

复方益智颗粒对 $A\beta_{25-35}$ 致 PC12 细胞损伤的神经保护作用研究

郝二伟^{1,2,3} 邓家刚² 杜正彩² 侯小涛² 缪剑华³

(1 暨南大学生物医学工程博士后流动站, 广州, 510632; 2 广西中医药大学广西中药效筛选重点实验室, 南宁, 530001; 3 广西药用植物园, 南宁, 530000)

摘要 目的: 探讨复方益智颗粒对 $A\beta_{25-35}$ 导致 PC12 细胞损伤的保护作用, 为进一步研究该产品改善阿尔茨海默症记忆功能障碍的作用机制奠定基础。方法: 取经不同处理的 PC12 细胞分为正常对照组、 $A\beta_{25-35}$ 模型组、 $A\beta_{25-35}$ + 正常血清组、 $A\beta_{25-35}$ + CYZG 含药血清组 (不同浓度)。正常对照组: DMEM 培养基培养 48 h, $A\beta_{25-35}$ 模型组: DMEM 培养基培养 24 h 后换含 20 μM $A\beta_{25-35}$ 的 DMEM 培养基继续培养 24 h, $A\beta_{25-35}$ + 正常血清组: 正常血清预处理 24 h 后加入 20 μM $A\beta_{25-35}$ 的 DMEM 培养基继续培养 24 h, $A\beta_{25-35}$ + CYZG 含药血清组: 不同浓度 CYZG 含药血清预处理 24 h 后, 加入 20 μM $A\beta_{25-35}$ 的 DMEM 培养基继续培养 24 h。分别采用 MTT 法检测细胞增殖情况、流式细胞仪检测 PC12 神经细胞凋亡情况。结果: $A\beta_{25-35}$ 时间依赖性地抑制 PC12 细胞的生长, 不同浓度 CYZG 含药血清对其造成的细胞损伤有保护作用, 随着含药血清剂量的增加, 细胞的存活率增加, 生长抑制率减少。 $A\beta_{25-35}$ 能显著引起 PC12 细胞凋亡, 不同浓度 CYZG 含药血清对其造成的细胞凋亡有抑制作用。结论: 复方益智颗粒对 $A\beta_{25-35}$ 引起的 PC12 细胞损伤具有一定的保护作用, 其神经保护作用可能与抑制 $A\beta_{25-35}$ 引起的 PC12 细胞凋亡有关。

关键词 阿尔茨海默症; $A\beta_{25-35}$; 细胞凋亡; 中药

Neuroprotective Effect Research of Compound Yizhi Granule on the PC12 Cell Injury Model Induced by $A\beta_{25-35}$

Hao Erwei^{1,2,3}, Deng Jiagang², Du Zhengcai², Hou Xiaotao², Miao Jianhua³

(1 The Post-Doctoral Research Station of Biomedical Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2 Guangxi Medicinal Botanic Garden, Nanning 530000, China; 3 Guangxi Key Laboratory of Efficacy Screening of Chinese Materia Medica, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

Abstract Objective: To observe the protection effects of Fufang yizhi Granule on the cellular damage induced by the protein $A\beta_{25-35}$, and to be the basis of further study on the mechanism of this product to improve the memory in Alzheimer's disease. **Methods:** Different processing cells were divided into Normal control group, $A\beta_{25-35}$ model control group, $A\beta_{25-35}$ + Normal serum group, and $A\beta_{25-35}$ + CYZG serum group, then given different procedure. Normal control group: cultured with DMEM medium for 48 h, $A\beta_{25-35}$ model control group, 24 h after being cultured with DMEM medium, then added the medium contained 20 μM $A\beta_{25-35}$ and continuously cultured 24 h. $A\beta_{25-35}$ + Normal serum group: 24 h after being cultured with DMEM medium contained normal serum, then add the medium contained 20 μM $A\beta_{25-35}$ and continuously cultured 24 h, $A\beta_{25-35}$ + CYZG serum group: 24 h after being cultured with DMEM medium contained CYZG serum, then add the medium contained 20 μM $A\beta_{25-35}$ and continuously cultured 24 h. **Results:** Protein $A\beta_{25-35}$ could time-dependently inhibit the growth of PC12 cells, CYZG serum of different concentrations had protective effect on the cellular damage, with the increase of the CYZG serum dosage, the cell survival rate increase, and growth inhibition rate decrease. Protein $A\beta_{25-35}$ could induce the apoptosis of PC12 cells, CYZG serum of different concentrations significantly inhibited the apoptosis. **Conclusion:** Fufang yizhi Granule could protect the PC12 from the damage induced by Protein $A\beta_{25-35}$, the mechanism of neuroprotective effect of Fufang yizhi Granule may relate with the inhibition effect of apoptosis.

Key Words Alzheimer's disease; $A\beta_{25-35}$; Apoptosis; Chinese Materia Medica

中图分类号: R285.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2016.11.006

复方益智颗粒是中泰联合开发的具有改善记忆功能的中药保健产品, 处方由人参、绞股蓝、三七等 6 味中药组成, 2012 年已获得生产批文和国家发明专利。前期动物和人体试验表明, 复方益智颗粒具

基金项目: 广西国际科技合作项目 (编号: 桂科合 1347004-16); 广西重点实验室建设项目 (编号: 15-140-31); 广西农作物废弃物功能成分研究协同创新中心建设 (编号: CICAR2015-Z1)

通信作者: 邓家刚, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 中药药效筛选及中药基础理论研究; E-mail: dengjg53@126.com

有显著的改善人体记忆功能的作用^[1];在小鼠跳台、避暗、水迷宫3项试验中均被证明具有确切的改善记忆的作用^[2],可显著改善老龄小鼠的学习记忆能力^[3];复方益智颗粒对 $A\beta_{25-35}$ 致老年性痴呆模型大鼠空间学习记忆损害也具有明显改善作用^[4]。我们采用 $A\beta_{25-35}$ 诱导建立老年痴呆细胞模型,观察益智颗粒对 $A\beta_{25-35}$ 致 PC12 细胞损伤和凋亡的保护作用,以期揭示该产品改善阿尔茨海默病患者记忆功能障碍的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级 SD 大鼠 20 只,质量 300 g 左右,雄性,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供。许可证号:SYXK(湘)2014-0012。笼中鼠颗粒饲料饲养,自由饮食,每天给予 12 h 光照,适应性饲养 1 周后才能进行实验操作。所有动物喂以标准颗粒饲料均由广西中医药大学实验动物中心提供。

1.2 细胞株 PC12 大鼠肾上腺髓质嗜铬瘤分化细胞株,购于上海中科院细胞库。

1.3 试剂及仪器 马血清(Gibco,美国)、青霉素-链霉素溶液(100X)(碧云天)、胎牛血清(Gibco,美国)、胰蛋白酶(碧云天)、DMEM 培养基(Gibco,美国)、DMSO(Amresco,美国)、 $A\beta_{25-35}$ (Sigma,美国)、DMEM 高糖培养基(Gibco,美国)、MTT 试剂盒(Sigma,美国)、Annexin V-FITC 流式凋亡试剂盒(BD,美国)。

倒置显微镜(OLYMPUS,日本)、流式细胞检测仪(BD,美国)、多功能酶标仪(ThermoFisher,美国)。

1.4 PC12 细胞体外培养 DMEM 培养基(Gibco),10% FBS,1% 抗生素(antibiotics/antimycotics(Gibco-BRL),2~3 d 换液 1 次,细胞 80% 融合度时传代。可按照 1:4 传代比例进行,37℃,5% CO_2 及饱和湿度培养箱。

1.5 含药血清的制备 雄性 SD 大鼠 20 只,体重 300 左右 g,随机分为正常对照组和 CYZG 组,每组 10 只,CYZG 组灌胃给予 CYZG 混悬液(14 mL/kg),对照组给予相同体积的生理盐水,2 次/d,2 次之间间隔 6 h,连续 10 d,末次给药 2 h 后腹主动脉采血,收集血清,56℃ 水浴灭活补体,经 0.22 μ m 微孔滤膜抽滤除菌,-20℃ 分装保存备用。

1.6 AD 细胞模型建立 采用 $A\beta$ 的活性片段 $A\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞凋亡建立 AD 的细胞模型。PC12 细胞用含 10% 马血清、5% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素及 100 μ g/mL 链霉素的 DMEM 高糖培养基中,于 37℃、饱和湿度、5% CO_2 的培养箱中培养,4

~5 d 传代 1 次。取对数生长期的细胞传代,传代时用 0.25 胰酶消化,显微镜下观察待细胞突起开始收缩时加入含血清的培养基中和,移液枪吹散细胞。收集细胞于 15 mL 离心管中,1 000 r/min 离心 5 min 去上清,新鲜培养基重悬细胞后接种于 96 孔培养板,细胞接种 24 h 后吸去旧培养基,加入含 $A\beta_{25-35}$ (20 μ M) 不含血清的培养基,继续培养 24 h 后用于后续指标检测。

1.7 MTT 法检测细胞增殖情况 1) 取经不同处理的细胞分为 8 个组:对照组、 $A\beta_{25-35}$ 组、 $A\beta_{25-35}$ + 正常血清组、 $A\beta_{25-35}$ + CYZG 血清 40 μ L 组、 $A\beta_{25-35}$ + CYZG 血清 60 μ L 组、 $A\beta_{25-35}$ + CYZG 血清 80 μ L 组、 $A\beta_{25-35}$ + CYZG 血清 100 μ L 组、 $A\beta_{25-35}$ + CYZG 血清 120 μ L 组,计数调整细胞浓度至 1×10^5 /mL。2) 分别接种于 96 孔板中,每孔 200 μ L,每组细胞设 3 个复孔。3) 将 96 孔板移入培养箱中培养(37℃,5% CO_2),培养细胞到适当时间。4) 对照组:DMEM 培养基培养 48 h; $A\beta_{25-35}$ 组:DMEM 培养基培养 24 h 后换含 20 μ M $A\beta_{25-35}$ 的 DMEM 培养基继续培养 24 h; $A\beta_{25-35}$ + 正常血清组:正常血清预处理 24 h 后加入 20 μ M $A\beta_{25-35}$ 的 DMEM 培养基继续培养 24 h; $A\beta_{25-35}$ + CYZG 血清组(40 μ L,60 μ L,80 μ L,100 μ L,120 μ L):CYZG 含药血清预处理 24 h 后加入 20 μ M $A\beta_{25-35}$ 的 DMEM 培养基继续培养 24 h。5) 向每孔加入 20 μ L 5 mg/mL MTT 溶液溶液(注意不要在孔中生成气泡,它们会影响 OD 值的读数)。6) 将培养板在培养箱内孵育 4~6 h。7) 终止培养,小心吸去孔内培养液。8) 每孔加入 150 μ L DMSO,置摇床上低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 OD490 nm 处测量各孔的吸光值。9) 同时设置调零孔(培养基、MTT、二甲基亚砷),对照孔(细胞、相同浓度的药物溶解递质、培养液、MTT、二甲基亚砷)。

1.8 流式细胞仪检测 PC12 神经细胞凋亡 1) 取经不同处理的细胞分为 8 个组:对照组、 $A\beta_{25-35}$ 组、 $A\beta_{25-35}$ + 正常血清组、 $A\beta_{25-35}$ + CYZG 血清 40 μ L 组、 $A\beta_{25-35}$ + CYZG 血清 80 μ L 组、 $A\beta_{25-35}$ + CYZG 血清 120 μ L 组,计数调整细胞浓度至 1×10^5 /mL。用 6 孔板培养细胞,待细胞生长达到 60%~70%,吸出旧培养基,根据实验需求处理,继续培养。2) 根据实验处理时间,把细胞培养液吸出至一合适离心管内,PBS 洗涤贴壁细胞 1 次,加入适量胰酶细胞消化液消化细胞。转移到离心管内,1 000 g 离心 5 min,弃上清,收集细胞,用 PBS 轻轻重悬细胞并计数。3)

取 5 万 ~10 万重悬的细胞,1 000 g 离心 5 min,弃上清,加入 195 μ L Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞。4)加入 5 μ L Annexin V-FITC,轻轻混匀。5)室温(20 ~25 $^{\circ}$ C)避光孵育 10 min。可以使用铝箔进行避光。6)1 000 g 离心 5 min,弃上清,加入 190 μ L Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞。7)加入 10 μ L 碘化丙啶染色液,轻轻混匀,冰浴避光放置。随即进行流式细胞仪检测,Annexin V-FITC 为绿色荧光,PI 为红色荧光。

2 实验结果

2.1 复方益智颗粒对 PC12 细胞增殖的影响 见表 1。

实验分组	抑制率(%)		
	6 h	12 h	24 h
空白组	—	—	—
对照组	—	—	—
A β_{25-35} 组	6.29	20.86	38.49
A β_{25-35} + 正常血清组	5.43	22.90	40.24
A β_{25-35} + CYZG 血清 40 μ L 组	4.64	17.05	32.45 *
A β_{25-35} + CYZG 血清 60 μ L 组	4.34	12.59 *	21.40 **
A β_{25-35} + CYZG 血清 80 μ L 组	5.03	11.44 *	15.49 **
A β_{25-35} + CYZG 血清 100 μ L 组	4.02	7.19 *	10.85 **
A β_{25-35} + CYZG 血清 120 μ L 组	5.24	6.92 *	7.31 **

注:与 A β_{25-35} 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

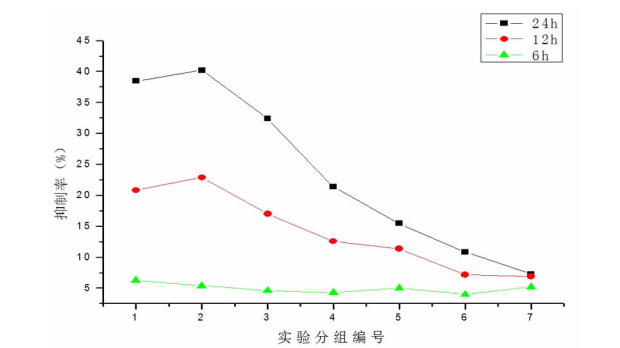


图 1 不同浓度 CYZG 含药血清对 PC12 细胞增殖的影响

注:1: A β_{25-35} 组;2: A β_{25-35} + 正常血清组;3: A β_{25-35} + CYZG 血清 40 μ L 组;4: A β_{25-35} + CYZG 血清 60 μ L 组;5: A β_{25-35} + CYZG 血清 80 μ L 组;6: A β_{25-35} + CYZG 血清 100 μ L 组;7: A β_{25-35} + CYZG 血清 120 μ L 组;抑制率(%) = 1 - 实验组去除空白后 OD 值/对照组去除空白后 OD 值。

根据以上实验结果分析,A β_{25-35} 时间依赖性地抑制 PC12 细胞的生长,含药血清对其修复作用有剂量依赖性,随着含药血清剂量的增加,细胞的存活率增加,生长抑制率减少。PC12 对后续实验低血清处理组为 A β_{25-35} + CYZG 血清 40 μ L 组;中血清处理组为 A β_{25-35} + CYZG 血清 80 μ L 组;高血清处理组为 A β_{25-35} + CYZG 血清 120 μ L 组。

2.2 复方益智颗粒对 A β_{25-35} 诱导 PC12 细胞凋亡的影响 流式细胞仪检测各组细胞 annexinV/PI 染色情况显示,A β_{25-35} 处理 PC12 细胞能够显著增加细胞凋亡率(与正常对照组比较, $P < 0.01$),A β_{25-35} + 正常血清处理组对 A β_{25-35} 引起的细胞凋亡没有明显的影响,不同剂量 CYZG 含药血清对 A β_{25-35} 引起的细胞凋亡均可以起到明显的抑制作用,A β_{25-35} + CYZG40 μ L 组、A β_{25-35} + CYZG 血清 80 μ L 组、A β_{25-35} + CYZG 血清 120 μ L 组的凋亡率明显下降(与 A β_{25-35} 模型组比较, $P < 0.01$)。

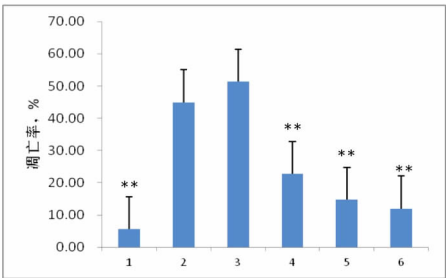


图 2 CYZG 含药血清对 A β_{25-35} 致 PC12 细胞凋亡的影响
注:1:正常对照组,2:A β_{25-35} 组,3:A β_{25-35} + 正常血清组,4:A β_{25-35} + CYZG 血清组(低),5:A β_{25-35} + CYZG 血清组(中),6:A β_{25-35} + CYZG 血清组(高)。

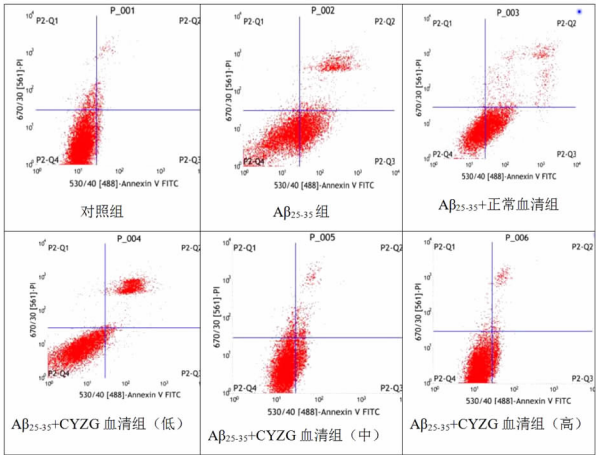


图 3 各组细胞流式细胞仪检测信号图
注:P2-Q2:晚期凋亡细胞;P2-Q3:早期凋亡。

3 讨论

阿尔茨海默病(Alzheimer's Disease, AD),是一种严重危害老年人身心健康的中枢神经系统退行性疾病,临床表现为进行性记忆力减退、认知功能障碍、分析判断力下降、意识模糊和智力逐渐丧失,最终导致生活不能自理^[5]。其特征性病理变化为大脑皮质萎缩,并伴有 β -淀粉样蛋白(β -amyloid protein, A β)沉积,神经元纤维缠结(Neuro Fibrillary Tangles, NFT),大量记忆性神经元数目减少,以及老年斑(Senile Plaque, SP)的形成^[6-8]。目前,对于 AD 的发

病机制有多种假说,其中“ $A\beta$ 级联反应学说”已为大多学者所接受,即各种原因所致的 $A\beta$ (β -amyloid)代谢异常,引起 $A\beta$ 在脑组织的异常增多,在此过程触发了与 AD 病理生理、生物化学相关的级联反应,如胆碱能神经损害、突触可塑性功能障碍等,最终导致神经元损害并引起痴呆^[9]。因此, $A\beta$ 作为一个重要的分子靶点,已经成为治疗阿尔茨海默病药物研究与开发的重点^[10]。

本实验采用 $A\beta_{25-35}$ 处理 PC12 细胞建立 AD 细胞模型。结果表明, $A\beta_{25-35}$ 预处理 PC12 细胞 24 h 后,造成细胞损伤,抑制细胞的增殖;CYZG 含药血清预处理 24 h 后,细胞抑制率降低,不同浓度 CYZG 含药血清均能显著降低细胞抑制率,且呈剂量依赖性;提示 CYZG 可以有效的抑制 $A\beta$ 对神经细胞造成的毒性,从而起到保护神经细胞的作用。

$A\beta$ 聚集是 AD 的早期变化之一,可能导致中枢神经系统细胞死亡^[11-12]。神经细胞凋亡是 AD 患者脑内出现大量神经元丢失现象的重要原因之一^[13-15]。本研究结果表明, $A\beta_{25-35}$ 处理 PC12 细胞能够显著增加细胞凋亡率不同剂量 CYZG 含药血清对 $A\beta_{25-35}$ 引起的细胞凋亡均可以起到明显的抑制作用。本研究结果揭示复方益智颗粒可对抗 $A\beta_{25-35}$ 聚集导致的神经细胞损伤和凋亡,具体分子机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 杜正彩,邓家刚. 复方绞股蓝益智颗粒改善记忆作用临床观察研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(12):309-313.
- [2] 杜正彩,邓家刚. 复方绞股蓝益智颗粒改善记忆作用药效学研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(15):250-253.
- [3] 邓家刚,杜正彩,郝二伟. 复方绞股蓝对小鼠学习记忆及脑内单胺氧化酶活性的影响[J]. 世界中西医结合杂志,2007,2(12):692-

694.

- [4] 杜正彩,邓家刚,兰太进,等. 复方田七益智颗粒对老年痴呆模型大鼠学习记忆及海马 AChE 活性的影响[J]. 中国老年学杂志,2011,31(17):3318-3320.
- [5] Perrin, Fagan, Holtzman. Multimodal techniques for diagnosis and prognosis of Alzheimer's disease[J]. Nature,2009,461(7266):916-922.
- [6] 胡海燕. β -淀粉样蛋白在阿尔茨海默病中的作用及中药多靶点对抗研究进展[J]. 中华中医药学刊,2012,30(3):488-491.
- [7] 方伯言,贾建平. 早老素 1 基因突变与阿尔茨海默病病理变化的关系[J]. 中国临床康复,2005,45(9):113-115.
- [8] 唐湘祁,刘正清,谭利明,等. 泛素在阿尔茨海默病神经原纤维缠结和老年斑中的表达[J]. 中华神经科杂志,2005,37(5):393-395.
- [9] 牛英才,兴桂华,李春荣,等. 中药提取物对阿尔茨海默病模型大鼠神经细胞凋亡的干预作用[J]. 中国老年学杂志,2008,28(2):119-121.
- [10] 吴彦霖. 抗老年痴呆药物 971 靶向保护线粒体的功能作用及机制研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2010.
- [11] 钟树志,马世平,汪全海,等. 丹皮酚对 $A\beta_{1-42}$ 致神经元细胞毒的保护作用及机制[J]. 中国中药杂志,2012,37(17):2603-2606.
- [12] 黄昕艳,赵锦程,尉荣翠,等. $A\beta_{25-35}$ 寡聚体对大鼠海马神经细胞的活性影响及形态学观察[J]. 中风与神经疾病,2013,30(3):218-221.
- [13] YANG DS, Kumar A, Stavrides P, et al. Neuronal apoptosis and autophagy cross talk in aging PS/APP mice, a model of Alzheimer's disease[J]. Am J Pathol,2008,173(3):665-681.
- [14] 黄鹤鸣,陈实,赵艳杰,等. 神经细胞凋亡与阿尔茨海默病大鼠模型炎症因子相关性研究[J]. 中国医学工程,2015,23(6):26-29.
- [15] 夏趁意,赵妍,徐颖,等. 银杏酮酯抑制 β -淀粉样蛋白诱导海马神经元细胞凋亡的研究[J]. 中华中医药杂志,2014,29(6):2030-2034.

(2016-10-17 收稿 责任编辑:洪志强)

(上接第 2226 页)

- [6] 黄萍,吴清和,徐鸿华,等. 复方灵芝降糖胶囊治疗糖尿病的实验研究[J]. 广州中医药大学学报,2000,17(2):158-162,192.
- [7] 李小可,周义浪,赵丹丹,等. 肾气丸类方干预糖尿病前期与早期糖尿病血糖漂移的理论与应用分析[J]. 世界中医药,2015,10(5):793-797.
- [8] 钟饒生. 中药学[M]. 3 版. 北京:中国中医药出版社,2012.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部). 2015 版[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:6.

- [10] 全小林,胡洁,李洪蛟,等. 糖尿病中医新论[J]. 中华中医药杂志,2006,21(6):349-352.
- [11] 冷雪,谷丽艳,朱芳. 2 型糖尿病中医证型流行病学调查及其中医病因病机初探[J]. 中华中医药杂志,2015,30(3):732-735.
- [12] 吴春,徐寒松. 糖尿病前期的中医辨证施治[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(13):316-318.
- [13] 王旭,朱垚,陆明. 周仲瑛“瘀热致消”学术思想探究[J]. 中医杂志,2009,50(3):206-207.

(2016-10-17 收稿 责任编辑:洪志强)