哈巴苷对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞毒性的保护作用

王 飞，王剑石

南昌大学抚州医学院，江西 抚州 344000

摘 要：目的 探讨哈巴苷对 β 淀粉样蛋白（$A\beta_{25-35}$）诱导的 PC12 细胞毒性的影响。**方法** PC12 细胞以哈巴苷（20、40、80 μmol/L）预孵育 3 h 后以 $A\beta_{25-35}$（30 μmol/L）损伤 24 h；MTT 法检测细胞增殖；检测细胞上清液中丙二醛（MDA）、谷胱甘肽（GSH）、超氧化物歧化酶（SOD）水平；采用 Annexin-V-FITC 双染法检测细胞凋亡率；检测活性氧（ROS）的生成；Western blotting 法检测 Akt、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达。**结果** 与对照组比较，$A\beta_{25-35}$ 使 PC12 细胞的存活率显著降低（$P<0.01$），细胞上清液中 MDA 水平显著升高（$P<0.01$）、GSH 和 SOD 水平显著降低（$P<0.01$），细胞内 ROS 水平显著升高（$P<0.01$），细胞凋亡率显著增加（$P<0.01$），细胞内 p-Akt、Bcl-2 蛋白表达下调（$P<0.01$），Bax 蛋白表达显著上调（$P<0.01$）；哈巴苷预孵育 PC12 细胞 3 h，使细胞上清液中的 MDA 水平降低，GSH 和 SOD 水平显著升高（$P<0.05$、0.01）；明显剂量依赖性抑制细胞凋亡；上调 p-Akt 和 Bcl-2 蛋白表达（$P<0.05$、0.01），并下调 Bax 蛋白表达（$P<0.05$、0.01）。**结论** 哈巴苷改善 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞毒性，可能通过激活 PI3K/Akt 信号通路和上调细胞内 SOD 水平发挥作用。

关键词：哈巴苷；PC12 细胞；β 淀粉样蛋白；细胞凋亡；氧化应激

中图分类号：R285.5 **文献标志码：**A **文章编号：**0253 - 2670(2015)23 - 3539 - 05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.23.016

Protection of harpagide on cytotoxicity in PC12 cells induced by $A\beta_{25-35}$ peptides

WANG Fei, WANG Jian-shi

Fuzhou Medical College of Nanchang University, Fuzhou 344000, China

Abstract: Objective The main purpose of the present study is to investigate the influence of harpagide on amyloid-β_{25-35} ($A\beta_{25-35}$)-induced cytotoxicity. **Methods** Oxidative stress was assessed by measuring MDA, glutathione (GSH), and superoxide dismutase (SOD) levels. Cell viability was assessed by MTT assay. Cell apoptosis detection was performed using an Annexin-V-FITC Apoptosis Detection Kit. The production of ROS was determined using a ROS Assay Kit. Western blotting detection was carried out to detect the protein expression. **Results** Our studies showed that pretreatment with harpagide could reduce $A\beta_{25-35}$-induced oxidative stress. Harpagide markedly inhibited cell apoptosis in a dose dependent manner. More importantly, harpagide increased the PI3K/AKt and Bcl-2 family protein ratios on pre-incubation with cells for 3 h. **Conclusion** One possible mechanism of harpagide to improve $A\beta_{25-35}$-induced PC12 cytotoxicity may be through the up-regulation of SOD and activation of the PI3K/AKt pathway.

Key words: harpagide; PC12 cells; amyloid-β; apoptosis; oxidative stress

阿尔茨海默病（Alzheimer's disease, AD）的发病率随着世界人口的老龄化而与日俱增。国内外虽然做了大量关于该病的发病机制和临床治疗的研究，但尚未取得满意结果。AD 的发病机制比较复杂，目前普遍接受的假说有胆碱功能低下、基因突变、炎症和免疫反应、淀粉样蛋白沉积、氧化应激等[1-2]。

哈巴苷是玄参中的主要成分，文献报道有抗血小板聚集、抗炎、调节免疫功能、保护血管内皮细胞等作用[3-5]。本实验研究哈巴苷对 β 淀粉样蛋白（$A\beta_{25-35}$）诱导的 PC12 细胞毒性的影响，为 AD 的研究和药物开发提供潜在的先导化合物。

1 材料

1.1 药品与试剂

哈巴苷（批号 111730-201307，质量分数＞98%），中国食品药品检定研究院；噻唑蓝（MTT）、丙二醛（MDA）、谷胱甘肽（GSH）和超氧化物歧化酶（SOD）试剂盒、细胞浆蛋白抽提试剂盒，南京建成生物工程研究所；活性氧（ROS）检测试剂盒，上海碧云天生物技术有限公司；AnnexinV/PI 细胞凋亡检测试剂盒，Bender 公司；兔抗大鼠 Akt、

收稿日期：2015-05-27

作者简介：王 飞，男，讲师，硕士，从事中药药理学研究。Tel: (0794)8251803 E-mail: wangfei54321@163.com

p-Akt、Bcl-2、Bax、β-actin 和 GAPDH 多克隆抗体，美国 CST 公司；山羊抗兔 IgG-HRP、DAB 显色试剂盒，上海瑞齐实业科技有限公司；$A\beta_{25-35}$ 和其他化学品均购自 Sigma 公司。

1.2 细胞

PC12 细胞购于中国科学院上海细胞库。

1.3 仪器

倒置显微镜（日本尼康）；Spectra Max M2 多功能酶标仪（Molecular Devices）；凝胶成像系统（Bio-rad）。

2 方法

2.1 MTT 法检测 PC12 细胞增殖

2.1.1 不同浓度 $A\beta_{25-35}$ 对 PC12 细胞增殖的影响 取对数生长期的 PC12 细胞 1×10^5/mL，接种于 96 孔板（200 μL/孔）。对照组，正常培养 PC12 细胞，$A\beta_{25-35}$ 处理组，PC12 细胞培养液中添加不同浓度（1～80 μmol/L）$A\beta_{25-35}$ 处理 24 h。于实验结束前 4 h 加入 MTT 试剂 20 μL/孔，继续孵育 4 h，吸掉上清，加入 DMSO 150 μL/孔，摇床上振荡 10 min，待结晶完全溶解后酶标仪上检测 570 nm 处的吸光度值（*A* 值），计算细胞存活率（实验组 *A* 值/对照组 *A* 值）。

2.1.2 哈巴苷对 $A\beta_{25-35}$ 损伤 PC12 细胞增殖的影响 取对数生长期的 PC12 细胞 1×10^5/mL，接种于 96 孔板（200 μL/孔）。实验分组及药物处理：对照组：正常培养 PC12 细胞，模型组：PC12 细胞培养基中加入 $A\beta_{25-35}$（30 μmol/L）处理 24 h；哈巴苷组：PC12 细胞培养液中同时加入 30 μmol/L $A\beta_{25-35}$ 及 20、40、80 μmol/L 哈巴苷，处理 24 h。其余操作同“2.1.1”项，计算细胞存活率。

2.2 氧化应激指标检测

细胞分组及药物处理情况：对照组，PC12 细胞不添加哈巴苷及 $A\beta_{25-35}$；模型组，加入 30 μmol/L $A\beta_{25-35}$；哈巴苷低、中、高剂量组，加入 30 μmol/L $A\beta_{25-35}$ 及 20、40、80 μmol/L 哈巴苷。

PC12 细胞培养于 6 孔板（每孔 4×10^4 个）中 24 h，分别加入 20、40、80 μmol/L 哈巴苷，预孵育 3 h，模型组和哈巴苷组加入 $A\beta_{25-35}$ 继续培养 24 h。胰蛋白酶消化，PBS 洗 2 次，悬浮在 500 μL PBS 中，在蛋白酶抑制剂的作用下超声裂解，4 000 r/min 离心 5 min，收集上清液进行分析。MDA、GSH 和 SOD 的测定按照试剂盒说明书进行。

2.3 ROS 检测

细胞分组及药物处理同“2.2”项，ROS 检测按照试剂盒说明书操作。

2.4 细胞凋亡检测

细胞分组及药物处理同“2.2”项，采用 Annexin-V-FITC 和 PI 双染凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡。胰酶消化收集细胞，冷 PBS 洗涤 2 次，分散在 1× 结合缓冲液中，浓度为 1×10^6/mL。500 μL 细胞悬液添加 5 μL Annexin- V-FITC 和 10 μL PI，于黑暗环境中孵育 15 min，用 FACS Calibur 分析凋亡数据。正常活细胞不会被标记，早期凋亡细胞可被 Annexin V 标记，坏死和晚期凋亡细胞可被 Annexin V 和 PI 同时标记。

2.5 Western blotting 法检测蛋白表达变化

除了不设对照组外，细胞分组及药物处理同“2.2”项，胰蛋白酶 EDTA 消化收集细胞，PBS 洗 2 次，用缓冲液（1 mmol/L EDTA、150 mmol/L NaCl、100 μg/mL 苯甲基磺酰氟和 50 mmol/L Tris-HCl，pH 值为 7.5）在冰上裂解 30 min，无颗粒的上清液经 14 000 × *g* 离心 15 min，取上清。所有操作均在 0～4 □ 进行。抽提的蛋白样品加入 1/5 体积的 5×上样缓冲液，沸水中煮 5 min，20 μg/孔上样，进行 SDS-PAGE 电泳，电转至 PVDF 膜上，室温封闭 1 h，分别加入 1∶1 000 稀释的兔抗大鼠 Akt、p-Akt、Bcl-2、Bax 抗体，β-actin 和 GAPDH 分别作为内参，4 ℃过夜。TBST 洗膜 3 次，加入 1∶1 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG，室温孵育 2 h，TBST 洗膜 3 次，ECL 发光液显色，观察各条带深浅变化，采用 Image-Pro Plus（IPP）软件分析蛋白浓度。

2.6 统计方法

实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 19.0 统计学软件进行数据分析，两组间比较采用 *t* 检验；多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。

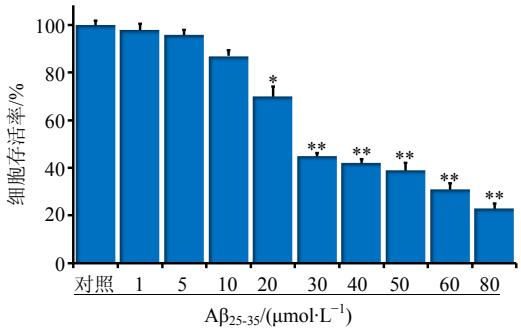
3 结果

3.1 $A\beta_{25-35}$ 对 PC12 细胞增殖的影响

不同浓度 $A\beta_{25-35}$ 处理细胞 24 h 后，测定细胞活力。$A\beta_{25-35}$ 在 20～80 μmol/L 均可显著抑制 PC12 细胞活力（$P<0.05$、0.01），且随浓度的升高，抑制作用逐渐增强，表现出浓度依赖性。结果见图 1。$A\beta_{25-35}$ 30 μmol/L 时细胞存活率在 50%左右，因此后续实验均选择该浓度进行 $A\beta_{25-35}$ 损伤。

3.2 哈巴苷对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的细胞毒性的影响

随着哈巴苷浓度的增加，细胞存活率也随之升高，模型组细胞存活率为 43.3%，哈巴苷 80 μmol/L 组的细胞存活率为 83.9%（$P<0.01$）。结果见图 2。

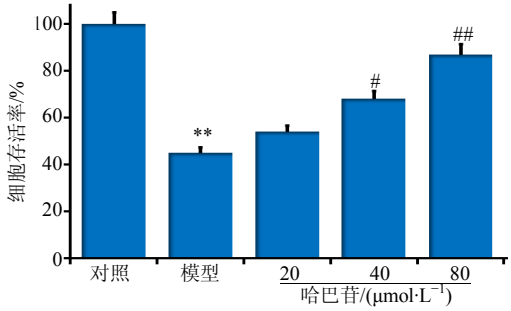


与对照组比较：$^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$，下同

$^{**}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ *vs* control group, same as below

图 1 $A\beta_{25-35}$ 对 PC12 细胞活力的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n = 3$)

Fig. 1 Effect of $A\beta_{25-35}$ on cell viability of PC12 cells ($\bar{x}\pm s$, $n = 3$)



与模型组比较：$^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$，下同

$^{\#}P < 0.05$ $^{\#\#}P < 0.01$ *vs* model group, same as below

图2 哈巴苷对 $A\beta_{25-35}$ 损伤 PC12 细胞活力的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n = 3$)

Fig. 2 Effect of harpagide on cell viability of PC12 cells injuried by $A\beta_{25-35}$ ($\bar{x}\pm s$, $n = 3$)

3.3 对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的氧化应激损伤的影响

与对照组比较，模型组细胞内 MDA 水平明显增加，GSH、SOD 水平显著下降（$P<0.01$）；与模型组比较，哈巴苷组细胞内 MDA 水平显著降低（$P<0.05$、0.01），GSH 水平显著升高（$P<0.01$），中、高剂量组 SOD 水平显著升高（$P<0.01$）。结果见表 1。

表 1 哈巴苷对 $A\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞氧化应激损伤的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n = 3$)

Table 1 Effects of harpagide on parameters of $A\beta_{25-35}$-induced oxidative stress in PC12 cells ($\bar{x}\pm s$, $n = 3$)

组别	剂量/(μmol·L^{-1})	MDA/(nmol·mg^{-1})	GSH/(U·mg^{-1})	SOD/(U·mg^{-1})
对照		14.3±1.6	748±46	28.4±0.3
模型		59.8±5.6**	257±43**	12.2±1.4**
哈巴苷	20	45.2±3.3$^{\#}$	421±24$^{\#\#}$	14.6±2.6
	40	25.6±1.8$^{\#}$	521±57$^{\#\#}$	24.8±3.8$^{\#\#}$
	80	18.7±4.3$^{\#\#}$	724±37$^{\#\#}$	26.2±0.9$^{\#\#}$

3.4 对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的细胞内 ROS 的影响

与对照组比较，模型组细胞中 ROS 水平显著增加（$P<0.01$），哈巴苷显著降低 ROS 水平，呈剂量依赖性，40、80 μmol/L 组与模型组比较差异显著（$P<0.05$、0.01）。结果见图 3。

3.5 对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的细胞凋亡的影响

与对照组比较，模型组细胞凋亡率明显增加（$P<0.01$）；哈巴苷显著降低凋亡率并呈剂量依赖性，中、高剂量组与模型组比较差异显著（$P<0.01$）。结果见图 4。

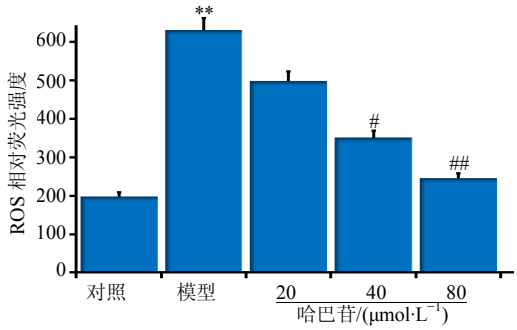


图 3 哈巴苷对 $A\beta_{25-35}$ 损伤 PC12 细胞内 ROS 的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n = 3$)

Fig. 3 Effect of harpagide on intracellular ROS in PC12 cells injuried by $A\beta_{25-35}$ ($\bar{x}\pm s$, $n = 3$)

3.6 对 Bcl-2 家族蛋白表达的影响

各组细胞中的总 Akt 蛋白水平无明显差异，模型组 p-Akt 蛋白表达相比对照组下降明显（$P<0.01$）；哈巴苷处理后的 p-Akt 蛋白表达显著上调（$P<0.05$、0.01），呈明显剂量关系；哈巴苷明显上调 Bcl-2、下调 Bax 蛋白表达，并呈剂量依赖性。结果见图 5。

4 讨论

AD 的 3 个主要病理特征为胆碱能神经元功能障碍、β-淀粉样蛋白（Aβ）沉积和 tau 蛋白的过度磷酸化[6]。Aβ 和 tau 蛋白的胞间转移受到越来越多的关注，虽然其与脑功能退化的联系机制不明，但 Aβ 级联假说仍在 AD 病因中占主导地位。随着大量降低 Aβ 的临床试验并未获得预期的治疗效果，重新认识和深入了解 Aβ 级联假说十分必要[7-8]。目前，不再认为不溶性 Aβ 在胞外沉积是 AD 发病的主要原因[9-10]，众多实验证实细胞内低聚 Aβ 的异常聚集是 AD 的主要病理表现[11-12]。越来越多的研究开始关注细胞内 Aβ 级联反应和子细胞器，特别是线粒体功能障碍之间的关联[13-15]。据报道，线粒体 Aβ 水平与 APP 或 APP/PS1 转基因小鼠不同脑区线粒

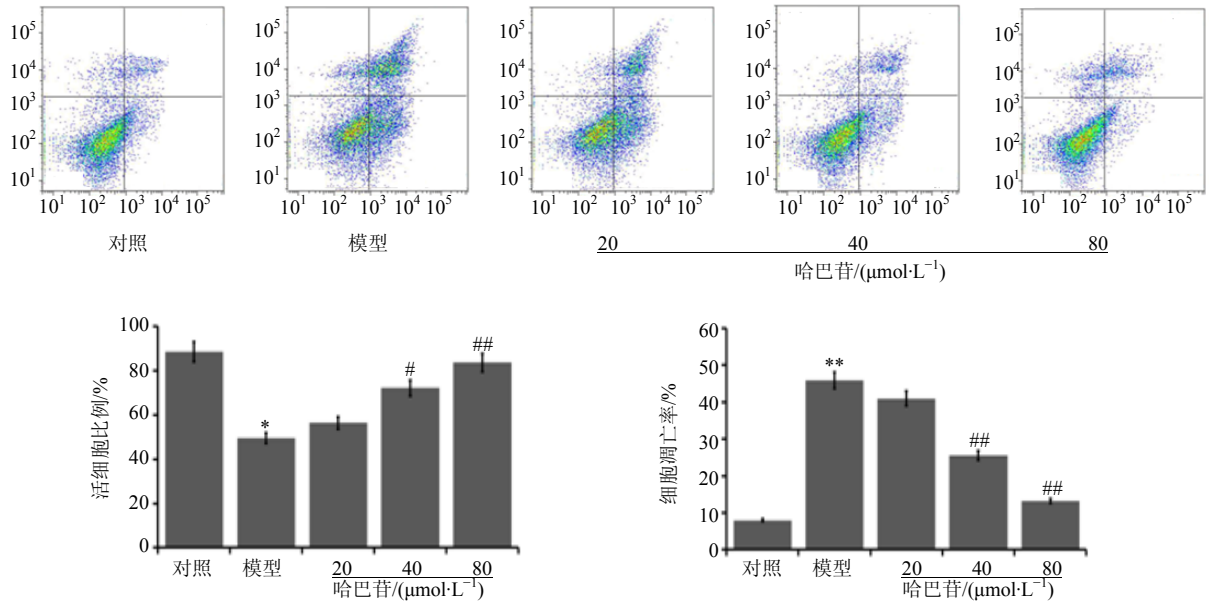


图 4　哈巴苷对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 4　Attenuation of harpagide on $A\beta_{25-35}$-induced apoptosis in PC12 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

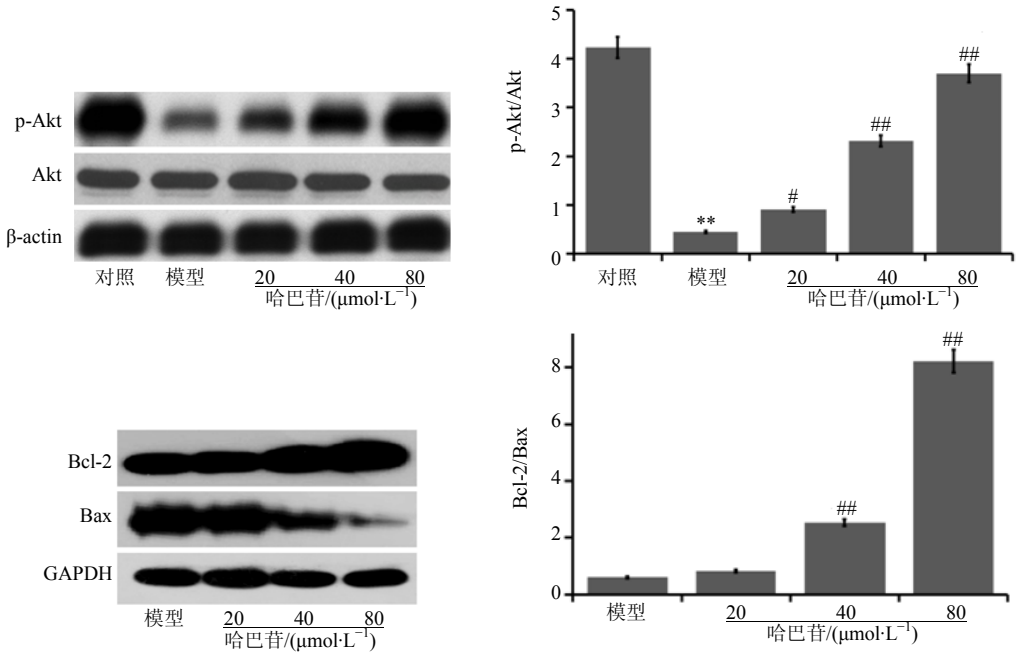


图 5　Western blotting 检测 Akt 和 Bcl-2 蛋白表达变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 5　Detection on expression levels of Akt and Bcl-2 proteins by Western blotting ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

体功能障碍程度呈正比，AD 转基因小鼠认知功能损害的程度可能与突触线粒体功能障碍以及线粒体 Aβ 程度相关[16-17]。因此针对 Aβ 相关的线粒体功能障碍，特别是阻止线粒体 Aβ 积累将是一个很有前途的防治 AD 的手段。

由氧化应激损伤、能量缺乏和线粒体去极化所导致的线粒体缺失常见于 Aβ 诱导的细胞模型和 Aβ 过表达的动物模型[13]。本研究发现，哈巴苷能有效降低 Aβ 诱导的细胞毒性。除了寻找氧化损伤的指标，还研究了几种重要的抗氧化剂，如 GSH 和 SOD 水平，在 AD 和其他神经系统疾病中，GSH 和 SOD 的表达降低[18-19]，本实验结果表明哈巴苷组细胞中 GSH 和 SOD 水平较模型组明显增加。细胞凋亡加快神经退行性疾病的病理进程，哈巴苷组较模型组

活细胞比例显著增加，凋亡程度明显减轻。

PI3K/Akt 信号通路是介导多种生长因子促存活的重要通路，独立于 MAPK、PKC 通路。非磷酸化的 Akt 蛋白不具备生物活性，可经 PI3K/Akt 信号通路磷酸化生成 p-Akt 而活化，随后 p-Akt 磷酸化一系列凋亡调控蛋白，如 Bcl-2、caspase-9、GSK-3β、BAD 等，调节细胞的分裂、分化和存活[20]。本实验中，PC12 细胞经 $A\beta_{25-35}$ 诱导后，p-Akt 蛋白表达减少，哈巴苷增加 p-Akt 蛋白表达，总 Akt 蛋白表达几乎不变。Bcl-2 的表达明显上调，而 Bax 的表达明显下调。细胞凋亡过程中最重要的调节因子就是 Bcl-2 家族，该家族根据功能不同分为 2 类，一是促凋亡成员，如 Bax、Bad 等；另外是抗凋亡成员，如 Bcl-2、Bcl-xl 等。Bcl-2/Bax 蛋白之间的比例是决定对细胞凋亡抑制作用强弱的关键因素。本实验表明，激活 PI3K/Akt 通路，进而上调 Bcl-2、下调 Bax 的表达，增加 Bcl-2/Bax 值，抑制细胞凋亡，可能是哈巴苷保护 Aβ 诱导 PC12 细胞氧化损伤的机制之一。

本研究首次发现哈巴苷改善 Aβ 诱导的 PC12 细胞损伤。哈巴苷可以增加细胞存活率，降低细胞凋亡和细胞毒性，并改善各种氧化应激指标。研究结果提示哈巴苷作为潜在的治疗 AD 的先导化合物，值得深入研究。

参考文献

[1] Alzheimer's Association. Alzheimer's disease facts and figures [J]. *Alzheimer's & Dementia*, 2014, 10(2): e47-e92.

[2] Denk J, Boelmans K, Siegismund C, *et al*. Micro RNA profiling of CSF reveals potential biomarkers to detect Alzheimer's Disease [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0126423.

[3] 张刘强, 李医明. 近 10 年玄参属植物化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2011, 42(11): 2360-2368.

[4] 崔忠生, 邸科前, 马焕云. 哈巴苷及哈巴俄苷对过氧化氢损伤血管内皮细胞的保护作用 [J]. 医学研究与教育, 2009, 26(2): 11-12.

[5] 谢丽华, 刘洪宇, 钱瑞琴, 等. 哈巴苷与哈巴俄苷对阴虚小鼠免疫功能及血浆环化核苷酸的影响 [J]. 北京大学学报, 2001, 33(3): 283-284.

[6] Risacher S L, Saykin A J. Neuro imaging and other biomarkers for Alzheimer's disease: the changing landscape of early detection [J]. *Annu Rev Clin Psychol*, 2013, 9(1): 621-648.

[7] Giacobini E, Gold G. Alzheimer disease therapy-moving from amyloid-b to tau [J]. *Nat Rev Neurol*, 2013, 9(12): 677-686.

[8] Mangialasche F, Solomon A, Winblad B, *et al*. Alzheimer's disease: clinical trials and drug development [J]. *Lancet Neurol*. 2010, 9(7): 702-716.

[9] Goure W F, Krafft G A, Jerecic J, *et al*. Targeting the proper amyloid-beta neuronal toxins: a path forward for Alzheimer's disease immunotherapeutics [J]. *Alzheimers Res Ther*, 2014, 6(4): 42-48.

[10] Shankar G M, Li S, Mehta T H, *et al*. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory [J]. *Nat Med*, 2008, 14(8): 837-842.

[11] Benilova I, Karran E, De Strooper B. The toxic Aβ oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes [J]. *Nat Neurosci*, 2012, 15(3): 349-357.

[12] Narayan P, Holmström K M, Kim D H, *et al*. Rare individual amyloid-β oligomers act on astrocytes to initiate neuronal damage [J]. *Biochemistry*, 2014, 53(15): 2442-2453.

[13] Dragicevic N, Smith A, Lin X, *et al*. Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and other flavonoids reduce Alzheimer's amyloid-induced mitochondrial dysfunction [J]. *J Alzheimers Dis*, 2011, 26(3): 507-521.

[14] Du H, Guo L, Fang F, *et al*. Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease [J]. *Nat Med*, 2008, 14(10): 1097-1105.

[15] Takuma K, Yao J, Huang J, *et al*. ABAD enhances Abeta-induced cell stress via mitochondrial dysfunction [J]. *FASEB J*, 2005, 19(6): 597-598.

[16] Dragicevic N, Mamcarz M, Zhu Y, *et al*. Mitochondrial amyloid-beta levels are associated with the extent of mitochondrial dysfunction in different brain regions and the degree of cognitive impairment in Alzheimer's transgenic mice [J]. *J Alzheimers Dis*, 2010, 20(Suppl 2): S535-550.

[17] Manczak M, Anekonda T S, Henson E, *et al*. Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression [J]. *Hum Mol Genet*, 2006, 15(9): 1437-1449.

[18] Bains J S, Shaw C A. Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death [J]. *Brain Res Brain Res Rev*, 1997, 25(3): 335-358.

[19] Maier C M, Chan P H. Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders [J]. *Neuroscientist*, 2002, 8(4): 323-334.

[20] Song G, Ouyang G L, Bao S D. The activation AKt/PKB signaling pathway and cell survival [J]. *Cell Mol Med*, 2005, 9(1): 59-63.