

黄芪甲苷对 $A\beta_{1-42}$ 诱导的体外血脑屏障模型损伤的影响及机制探究

张乐裕, 刘晨阳, 于顾然*

南京中医药大学附属江阴市中医院, 江苏 江阴 214400

摘要: **目的** 探究黄芪甲苷对纤维状 $A\beta_{1-42}$ 诱导的体外血脑屏障 (BBB) 模型损伤的影响及可能机制。 **方法** 制备 $A\beta_{1-42}$ 诱导的小鼠脑微血管内皮细胞 bEnd.3 和原代大鼠星形胶质细胞 As 非接触式共培养 BBB 模型, 分为对照组、模型组 ($A\beta_{1-42}$ 30 $\mu\text{mol/L}$) 及黄芪甲苷低、高剂量 (50、200 $\mu\text{mol/L}$) 组; 利用噻唑蓝 (MTT) 法检测黄芪甲苷对 $A\beta_{1-42}$ 诱导的 bEnd.3 细胞活力的影响; 通过检测荧光素钠透过体外 BBB 模型的量鉴定 BBB 的通透性; Western blotting 法检测细胞凋亡执行蛋白半胱天冬蛋白酶-3 (Caspase-3)、活化的半胱天冬蛋白酶-3 (cleaved Caspase-3) 的表达水平以及 BBB 内皮细胞间相关连接蛋白细胞质透明带蛋白-1 (ZO-1)、Claudin-5、Occludin 的表达水平。 **结果** MTT 结果显示, 与模型组比较, 黄芪甲苷低、高剂量组均能显著提高 bEnd.3 细胞活性 ($P < 0.001$), 且保护作用与黄芪甲苷浓度呈正相关; 荧光素钠通透性实验结果显示, 与模型组相比较, 黄芪甲苷预处理可显著降低 BBB 的通透性 ($P < 0.001$)。Western blotting 结果显示, 与模型组比较, 黄芪甲苷预处理后, cleaved Caspase-3/Caspase-3 显著降低, ZO-1、Claudin-5、Occludin 蛋白的表达水平显著增加 ($P < 0.001$)。

结论 黄芪甲苷可能是通过抑制 $A\beta_{1-42}$ 诱导的脑微血管内皮细胞 bEnd.3 的凋亡及增加其连接蛋白表达而发挥 BBB 保护作用。

关键词: 黄芪甲苷; $A\beta_{1-42}$; 血脑屏障; 阿尔兹海默病; 半胱天冬蛋白酶-3; 细胞质透明带蛋白-1

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)17-4099-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.17.020

Effect of astragaloside IV on damaged blood-brain barrier *in vitro* model induced by $A\beta_{1-42}$ and its mechanism

ZHANG Le-yu, LIU Chen-yang, YU Gu-ran

Jiangyin traditional Chinese medicine Hospital, Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese medicine, Jiangyin 214400, China

Abstract: Objective To explore the effect of astragaloside IV on the damaged blood-brain barrier (BBB) *in vitro* model induced by amyloid-beta protein ($A\beta_{1-42}$) and the underlying mechanism. **Methods** Firstly, the non-contact co-culture blood-brain barrier (BBB) model was established by $A\beta_{1-42}$ -induced mouse brain microvascular endothelial cell (bEnd.3) and primary rat astrocyte (As). Then the mice were divided into four groups: control, model ($A\beta_{1-42}$ 30 $\mu\text{mol/L}$), astragaloside IV low and high dose groups ($A\beta_{1-42}$ 30 $\mu\text{mol/L}$ with Astragaloside IV 50 and 200 $\mu\text{mol/L}$). The effect of astragaloside IV on the vitality of bEnd.3 induced by $A\beta_{1-42}$ was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. The permeability of BBB *in vitro* was determined by detecting the quantity of fluorescein sodium through BBB in various groups. In order to explore the mechanism of its protection, the apoptosis related proteins Caspase-3, cleaved Caspase-3 and tight junction proteins ZO-1, Claudin-5 and Occludin were detected by Western blotting. **Results** Compared with model group, the astragaloside IV groups improved the activity of bEnd.3 cells significantly ($P < 0.001$). The protective effect was positively correlated with the concentration of astragaloside IV. Astragaloside IV with low and high dose decreased the permeability of BBB model *in vitro* ($P < 0.001$). According to the results of Western blotting, the ratio of cleaved Caspase-3/Caspase-3 was significantly declined, and the expression levels of ZO-1, Claudin-5 and Occludin were significantly increased in astragaloside IV groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Astragaloside IV may play a BBB protective role by inhibiting the apoptosis of bEnd.3 cells induced by fibrous $A\beta_{1-42}$ and increasing the expression of tight junction proteins.

Key words: astragaloside IV; $A\beta_{1-42}$; blood-brain barrier; Alzheimer's disease; Caspase-3; ZO-1

收稿日期: 2018-03-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81573771); 江苏省自然科学基金项目 (BK20151599)

作者简介: 张乐裕, 硕士, 主要从事阿尔兹海默病中药干预的研究。Tel: 17768318313 E-mail: 649998524@qq.com

*通信作者 于顾然, 教授, 主任中医师, 博士生导师, 主要从事阿尔兹海默病中药干预的研究。Tel: (025)86663507 E-mail: dr.ygrdf@163.com

目前认为 β 淀粉样蛋白 (amyloid-beta, $A\beta$) 诱导的血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 完整性的破坏是导致阿尔兹海默病 (Alzheimer's disease, AD) 发生与进展的关键因素之一^[1]。BBB 是屏障外周循环中有害物质进入神经系统的一道重要的物理性滤过结构, 其结构完整性的破坏可增加其通透性, 最终致使脑实质的损伤, 加剧一些神经退行性疾病的发生及发展。脑微血管内皮细胞是一种特殊的内皮细胞, 其本身及其细胞间的连接蛋白 [细胞质透明带蛋白-1 (ZO-1)、Occludin、Claudin-5] 是 BBB 结构及屏障功能的主要承担者。有研究表明, 在 AD 早期, $A\beta$ 沉积于 BBB 脑微血管中的内皮细胞间, 从而导致内皮细胞的损伤, 最终导致 BBB 结构的完整性遭到破坏^[2]。可见, 预防和抑制 AD 发生和进展的关键是抑制 $A\beta$ 介导的 BBB 结构完整性的损伤及通透性的增加。

研究表明, 永生化的小鼠脑微血管内皮细胞 bEnd.3 体外培养后通过测量跨内皮细胞电阻抗及检测体外模型通透性等方法证明该细胞株具有脑微血管内皮细胞的屏障特性^[3]。另研究证实, bEnd.3 细胞与大鼠原代星形胶质细胞 As 非接触式共培养 BBB 体外模型在跨内皮电阻和通透性方面具备了在体 BBB 的基本特性, 已被用于神经系统药物早期筛选方面的研究^[4-5]。本实验采用纤维状 $A\beta_{1-42}$ 诱导的该模型的损伤模拟 AD 患者体内受损的 BBB, 通过检测其通透性, 探究黄芪甲苷对纤维状 $A\beta_{1-42}$ 诱导的 BBB 损伤的影响。另外, 为探究黄芪甲苷保护 BBB 的具体机制, 本研究采用纤维状 $A\beta_{1-42}$ 损伤的 bEnd.3 细胞作为 AD 患者脑内微血管内皮细胞损伤的模型, 通过 Western blotting 法检测凋亡相关蛋白及连接蛋白的表达进行探索。

黄芪甲苷是从黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge 中提取的最主要的具有生物活性的皂苷类单体成分, 其含量也是黄芪药材质量优劣评价的标准。最近研究表明黄芪具有增强机体免疫力^[6]、抗炎^[7]、抗氧化^[8]、抗凋亡^[9]、抗癌^[10-11]、保护胃黏膜^[12]、降糖、调脂^[13]等多种药理作用。另有研究显示, 黄芪甲苷具有显著的神经保护作用, 例如黄芪甲苷可通过抑制线粒体膜上转换孔的开放及活性氧 (ROS) 产生来阻止 $A\beta_{1-42}$ 诱导的人神经母细胞瘤 SKNSH 细胞凋亡^[14]。一定剂量的黄芪甲苷可通过调节 Notch 蛋白的激活或表达而促进神经干细胞的增殖分化, 从而抑制 $A\beta$ 对神经元的神经毒

性^[15]。还有研究表明, 黄芪甲苷对脑血管疾病中缺血再灌注导致的 BBB 损伤具有保护作用^[16]。但关于黄芪甲苷对 $A\beta$ 介导的 BBB 损伤的影响及具体机制目前尚未见到报道。故本实验研究黄芪甲苷对 AD 中 $A\beta$ 介导的 BBB 损伤的影响及可能的机制, 为黄芪在临床上用于预防与治疗 AD 提供理论依据。

1 材料

1.1 动物

雌性刚出生 1 d 的 Wistar 乳鼠, 由南京凯基生物科技发展有限公司提供, 动物伦理委员会许可号 BSK-046-00, 动物合格证号 SCXK (沪) 2013-006。

1.2 仪器与试剂

Type A2 型生物安全柜及 C150 型 CO_2 培养箱 (美国 Thermo 公司); M3 型多功能酶标仪 (美国 MD 公司); MERS00002 型电阻仪 (美国 Millipore 公司); 04313R49512 型免疫印迹蛋白电泳系统及 CHEMZDOCX RS+ 型凝胶成像系统 (美国 Bio-rad 公司); DMEM 高糖培养液及澳洲胎牛血清 (美国 Gibco 公司); 内皮细胞生长因子 (ECGS, 美国 Sciencell 公司); 噻唑蓝 (MTT) 粉末及荧光素钠粉末 (美国 Sigma 公司); 胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 试剂盒 (武汉博士德公司); 半胱天冬蛋白酶-3 (Caspase-3) 以及 β -actin 抗体 (CST 公司); 活化的半胱天冬蛋白酶-3 (cleaved Caspase-3)、ZO-1、Claudin-5、Occludin 抗体均为小鼠源, 二抗均为兔抗 (南京福麦斯公司); ECL 化学发光液 (美国 Millipore 公司)。 $A\beta_{1-42}$ 粉末 (上海强耀公司, 质量分数 95.08%), $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存 (参照文献中纤维状 $A\beta$ 的制备方法^[17]), 具体如下: 在灭菌后的生物安全柜中加入无菌 PBS 100 μL 并轻轻吹打混匀, 置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 7 d 使其成为纤维状, 取出后于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存待用; 黄芪甲苷 (成都曼思特公司, 质量分数 $\geq 98\%$), 以 PBS 稀释成 0.8 mmol/L 的溶液, 等量分装, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存待用。

1.3 细胞

永生化的 bEnd.3 细胞源自美国 ATCC 公司。

2 方法

2.1 bEnd.3 细胞培养

bEnd.3 细胞用配制好的完全培养基于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中。其中完全培养基配制比为 DMEM-胎牛血清-3 抗 (青霉素、链霉素及两性霉素) 89:10:1。细胞培养过程中每 2 天换 1 次液,

选取处于对数生长期的细胞进行实验。

2.2 MTT 法检测 bEnd.3 细胞活力

取融合度为 90% 的 bEnd.3 细胞,用胰酶消化后均匀接种于 96 孔板内,接种密度为 5×10^3 个/孔。分为对照组、模型组 ($A\beta_{1-42}$ 30 $\mu\text{mol/L}$) 及黄芪甲苷低、高剂量组 (50、200 $\mu\text{mol/L}$)。以各浓度黄芪甲苷预处理细胞 2 h 后加入制备好的 30 $\mu\text{mol/L}$ 的纤维状 $A\beta_{1-42}$ 继续损伤 24 h, 移除原培养液, 每孔加入配制好的 MTT 溶液 100 μL , 使 $A\beta_{1-42}$ 终质量浓度为 5 mg/L, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中继续培养 4 h 后移除培养液, 每孔加入 DMSO 150 μL , 于室温下避光震荡 15 min, 酶标仪检测吸光度 (A) 值。

$$\text{细胞活力} = A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

2.3 原代 As 提取及鉴定

Wistar 乳鼠于 75% 酒精中浸泡消毒 1~2 min, 无菌条件下取出大脑组织, 分离大脑皮质后置于预冷的 PBS 中, 并去掉大血管组织。将皮质机械性剪碎并用钝性玻璃棒轻轻按压碾碎, 0.125% 胰蛋白酶于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中消化 10 min (每隔 3 min 轻轻摇晃, 以保证组织充分消化)。200 目筛网滤过, 滤液以 1 000 r/min 离心 3 min。弃上清, 用完全培养基重悬 EP 管底沉淀, 均匀接种于多聚赖氨酸包被后的培养瓶中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 环境中培养。选取融合度为 80% 的原代 As, 均匀接种于板底置有盖玻片的 24 孔板中。待 As 长满, 取出板底的盖玻片, 4% 的多聚甲醛室温固定 30 min, PBS 浸洗 3 min $\times$ 3。3% H_2O_2 -甲醇溶液滴加 2 滴/片, 于室温下封闭 10 min, PBS 浸洗 3 次。滴加山羊血清 50 μL /片, 室温封闭 30 min; 滴加一抗 GFAP (1:100) 50 μL /片, 室温湿盒孵育 2 h, PBS 浸洗 3 次。滴加 FITC 标记的二抗 (1:200) 50 μL /片, 室温避光孵育 1 h, PBS 浸洗 3 次。滴加 DAPI 染液 50 μL /片, 室温避光孵育 5 min。用防猝灭液及透明指甲油进行封片固定玻片。多功能正置荧光显微镜下观察细胞中被染成荧光绿色的蛋白的量。

2.4 体外 BBB 模型的建立

制备 bEnd.3 细胞和 As 非接触式共培养模型的支持物选用 Corning 公司的 24 孔 Transwell 3413 细胞培养池 (微孔直径 0.4 μm)。在细胞培养池的上室接种 bEnd.3 细胞, 培养池的下室底部接种提取的原代 As, 前 4 d 每 2 天换 1 次液, 之后每天换 1 次液。培养 5 d 后, 测定其跨膜电阻值 (transendothelial electric resistance, TEER), 检测体外 BBB 模型是

否建立成功。

2.5 跨膜电阻值的测定

采用 Millicell ERS 电阻仪测定的体外 BBB 模型的 TEER [TEER = 内皮细胞电阻值 (TEER_{ec}) + 滤过层电阻值 (TEER_f)]。以无细胞的培养池测得的电阻值 TEER_f 为对照, 作为滤过层的电阻值, 则单层 bEnd.3 细胞膜的电阻值为 TEER_{ec} = [TEER - TEER_f $\times$ 滤过层膜面积 (S)], 单位为 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ 。

2.6 BBB 通透性的测定及计算

2.6.1 实验分组 实验共分空白对照组 (无细胞)、对照组、模型组 ($A\beta$ 30 $\mu\text{mol/L}$) 及黄芪甲苷低、高剂量组 (50、200 $\mu\text{mol/L}$)。通过测定荧光素钠 (sodium-fluorescein, Na-F) 跨 BBB 模型时从受池到达供池的荧光强度, 计算得出体外 BBB 模型的通透性。

2.6.2 Na-F 标准曲线绘制 多功能酶标仪测定 Na-F 质量浓度分别为 0.004、0.02、0.1、0.5、1、5 mg/L 的荧光强度, 并根据结果绘制出 Na-F 标准曲线。

2.6.3 Na-F 透过体外 BBB 模型量的测定 按照“2.6.1”项下分组, 分别在上室中加入终浓度为 50、200 $\mu\text{mol/L}$ 的黄芪甲苷孵育 4 h, 再加入终浓度为 30 $\mu\text{mol/L}$ 的纤维状 $A\beta_{1-42}$ 损伤 2 h, 同时弃掉上室与下室的培养液, 在上室加入用 Hanks 溶液配制好的 Na-F 溶液 (10 mg/L), 每孔 200 μL , 下室每孔加入 1 mL 的 Hanks 液, 孵育 1 h 后从下室每孔中取 100 μL 溶液测定荧光强度。

2.6.4 体外 BBB 模型通透性计算 通过 Na-F 标准曲线, 计算透过共培养 BBB 模型及无细胞空白对照组 Na-F 的量。

$$\text{清除体积} = (C_A \times V_A) / C_S$$

$$\text{清除率} = P \times S = \text{清除体积} / t$$

C_A 为下室浓度, V_A 为下室体积, C_S 为上室初始浓度, t 为 60 min, P 为通透性, S 为表面积

则 Na-F 体外透过单层内皮细胞的通透性 (P_e) $\times S$ 可由公式计算得到:

$$1/PS_e = 1/PS_t - 1/PS_f$$

PS_e 为 $P_e \times S$, PS_t 表示总的 BBB 体外模型的通透性 (P_t) $\times S$, PS_f 表示无细胞空白对照组的通透性 (P_f) $\times S$, S 为细胞培养池上室的膜面积 (0.33 cm^2) [18-19]

2.7 Western blotting 法检测蛋白表达量

按照“2.2”项方法进行实验分组及处理, 取出培养皿, 用预冷的 PBS 洗 3 次, 每个培养皿加入 60 μL 配制好的蛋白裂解液, 于冰上反复吹打 5 min,

收集蛋白裂解液, 超声裂解 15 s, 于 12 000 r/min、4 °C 条件下离心 15 min, 取上清液, 按照上清液-5×SDS 4:1 加入上样缓冲液, 开水煮 20 min, 电泳并转膜。配制好的 5% BSA 室温摇床封闭 1 h, 加一抗 4 °C 孵育过夜, TBST 洗 3 次, 室温于摇床上孵育二抗 1 h, TBST 洗 3 次后采用 ECL 化学发光法, 于 Image Lab 凝胶成像系统中曝光显影。

2.8 统计学处理

实验结果均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 运用 SPSS 22.0 对数进行分析, 多个样本间的均数比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 2 个独立样本之间的均数比较采用 Tukey 检验。上述实验过程均重复 3 次以上。

3 结果

3.1 黄芪甲苷对 $A\beta_{1-42}$ 诱导的 bEnd.3 细胞活力损伤的影响

MTT 法检测 bEnd.3 细胞活力, 结果如表 1 所示, 与对照组比较, 模型组 bEnd.3 细胞活力显著下降 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 经低、高剂量黄芪甲苷预处理后的 bEnd.3 细胞活力均显著增加 ($P < 0.001$)。说明黄芪甲苷能够对抗 $A\beta_{1-42}$ 的神经毒性作用, 提高 bEnd.3 细胞的活力, 且其神经保护功效与黄芪甲苷浓度呈正相关。

表 1 黄芪甲苷对 $A\beta_{1-42}$ 介导的 bEnd.3 细胞活力损伤的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Effect of astragaloside IV on injury of bEnd.3 cells induced by $A\beta_{1-42}$ ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	C/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	细胞活力/%
对照	—	100.00 $\pm$ 0.00
模型	30	57.98 $\pm$ 2.45 ^{###}
黄芪甲苷	50	73.53 $\pm$ 4.00 ^{***}
	200	90.50 $\pm$ 3.88 ^{***}

与对照组比较: ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{***} $P < 0.001$, 表 2 同

^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{***} $P < 0.001$ vs model group, same as

Table 2

3.2 原代 As 的鉴定

通过免疫荧光法鉴定原代提取的 As 纯度。检测被特异性 GFAP 标记的 As 荧光强度, 结果如图 1 所示, GFAP 为 As 细胞质中特有的蛋白, GFAP 特异性标记的 As 呈现绿色荧光, 被 DAPI 标记的 As 细胞核呈现蓝色, 表示总细胞数。结果表明, 原代提取的 As 纯度达 95% 以上, 可用于后续实验研究。

3.3 体外 BBB 模型评价

本实验所制备的 bEnd.3 细胞与 As 非接触式共培养 BBB 模型见图 2。bEnd.3 细胞接种于上室 (供

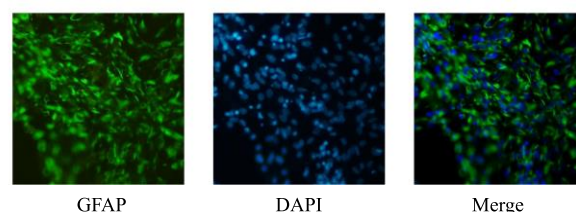


图 1 原代 AS 鉴定 (免疫组化, ×200)

Fig. 1 Immunohistochemical identification of astrocytes (IAC, ×200)

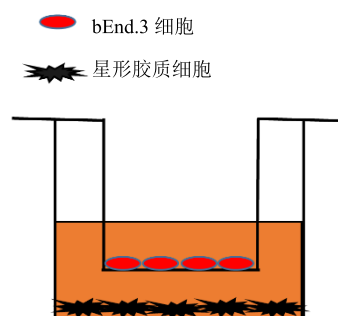


图 2 体外 BBB 模型

Fig. 2 BBB co-culture in vitro model

池), As 接种于下室 (受池)。

为了检测体外 BBB 模型是否建立成功, 通过测定 TEER 评价体外 BBB 模型的通透性。有研究表明, 当体外共培养 BBB 模型中的跨细胞单层电阻值在 300 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ 以上时, 才能更好地模拟体内 BBB 的屏障特性^[5,18-19]。经检测本实验中跨 bEnd.3 细胞电阻值为 (306.57 $\pm$ 14.19) $\Omega \cdot \text{cm}^2$, 符合体外 BBB 模型的要求。

3.4 黄芪甲苷对 $A\beta_{1-42}$ 诱导的体外 BBB 模型损伤的影响

为了探究黄芪甲苷对 $A\beta_{1-42}$ 诱导的体外 BBB 模型损伤是否具有保护作用, 本研究参照文献方法^[18], 测定从供池透过体外 BBB 模型到达受池的 Na-F 荧光强度。结果表明, 与对照组比较, 模型组 BBB 的通透性明显增加 ($P < 0.001$)。与模型组比较, 经低、高剂量黄芪甲苷预处理后 BBB 的通透性均显著降低 ($P < 0.001$), 且与浓度呈正相关。结果表明, 黄芪甲苷能够对抗 $A\beta_{1-42}$ 的神经毒性作用所致的 BBB 的通透性增加 (表 2)。

3.5 黄芪甲苷对 $A\beta_{1-42}$ 诱导的 BBB 损伤相关凋亡蛋白及连接蛋白表达的影响

BBB 主要由脑微血管内皮细胞、星形胶质细胞足突、基质及周皮细胞等构成, 其中脑微血管内皮细胞及其之间的连接蛋白 (ZO-1、Claudin-5、

Occludin) 是 BBB 屏障特性的主要承担者。所以保护内皮细胞及连接蛋白是保证 BBB 屏障特性的关键。为了进一步探究黄芪甲苷保护 BBB 的具体机制, 运用 Western blotting 法检测 Caspase-3、cleaved Caspase-3、ZO-1、Claudin-5、Occludin 蛋白的表达水平。结果如图 3 及表 3 所示, 与对照组比较, 模型组细胞 cleaved Caspase-3 蛋白水平显著增加, 而 ZO-1、Claudin-5、Occludin 表达水平显著降低 ($P<0.001$)。与模型组比较, 经高浓

表 2 黄芪甲苷对 $A\beta_{1-42}$ 诱导的体外 BBB 模型损伤的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of astragaloside IV on damaged BBB model induced by $A\beta_{1-42}$ *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	C/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Pe
对照	—	1.20 $\pm$ 0.04
模型	30	5.01 $\pm$ 0.23 ^{###}
黄芪甲苷	50	2.16 $\pm$ 0.05 ^{***}
	200	2.02 $\pm$ 0.02 ^{***}

表 3 黄芪甲苷对 $A\beta_{1-42}$ 诱导的 bEnd.3 细胞损伤相关凋亡蛋白及连接蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of astragaloside IV on relative expression levels of apoptosis proteins and junction proteins induced by $A\beta_{1-42}$ in bEnd.3 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	C/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	蛋白相对表达量			
		cleaved Caspase-3/Caspase-3	ZO-1	claudin-5	occludin
对照	—	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00
模型	30	177.07 $\pm$ 16.84 ^{###}	56.85 $\pm$ 2.74 ^{###}	41.41 $\pm$ 2.26 ^{###}	51.11 $\pm$ 4.90 ^{###}
黄芪甲苷	50	152.29 $\pm$ 9.29	78.78 $\pm$ 20.18	50.58 $\pm$ 3.85 [*]	80.31 $\pm$ 8.99 [*]
	200	71.58 $\pm$ 12.81 ^{***}	96.43 $\pm$ 1.91 ^{***}	57.72 $\pm$ 0.68 ^{***}	93.83 $\pm$ 9.67 ^{***}

与对照组比较: ^{###} $P<0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{***} $P<0.001$

^{###} $P<0.001$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ ^{***} $P<0.001$ vs model group

4 讨论

临床中 AD 以进行性记忆及认知功能的慢性恶化为主要表现。近年来文献显示, AD 患者的人数已达老年痴呆患者总数的 65%~70%, 是老年痴呆中发病率最高的一种类型^[20]。脑内 $A\beta$ 过度沉积的慢性毒性作用介导的 BBB 损伤及神经元突触的丢失是 AD 患者记忆与认知功能缺失的主要病理因素^[21-22]。伴随着我国老龄化社会的到来, AD 的预防与治疗显得越来越重要。

脑微血管内皮及其之间的连接蛋白是维持 BBB 结构完整性及屏障特性的重要组成成分, 而 BBB 的完整性是保护神经元细胞免受外周循环有害物质损伤的关键条件。有研究表明, 在 AD 早期,

度的黄芪甲苷预处理后, cleaved Caspase-3/Caspase-3 蛋白水平明显降低 ($P<0.001$), 且 ZO-1、Claudin-5、Occludin 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.001$)。说明黄芪甲苷可以通过抑制凋亡相关蛋白的表达及增加连接蛋白的表达抑制 $A\beta_{1-42}$ 诱导的 BBB 通透性增加。

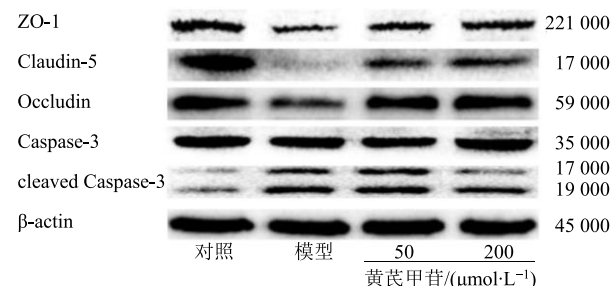


图 3 黄芪甲苷对 $A\beta_{1-42}$ 诱导的 bEnd.3 细胞损伤相关凋亡蛋白及连接蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of astragaloside IV on expression levels of apoptosis proteins and junction proteins induced by $A\beta_{1-42}$ in bEnd.3 cells

$A\beta$ 沉积在脑微血管壁间, 介导了脑微血管内皮损伤, 导致 BBB 的完整性遭到破坏, 进一步导致外周循环中的 $A\beta$ 及其他有害物质跨 BBB 入脑增加, 造成 AD 发病及病情进展^[23]。由此可见, 如何减轻 $A\beta$ 神经毒性作用介导的 BBB 损伤是目前研究 AD 早期预防 and 治疗的又一关键突破点。

研究表明, $A\beta$ 慢性毒性作用可通过激活 Caspase 依赖途径诱导神经元或内皮细胞凋亡^[24-25]。cleaved Caspase 家族是执行程序性细胞凋亡的关键介质。其中由 Caspase-3 活化而来的 cleaved Caspase-3 为细胞凋亡级联反应中最关键的凋亡蛋白, 最终致使细胞发生凋亡^[25-26]。

连接蛋白是连接 2 个内皮细胞, 维持 BBB 细

胞旁路通透性的主要功能性蛋白, 包括 Occludin、细胞质透明带蛋白 (cytoplasmic zona occludens proteins, ZO) 和 claudins^[27]。在许多疾病发生及发展过程中, ZO-1、Claudin-5、Occludin 是反映 BBB 结构变化最敏感的指标。现有研究发现, A β 可通过抑制 ZO-1、Claudin-5、Occludin 的表达造成 BBB 结构的损伤, 从而增加体内及体外 BBB 的通透性^[28-29]。因此连接蛋白在维持 BBB 的完整性中也起着重要作用。

本研究结果显示, 黄芪甲苷能够减轻 A β 介导的体外非接触式共培养 BBB 模型的高通透性。进一步研究发现, 黄芪甲苷可通过抑制细胞凋亡级联反应中的关键执行蛋白 Caspase-3 的活化而抑制 A β 介导的内皮细胞凋亡。同时, 与模型组比较, 黄芪甲苷还可以显著地促进连接蛋白 ZO-1、Claudin-5、Occludin 的表达。据此, 推测黄芪甲苷可能是通过抗凋亡及保护连接蛋白而减轻 A β 介导的体外 BBB 模型的高通透性。

综上所述, 黄芪甲苷对纤维状 A β_{1-42} 介导的 BBB 损伤具有保护作用。本研究为黄芪在临床中用于预防和治疗 AD 提供理论依据, 同时为开发出预防和治疗 AD 的新药提供参考。

参考文献

- [1] Erickson M A, Banks W A. Blood-brain barrier dysfunction as a cause and consequence of Alzheimer's disease [J]. *J Cerebr Blood Flow Metab*, 2013, 33(10): 1500-1513.
- [2] Axel M, Samuel R B, Melanie D S. Blood-brain barrier breakdown in the aging human hippocampus [J]. *Neuron*, 2015, 85(2): 296-302.
- [3] 何芳, 尹飞, 彭镜, 等. 永生化小鼠 bEnd.3 细胞株具有脑微血管内皮细胞的屏障特性 [J]. 中国当代儿科杂志, 2010(6): 474-478.
- [4] 张水华, 季龙凤, 马璟. 非接触式共培养体外血脑屏障模型的跨膜电阻及通透性 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2012, 26(6): 882-887.
- [5] Sharma G, Modgil A, Singh J. Grafting of cell-penetrating peptide to receptor-targeted liposomes improves their transfection efficiency and transport across blood-brain barrier model [J]. *Pharm Nanotechnol*, 2012, 101(7): 2468-2478.
- [6] 张峰, 高鹏, 彭俊华. 黄芪多糖及黄芪甲苷对巨噬细胞吞噬结核杆菌作用的研究 [J]. 西北国防医学杂志, 2005, 26(6): 434-436.
- [7] Li J F, Huang L F, Wang S Z, et al. Astragaloside IV attenuates inflammatory reaction via activating immune function of regulatory T cells inhibited by HMGB1 in mice [J]. *Pharm Biol*, 2016, 23(55): 1388-0209.
- [8] He Y X, Du M, Gao Y, et al. Astragaloside IV attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis of mice by counteracting oxidative stress at multiple levels [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e76495.
- [9] 杨文亮, 宋玉, 赵灿灿, 等. 黄芪甲苷对 PC12 细胞缺糖缺氧损伤的保护作用 [J]. 神经药理学报, 2015, 5(1): 10-14.
- [10] Qi H Y, Wei L, Han Y F, et al. Proteomic characterization of the cellular response to chemopreventive triterpenoid astragaloside IV in human hepatocellular carcinoma cell line Hep G2 [J]. *Int J Oncol*, 2010, 36(3): 725-735.
- [11] Fan D D, Lin S, Song Y P, et al. Astragaloside IV protects rat gastric mucosa against aspirin-induced damage [J]. *Inter Immunopharmacol*, 2016, 41: 47-55.
- [12] 张莹, 王蕾, 杜梦楠. 注射用黄芪多糖治疗肿瘤的临床研究进展 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(6): 1092-1094.
- [13] Lv L, Wu S Y, Wang G F, et al. Effect of astragaloside IV on hepatic glucose-regulating enzyme in diabetic mice induced by a high-fat diet and streptozotocin [J]. *Phytother Res*, 2010, 24(2): 219-224.
- [14] Sun Q, Jia N, Wang W, et al. Protective effects of astragaloside IV against amyloid beta1-42 neurotoxicity by inhibiting the mitochondrial permeability transition pore opening [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e98866.
- [15] 胡海燕, 金国琴, 张学礼, 等. 黄芪甲苷对淀粉样蛋白 1-40 损伤的胚胎鼠神经干细胞的增殖和分化的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(1): 246-248.
- [16] 曲友直, 赵燕玲, 李敏, 等. 黄芪甲苷对脑缺血再灌注后血脑屏障的保护作用及 occludin 蛋白表达的影响 [J]. 卒中与神经疾病, 2010, 17(2): 92-96.
- [17] Jekabsone A, Mander P K, Tickler A, et al. Fibrillar beta-amyloid peptide Abeta1-40 activates microglial proliferation via stimulating TNF-alpha release and H₂O₂ derived from NADPH oxidase: A cell culture study [J]. *J Neuroinflammation*, 2006, doi: 10.1186/1742-2096-3-24.
- [18] Liu C, Chen K, Lu Y, et al. Catalpol provides a protective effect on fibrillary A β_{1-42} induced barrier disruption in an *in vitro* model of the blood-brain barrier [J]. *Phytother Res*, 2018, doi: 10.1002/ptr.6043.
- [19] Deli M A, Abraham C S, Kataoka Y, et al. Permeability studies on *in vitro* blood-brain barrier models: Physiology, pathology, and pharmacology [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2005, 25(1), 59-127.
- [20] Luigi Y M, Annalena V, Eszter F, et al. Vascular

- dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease-A review of endothelium-mediated mechanisms and ensuing vicious circles [J]. *Neurobiol Dis*, 2015, doi: 10.1016/j.nbd.2015.08.014.
- [21] Blennow K, deLeon M J, Zetterberg H. Alzheimer's disease [J]. *Lancet*, 2006, 368(9533): 387-403.
- [22] Hosoda T, Nakajima H, Honjo H. Estrogen protects neuronal cells from amyloid β -induced apoptotic cell death [J]. *Neuroreport*, 2001, 12(9): 1965-1970.
- [23] Clifford P M, Zarrabi S, Siu G, *et al.* A β peptides can enter the brain through a defective blood-brain barrier and bind selectively to neurons [J]. *Brain Res*, 2007, doi: 10.1016/j.brainres.2007.01.070.
- [24] Feng J, Meng C, Xing D. A β induces PUMA activation: A new mechanism for A β -mediated neuronal apoptosis [J]. *Neurobiol Aging*, 2015, 36(2): 789-800.
- [25] Folini M, Baiguera S, Fioravanzo L, *et al.* Caspase-8 activation and oxidative stress are involved in the cytotoxic effect of beta-amyloid on rat brain microvascular endothelial cells [J]. *Int J Mol Med*, 2006, 17(3): 431-435.
- [26] Zhao L, Qian Z M, Zhang C, *et al.* Amyloid beta-peptide 31-35-induced neuronal apoptosis is mediated by caspase-dependent pathways via cAMP-dependent protein kinase A activation [J]. *Aging cell*, 2008, 7(1): 47-57.
- [27] Forster C. Tight junctions and the modulation of barrier function in disease [J]. *Histochem Cell Biol*, 2008, 130(1): 55-70.
- [28] Hartz A M, Bauer B, Soldner E L, *et al.* Amyloid-beta contributes to blood-brain barrier leakage in transgenic human amyloid precursor protein mice and in humans with cerebral amyloid angiopathy [J]. *Stroke*, 2012, 43(2): 514-523.
- [29] Kook S Y, Seok H H, Moon M, *et al.* Disruption of blood-brain barrier in Alzheimer disease pathogenesis [J]. *Tissue Barriers*, 2013, 1(2): e23993.