

知母须根总皂苷提取工艺的优化及其对糖氧剥夺损伤的 PC12 细胞保护作用研究

李丽丽, 黄 琪, 彭代银*, 吴德玲, 韩 岚

安徽中医药大学药学院 安徽省中药研究与开发重点实验室, 安徽 合肥 230012

摘要: 目的 优化知母须根总皂苷提取工艺, 探讨其对糖氧剥夺 (oxygen-glucose deprivation, OGD) 损伤的 PC12 细胞的保护作用。方法 在单因素实验基础上, 利用响应面法优化知母须根总皂苷提取工艺; 建立 OGD 损伤的 PC12 细胞模型, 采用终质量浓度为 20、40、80 mg/L 的知母须根总皂苷进行干预。分别用倒置显微镜观察细胞形态, MTT 法测定细胞存活率, 荧光探针二氯荧光素-双乙酸盐 (DCF-DA) 法测定细胞内活性氧 (ROS) 含量, AnnexinV/PI 双染法测定细胞凋亡率, 蛋白免疫印记法检测凋亡信号蛋白 Bcl-2、Bax 表达情况。**结果** 知母须根总皂苷提取的最优条件为乙醇体积分数 72.22%, 料液比 1 : 11, 提取时间 73.33 min, 在此条件下, 理论提取率为 8.38%, 实测提取率为 8.33%。PC12 细胞经 OGD 损伤 4 h 后细胞活力显著降低, 知母须根总皂苷对其呈现保护作用, 并随着知母须根总皂苷质量浓度的升高而增强; 流式细胞术分析结果表明知母须根总皂苷能明显减少 OGD 损伤 PC12 细胞中 ROS 含量及凋亡率, 免疫印迹实验结果表明知母须根总皂苷可上调 PC12 细胞 Bcl-2 表达并下调 Bax 表达。**结论** 通过响应面法优化的工艺得率高、提取效果好。知母须根总皂苷对 OGD 损伤的 PC12 细胞具有一定的保护作用, 其机制可能与减少 OGD 诱导 PC12 细胞 ROS 含量、抑制线粒体凋亡通路有关。

关键词: 知母须根; 总皂苷; 响应面优化; PC12 细胞; OGD 损伤; 细胞凋亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253 - 2670(2018)13 - 3087 - 08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.13.020

Optimization of extraction process for total saponins from fibrous root of *Anemarrhena asphodeloides* and its protective effect on PC12 cells induced by oxygen-glucose deprivation

LI Li-li, HUANG Qi, PENG Dai-yin, WU De-ling, HAN Lan

Anhui Key Laboratory of Research and Development of Traditional Chinese Medicine, College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China

Abstract: Objective To optimize the extraction of total saponins from fibrous root of *Anemarrhena asphodeloides* (TSFAA) and explore its protective effect on PC12 cells induced by oxygen-glucose deprivation (OGD). **Methods** Single factor experiment and Box-Benken response surface method were used to select the best extraction technology. The model of PC12 cells induced by OGD was established and treated with the total concentration of 20, 40, and 80 mg/L TSFAA. Inverted microscope was used to observe the morphology of PC12 cells, and cell viability was measured by MTT assay. Fluorescence probe was used to detect the intracellular oxygen free radical (ROS), and Annexin V/PI double staining method was performed to measure the apoptotic rate. The apoptotic protein Bcl-2 and Bax expression were detected by Western blotting. **Results** The optimum conditions were as follows: The concentration of solvent was 72.22%; The ratio of material to liquid was 1 : 11; And the extraction time was 73.33 min. Under this condition, the theoretical calculated extraction rate was 8.38% and the measured value was 8.33%. PC12 cells viability was significantly decreased after OGD injury for 4 h. However, TGA showed a dose-dependent protective effect on OGD-induced cell damage; Flow cytometry analysis showed that TSFAA significantly reduced the content of ROS and apoptotic rate of PC12 cells. Also, Western blotting showed that TSFAA up-regulated the expression of Bcl-2 and down-regulated Bax expression. **Conclusion** The extraction process for TSFAA optimized by response surface method has high yield and good extraction effect. TSFAA has protective

收稿日期: 2017-11-28

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2017YFC1701600); 2018 年度安徽高校科学研究重点项目: 知母须根总皂苷抑制 AD 转基因秀丽隐杆线虫中 β 淀粉样蛋白毒性作用及机制研究 (KJ2018A0298); 安徽省高校科研创新平台团队建设项目: 中药饮片产地加工与炮制一体化关键技术研究创新团队 (2015TD035)

作者简介: 李丽丽 (1989—), 女, 在读博士生, 研究方向为中药药理学。E-mail: Lily5637@163.com

***通信作者** 彭代银 (1963—), 男, 博士生导师, 教授, 研究方向为中药药理学。E-mail: pengdy@ahtcm.edu.cn

effect on PC12 cells injured by OGD. The mechanism may be related to the decrease in the content of ROS in PC12 cells induced by OGD and the inhibition of mitochondrial apoptosis pathway.

Key words: fibrous root of *Anemarrhena asphodeloides* Bunge.; total saponins; response surface optimized method; PC12 cells; OGD injury; cell apoptosis

知母为百合科植物知母 *Anemarrhenas asphodeloide* Bunge. 的干燥根茎, 具有清热泻火、滋阴润燥、止渴除烦等功效, 皂苷是其活性成分^[1]。知母须根较发达, 在其产地加工过程中, 多作为非药用部位被弃去不用, 大量须根被丢弃造成了巨大的环境污染和资源浪费。且有文献研究表明, 知母主根和须根有着相同的化学成分和药理作用^[2]。实验室前期研究表明, 知母须根总皂苷对乙酰胆碱酯酶具有一定的抑制作用, 提示其具有抗阿尔茨海默病 (AD) 的活性。

AD 是一种神经退行性病变, 最主要的临床表现为认知功能的障碍和记忆力的减退^[3]。大量的研究发现, 血管性的危险因素是 AD 发病的重要原因, 其中包括高龄、高血压、糖尿病、高胆固醇血症等^[4-6]。而这些恰巧又是脑缺血的危险因素, 因此脑缺血与 AD 在某种程度上是交叉的, 被认为是 AD 发病的危险因子^[7]。神经细胞的氧糖剥夺模型 (oxygen and glucose deprivation, OGD) 近年来多被运用于在细胞水平模拟临床脑卒中过程, 从而模拟脑缺血损伤进行细胞自主修复及药物研究^[8]。大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞 PC12 具有神经分泌细胞和神经元的性质, 广泛应用于神经毒理、神经生化等方面的研究^[9]。为了探讨脑缺血在 AD 病理机制上的重要性, 本实验采用 OGD 损伤的 PC12 细胞模型来研究药物对 AD 的干预作用。

知母的传统用药仅以主根入药, 大量须根弃之不用, 这就造成了巨大的浪费和与环境污染。因此, 提高知母须根总皂苷的提取率, 将弃之不用的须根充分利用起来非常有意义。故本实验采用响应面法探讨知母须根总皂苷的最佳提取工艺条件, 同时采用细胞培养及分子生物学技术, 研究知母须根总皂苷对 OGD 损伤的 PC12 细胞的影响, 探讨其防治 AD 的作用机制。

1 材料与仪器

1.1 药物与试剂

知母须根采自安徽亳州市十九里镇, 经安徽中医药大学药学院刘守金教授鉴定为百合植物知母 *A. asphodeloide* Bunge. 的干燥须根。

对照品知母皂苷 AIII (批号 41059-79-4, 质量分数 $\geq 98\%$), 购于南京元宝山医药科技有限公司; 知母须根总皂苷为实验室自制 (采用 70% 乙醇为提取溶剂, 料液比为 1:11, 回流提取 70 min, 以等体积水饱和正丁醇萃取至皂苷显色为阴性, 合并正丁醇层, 挥去正丁醇, 即得), 标准曲线法测得知母须根总皂苷中含总皂苷为 51.27%。

胎牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司); DMEM 完全高糖培养液 (江苏凯基生物技术股份有限公司); DMEM 无糖无血清培养基 (石家庄市宏伟生物技术有限公司); 噻唑蓝 (MTT, 北京索莱宝科技有限公司); 活性氧 (ROS) 试剂盒 (碧云天生物技术有限公司); Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒 (BestBio 公司); Bcl-2、Bax 多克隆抗体 (CST 公司); β -actin 多克隆抗体 (艾美捷科技有限公司); ECL 化学发光试剂盒 (赛默飞公司); 95% 乙醇、甲醇、正丁醇、冰醋酸等所用试剂均购于天津永大化学试剂公司, 均为分析纯。

1.2 细胞

PC12 细胞购自中国科学院上海细胞生物研究所, 培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全高糖培养基中, 常规传代培养。

1.3 仪器

凝胶成像仪 (Bio Rad 公司); BCFC-500 流式细胞仪 (Beckman 公司); 酶标仪、三气培养箱、CO₂ 培养箱 (赛默飞公司); 倒置显微镜 (上海长方光学仪器有限公司); R-1001N 型旋转蒸发仪 (郑州长城科工贸有限公司); CP2225-D 型十万分之一的电子天平 (Sartorius 公司); SPECORD S600 紫外-可见分光光度计 (德国耶拿分析仪器股份公司); HH-4 数显恒温水浴锅 (苏州普天仪器制造有限公司); Milli-Q Advantage 超纯水机 (Millipore 公司)。

2 方法与结果

2.1 知母须根总皂苷定量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取知母皂苷 AIII 7.5 mg, 加甲醇定容至 10 mL 量瓶中, 制成质量浓度为 0.75 g/L 的对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称取知母须根粉末

5 g (过 2 号筛), 置于 100 mL 锥形瓶中, 加乙醇回流提取, 滤过, 取续滤液于蒸发皿中蒸干, 蒸馏水复溶, 等体积水饱和正丁醇萃取至皂苷显色为阴性, 合并萃取液, 旋干, 蒸馏水定容至 10 mL 量瓶中, 作为供试品溶液。

2.1.3 显色方法 取各待测液适量, 置于 10 mL 量瓶中, 加入 5% 香草醛-冰醋酸溶液 0.2 mL, 高氯酸 0.8 mL, 60 °C 水浴生色 20 min, 立即冷却 5 min, 加入 5 mL 冰醋酸稀释, 摇匀, 空白对照组不加样品。

2.1.4 测定波长的选择 分别取显色后的对照品溶液、供试品溶液、空白溶液于 400~700 nm 进行波长扫描, 测得最大吸收波长为 450 nm。

2.1.5 线性范围的考察 精密吸取知母皂苷 AIII 对照品溶液 0.20、0.25、0.40、0.45、0.60 mL 于具塞试管中, 水浴蒸干后, 按“2.1.3”项下方法显色, 在 450 nm 处测定吸光度 (A) 值, 每个质量浓度平行测定 3 次, 取平均值。以知母皂苷 AIII 质量浓度为横坐标 (X), A 值为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线, 计算回归方程。结果显示知母皂苷 AIII 在 0.15~0.45 mg 与 A 值呈现良好的线性关系, 所得回归方程为 $Y=1.8149X+0.033$, $r=0.9996$ 。

2.1.6 精密度试验 精密移取对照品溶液适量, 置于 10 mL 量瓶中, 按“2.1.3”项下方法显色后, 在 450 nm 处平行测定 A 值 6 次, 计算 RSD 值为 1.45%, 表明在该条件下仪器精密度良好。

2.1.7 稳定性试验 取同一供试品溶液, 按“2.1.3”项下显色方法, 分别在 0、5、10、30、60、120 min 测定, 得出 A 值的 RSD 为 0.72%, 表明样品溶液在 120 min 内基本稳定。

2.1.8 重复性试验 精密称取 6 份知母须根粉末, 按“2.1.2”项下方法进行提取, 按“2.1.3”项下方法显色后, 在 450 nm 处平行测定其 A 值, 计算 RSD 为 1.65%, 说明重复性良好。

2.1.9 加样回收率试验 取知母须根粉末 2.5 g (知母须根总皂苷提取率为 7.25%) 6 份, 分别加入知母皂苷 AIII 对照品约 0.181 mg, 按“2.1.2”项下方法进行提取, 按“2.1.3”项下显色, 在 450 nm 处平行测定其 A 值 6 次, 计算得平均回收率为 98.8%, RSD 值为 1.65%。

2.2 单因素考察

2.2.1 乙醇体积分数考察 按“2.1.2”项下方法分别考察提取溶剂为水及 10%、30%、50%、70%、90% 乙醇对知母须根总皂苷提取效果的影响, 结果知母

须根总皂苷提取率分别为 3.32%、3.79%、4.44%、6.04%、7.45%、7.17%。实验结果显示乙醇体积分数为 70% 时, 对知母须根总皂苷的提取效果最佳。

2.2.2 料液比考察 按照“2.1.2”项下方法分别考察料液比为 1:6、1:8、1:10、1:12、1:15, 对知母须根总皂苷提取效果的影响, 结果知母须根总皂苷提取率分别为 1.23%、3.97%、7.56%、7.84%、7.68%。实验结果显示当料液比低于 1:12 时, 知母须根总皂苷的提取率随着料液比升高而增加, 而当提料液比大于 1:12 时, 知母须根总皂苷提取率略有下降。因此初步确定 1:12 为最佳料液比。

2.2.3 提取时间考察 按照“2.1.2”项下方法分别考察提取时间为 30、60、90、120、150、180 min 对知母须根总皂苷提取效果的影响, 结果知母须根总皂苷提取率分别为 4.85%、7.07%、7.82%、7.24%、7.44%、7.54%。实验结果显示当提取时间为 90 min, 知母须根总皂苷提取率达到最高值, 故确定 90 min 为最佳提取时间。

2.2.4 提取次数考察 按照“2.1.2”项下方法分别考察提取 1、2、3、4、5、6 次对知母须根总皂苷提取效果的影响, 结果知母须根总皂苷提取率分别为 7.29%、7.52%、8.06%、8.07%、7.98%、8.03%。实验结果显示当提取 3 次时, 知母须根总皂苷提取已较为完全, 故确定提取 3 次为最佳提取次数。

2.3 响应面优化

2.3.1 响应面试验设计、统计及结果 根据中心组合试验设计原理, 综合单因素试验所得结果, 选取乙醇体积分数 (A)、液料比 (B)、提取时间 (C) 3 个对皂苷提取率影响显著的因素, 采用 3 因素 3 水平的响应面分析方法优化知母须根总皂苷提取工艺 (表 1)。并利用统计软件 Design-Expert 对试验数据进行回归分析, 预测知母须根总皂苷提取的最佳工艺参数。

2.3.2 Box-Behnken 中心组合设计及结果 对知母须根总皂苷提取工艺的结果进行响应面分析 (表 1), 采用 Design-Expert 8.0.6 软件对知母须根总皂苷提取工艺的结果进行多元回归拟合, 可得知母须根总皂苷提取率 (Y) 对 A、B、C 的二元多次回归模型为 $Y=8.06+0.34A+0.162B+0.48C-0.92A^2-1.84B^2-0.85C^2$ 。

模型的各项方差分析结果及模型的决定系数可反映其可靠性, 结果见表 2。该模型的 $P<0.0001$, 具有高度显著性, 失拟项 $P=0.9490>0.05$, 无显著性差异, 另外该模型的校正决定性系数 $R_{Adj}^2=$

0.999 7, 说明该模型对知母须根总皂苷提取实验的拟合程度好, 此实验方案可行。由 A、B、C 各因素的 F 值可知, 对知母须根总皂苷提取率的影响: B>C>A, 即液料比>提取时间>乙醇体积分数。

表 1 中心组合试验设计方案及结果

Table 1 Project and results in Box-Behnken design

试验号	A/%	B	C/min	Y/%
1	70 (0)	5 : 1 (-1)	90 (1)	4.21
2	45 (-1)	10 : 1 (0)	30 (-1)	5.45
3	70 (0)	10 : 1 (0)	60 (0)	8.03
4	95 (1)	15 : 1 (1)	60 (0)	7.25
5	95 (1)	5 : 1 (-1)	60 (0)	4.01
6	45 (-1)	15 : 1 (1)	60 (0)	6.56
7	95 (1)	10 : 1 (0)	90 (1)	7.11
8	70 (0)	5 : 1 (-1)	30 (-1)	3.26
9	70 (0)	10 : 1 (0)	60 (0)	8.11
10	70 (0)	10 : 1 (0)	60 (0)	7.99
11	45 (-1)	10 : 1 (0)	90 (1)	6.42
12	70 (0)	10 : 1 (0)	60 (0)	8.07
13	70 (0)	10 : 1 (0)	60 (0)	8.09
14	45 (-1)	5 : 1 (-1)	60 (0)	3.35
15	95 (1)	10 : 1 (0)	30 (-1)	6.16
16	70 (0)	15 : 1 (1)	30 (-1)	6.51
17	70 (0)	15 : 1 (1)	90 (1)	7.47

2.3.3 各因素之间的交互作用 根据以上得到的回归方程来绘制分析图, 考察所拟合响应曲面的形状, 各因素交互作用的响应面 3D 图见图 1。结果表明, 液料比和提取时间、乙醇体积分数和液料比之间的交互关系非常明显, 表现为曲面较陡, 等高线为椭圆形; 乙醇体积分数和提取时间交互关系差异无统计学意义, 表现为曲面平缓, 等高线为圆形。这与方差分析结果一致。从响应面图可以看出此试验模型都能够达到极值点。

2.3.4 响应面预测及验证 通过回归模型预测的知母须根总皂苷的最佳提取条件是乙醇体积分数 72.22%, 料液比 1 : 11, 提取时间 73.33 min, 在这个条件下, 知母须根总皂苷提取率预测值为 8.38%。在响应面分析法求得的最佳提取条件下进行 3 组平行实验, 知母须根总皂苷提取率分别为 8.36%、8.17%、8.46%, 平均值为 8.33%, 接近模型的预测值 8.38%, RSD 为 1.77%, 表明该模型具有良好的实用指导意义, 重现性好。

2.4 知母须根总皂苷对 PC12 细胞活性的影响

取知母须根总皂苷 12.8 mg, 加 10 mL 完全培

表 2 响应面二次模型及其回归系数的方差分析结果

Table 2 Analysis of variance of two times model of response surface and its regression coefficient

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	46.75	9	5.19	3 616.30	<0.000 1
A	0.95	1	0.95	658.10	<0.000 1
B	21.00	1	21.00	14 616.25	<0.000 1
C	1.83	1	1.83	1 276.51	<0.000 1
AB	2.25×10 ⁻⁴	1	2.25×10 ⁻⁴	0.16	0.704 1
AC	1.00×10 ⁻⁴	1	1.00×10 ⁻⁴	0.07	0.799 5
BC	2.50×10 ⁻⁵	1	2.50×10 ⁻⁵	0.02	0.898 8
A ₂	3.58	1	3.58	2 489.10	<0.000 1
B ₂	14.32	1	14.32	9 967.22	<0.000 1
C ₂	3.05	1	3.05	2 125.31	<0.000 1
残差	0.01	7	1.44×10 ⁻³		
失拟项	7.75×10 ⁻⁴	3	2.58×10 ⁻⁴	0.11	0.949 0
净误差	9.28×10 ⁻³	4	2.32×10 ⁻³		
总离差	46.76	16			

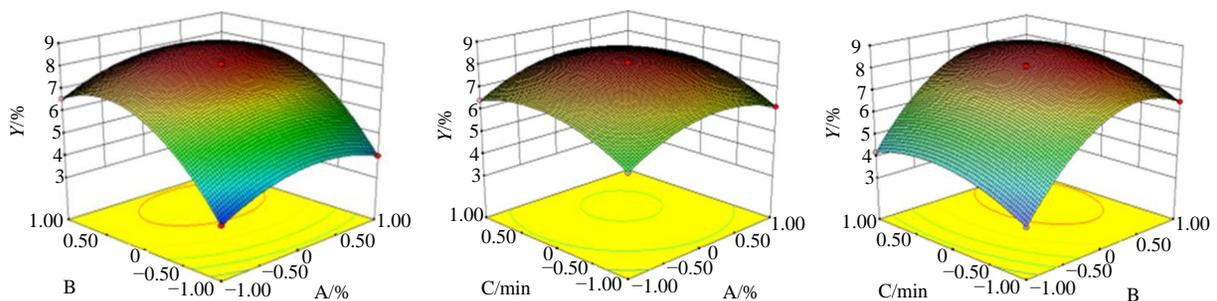


图 1 各因素对知母须根总皂苷提取率影响的交互作用

Fig. 1 Interaction effect of various factors on extraction rate of TSFAA

培养基使其溶解并混合均匀, 配制质量浓度为 1 280 mg/L 的母液, 用 0.22 μm 的无菌滤膜滤过除菌, 根据需要稀释成质量浓度为 640、320、160、80、40、20、10、5、0.05 mg/L。取对数生长期的 PC12 细胞, 以 1×10⁵ 个/mL 密度, 使用完全培养基接种于 96 孔细胞培养板, 每孔 200 μL。培养 24 h 待细胞贴壁后, 将其分为对照组和各给药组。给药组更换不同质量浓度的知母须根总皂苷溶液, 每组设 6 个复孔。继续培养 24 h 后, 每孔加入 20 μL 终质量浓度为 5 mg/mL 的 MTT 继续孵育 4 h, 弃去培养基后每孔加入 150 μL 的 DMSO, 室温震荡 10~15 min, 酶标仪测定 492 nm 波长下的吸光度 (A) 值, 按照公式计算细胞增殖率 (细胞增殖率 = A_{给药}/A_{对照}), 筛选出最适的药物质量浓度。

采用 SPSS 11.0 统计软件进行分析, 各组数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间采用单因素方差分析。

MTT 法检测结果显示, 与对照组比较, 知母须根总皂苷 5、10、20、40、80、160、320 mg/L 组细胞增殖率均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 当质量浓度为 160 mg/L 时细胞增殖率开始下降, 见表 3。最终选取 20、40、80 mg/L 作为后续实验的药物质量浓度。

2.5 不同 OGD 损伤时间对 PC12 细胞活性的影响

取对数生长期的 PC12 细胞, 以 1×10⁵ 个/mL 密度, 使用完全培养基, 接种于 96 孔细胞培养板, 分为对照组和 OGD 模型组。培养 24 h 待细胞贴壁后, 吸去培养基, 继续加入完全培养基 200 μL, 放于正常培养箱内培养 20 h 后, 吸去培养基, 对照组加入高糖无血清的培养基 200 μL, 置于正常培养箱

表 3 不同质量浓度知母须根总皂苷对 PC12 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effects of different concentrations of TSFAA on proliferation of PC12 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	ρ /(mg·L ⁻¹)	A 值	细胞增殖率/%
对照	—	0.883±0.047	100.00
知母须根总皂苷	0.05	0.889±0.026	100.87±3.73
	5	0.962±0.018**	109.23±6.83**
	10	0.993±0.051*	112.90±10.41*
	20	1.044±0.044**	118.46±6.86**
	40	1.058±0.031**	120.07±7.41**
	80	1.099±0.087**	124.96±14.18**
	160	1.015±0.027**	115.23±6.88**
	320	0.958±0.024**	108.68±3.95**
640	0.472±0.073**	53.69±9.06**	

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 图 2 同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group, same as Fig. 2

内培养, 模型组加入无糖无血清的培养基 200 μL, 放于三气培养箱内培养, 制备 OGD 模型。模型组细胞分别设置为缺糖缺氧 0、2、4、6、8 h, 每组设 6 个复孔, MTT 法检测细胞活性, 筛选出最适的 OGD 损伤时间为 4 h, 用于后续实验 (图 2)。

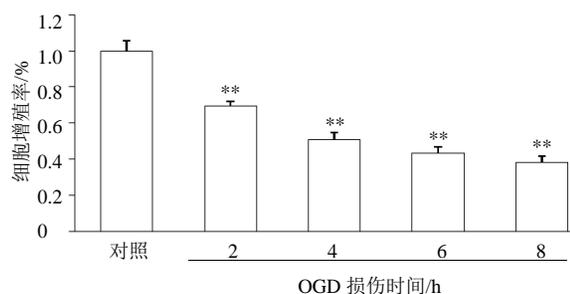


图 2 不同 OGD 损伤时间对 PC12 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effect of time after OGD injury on activity of PC12 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

2.6 知母须根总皂苷对 OGD 损伤的 PC12 细胞形态及活性的影响

使用完全培养基培养 PC12 细胞于 96 孔板中, 使细胞贴壁生长 24 h, 吸弃培养基。实验分为对照组, OGD 模型组, 知母须根总皂苷低、中、高质量浓度 (20、40、80 mg/L) 组。对照组、模型组每孔加入 200 μL 完全培养基, 加药组分别加入用完全培养基配制的不同质量浓度的药物, 放于培养箱中培养 20 h 后, 吸弃培养基, 对照组加入高糖无血清的培养基 200 μL, 模型组加入无糖无血清培养基 200 μL, 加药组分别加入用无糖无血清培养基配制的不同质量浓度的药物。模型组、加药组置于三气培养箱内培养 4 h, 制备 OGD 模型; 对照组置于正常培养箱内培养 4 h。培养结束后, 观察细胞形态并采用 MTT 法检测细胞活性。结果发现对照组 PC12 细胞的形态呈梭状, 有类似于神经突起的细胞突起出现, 细胞数量较多 (图 3)。OGD 损伤的 PC12 细胞不同程度的皱缩, 细胞碎片增多, 且数量明显减少 (图 3)。知母须根总皂苷各质量浓度组细胞皱缩程度降低, 细胞形态基本正常 (图 3)。MTT 检测结果表明, 知母须根总皂苷各质量浓度均可增加 OGD 损伤的 PC12 细胞的活性, 且作用随着质量浓度的增加而增强 (图 4)。

2.7 流式细胞仪检测知母须根总皂苷对 OGD 损伤的 PC12 细胞 ROS 释放的影响

使用完全培养基培养 PC12 细胞于培养瓶中,

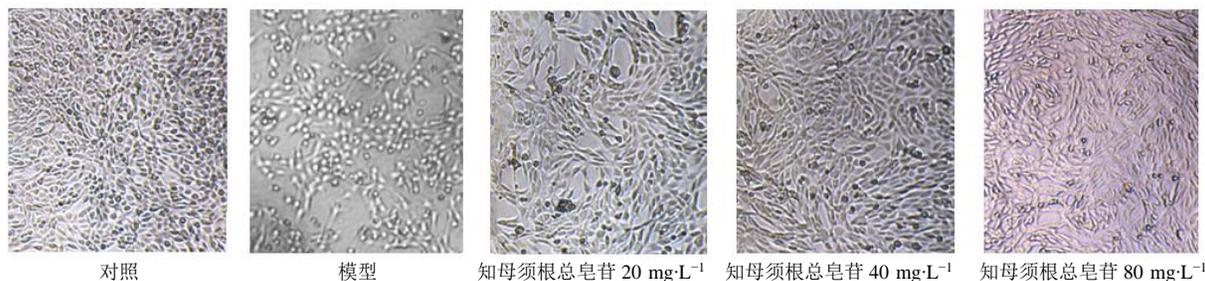
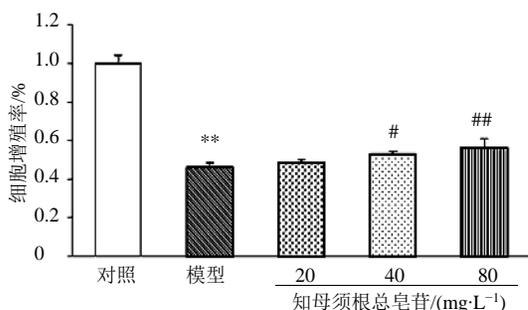


图 3 知母须根总皂苷对 OGD 损伤的 PC12 细胞形态的影响 (×40)

Fig. 3 Effect of TSFAA on proliferation of PC12 cells induced by OGD (×40)



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$, 下同

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group, same as below

图 4 知母须根总皂苷对 OGD 损伤的 PC12 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 4 Effect of TSFAA on proliferation of PC12 cells induced by OGD ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

使细胞贴壁生长 24 h, 吸弃培养基。细胞分组及给药同“2.6”项下。药物处理 24 h 后, PBS 缓冲液洗 1 次, 加入荧光探针二氯荧光素-双乙酸盐 (DCF-DA), 终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$, 孵育 30 min, 弃去上清液, 消化细胞, PBS 洗 2 次, 重悬, 在流式细胞仪上检测。每组 3 个样本, 计数 10 000 个细胞, 检测结果使用 Win MDI 2.8 软件分析。

结果表明, 与对照组比较, 模型组细胞的 ROS 量显著增加 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 知母须根总皂苷中、低质量浓度可显著抑制 PC12 细胞 ROS 的释放 ($P < 0.01$, 图 5)。

2.8 Annexin V-FITC/Propidium iodide 双染检测知母须根总皂苷对 OGD 损伤的 PC12 细胞凋亡的影响

细胞培养、分组及给药同“2.7”项下。药物处理 24 h 后, 使用不含 EDTA 的胰酶消化, 离心收集贴壁及悬浮细胞, 预冷的 PBS 洗 2 次, 用 400 μL 1 \times Annexin V 结合液悬浮细胞。在细胞悬浮液中加入 5 μL Annexin V-FITC, 轻轻混匀后于 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 避

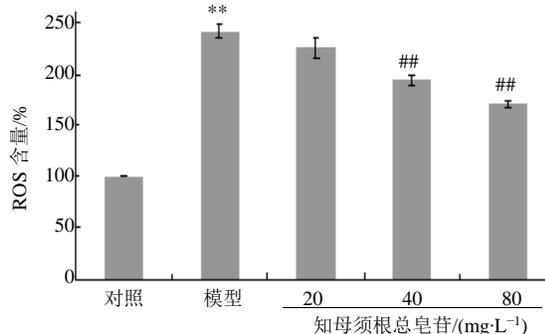


图 5 知母须根总皂苷对 OGD 损伤的 PC12 细胞中 ROS 释放的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of TSFAA on release of ROS in PC12 cells induced by OGD ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

光条件下孵育 15 min; 加入 10 μL PI 染色液后混匀, 于 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 避光条件下孵育 5 min, 在流式细胞仪上检测。每组 3 个样本, 计数 10 000 个细胞, 检测结果使用 FlowJo 7.6 软件分析。

如图 6、7 所示, 对照组细胞的凋亡率为 4.35%, 模型组细胞的凋亡率显著增加至 19.27% ($P < 0.01$)。知母须根总皂苷各质量浓度 (20、40、80 mg/L) 可显著降低细胞的凋亡率, 分别为 13.44%、9.15%、6.50% ($P < 0.01$)。结果表明, 知母须根总皂苷可抑制 OGD 诱导的 PC12 细胞的凋亡。

2.9 Western blotting 法检测知母须根总皂苷对 OGD 损伤的 PC12 细胞中 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响

细胞培养、分组及给药同“2.7”项下。知母须根总皂苷处理细胞 24 h 后, 加入预冷的 PBS (0.01 mol/L , pH 7.2~7.3) 于培养瓶中, 洗 3 次, 弃上清, 加入适量细胞裂解液提取总蛋白, BCA 法测定样品蛋白含量。每组取总蛋白 20 μg 上样, 于 12% SDS-PAGE 电泳分离, 电泳完毕转移至 PVDF 膜上, 3% BSA 室温封闭 2 h, 分别加入不同一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜。TBST 漂洗后加入相应的辣根过氧化物

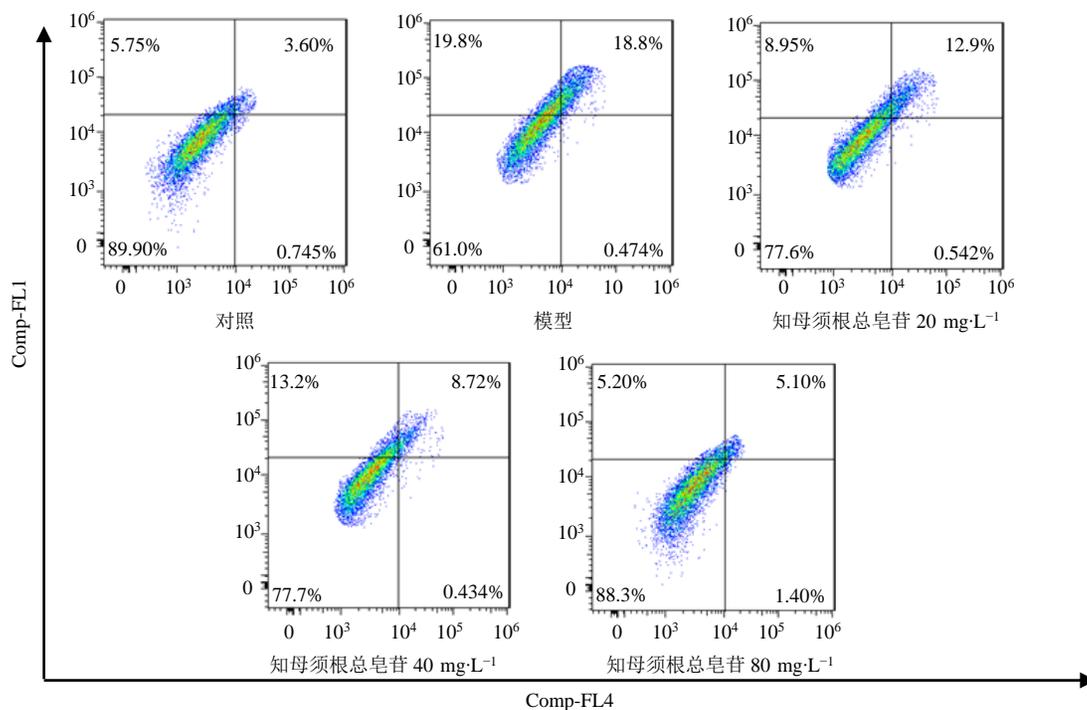


图 6 知母须根总皂苷对 OGD 损伤的 PC12 细胞凋亡的影响
Fig. 6 Effect of TSFAA on apoptosis of PC12 cells induced by OGD

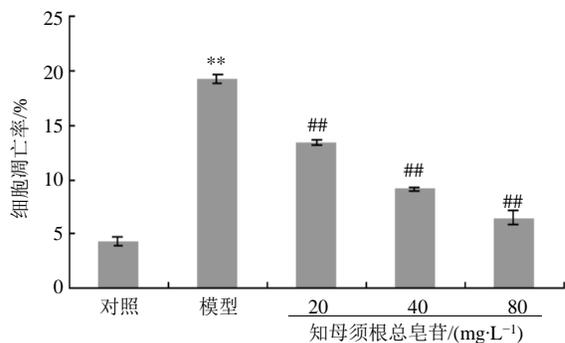
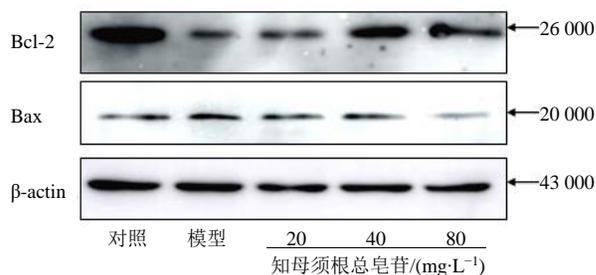


图 7 知母须根总皂苷对 OGD 损伤 PC12 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 7 Effect of TSFAA on apoptosis rate of PC12 cells induced by OGD ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



酶标记的二抗，室温孵育 1 h，TBST 漂洗后加入 ECL 发光液进行显影，LAS-3000 型化学发光成像系统采集图像。

实验结果显示，与对照组比较，经 OGD 处理 4 h 后，PC12 细胞 Bcl-2 表达水平显著下调，Bax 表达水平显著上调 ($P < 0.01$)。与模型组比较，各质量浓度的知母须根总皂苷均可上调细胞 Bcl-2 蛋白的表达水平 ($P < 0.01$)，知母须根总皂苷 40、80 mg/L 可下调细胞 Bax 蛋白的表达水平 ($P < 0.05$ 、0.01，图 8)。

3 讨论

临床病例研究显示，超过 1/3 的 AD 死者脑内存在不同程度的脑血管病理改变，如典型的多发性

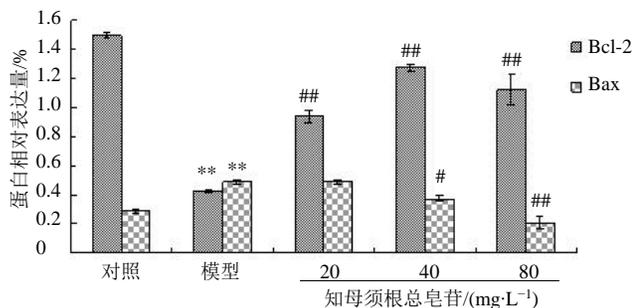


图 8 知母须根总皂苷对 OGD 损伤的 PC12 细胞中 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 8 Effect of TSFAA on levels of Bcl-2 and Bax in PC12 cells induced by OGD ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

梗死性脑病、微血管病变及缺血后脑病，而这些又恰是缺血性脑卒中的病理特征^[10-11]。PC12 细胞是一种来源于大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤的单胺能细胞，其具有类似神经元功能，常用于神经退行性疾病的药物筛选、效果评价及机制研究^[12]。研究表明^[13]，脑缺血是 AD 发生的一个重要的危险因素。因此，本实验使用 OGD 损伤的 PC12 细胞体外模型来模拟脑缺血，以研究知母须根总皂苷对脑缺血的作用，来探讨知母须根总皂苷的抗 AD 作用。

本实验通过单因素和响应面法优化知母须根总皂苷的提取工艺，结果表明，乙醇体积分数为 72.22%，料液比 1:11，提取时间 73.33 min，知母须根总皂苷的提取率达到最大，为 8.33%，影响知母须根总皂苷提取的因素顺序依次为液料比>提取时间>乙醇体积分数。体外实验结果表明，随着 OGD 处理时间的增加，PC12 细胞活力逐渐降低，实验中选定 OGD 处理 4 h 为后续造模条件。知母须根总皂苷能增加 OGD 损伤细胞的活力。正常生理状态下，ROS 水平与机体的抗氧化水平保持在相对平衡的状态^[14]。而高水平的 ROS 可进入线粒体，引起线粒体肿胀和膜电位消失，使能量生成减少，ROS 生成进一步增加，最后引起线粒体破裂、细胞色素 C 释放和凋亡因子激活，导致神经元凋亡。实验结果表明，知母须根总皂苷能降低 OGD 损伤细胞中 ROS 的水平，减少细胞的凋亡。

细胞凋亡的通路包括死亡受体通路、线粒体通路和内质网通路，本研究针对知母须根总皂苷抗 OGD 损伤的 PC12 细胞凋亡进行初步探索。研究表明氧化应激可导致线粒体膜通透性转换孔开放，从而介导细胞凋亡发生^[15]，而位于线粒体膜上的 Bcl-2 蛋白家族在线粒体膜通透性转换孔开启调节中发挥重要作用，Bcl-2 蛋白家族分为抗凋亡蛋白和促凋亡蛋白，前者包括 Bcl-2、Bcl-xL 等，后者包括 Bax、Bad 等。本研究表明 OGD 损伤可诱导 PC12 细胞中 Bcl-2 表达下调和 Bax 表达上调，引发细胞凋亡；而知母须根总皂苷可抑制 Bcl-2 表达的下调和 Bax 表达的上调，从而保护细胞。本研究结果为知母须根及其活性物质在临床应用及产品开发提供实验依据，为防治 AD 的药物开发提供参考。

参考文献

[1] Jellinger K A. Clinicopathological analysis of dementia disorders in the elderly—an update [J]. *J Alzheimers Dis*, 2006, 9(3): 61-70.

[2] Dela Torre J C. Alzheimer's disease is a vasocognopathy: a new term to describe its nature [J]. *Neurol Res*, 2004, 26(5): 517-524.

[3] Casserly I, Topol E. Convergence of atherosclerosis and Alzheimer's disease: Inflammation, cholesterol and misfolded proteins [J]. *Lancet*, 2004, 363(9415): 1139-1146.

[4] 张婷. 脑缺血和阿尔茨海默病 [J]. *中国老年学杂志*, 2011, 31(10): 1926-1928.

[5] 齐倩倩, 田晔. 缺氧缺糖模型的研究现状 [J]. *中华脑科疾病与康复杂志*, 2015, 5(5): 363-366.

[6] Shafer T I, Atchison W D. Transmitter, ion channel and receptor properties of pheochromocytoma (PC12) cells: A model for neurotoxicological studies [J]. *Neurotoxicology*, 1991, 12(3): 473-492.

[7] 中国药典 [S]. 一部. 2015.

[8] Wang F X, Yuan J C, Kang L P, et al. An efficient approach to identify different chemical markers between fibrous root and rhizome of *Anemarrhena asphodeloides* by ultrahigh-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry with multivariate statistical analysis [J]. *J Pharm Biomed*, 2016, doi: 10.1016/j.jpba.2016.06.038.

[9] 隋海娟, 马瑞国, 刘卓, 等. 知母皂苷对 AD 模型大鼠学习记忆能力及磷酸化 Tau 蛋白和胆碱乙酰基转移酶表达的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2016, 32(2): 71-73.

[10] Roman G C, Tatemichi T K, Erkinjuntti T, et al. Vascular dementia: Diagnostic criteria for research studies: Report of the NINDS-AIREN international workshop [J]. *Neurology*, 1993, 43(2): 250-260.

[11] Vinters H V, Ellis W G, Zarow C, et al. Neuropathologic substrates of ischemic vascular dementia [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2000, 59(11): 931-945.

[12] 刘红亮, 王靖凯, 邓锦波, 等. 丹参配方颗粒对乙醇所致 PC12 细胞损伤的保护作用 [J]. *中草药*, 2015, 46(12): 1800-1805.

[13] Reitz C, Patel B, Tang M X, et al. Relation between vascular risk factors and neuropsychological test performance among elderly persons with Alzheimer's disease [J]. *J Neurol Sci*, 2007, 257(1/2): 194-201.

[14] Van Muiswinkel F L, Kuiperij H B. The Nrf2-ARE signaling pathway: Promising drug target to combat oxidative stress in neurodegenerative disorders [J]. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, 2005, 4(3): 267-281.

[15] Takeyama N, Miki S, Hirakawa A, et al. Role of mitochondrial permeability transition and cytochrome C release in hydrogen peroxide induced apoptosis [J]. *Exp Cell Res*, 2002, 274(1): 16-24.