

• 药理与临床 •

基于高内涵技术的 20 种中药提取物对 β 淀粉样蛋白致 SH-SY5Y 细胞损伤保护作用研究

王俨如^{1,2}, 陶晓倩^{1,2}, 胡玉梅^{1,2}, 李娜^{1,2}, 曹亮^{1,2}, 刘文君^{1,2}, 丁岗^{1,2}, 王振中^{1,2}, 萧伟^{1,2*}

1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001

摘要: 目的 应用高内涵 (HCS) 技术快速筛选对 β 淀粉样蛋白 ($A\beta_{25-35}$) 致 SH-SY5Y 细胞损伤模型有保护作用的中药提取物。方法 选取 20 种中药饮片, 每种药材分别进行 20%、40% 和 95% 乙醇提取, 以 $A\beta_{25-35}$ 损伤的 SH-SY5Y 细胞为模型, 采用 Hoechst 33342 和 PI 双染, 并利用 HCS 技术观察 60 个提取物对模型细胞的保护作用; 在此基础上进一步观察活性提取物对模型细胞 Caspase-3/7 活性的影响, 快速筛选对阿尔茨海默病 (AD) 有潜在治疗作用的中药提取物。结果 HCS 筛选发现, 在 60 个提取物中, 有 17 个提取物对模型细胞具有较好的保护作用; 进一步研究显示, 其中有 8 个提取物对模型细胞 Caspase-3/7 活性有较好的抑制作用。并且以刘寄奴 40% 乙醇部位及丹参 20%、40% 乙醇部位效果最优。结论 以荧光标记为基础的 HCS 技术是有效、快速筛选对 $A\beta_{25-35}$ 致 SH-SY5Y 细胞损伤模型有保护作用中药提取物的分析方法, 筛选出的中药提取物具有潜在的抗 AD 活性。

关键词: 高内涵筛选; 中药提取物; 阿尔茨海默病; β 淀粉样蛋白; SH-SY5Y 细胞; 凋亡

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)02-0267-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.02.015

Protection of 20 Chinese materia medica extracts to $A\beta_{25-35}$ -induced SH-SY5Y cell injury using high content screening

WANG Yan-ru^{1,2}, TAO Xiao-qian^{1,2}, HU Yu-mei^{1,2}, LI Na^{1,2}, CAO Liang^{1,2}, LIU Wen-jun^{1,2}, DING Gang^{1,2}, WANG Zhen-zhong^{1,2}, XIAO Wei^{1,2}

1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

2. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China

Abstract: Objective To identify neuroprotective extracts with the protective effects on $A\beta_{25-35}$ -induced SH-SY5Y cell injury via high content screening (HCS). **Methods** Hoechst 33342/PI double staining method was used to screen neuroprotective extracts from 60 Chinese materia medica (CMM) extracts. Further more, the effects of neuroprotective extracts on $A\beta_{25-35}$ -induced changes in the levels of Caspase-3/7 were detected. **Results** The results showed that 17 extracts had obviously neuroprotective effects. Among the 17 extracts, 8 of them inhibited $A\beta_{25-35}$ -induced up-regulation of Caspase-3/7. **Conclusion** HCS is an efficient method to screen neuroprotective extracts with the protective effects of $A\beta_{25-35}$ -induced SH-SY5Y cell injury. The neuroprotective extracts have potential medicinal value in Alzheimer's disease.

Key words: high content screening; Chinese materia medica extracts; Alzheimer's disease; $A\beta_{25-35}$; SH-SY5Y cell; apoptosis

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是常见的中枢神经系统退行性疾病, 基本特征为记忆减退、认知障碍、生活能力进行性减退, 发病率随着年龄的增长而增加, 已成为发达国家老年人四大死因之一。此病病程漫长且不可逆, 精神上和经济上

给家庭和社会带来严重的危害。随着我国人口逐渐老龄化, AD 的发病率不断上升, 因此, 建立有效、快速筛选抗 AD 药物的分析方法、提高抗 AD 药物开发速度, 具有重要意义。

高内涵筛选 (high content screening, HCS)

收稿日期: 2015-04-11

基金项目: 国家科技部重大新药创制项目 (2013ZX09402203)

作者简介: 王俨如 (1987—), 女, 硕士, 主要从事药物筛选与药效评价研究。E-mail: yanru719@126.com

*通信作者 萧伟 (1959—), 男, 研究员级高级工程师, 博士, 研究方向为中药新药的研究与开发。E-mail: kanionlunwen@163.com

是基于荧光成像的高效筛选评价技术,近几年在新药研发领域发挥了重要作用^[1]。此项技术不仅能保持待测细胞结构和功能的完整,还能从单一实验中获得多种信息,多方面考察待测样品的活性。目前,HCS 技术已应用到新药研发的各个阶段^[2-3],包括药物活性筛选、毒性评估和早期的 ADME(吸收、分布、代谢、排泄)研究等。

中药多成分、多靶点的特点在治疗复杂疾病方面具有显著优势。根据前期文献报道,本研究选取了 20 种中药,制备了 60 个提取物,采用 β 淀粉样蛋白 ($A\beta_{25-35}$) 诱导神经细胞损伤的 AD 体外细胞模型,结合 HCS 技术对中药提取物的细胞保护作用进行筛选。 $A\beta$ 是 AD 的主要病理特征之一,在胞外沉积形成老年斑,这可能是 AD 发病原因之一。神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞是一种分化程度较低的神经肿瘤细胞,其形态、生理生化功能类似于正常神经细胞。研究表明 $A\beta_{25-35}$ 诱导 SH-SY5Y 细胞凋亡和坏死^[4]。小檗碱是黄连的重要成分之一,有清热解毒和抗菌的功效,研究发现,小檗碱还可抑制 $A\beta$ 产生、Tau 蛋白过度磷酸化以及参与 AD 发病过程中的关键酶^[5-6],抑制 $A\beta$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞乳酸脱氢酶(LDH)的漏出和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平的上调,对该模型发挥明显的细胞保护作用^[7]。故本研究以小檗碱为阳性药,制备 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤模型,采用 Hoechst 33342、碘化丙啶(PI)双染法检测细胞晚期凋亡和坏死水平,Calcein Blue、Caspase-3/7 双染检测凋亡相关蛋白 Caspase-3/7 水平,建立以荧光标记为基础的、有效、快速抗 $A\beta_{25-35}$ 致 SH-SY5Y 细胞损伤模型药物的分析方法,为治疗 AD 药物的研发提供理论依据。

1 材料

1.1 细胞

神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞购自南京凯基生物科技有限公司,用含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养基于 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养。每 3 天按 1:5 传代 1 次,取对数生长期细胞进行实验。

1.2 药材及主要试剂

益母草 *Leonurus ja ponicus* Houtt.、木香 *Aucklandia lappa* Decne.、乌药 *Lindera aggregate* (Sims) Kosterm.、刘寄奴 *Siphonostegia chinensis* Benth.、肉苁蓉 *Cistanche deserticola* Y. C. Ma、当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels、丹皮 *Paeonia*

suffruticosa Andr.、续断 *Dipsacus asper* Wall. ex Henry、杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv.、防己 *Stephania tetrandra* S. Moore、泽兰 *Lycopus lucidus* Turcz. var. *hirtus* Regel、丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge.、牛膝 *Achyranthes bidentata* Bl.、淫羊藿 *Epimedium brevicornu* Maxim.、地锦草 *Euphorbia humifusa* Willd.、分心木 *Juglans regia* L.、赤芍 *Paeonia lactiflora* Pall.、元胡 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang、女贞子 *Ligustrum lucidum* Ait.、旱墨莲 *Eclipta prostrata* L. 20 种中药材饮片,购自连云港康济大药房,经江苏康缘药业股份有限公司王振中研究员鉴定均为正品;RPMI 1640 培养基,南京凯基生物科技发展有限公司;胎牛血清,杭州天杭生物科技有限公司;胰蛋白酶,购自 Gibco 公司; $A\beta_{25-35}$ 、Hoechst 33342、PI,购自 Sigma 公司;Calcein Blue、Cell Event Caspase-3/7 Green Detection Reagent,购自 Molecular Probes 公司;其他试剂均为分析纯。小檗碱购自中国食品药品检定研究院(批号 110713-201212,质量分数 86.7%),二甲基亚砜(DMSO)购自 Sigma 公司。

1.3 仪器

SW-CJ-2F 型超净工作台(上海博迅实业有限公司);Thermo 3111 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific);XDS-1 型倒置显微镜(重庆光学仪器厂);LDZ5-2 型离心机(北京京力离心机有限公司);countess 型细胞自动计数仪(美国 Invitrogen 公司);ImageXpress Micro 型高内涵细胞分析仪(美国 MD 公司);调温电热套(通州市申通电热器厂);R502 旋转蒸发仪(上海申生科技有限公司);FD-1B-55 冷冻干燥机(北京博医康实验有限公司);HH-4 数显恒温水浴锅(国华电器有限公司);MP15KC 计数天平(上海恒平科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 中药提取物的制备

称取各单味药材饮片 300 g 置于 5 L 烧瓶中,加入 10 倍量水浸泡 1 h 后,回流 2 h,绢布滤过,再加入 8 倍量水回流 1 h,绢布滤过,合并 2 次提取液,静置;取上清液上柱体积(BV)为 500 mL 的大孔树脂,4 BV 纯化水去杂后,不同体积分数乙醇梯度洗脱,体积流量 2 BV/h,依次得到 20%、40%、95%乙醇洗脱部位,旋转蒸发仪 70 °C 浓缩至小体积,水浴蒸干,冷冻干燥后分别得到各药材 20%、40%、95%乙醇洗脱部位样品。样品用 DMSO 溶解,

配成 200 mg/mL 母液, -20 °C 保存。

2.2 试剂的配制

A β_{25-35} 溶液: 1 mg A β_{25-35} 溶于 943 μ L 无菌超纯水中, 配成 1 mmol/L 的母液, 放于 37 °C 培养箱中老化 7 d; Hoechst 33342 溶液: 100 mg Hoechst 33342 溶于 10 mL 磷酸缓冲液 (PBS) 中, 配成 10 mg/mL 母液; PI 溶液: 250 mg PI 溶于 12.5 mL DMSO 中, 配成 20 mg/mL 母液; Calcein Blue 溶液: 1 mg Calcein Blue 溶于 42.97 μ L DMSO 中, 配成 50 mmol/L 母液, 分装。以上试剂配制完成后均-20 °C 保存备用。实验前用 RPMI 1640 培养基稀释成实验所需浓度。

2.3 分组及给药

将细胞分为对照组、模型组、阳性药 (小檗碱) 组和给药组。取对数生长期细胞, 调整密度为 6×10^4 /mL, 每孔 100 μ L 接种于 96 孔板, 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养 18~20 h。20 h 后吸弃旧培养基, 对照组和模型组加入 100 μ L 含 0.1% DMSO 的空白培养基, 阳性药组加入 100 μ L 含 25 μ g/mL 小檗碱的培养基, 给药组加入 100 μ L 含 10 μ g/mL 中药提取物的培养基, 各组 DMSO 体积分数不高于 0.1%, 每组设 3 个复孔。药物作用 4 h 后, 对照组加入 100 μ L 的空白培养基, 模型组、阳性药组和给药组加入 100 μ L 含 20 μ mol/L A β_{25-35} 的培养基 (A β_{25-35} 终浓度为 10 μ mol/L); 孔内总体积为 200 μ L。放于培养箱继续孵育 48 h 后进行各项指标测定。

2.4 Hoechst 33342 和 PI 双染

各组细胞 96 孔板孵育 48 h 后, 1 500 r/min 离心 5 min, 每孔小心吸除 150 μ L 培养基, 加入 50 μ L 的 Hoechst 33342、PI 染液 (RPMI 1640 培养基稀释, Hoechst 33342、PI 终质量浓度分别为 10、15 μ g/mL), 避光, 放入细胞培养箱中孵育 10 min 后, 立即用高内涵细胞分析仪进行细胞成像。

2.5 Calcein Blue 和 Caspase-3/7 双染

各组细胞 96 孔板孵育 48 h 后, 1 500 r/min 离

心 5 min, 弃去板中液体, 各孔加入 100 μ L Calcein Blue 染液 (RPMI 1640 培养基稀释, 终浓度为 50 μ mol/L), 避光, 放入培养箱中孵育 30 min 后, 用预热的 RPMI 1640 培养基洗板 3 次, 各孔加入 100 μ L 的 Caspase-3/7 染液 (RPMI 1640 培养基稀释, 终浓度 5 μ mol/L), 避光, 放入细胞培养箱中孵育 30 min 后, 立即用高内涵细胞分析仪进行细胞成像。

2.6 细胞成像与分析

Hoechst 33342 和 PI 双染成像条件如下: 10 倍物镜, 每孔取 4 个视野。Hoechst 33342 激发波长 377 nm, 发射波长 447 nm; PI 激发波长 543 nm, 发射波长 593 nm。以 4 个视野中的 Hoechst 33342 染色细胞数 (蓝色) 记为总细胞数, PI 染色细胞数 (红色) 记为晚期凋亡和坏死细胞数, 阳性率 = PI 染色细胞数/Hoechst 33342 染色细胞数, 保护率 = (模型组阳性率 - 给药组阳性率)/(模型组阳性率 - 对照组阳性率)。

Calcein Blue 和 Caspase-3/7 双染成像条件如下: 10 倍物镜, 每孔取 4 个视野。Calcein Blue 激发波长 377 nm, 发射波长 447 nm; Caspase-3/7 激发波长 482 nm, 发射波长 536 nm。以 Calcein Blue 染色细胞数 (蓝色) 作为总细胞数, 以 Caspase-3/7 染色细胞数 (绿色) 作为阳性细胞数, 阳性率 = Caspase-3/7 染色细胞数/Calcein Blue 染色细胞数, 抑制率 = (模型组阳性率 - 给药组阳性率)/(模型组阳性率 - 对照组阳性率)。

3 结果

3.1 模型评价

A β_{25-35} 导致 SH-SY5Y 细胞 PI 和 Caspase-3/7 阳性细胞数增加, 引起细胞发生凋亡、坏死以及激活 Caspase-3/7, 阳性药小檗碱对细胞的凋亡和坏死、Caspase-3/7 的激活均有明显的抑制作用 ($P < 0.01$), 该模型可用于药物筛选。结果见表 1。

表 1 双染法检测小檗碱的神经保护作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Neuroprotective effects of berberine on A β_{25-35} -induced SH-SY5Y cell injury by double staining ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 组别 | $\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ | Hoechst 33342/PI | | Calcein Blue/(Caspase-3/7) | |
|-----|-----------------------------------------|--------------------|-------|----------------------------|-------|
| | | 阳性率/% | 保护率/% | 阳性率/% | 抑制率/% |
| 对照 | — | 1.09 \pm 0.34 | — | 9.23 \pm 7.79 | — |
| 模型 | — | 25.68 \pm 6.10** | — | 59.79 \pm 10.40** | — |
| 小檗碱 | 25 | 1.21 \pm 0.05### | 99.53 | 18.17 \pm 3.12### | 82.32 |

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

** $P < 0.01$ vs control group; ### $P < 0.01$ vs model group

3.2 60 个中药提取物对 Aβ₂₅₋₃₅ 诱导的神经细胞损伤的保护作用

应用模型对 60 个提取物进行筛选, 保护率在 80%~90%的提取物有 8 个, 90%以上的提取物有 9 个, 结果见表 2。其中刘寄奴 40%乙醇部位及丹参 20%、40%乙醇部位保护效果最优, 结果见表 2 和图 1。

3.3 保护作用较强的 17 个中药提取物对 Aβ₂₅₋₃₅ 损伤神经细胞中 Caspase-3/7 活性的影响

挑选 Hoechst 33342/PI 模型保护率在 80%以上

的 17 个中药提取物, 采用 Calcein Blue/ (Caspase-3/7) 双染法观察 17 个中药提取物对模型细胞 Caspase-3/7 活性的影响, 抑制率在 80%~90%的中药提取物有 5 个, 结果见表 3。其中刘寄奴 40%乙醇部位及丹参 20%、40%乙醇部位提取物抑制率最优, 均在 90%以上, 能够较好地抑制 Aβ₂₅₋₃₅ 诱导的神经细胞中 Caspase-3/7 活性增加, 见图 2。结果提示应用 HCS 技术能够筛选出具有神经细胞保护活性的中药提取物。

表 2 Hoechst 33342 和 PI 双染法检测 60 个中药提取物的神经保护作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Neuroprotective effects of 60 CMM extracts on Aβ₂₅₋₃₅-induced SH-SY5Y cell injury by Hoechst 33342/PI double staining ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 药材 | 提取部位 | PI 阳性率/% | 保护率/% | 药材 | 提取部位 | PI 阳性率/% | 保护率/% |
|-----|---------|------------|---------|-----|---------|------------|--------|
| 益母草 | 20%乙醇部位 | 7.09±1.51 | 75.59 | 泽兰 | 20%乙醇部位 | 1.25±0.28 | 97.07 |
| | 40%乙醇部位 | 4.31±0.68 | 86.91 | | 40%乙醇部位 | 2.35±0.40 | 91.58 |
| | 95%乙醇部位 | 12.98±2.43 | 51.66 | | 95%乙醇部位 | 20.57±2.85 | 1.08 |
| 木香 | 20%乙醇部位 | 8.36±1.65 | 70.44 | 丹参 | 20%乙醇部位 | 0.81±0.10 | 99.26 |
| | 40%乙醇部位 | 4.51±0.40 | 86.09 | | 40%乙醇部位 | 2.42±0.67 | 99.89 |
| | 95%乙醇部位 | 46.22±5.03 | -83.56 | | 95%乙醇部位 | 7.28±0.77 | 71.95 |
| 乌药 | 20%乙醇部位 | 4.99±1.34 | 84.15 | 牛膝 | 20%乙醇部位 | 20.11±2.00 | -1.77 |
| | 40%乙醇部位 | 2.78±0.29 | 93.12 | | 40%乙醇部位 | 26.69±1.99 | -39.62 |
| | 95%乙醇部位 | 6.28±1.62 | 78.89 | | 95%乙醇部位 | 28.29±2.26 | -48.82 |
| 刘寄奴 | 20%乙醇部位 | 1.69±0.27 | 97.55 | 淫羊藿 | 20%乙醇部位 | 8.16±4.03 | 66.91 |
| | 40%乙醇部位 | 1.64±0.50 | 97.76 | | 40%乙醇部位 | 13.90±1.03 | 33.92 |
| | 95%乙醇部位 | 3.12±0.17 | 91.74 | | 95%乙醇部位 | 21.68±2.60 | -10.83 |
| 肉苁蓉 | 20%乙醇部位 | 9.39±2.29 | 66.26 | 地锦草 | 20%乙醇部位 | 3.21±0.72 | 95.35 |
| | 40%乙醇部位 | 3.88±1.22 | 88.64 | | 40%乙醇部位 | 4.62±0.59 | 87.23 |
| | 95%乙醇部位 | 5.92±1.70 | 80.38 | | 95%乙醇部位 | 5.70±1.26 | 81.04 |
| 当归 | 20%乙醇部位 | 9.88±0.71 | 64.23 | 分心木 | 20%乙醇部位 | 7.89±1.16 | 68.46 |
| | 40%乙醇部位 | 15.77±2.54 | 40.28 | | 40%乙醇部位 | 21.24±3.24 | -8.30 |
| | 95%乙醇部位 | 13.57±2.16 | 35.85 | | 95%乙醇部位 | 9.75±0.68 | 57.77 |
| 丹皮 | 20%乙醇部位 | 5.09±0.79 | 77.97 | 赤芍 | 20%乙醇部位 | 10.91±3.59 | 51.09 |
| | 40%乙醇部位 | 5.82±2.49 | 74.38 | | 40%乙醇部位 | 12.10±1.52 | 44.24 |
| | 95%乙醇部位 | 9.78±0.44 | 54.68 | | 95%乙醇部位 | 14.55±5.00 | 30.14 |
| 续断 | 20%乙醇部位 | 3.58±0.16 | 85.48 | 元胡 | 20%乙醇部位 | 24.01±1.91 | -29.02 |
| | 40%乙醇部位 | 13.13±0.71 | 38.01 | | 40%乙醇部位 | 23.93±3.26 | -28.56 |
| | 95%乙醇部位 | 23.79±0.11 | -14.94 | | 95%乙醇部位 | 13.10±5.52 | 38.81 |
| 杜仲 | 20%乙醇部位 | 9.03±2.06 | 58.42 | 女贞子 | 20%乙醇部位 | 14.92±0.92 | 27.45 |
| | 40%乙醇部位 | 13.10±4.01 | 38.20 | | 40%乙醇部位 | 13.36±0.75 | 37.20 |
| | 95%乙醇部位 | 21.58±3.90 | -3.96 | | 95%乙醇部位 | 12.21±2.19 | 44.34 |
| 防己 | 20%乙醇部位 | 19.22±3.66 | 7.79 | 旱墨莲 | 20%乙醇部位 | 11.99±1.53 | 45.69 |
| | 40%乙醇部位 | 17.36±2.58 | 16.99 | | 40%乙醇部位 | 10.43±2.89 | 55.40 |
| | 95%乙醇部位 | 96.39±1.33 | -375.73 | | 95%乙醇部位 | 21.34±5.12 | -12.43 |

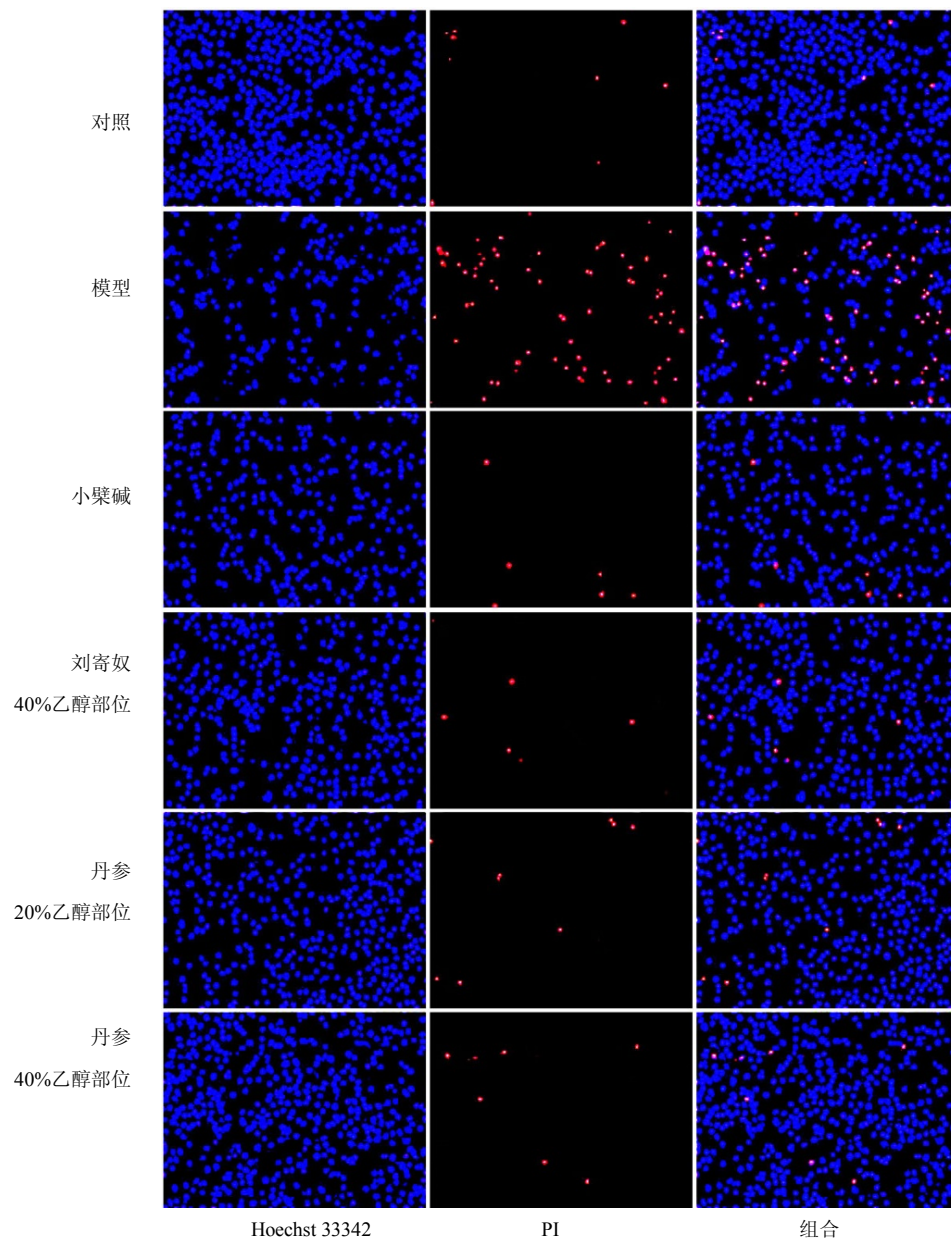


图 1 刘寄奴 40%乙醇部位及丹参 20%、40%乙醇部位对 Aβ₂₅₋₃₅ 致 SH-SY5Y 细胞损伤模型的保护作用

Fig. 1 Protective effects of three CMM extracts on Aβ₂₅₋₃₅-induced SH-SY5Y cell injury

表 3 Calcein Blue 和 Caspase-3/7 双染法检测 17 个中药提取物对模型细胞 Caspase-3/7 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effects of 17 CMM extracts on cell model of Caspase-3/7 by Calcein Blue and Caspase-3/7 double staining ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 药材 | 提取部位 | Caspase-3/7 阳性率/% | 抑制率/% | 药材 | 提取部位 | Caspase-3/7 阳性率/% | 抑制率/% |
|-----|---------|-------------------|-------|-----|---------|-------------------|-------|
| 益母草 | 40%乙醇部位 | 39.67 ± 8.98 | 39.80 | 续断 | 20%乙醇部位 | 52.01 ± 5.27 | 15.39 |
| 木香 | 40%乙醇部位 | 49.97 ± 3.86 | 19.42 | 泽兰 | 20%乙醇部位 | 14.80 ± 3.15 | 88.98 |
| 乌药 | 20%乙醇部位 | 37.56 ± 11.84 | 43.98 | | 40%乙醇部位 | 31.21 ± 5.60 | 56.53 |
| | 40%乙醇部位 | 34.05 ± 2.79 | 50.90 | 丹参 | 20%乙醇部位 | 11.42 ± 3.33 | 95.67 |
| 刘寄奴 | 20%乙醇部位 | 18.68 ± 1.41 | 81.29 | | 40%乙醇部位 | 11.16 ± 1.31 | 96.18 |
| | 40%乙醇部位 | 13.97 ± 1.97 | 90.61 | 地锦草 | 20%乙醇部位 | 14.51 ± 2.55 | 89.55 |
| | 95%乙醇部位 | 30.19 ± 7.61 | 58.54 | | 40%乙醇部位 | 18.35 ± 1.40 | 81.96 |
| 肉苁蓉 | 40%乙醇部位 | 35.26 ± 4.33 | 48.53 | | 95%乙醇部位 | 17.53 ± 4.36 | 83.58 |
| | 95%乙醇部位 | 50.96 ± 8.79 | 17.46 | | | | |

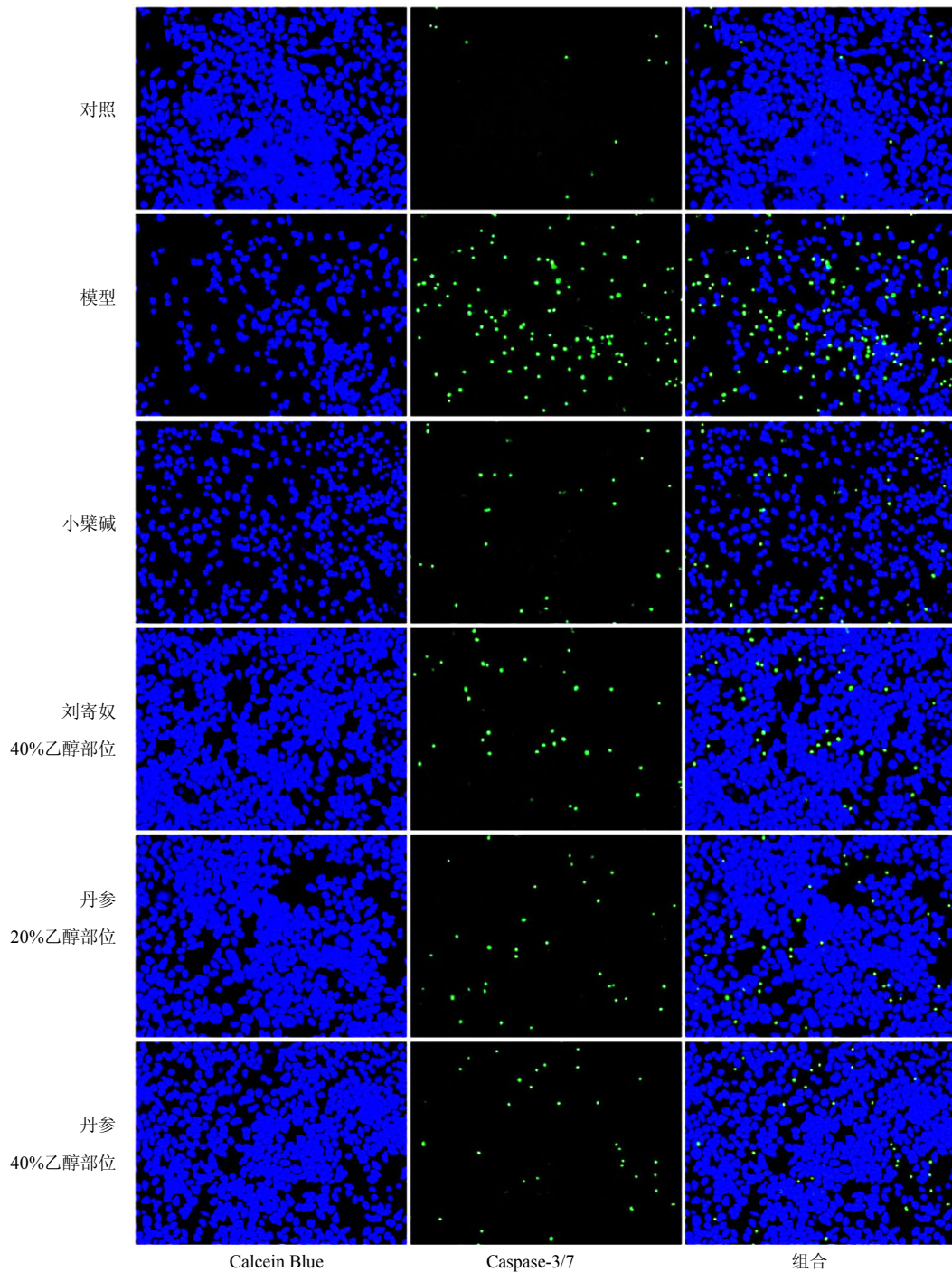


图 2 刘寄奴 40%乙醇部位及丹参 20%、40%乙醇部位对 $A\beta_{25-35}$ 致 SH-SY5Y 细胞损伤模型 Caspase-3/7 活性的影响
 Fig. 2 Effects of three CMM extracts on Caspase-3/7 activity in SH-SY5Y cell injured by $A\beta_{25-35}$

4 讨论

AD 是最常见的神经退行性疾病，此病病理特征是神经元胞外形成老年斑 (senile plaque, SP)、神经元胞内形成神经原纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFTs) 以及神经元的丢失。此病发病机制至今不明，病因有多种学说，例如 β -淀粉样蛋白

($A\beta$) 沉积学说、基因突变学说、胆碱能受损学说、铝中毒假说等。目前认为， $A\beta$ 是各种原因诱导 AD 的共同通路，是 AD 发生过程中的重要环节^[8]。 $A\beta$ 是淀粉样前体蛋白 (APP) 的一个 39~43 个氨基酸残基组成的肽段，是 SP 的主要成分。研究认为痴呆的发生是由于 $A\beta$ 在脑内广泛沉积，最终引起神

神经元退化和凋亡^[9]。聚集态的 $A\beta$ 不仅能够直接对神经元产生损伤作用, 同时也能增强神经元对兴奋性氨基酸、神经毒素等损伤因子的敏感性, 诱导神经元出现坏死和凋亡^[10-12]。 $A\beta$ 损伤神经元初期, 细胞膜完整, 细胞逐渐皱缩, 同时发生核固缩等现象, 最终形成凋亡小体^[13]。 $A\beta$ 损伤神经元后 24 h, 提取神经元 DNA, DNA ladder 检测结果也证实凋亡的发生^[14]。目前普遍认为细胞凋亡是半胱氨酸蛋白酶 Caspase 级联反应的结果, Caspase-3、6、7 处于级联反应下游, 是凋亡的执行者。研究发现, $A\beta_{25-35}$ 可引起小脑颗粒细胞和皮质神经元发生凋亡, 模型细胞中 Caspase-3 活性增加, Caspase-3 特异性抑制剂可抑制 $A\beta_{25-35}$ 造成的损伤^[15]。向大鼠脑室内注射 $A\beta$ 可以活化 Caspase-3 和 Caspase-7^[16], 也有研究认为, $A\beta$ 活化凋亡通路上游的启动蛋白酶, 经级联放大反应激活下游的效应蛋白酶^[17]。Caspase-3 在凋亡中起重要作用, 以酶原形式存在的 Caspase-3 被激活后, 活化的 Caspase-3 切割多种蛋白质底物, 例如细胞骨架蛋白、抗凋亡蛋白和修复 DNA 的酶等, 最终导致细胞死亡^[18]。

本研究利用 $A\beta_{25-35}$ 损伤 SH-SY5Y 细胞建立体外 AD 模型, 小檗碱为阳性对照, 采用 Hoechst 33342 和 PI 双染法, 利用 HCS 技术观察 60 个中药提取物对模型细胞的保护作用, Hoechst33342、PI 均可与 DNA 结合, Hoechst 33342 为膜通透性染料, 而 PI 不能通过正常的细胞膜, 只有在细胞处于晚期凋亡或坏死时, PI 可与核结合。并用 Calcein Blue 和 Caspase-3/7 双染法观察活性提取物对模型细胞 Caspase-3/7 活性的影响。Caspase-3/7 均为下游效应蛋白酶, 直接作用于底物蛋白, 引起凋亡。Caspase-3/7 的激活被认为是凋亡发生的关键事件, 以 caspase-3/7 的活化水平反应细胞的凋亡水平^[19]。该染料被凋亡细胞中的 Caspase-3/7 切割后, 切割产物可与 DNA 结合, 发出绿色荧光; Calcein Blue 被活细胞摄取后, 切割 AM 基团, 切割产物无法自由出入细胞, 在胞内呈蓝色荧光。研究发现, 刘寄奴 40%乙醇部位及丹参 20%、40%乙醇部位对 $A\beta_{25-35}$ 引起的细胞损伤有较好的保护作用。

虽然刘寄奴对 AD 的治疗活性未见报道, 但北京大学的科研人员从刘寄奴中分离得到 11 个黄酮类化合物和 2 个黄酮木脂素类化合物, 其中包括柚皮素和槲皮素^[20]。有报道指出, 柚皮素可减少链脲佐菌素诱导的 AD 模型大鼠 Tau 蛋白磷酸化水平和

$A\beta$ 的水平, 改善模型大鼠的认知能力和学习记忆能力^[21]。槲皮素能够降低喹啉酸诱导的 AD 模型大鼠海马组织钙水平和血清自由基水平, 改善模型大鼠学习记忆能力^[22-23]。有研究指出, 丹参能够缓解 $AlCl_3$ 致 AD 模型小鼠学习记忆能力的减退, 降低模型小鼠脑内及血清中胆碱酯酶活性^[24]。丹参提取物隐丹参酮能够剂量依赖的减少跳台实验和水迷宫实验的错误次数, 改善模型小鼠的学习记忆能力^[25]。槲皮素、柚皮素和隐丹参酮可能是这 3 种中药提取物中的活性成分。它们对 $A\beta_{25-35}$ 致 SH-SY5Y 细胞损伤模型保护作用可能与抗凋亡作用有关, 本研究为开发治疗 AD 药物提供了实验依据。

综上所述, 本研究应用 HCS 技术观察 60 个中药提取物对 $A\beta_{25-35}$ 致 SH-SY5Y 细胞损伤模型的保护作用, 筛选所得提取物对 $A\beta_{25-35}$ 致 SH-SY5Y 细胞损伤模型有较好的保护作用, 可能是通过抑制 Caspase-3/7 的活性、抑制凋亡通路而发挥作用的。此方法与传统的荧光显微镜相比, 具有通量高、效率高的优点, 能够快速、客观地把图片结果转换为数值结果; 与流式细胞术相比, 无需消化细胞, 细胞成团对实验无太大影响, 需要的细胞量少; 与 Western Blotting 相比, 减少了细胞蛋白提取、定量、电泳分离等一系列步骤, 大大缩短了检测时间。应用 HCS 技术快速发现具有潜在活性的药物对新药研发具有重要意义。

参考文献

- [1] Liptrot C. High content screening-from cells to data to knowledge [J]. *Drug Discov Today*, 2001, 6(16): 832-834.
- [2] Giuliano K A, Haskins J R, Taylor D L. Advances in high content screening for drug discovery [J]. *Assay Drug Dev Technol*, 2003, 1(4): 565-577.
- [3] Lessman C A. The developing zebrafish (Danio rerio): a vertebrate model for high-throughput screening of chemical libraries [J]. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2011, 93(3): 268-280.
- [4] 蔡 贞, 姬志娟, 徐艳玲, 等. APP17 肽对 $A\beta_{25-35}$ 诱导神经细胞凋亡保护作用 [J]. *中国药理学通报*, 2002, 18(1): 31-35.
- [5] 马丽丽, 陈晓红. 小檗碱在神经系统疾病中的应用进展 [J]. *新医学*, 2012(7): 437-440.
- [6] 王 静, 张艳军, 常亮堂. 小檗碱对 $A\beta_{25-35}$ 损伤大鼠皮层神经元的保护作用 [J]. *中草药*, 2011, 42(4): 728-733.
- [7] 许 旌, 张 洪, 杨 帆, 等. 小檗碱对 $A\beta_{25-35}$ 致 SH-SY5Y 细胞株炎症反应中 TNF- α 及 I 型受体表达的干预作用 [J]. *中国中药杂志*, 2013(9): 1327-1330.

- [8] Ashall F, Goate A M. Role of the beta-amyloid precursor protein in Alzheimer's disease [J]. *Trends Biochem Sci*, 1994, 19(1): 42-46.
- [9] Zhu H, Fu W, Mattson M P. The catalytic subunit of telomerase protects neurons against amyloid beta-peptide-induced apoptosis [J]. *J Neurochem*, 2000, 75(1): 117-124.
- [10] Kim H, Park B S, Lee K G, *et al.* Effects of naturally occurring compounds on fibril formation and oxidative stress of beta-amyloid [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(22): 8537-8541.
- [11] Awasthi A, Matsunaga Y, Yamada T. Amyloid-beta causes apoptosis of neuronal cells via caspase cascade, which can be prevented by amyloid-beta-derived short peptides [J]. *Exp Neurol*, 2005, 196(2): 282-289.
- [12] Ma B, Meng X, Wang J, *et al.* Notoginsenoside R1 attenuates amyloid-beta-induced damage in neurons by inhibiting reactive oxygen species and modulating MAPK activation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 22(1): 151-159.
- [13] Loo D T, Copani A, Pike C J, *et al.* Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(17): 7951-7955.
- [14] Geula C, Wu C K, Saroff D, *et al.* Aging renders the brain vulnerable to amyloid beta-protein neurotoxicity [J]. *Nat Med*, 1998, 4(7): 827-831.
- [15] Allen J W, Eldadah B A, Huang X, *et al.* Multiple caspases are involved in beta-amyloid-induced neuronal apoptosis [J]. *J Neurosci Res*, 2001, 65(1): 45-53.
- [16] 姜 艳, 金 英, 王世兴, 等. 吡格列酮对淀粉样 β 蛋白片段 1-42 引起的大鼠海马神经细胞凋亡相关蛋白表达的影响 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2008, 22(5): 355-361.
- [17] Harada J, Sugimoto M. Activation of caspase-3 in beta-amyloid-induced apoptosis of cultured rat cortical neurons [J]. *Brain Res*, 1999, 842(2): 311-323.
- [18] 王旭刚, 高 政. 预防性应用阿托伐他汀对 SD 大鼠局部脑缺血再灌注脑组织 Caspase-3 表达的影响 [J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2011, 14(16): 20-22.
- [19] Onodera R, Motoyama K, Okamatsu A, *et al.* Potential use of folate-appended methyl-beta-cyclodextrin as an anticancer agent [J]. *Sci Rep*, 2013, 3: 1104.
- [20] 温 晶, 史海明, 咎 珂, 等. 刘寄奴的化学成分研究 [J]. *中草药*, 2010, 41(6): 870-873.
- [21] 杨文青, 马 晶, 余华荣. 柚皮素改善阿尔茨海默病模型大鼠的认知能力及其机制研究 [J]. *中草药*, 2013, 44(6): 715-720.
- [22] 李永金, 顾振纶. 槲皮素对 Alzheimer 病大鼠的脑保护作用及其机理研究 [J]. *中成药*, 2002, 24(11): 859-862.
- [23] 李永金, 顾振纶, 陈月芳, 等. 槲皮素对阿尔茨海默病大鼠学习记忆影响及与海马细胞凋亡关系的研究 [J]. *中草药*, 2003, 34(7): 632-635.
- [24] 仇淑君, 王忠良, 李广意, 等. 丹参对 AD 模型小鼠学习记忆及脑内和血清内乙酰胆碱酯酶水平的影响 [J]. *实验动物科学*, 2014, 31(4): 11-13.
- [25] 梅峥嵘. 隐丹参酮对阿尔茨海默病的治疗作用及其机制研究 [J]. 广州: 中山大学, 2009.