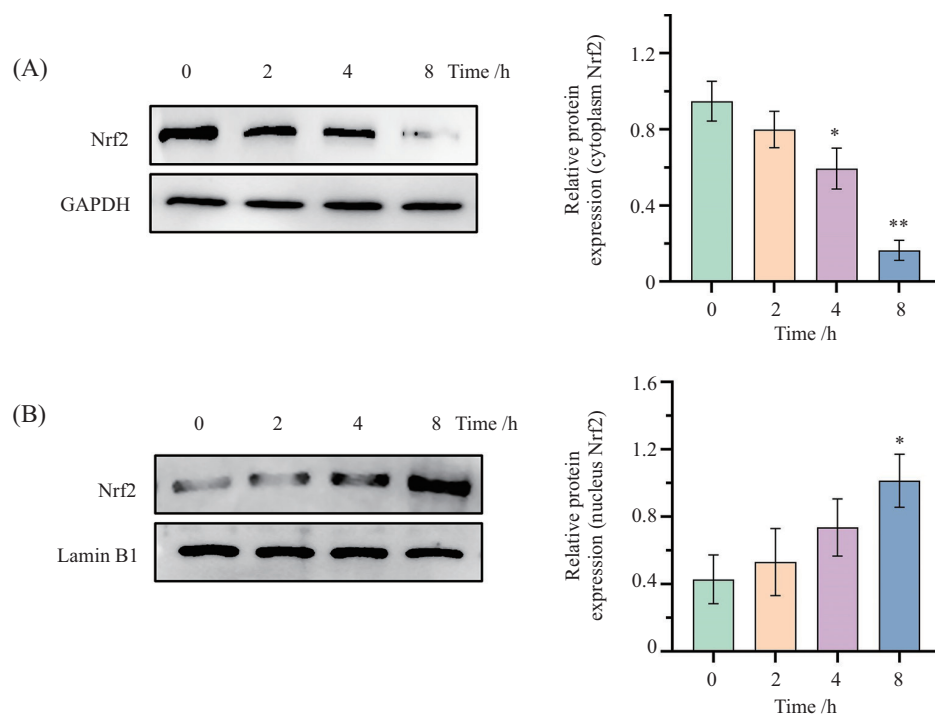


* $P<0.05$, 与空白对照组比较。

* $P<0.05$ compared with blank control group.

图4 AS-IV对PC12细胞总Nrf2表达的影响

Fig.4 Effect of AS-IV on total Nrf2 protein expression in PC12 cells

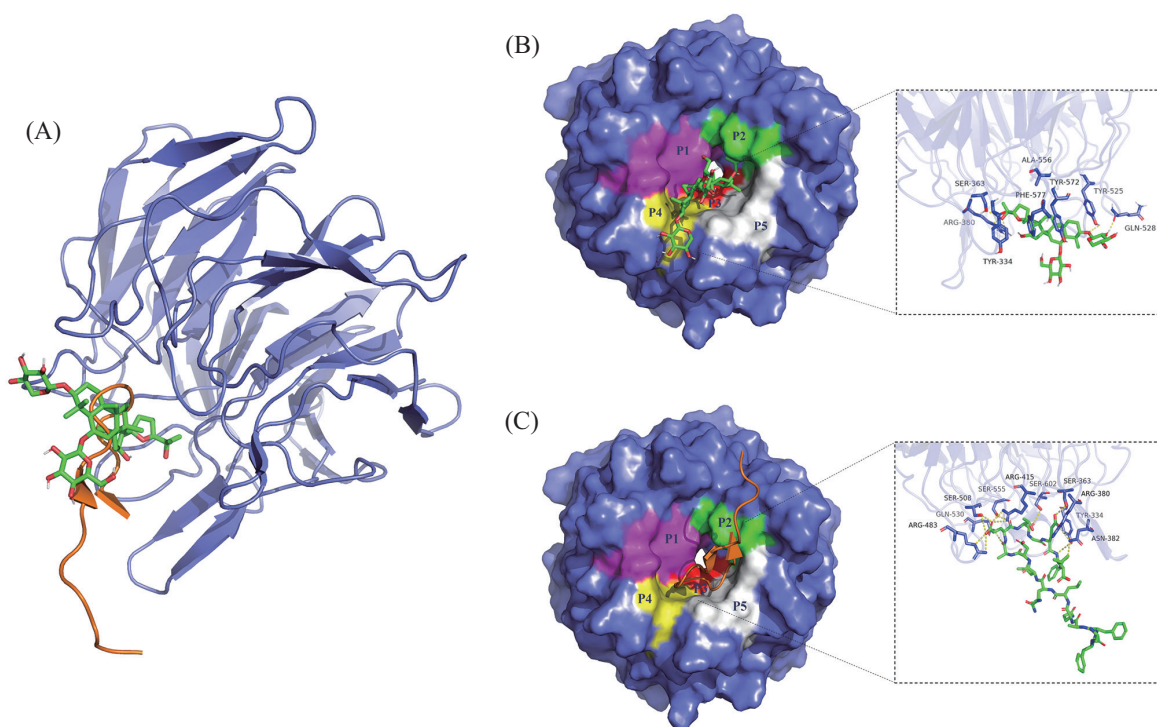


A: AS-IV对PC12细胞质Nrf2表达的影响; B: AS-IV对PC12细胞核Nrf2表达的影响。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与空白对照组比较。

A: the effect of AS-IV on Nrf2 expression in PC12 cytoplasm; B: effects of AS-IV on Nrf2 expression in PC12 nucleus. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with blank control group.

图5 AS-IV对PC12细胞质Nrf2及细胞核Nrf2表达的影响

Fig.5 Effects of AS-IV on Nrf2 expression in PC12 cytoplasm and nucleus

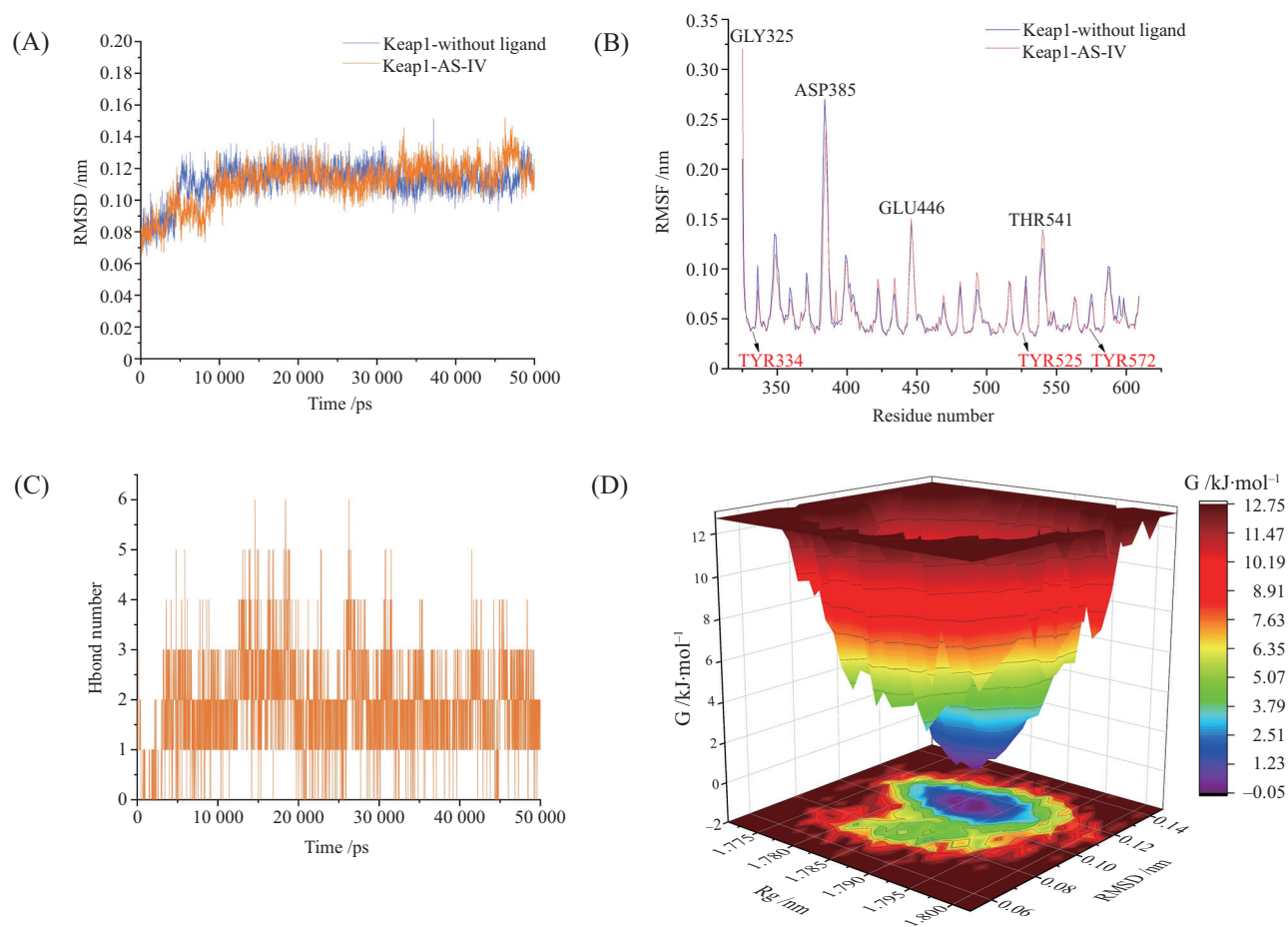


A: Keap1-Nrf2复合物与Keap1-AS-IV分子对接组合图; B: Keap1与AS-IV分子对接模式图; C: Keap1-Nrf2 PPI模式图。

A: Keap1-Nrf2 complex and Keap1-AS-IV molecular docking combination diagram; B: Keap1 and AS-IV molecular docking module diagram; C: Keap1-Nrf2 PPI model diagram.

图6 分子对接结合模式图

Fig.6 Molecular docking binding model



A: 50 ns模拟过程中Keap1-AS-IV和Keap1空载蛋白的RMSD监测值; B: 50 ns模拟过程中Keap1-AS-IV和Keap1空载蛋白的氨基酸残基的RMSF监测值; C: 50 ns模拟过程中Keap1-AS-IV复合物氢键数量统计; D: 50 ns模拟过程中Keap1-AS-IV复合物的三维自由能形貌图。

A: RMSD monitoring values of Keap1-AS-IV and Keap1-without ligand during 50 ns simulation; B: RMSF monitoring of amino acid residues of Keap1-AS-IV and Keap1-without ligand during 50 ns simulation; C: statistics of the number of hydrogen bonds in Keap1-AS-IV complex during the 50 ns simulation; D: free energy landscape of Keap1-AS-IV complex during 50 ns simulation.

图7 AS-IV与Keap1及Keap1空载蛋白的分子动力学模拟

Fig.7 Molecular dynamics simulation of Keap1-AS-IV and Keap1-without ligand

合物的RMSD均值更小,说明相较于空载蛋白,复合物构象变化更小,在模拟过程中处于更为稳定的状态。RMSF是测量原子位置随着时间变化而相对于参考位置的偏差值,用来评估体系中所有原子的稳定性。本研究计算了所有体系的每个氨基酸残基的RMSF值,从图7B可以看出,复合物与空载蛋白的残基波动趋势相似,均值分别为0.056 5 nm、0.057 1 nm,复合物的RMSF值更小,说明复合物体系中残基相对于初始位置的位移更小。其中,在复合物体系中RMSF值较大的残基有GLY325、ASP385、GLU446、THR541等,表明这些残基在50 ns的模拟过程中受到了牵引运动,构象发生了一定的变化;以红色显示的残基名称其RMSF值较低,表明这些残基与配体形成较强

的相互作用,而这些残基均位于疏水性的P4、P5子口袋中,这与对接分析中AS-IV与Keap1的P4、P5口袋有较强的疏水作用相一致。图7C显示,在50 ns的模拟过程中,持续检测配体与蛋白的氢键变化,发现随着时间的推移,氢键数量集中在2~3,且波动范围不大,表示在50 ns的模拟中,配体与蛋白之间的氢键作用相对稳定,构象没有出现较大的波动。利用复合物的RMSD、Rg和体系的Gibbs自由能构建自由能形貌图(free energy landscape, FEL),研究不同能量状态的构象变化。如图7D所示,复合物的Rg值在1.780~1.792 nm范围内和RMSD值在0.10~0.12 nm时其能量最低,有能量极小值代表了模拟中存在最稳定的结构,说明复合物的整体结构变化较小,且在50 ns的模拟时

表1 基于MM-PBSA方法计算的Keap1-AS-IV复合物的结合自由能

Table 1 Binding free energy of Keap1-AS-IV complex calculated based on MM-PBSA method

复合物 Complex	范德华能量项/ $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ $E_{\text{vdw}}/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	静电能量项/ $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ $E_{\text{ele}}/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	极性溶剂化能/ $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ $\Delta G_{\text{pol}}/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	非极性溶剂化能/ $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ $\Delta G_{\text{nonpol}}/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	总结合自由能/ $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ $\Delta G_{\text{bind}}/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
Keap1-AS-IV	-155.902	-27.878	101.189	-18.035	-100.626

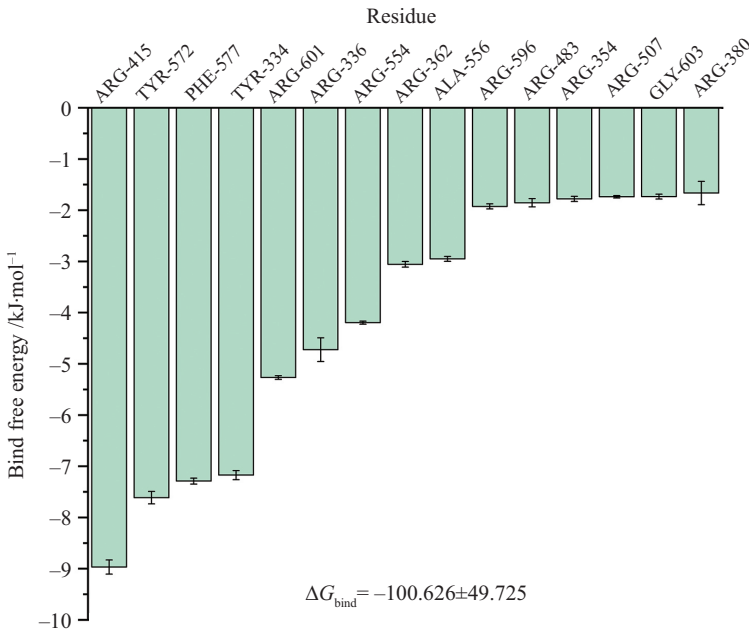


图8 Keap1-AS-IV复合物的残基能量分解图

Fig.8 Energy decomposition of Keap1-AS-IV complex residues

间中在逐渐趋于一个更稳定的构象。

2.9 结合自由能计算

采用MM-PBSA方法, 计算在模拟时间中最后 5 ns的结合自由能, 如表1所示, 复合物体系中范德华作用、静电作用和非极性溶剂化能对结合做出了有利贡献, 相反, 极性溶剂化能对结合做出了不利贡献, 能量总和为-100.626 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, 因此AS-IV与Keap1之间具有良好的亲和力。由于在配体结合状态下蛋白质的自由能分解可以计算单个残基的能量贡献, 并用于定量评价其重要性, 因此, 为了确定主导Keap1-AS-IV结合的关键残基, 本研究评估了蛋白质复合体中单个残基的能量贡献。如图8所示, ARG415、PHE577、TYR572、TYR334对能量的贡献最大, 而这些残基大部分位于Keap1的疏水性空腔P5口袋中, 与前面RMSF分析结果相吻合, 因此AS-IV与蛋白的疏水作用较强, 使其与Keap1稳定结合。

2.10 AS-IV的药代动力学预测

基于体外实验有效性的基础上, 对AS-IV进行

药代动力学预测, 使用ProTox-II数据平台和QikProp模块进行计算, 结果见表2所示, AS-IV符合CNS、QPlogKhsa、QPlogP_{o/w}、QPlogS、IP、#rtvFG, 表明其溶解性、透膜性、稳定性均较好且不易与人结合蛋白结合, 并可以作用于中枢神经系统, QPlogHERG在规定范围内, 说明其心脏毒性风险较低, 肝毒性预测显示, AS-IV不具有肝毒性, LD₅₀的毒性等级为V级, 安全性较好。

3 讨论

氧化应激是导致神经损伤的重要原因之一, 由氧化应激引发的ROS等自由基会攻击神经细胞, 从而使蛋白质错误折叠、神经胶质细胞活化、线粒体功能障碍、DNA修复系统受损以及随后的细胞死亡。PC12细胞来源于大鼠肾上腺肿瘤, 常用于研究神经生长因子信号和神经元分化, 并作为体外细胞模型, 用于神经保护剂的体外鉴定^[28-29]。6-OHDA是一种能破坏儿茶酚胺能神经末端的神经毒素, 可诱

表2 AS-IV的药代动力学性质

Table 2 Pharmacokinetic properties of AS-IV

化合物 Com-pound	中枢神经 系统作用 级别 ^a CNS ^a	与人结合蛋 白的结合常 数 ^b QPlogK _h ^{a,b}	辛醇和水 中的分配 系数 ^c QPlogP _{ow} ^c	饱和水溶 液中溶解 度的对数 ^d QPlogS ^d	阻断HERG K ⁺ 通道的IC ₅₀ 的对数 ^e QPlogHERG ^e	具有反应 性功能基 团数 ^f #rtvFG ^f	PM3计算 的离子化 势 ^g IP /eV ^g	半数致死量/ mg·kg ⁻¹ LD ₅₀ / mg·kg ⁻¹	毒性分级 ^h Toxicity class ^h
AS-IV	-2	-0.492	0.73	-4.591	-5.01	2	10.37	23 000	V

a: 预测化合物在中枢神经系统的作用级别, 范围为-2~-2; b: 预测化合物与人的结合蛋白的结合常数, 范围是-3.0~1.2; c: 化合物在辛醇和水中的分配系数, 范围是-2.0~6.5; d: 饱和水溶液中的溶解度的对数, 范围是-6.0~0.5; e: 阻断HERG K⁺通道的IC₅₀的对数值。范围为小于-5; f: 具有反应性的功能基团数量, 范围一般是0~2; g: PM3计算的离子化势, 范围是7.9~10.5; h: I级(LD₅₀≤5)为吞咽致命, II级(5<LD₅₀≤50)为吞咽可能致命, III级(50<LD₅₀≤300)为吞咽有毒, IV级(300<LD₅₀≤2 000)为吞咽有害, V级(2 000<LD₅₀≤5 000)为吞咽可能有害, VI级(LD₅₀>5 000)为无毒。

a: to predict the level of action of the compound in the central nervous system, ranging from -2~-2; b: to predict the binding constant of the compound to the human binding protein in the range of -3.0~1.2; c: the distribution coefficient of the compound in octanol and water ranges from -2.0~6.5; d: the logarithm of solubility in saturated aqueous solution, ranging from -6.0~0.5; e: the logarithm of IC₅₀ that blocks the HERG K⁺ channel. The range is less than -5; f: the number of reactive functional groups, the range is generally 0~2; g: ionization potential calculated by PM3, ranging from 7.9~10.5; h: Grade I (LD₅₀≤5) is fatal swallowing, Grade II (5<LD₅₀≤50) is potentially fatal swallowing, Grade III (50<LD₅₀≤300) is toxic swallowing, Grade IV (300<LD₅₀≤2 000) is harmful swallowing, Grade V (2 000<LD₅₀≤5 000) may be harmful to swallow, grade VI (LD₅₀>5 000) is non-toxic.

导细胞发生氧化应激反应, 常用于建立神经损伤模型^[30]。为研究AS-IV是否可以在PC12细胞中发挥神经保护作用, 本研究利用细胞活性的测定、LDH在培养基中的相对释放量、细胞凋亡情况来评估, 结果表明, AS-IV可以提高氧化应激损伤后细胞的增殖率, 降低培养基内LDH的释放量, 减少细胞凋亡的发生, 发挥神经保护效应。GSH是含有巯基的小分子肽类物质, 具有抗氧化和解毒功能, SOD是一种抗氧化金属酶, 是生物体内氧自由基的天然清除剂, T-AOC可以对各种抗氧化酶和抗氧化物质构成的总抗氧化水平进行评估。为证实AS-IV可以提高细胞的内源性抗氧化能力, 研究检测了总GSH、T-AOC的水平和SOD的活性, 结果表明, AS-IV能提高氧化应激损伤后PC12细胞内总GSH、T-AOC的水平和SOD的活性, 使内源性抗氧化防御系统的能力得到提高。Nrf2是机体重要的转录调节因子, 可通过激活抗氧化、抗炎等细胞保护基因的表达来维持细胞内的氧化还原稳态, 降低ROS的水平, 促进神经干细胞存活和神经发生^[31]。为了探究AS-IV的作用机制, 本研究测定了其对于Nrf2蛋白表达的影响, 发现AS-IV可以显著上调细胞内Nrf2的表达, 促进Nrf2从细胞质向细胞核的易位, 因此, AS-IV发挥抵御神经细胞氧化应激损伤的作用机制可能与Nrf2密切相关, 并且AS-IV可能是一种潜在的Nrf2激活剂。

计算机辅助药物设计(computer-aided drug design, CADD)通过结合计算机科学和化学原理, 可以评估化合物与特定目标蛋白的相互作用能力, 筛

选出具有潜在药物活性的候选化合物。为了进一步明确AS-IV对Keap1-Nrf2-ARE信号通路的作用机理, 随后通过分子对接、分子动力学模拟等CADD技术继续探究AS-IV的作用机制。基于对分子对接的结果进行分析, 发现AS-IV能以较高亲和力结合到Keap1的P2、P3、P4、P5活性口袋内, 形成较强的氢键和疏水相互作用, 所以, AS-IV可能是通过与Nrf2竞争性的结合Keap1, 而扰乱Keap1-Nrf2 PPI的一种小分子抑制剂。通过进一步的分子模拟研究, 发现复合物与空载蛋白的RMSD、RMSF值具有相似性, 说明在模拟过程中, 配体没有偏离初始的结合口袋, 复合物具有较高的稳定性。氢键数量演变与自由能形貌图也证明了配体与蛋白之间具有较高的亲和力, 易于形成稳定构象。通过对复合物体系的结合自由能计算与残基能量分解, 揭示了Keap1与AS-IV主要的结合形式是范德华相互作用与静电相互作用。此外, Keap1的疏水结构域对配体与蛋白的结合发挥了至关重要的作用。综上, 如图9所示, AS-IV的神经保护作用机制可能是通过与Nrf2竞争性地结合Keap1, 抑制Keap1-Nrf2的PPI, 随后Nrf2逃离了泛素化和蛋白酶体降解过程, 稳定化的Nrf2易位到细胞核中, 与sMaf异源二聚化, 激活ARE依赖的基因表达。另外, AS-IV的药代动力学结果显示, 其溶解性、透膜性、稳定性均较好, 心脏毒性低且不具有肝毒性, LD₅₀的毒性等级为V级, 安全性较好, 因此AS-IV是非常有前途的天然神经保护剂。

Keap1在细胞质中介导Nrf2的降解, 抑制Keap1-

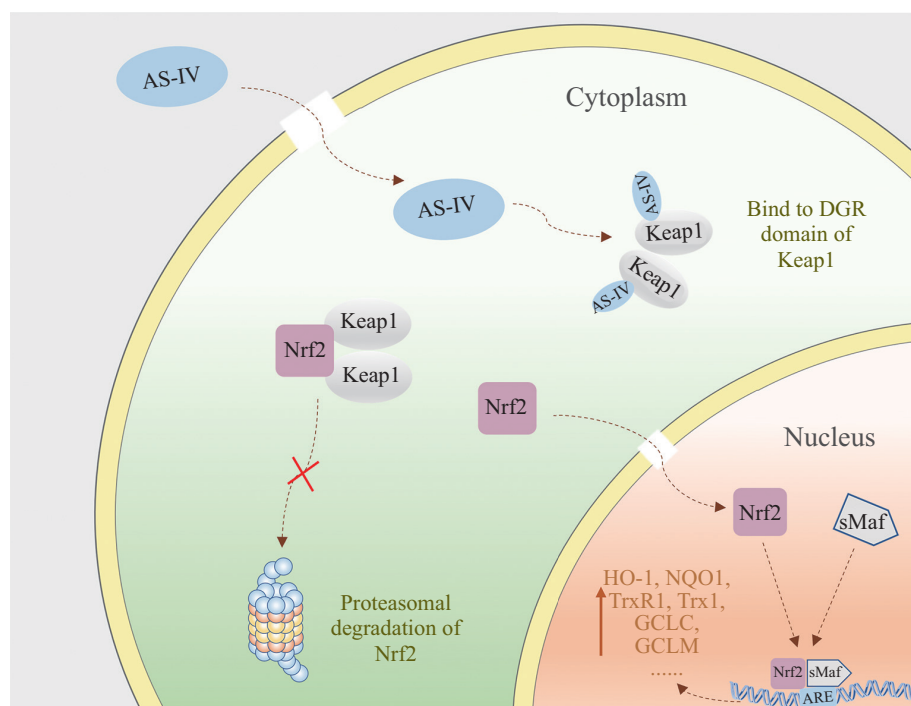


图9 AS-IV在PC12细胞中的作用机制(根据参考文献[37]修改)

Fig.9 Mechanism of action of AS-IV in PC12 cells (modified from reference [37])

Nrf2的PPI被认为是激活Nrf2的主要方式。与Keap1-Nrf2复合物的PPI直接抑制剂相比,基于共价修饰的Nrf2激活方式可能会存在一定的脱靶效应,产生多于预期的结合反应。所以,相比于共价抑制剂,AS-IV激活Nrf2的方式更安全、更有效。此外,其他调节机制也可以参与Nrf2的调控,如糖原合酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)可使Neh6结构域的DSGIS基序中的残基Ser335和Ser338磷酸化,促进Neh6结构域与 β -转导重复相容蛋白(β -transducin repeat-containing protein, β -TrCP)的结合,使Nrf2发生泛素化且被蛋白酶体快速降解^[32]。组蛋白乙酰转移酶P300可以使Nrf2直接乙酰化,并增强Nrf2对下游靶基因的调控能力^[33]。腺苷酸活化蛋白激酶(adenine monophosphate activated protein kinase, AMPK)则可以通过Nrf2的Ser550残基磷酸化而使Nrf2在细胞核内聚积,并上调抗氧化基因的表达;另外,AMPK还可以抑制GSK-3 β 的表达而间接抑制Nrf2的泛素化和降解^[34-36],而AS-IV是否参与以上这些调节机制也有待进一步的探讨。

综上所述,本研究证实了AS-IV可以减轻6-OHDA诱导的PC12细胞损伤,提高内源性抗氧化系统的防御能力,阐释了其机制可能与激活Keap1-

Nrf2信号通路有关。基于AS-IV在细胞实验中有有效性的基础上,后期可以在动物实验层面做进一步的论证。本研究可为AS-IV作为潜在的神经保护剂的进一步研究提供依据,也可为设计和开发新的小分子作为神经保护剂提供一定的参考。

参考文献 (References)

- [1] ESMAEILI Y, YARJANLI Z, PAKNIYA F, et al. Targeting autophagy, oxidative stress, and ER stress for neurodegenerative disease treatment [J]. J Control Release, 2022, 345: 147-75.
- [2] ZHOU Y, ZHEN Y, WANG G, et al. Deconvoluting the complexity of reactive oxygen species (ROS) in neurodegenerative diseases [J]. Front Neuroanat, 2022, 16: 910427.
- [3] 倪晓琦, 陈锡威, 金晓峰. E3泛素连接酶接头蛋白Keap1的研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展(NI X Q, CHEN X W, JIN X F. Research progress of E3 ubiquitin ligase adaptor protein Keap1 [J]. Progress in Biochemistry and Biophysics), 2022, 49(2): 328-48.
- [4] NAKAMURA Y, MIYOSHI N. Electrophiles in foods: the current status of isothiocyanates and their chemical biology [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2010, 74(2): 242-55.
- [5] LUO Y, EGGLE A L, LIU D, et al. Sites of alkylation of human Keap1 by natural chemoprevention agents [J]. J Am Soc Mass Spectrom, 2007, 18(12): 2226-32.
- [6] 刘圆圆, 彭婷, 姚娟, 等. 基于Keap1/Nrf2/ARE信号通路的天然产物在神经保护方面的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志(LIU Y Y, PENG T, YAO J, et al. Neuroprotection of natural products based on Keap1/Nrf2/ARE signaling pathway: a review

- [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2023, 29(7): 262-73.
- [7] BAIRD L, LLÈRES D, SWIFT S, et al. Regulatory flexibility in the Nrf2-mediated stress response is conferred by conformational cycling of the Keap1-Nrf2 protein complex [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(38): 15259-64.
- [8] JIANG C S, ZHUANG C L, ZHU K, et al. Identification of a novel small-molecule Keap1-Nrf2 PPI inhibitor with cytoprotective effects on LPS-induced cardiomyopathy [J]. J Enzyme Inhib Med Chem, 2018, 33(1): 833-41.
- [9] 刘丽丹, 田新玮, 刘文萍, 等. 抑制miR-128-3p对阿尔茨海默症大鼠认知功能障碍的影响[J]. 脑与神经疾病杂志(LIU L D, TIAN X W, LIU W P, et al. the influence of inhibition miR-128-3p on cognitive dysfunction in Alzheimer's disease rats [J]. Journal of Brain and Nervous Diseases), 2021, 29(10): 609-14.
- [10] BHAKKIYALAKSHMI E, DINESHKUMAR K, KARTHIK S, et al. Pterostilbene-mediated Nrf2 activation: mechanistic insights on Keap1:Nrf2 interface [J]. Bioorg Med Chem, 2016, 24(16): 3378-86.
- [11] ABED D A, GOLDSTEIN M, ALBANYAN H, et al. Discovery of direct inhibitors of Keap1-Nrf2 protein-protein interaction as potential therapeutic and preventive agents [J]. Acta Pharm Sin B, 2015, 5(4): 285-99.
- [12] CHEN C C, CHANG L C, YAO C H, et al. Increased calcitonin gene-related peptide and macrophages are involved in astragalus membranaceus-mediated peripheral nerve regeneration in rats [J]. Am J Chin Med, 2018, 46(1): 69-86.
- [13] WU Q, GU X, LIU X, et al. Astragalus membranaceus injection protects retinal ganglion cells by regulating the nerve growth factor signaling pathway in experimental rat traumatic optic neuropathy [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2020: 2429843.
- [14] 吴红伟, 李东辉, 宋沁洁, 等. 黄芪趁鲜切制饮片与传统饮片化学成分及体外抗氧化活性比较研究[J]. 中草药(WU H W, LI D H, SONG Q J, et al. Comparative study on chemical composition and *in vitro* anti-oxidant activity of Astragali Radix fresh-cut pieces and traditional pieces [J]. Chinese Herbal Medicine), 2022, 53(22): 7039-47.
- [15] 赵小强, 赵静, 张浩波, 等. 黄芪甲苷的提取、分离、纯化及其药理作用的研究进展[J]. 华西药理学杂志(ZHAO X Q, ZHAO J, ZHANG H B, et al. Research progress on extraction, separation and purification of astragaloside IV and its pharmacological effects[J]. West China Journal of Pharmaceutical Sciences), 2022, 37(6): 711-6.
- [16] HOU B, LIU R, WU Y, et al. Astragaloside IV reduces cerebral ischemia/reperfusion-induced blood-brain barrier permeability in rats by inhibiting ER stress-mediated apoptosis [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2020: 9087873.
- [17] GE B, LI S L, LI F R. Astragaloside-IV regulates endoplasmic reticulum stress-mediated neuronal apoptosis in a murine model of Parkinson's disease via the lincRNA-p21/CHOP pathway [J]. Exp Mol Pathol, 2020, 115: 104478.
- [18] COSTA I M, LIMA F O V, FERNANDES L C B, et al. Astragaloside IV supplementation promotes a neuroprotective effect in experimental models of neurological disorders: a systematic review [J]. Curr Neuroparmacol, 2019, 17(7): 648-65.
- [19] YAO J, PENG S, XU J, et al. Reversing ROS-mediated neurotoxicity by chlorogenic acid involves its direct antioxidant activity and activation of Nrf2-ARE signaling pathway [J]. Biofactors, 2019, 45(4): 616-26.
- [20] PALLESEN J S, TRAN K T, BACH A. Non-covalent small-molecule Kelch-like ECH-associated protein 1-nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Keap1-Nrf2) inhibitors and their potential for targeting central nervous system diseases [J]. J Med Chem, 2018, 61(18): 8088-103.
- [21] LO S C, LI X, HENZL M T, et al. Structure of the Keap1: Nrf2 interface provides mechanistic insight into Nrf2 signaling [J]. EMBO J, 2006, 25(15): 3605-17.
- [22] HONG J, SHI Z, LI C, et al. Virtual screening identified natural Keap1-Nrf2 PPI inhibitor alleviates inflammatory osteoporosis through Nrf2-mir214-Traf3 axis [J]. Free Radic Biol Med, 2021, 171: 365-78.
- [23] JUSTINO G C, NASCIMENTO C P, JUSTINO M C. Molecular dynamics simulations and analysis for bioinformatics undergraduate students [J]. Biochem Mol Biol Educ, 2021, 49(4): 570-82.
- [24] SCHMID N, EICHENBERGER A P, CHOUTKO A, et al. Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7 [J]. Eur Biophys J, 2011, 40(7): 843-56.
- [25] WANG E, LIU H, WANG J, et al. Development and evaluation of MM/GBSA based on a variable dielectric gb model for predicting protein-ligand binding affinities [J]. J Chem Inf Model, 2020, 60(11): 5353-65.
- [26] BANERJEE P, ECKERT A O, SCHREY A K, et al. ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals [J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(W1): W257-63.
- [27] JIANG Z Y, LU M C, XU L L, et al. Discovery of potent Keap1-Nrf2 protein-protein interaction inhibitor based on molecular binding determinants analysis [J]. J Med Chem, 2014, 57(6): 2736-45.
- [28] XIE D, DENG T, ZHAI Z, et al. The cellular model for Alzheimer's disease research: PC12 cells [J]. Front Mol Neurosci, 2023, 15: 1016559.
- [29] CHUA P, LIM W K. Optimisation of a PC12 cell-based *in vitro* stroke model for screening neuroprotective agents [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 8096.
- [30] 王莹雪, 卞育婕, 周玉奇, 等. 帕金森病动物模型神经炎症反应与损伤的研究进展[J]. 神经解剖学杂志(WANG Y X, BIAN Y J, ZHOU Y Q, et al. Research progress of neuroinflammatory response and damage in animal models of Parkinson's disease [J]. Journal of Neuroanatomy), 2017, 33(1): 90-4.
- [31] KAHROBA H, RAMEZANI B, MAADI H, et al. The role of Nrf2 in neural stem/progenitors cells: from maintaining stemness and self-renewal to promoting differentiation capability and facilitating therapeutic application in neurodegenerative disease [J]. Ageing Res Rev, 2021, 65: 101211.
- [32] CUADRADO A. Structural and functional characterization of Nrf2 degradation by glycogen synthase kinase 3 β -TrCP [J]. Free Radic Biol Med, 2015, 88(Pt B): 147-57.
- [33] LEE K H, WOO J, KIM J, et al. Cigarette smoke extract decreased basal and lipopolysaccharide-induced expression of MARCO via degradation of p300 [J]. Respiriology, 2021, 26(1): 102-11.
- [34] JOO M S, KIM W D, LEE K Y, et al. AMPK facilitates nuclear accumulation of Nrf2 by phosphorylating at serine 550 [J]. Mol

- Cell Biol, 2016, 36(14): 1931-42.
- [35] PARK S Y, CHOI Y W, PARK G. Nrf2-mediated neuroprotection against oxygen-glucose deprivation/reperfusion injury by emodin via AMPK-dependent inhibition of GSK-3 β [J]. J Pharm Pharmacol, 2018, 70(4): 525-35.
- [36] LU H, XIAO H, DAI M, et al. Britanin relieves ferroptosis-mediated myocardial ischaemia/reperfusion damage by upregulating GPX4 through activation of AMPK/GSK3 β /Nrf2 signalling [J]. Pharm Biol, 2022, 60(1): 38-45.
- [37] SHAW P, SEN A, MONDAL P, et al. Shinorine ameliorates chromium induced toxicity in zebrafish hepatocytes through the facultative activation of Nrf2-Keap1-ARE pathway [J]. Aquat Toxicol, 2020, 228: 105622.