

论著·基础研究

# 隐丹参酮与多奈哌齐合用对 $\beta$ -淀粉样蛋白诱导 SH-SY5Y 细胞凋亡的保护作用\*

梅峥嵘<sup>1</sup>, 张芳艳<sup>2</sup>, 吴仲洪<sup>1</sup>, 张仲林<sup>2△</sup>

(1. 广州医科大学附属第三医院药学部, 广东广州 510150; 2. 成都医学院, 四川成都 610083)

**摘要:**目的 观察隐丹参酮(CTS)与多奈哌齐(DON)合用对  $\beta$ -淀粉样蛋白(A $\beta$ )损伤 SH-SY5Y 细胞的保护作用,并探讨其可能的机制。方法 体外培养 SH-SY5Y 细胞,建立阿尔茨海默病(AD)细胞模型,采用 MTT 法检测细胞存活率, Hoechst 荧光染色检测细胞凋亡, Western blot 检测 Bcl-2 和 Bax 的表达。结果 CTS、DON 及联合用药均能明显减轻 A $\beta$  对 SH-SY5Y 细胞的损伤,提高细胞的存活率,显著上调 Bcl-2 蛋白表达,减少 Bax 蛋白表达,抑制细胞凋亡。CTS 与 DON 合用其抑制细胞凋亡的效果显著强于 CTS 与 DON 单用,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 CTS 与 DON 合用对 A $\beta$  损伤 SH-SY5Y 细胞有协同保护作用,其机制可能与协同调节凋亡相关基因 Bcl-2 蛋白家族的表达有关。

**关键词:**阿尔茨海默病;隐丹参酮;多奈哌齐;细胞凋亡

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.10.021

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)10-1211-03

## Protective effect of combination of cryptotanshinone and donepezil on amyloid- $\beta$ protein induced apoptosis in SH-SY5Y cells\*

Mei Zhengrong<sup>1</sup>, Zhang Fangyan<sup>2</sup>, Wu Zhonghong<sup>1</sup>, Zhang Zhonglin<sup>2△</sup>

(1. Department of Pharmacy, Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510150, China; 2. Chengdu Medical College, Chengdu, Sichuan 610083, China)

**Abstract:** Objective To investigate the protective effect of cryptotanshinone(CTS) and donepezil(DON) on amyloid- $\beta$  protein (A $\beta$ )-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. **Methods** SH-SY5Y cells were cultured in vitro for establishing the Alzheimer disease (AD) model. The cell viability was detected by the MTT assay. The apoptosis rate was measured by Hoechst 33342 and the expression of Bcl-2 and Bax was detected by Western blot. **Results** CTS, DON and their combination could obviously alleviate A $\beta$ -caused injury of SH-SY5Y cells, increase the cell survival rate, remarkably up-regulate the expression of Bcl-2 protein, decrease the expression of Bax protein and inhibit the apoptosis. The effect of the CTS and DON combination for inhibiting apoptosis was significantly stronger than that of the single use of CTS and DON, the difference had statistical significance( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The combination of CTS and DON has the synergistic protective effect on A $\beta$ -caused injury in SH-SY5Y cells, its mechanisms may be related with the cooperation regulation of the expression of apoptosis related gene Bcl-2 protein family.

**Key words:** Alzheimer disease; cryptotanshinone; donepezil; apoptosis

阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)是一种中枢神经系统退行性疾病,其最显著的神经病理学特征是在海马和大脑皮质神经细胞之间出现大量与神经元退行性有关的老年斑、神经细胞内出现神经原纤维缠结和明显的胶质化。其发病机制尚不清楚,但已有大量相关的实验资料表明, $\beta$ -淀粉样蛋白(amyloid-beta protein, A $\beta$ )在 AD 发生、发展的过程中起关键作用<sup>[1]</sup>。A $\beta$  是一类由 39~43 个氨基酸构成的小分子多肽,来源于脑内的淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)的裂解<sup>[2]</sup>。隐丹参酮(cryptotanshinone, CTS)是中药丹参的单体,药动学研究发现 CTS 作为脂溶性小分子化合物血脑屏障透过率很高,因此,对治疗神经系统疾病相当有利。它能够进入脑组织并通过清除脑氨和氧自由基达到治疗肝性脑病和亚临床肝性脑病,改善老年痴呆患者症状,是理想的天然药物。同时,CTS 表现出多种药理活性,包括抗炎、抗氧化、抗菌、抗凋亡及抗血小板聚集等<sup>[3]</sup>。动物实验显示,CTS 能够改善东莨菪碱脑室注射形成的 AD 样大鼠学习记忆功能障碍<sup>[4]</sup>。多奈哌齐(donepezil, DON)是乙酰胆碱酯酶抑制剂,可通过减少乙酰胆碱(acetylcholine, Ach)的水解而增加大脑海马和皮质 Ach 的水平,从而改善认知功能,是目前治疗 AD 的一线用药<sup>[5-6]</sup>。但大量临床实践证明,该药只能改善 AD 的症状,不能延缓病情的发展。由于 AD 的病因复杂,多种药物联合使用是

合理而有效的选择。本实验旨在研究 CTS 与 DON 联用抗 AD 的作用,体外培养 SH-SY5Y 细胞,用 A $\beta$ 42 诱导细胞损伤建立 AD 细胞模型,观察两药联用对 SH-SY5Y 细胞的保护作用,并对其机制进行探讨。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** 细胞:SH-SY5Y 细胞购自中国医学科学院基础医学研究所北京协和医学院基础医学院。试剂:DMEM 培养基、0.05% 胰蛋白酶-EDTA 购自美国 Gibco 公司;四甲基偶氮唑蓝(MTT)、A $\beta$ 42、二甲基亚砜(DMSO)、Hoechst 33342 均购自 Sigma 公司;一抗 Bcl-2、Bax 购自 cell signaling 公司;二抗购自 Santa 公司。CTS 由中山大学药学院制备,纯度大于 98%。盐酸 DON 片购自卫材中国药业有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养及实验分组** 细胞培养:用无菌 PBS 将 A $\beta$ 42 配制成 100  $\mu$ mol,过滤,分装, -20  $^{\circ}$ C 保存。SH-SY5Y 细胞采用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,置于恒温 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养,隔天换液,选取对数生长期细胞进行实验。实验分组:对照组,于培养的 SH-SY5Y 细胞中加入与 A $\beta$ 42 等体积的 PBS; A $\beta$ 42 组,于 SH-SY5Y 细胞中加入终浓度为 10  $\mu$ mol 的 A $\beta$ 42 继续培养 24 h,诱导建立 AD 细胞模型;药物组:分别应用 5  $\mu$ mol CTS(CTS 组)、5  $\mu$ mol

\* 基金项目:广东省中医药强省基金项目(20111257)。 作者简介:梅峥嵘(1978-),副主任药师,博士研究生,主要从事神经药理学研究。

△ 通讯作者, Tel: (020)62308633; E-mail: zhzhzhang05@163.com。

DON(DON 组)、5  $\mu\text{mol}$  CTS 联合 5  $\mu\text{mol}$  DON(联合组)预处理细胞 1 h 后,然后加入 10  $\mu\text{mol}$  的 A $\beta$ 42 共同作用于细胞 24 h。实验至少重复 3 次。

**1.2.2 MTT 比色法检测细胞活性** 用 96 孔板培养细胞,于细胞培养第 2 天,按照实验分组加入药物处理,处理结束后加入终浓度为 0.5 mg/mL 的 MTT,孵育 4 h 后,吸弃上清液,每孔加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO,室温振荡 10 min,待紫色结晶物充分溶解,用全自动酶标仪读取 570 nm 处光密度值(OD 值),每组重复 3 孔。细胞存活率=(检测孔的 OD 值/对照孔的 OD 值)×100%。

**1.2.3 Hoechst 荧光染色** 细胞经药物处理结束后,吸弃培养液,PBS 洗 2 次,4%的多聚甲醛固定,Hoechst33342 染色(5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )室温孵育 15 min,倒置荧光显微镜下观察计数各组细胞凋亡情况。

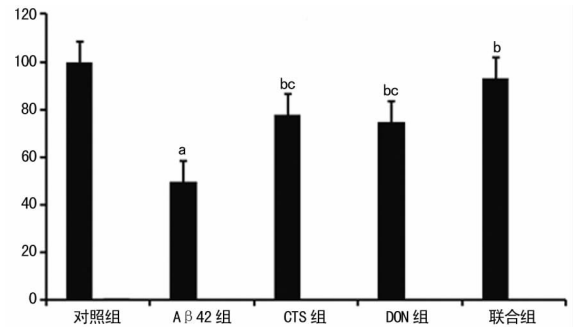
**1.2.4 Western blot 检测 Bcl-2、Bax 表达** 将细胞接种于 6 孔板中,同上分组进行药物处理,24 h 后,收集细胞,加入细胞裂解液,离心取上清液。Lowry 法测定蛋白浓度后,调整蛋白裂解液到相同浓度,与等体积的 2×上样缓冲液混匀,煮沸 5 min。用 12%的分离胶和 5%的浓缩胶进行聚丙烯酰胺凝胶电泳;电泳完毕后,用 100 V 电压转移 2 h 将蛋白转至测 NC 膜上,用封闭液室温封闭 1 h。将膜与溶于封闭液中的一抗(1:1 000)室温孵育 2 h,TBS 洗 5 min×3 次;后用加辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔二抗(1:2 000)孵育,1 h 后取出膜洗 3 次,每次 5 min;最后加入化学发光剂,在暗室内显影定影。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS11.5 统计软件进行统计分析,

计量资料采用  $\bar{x}\pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

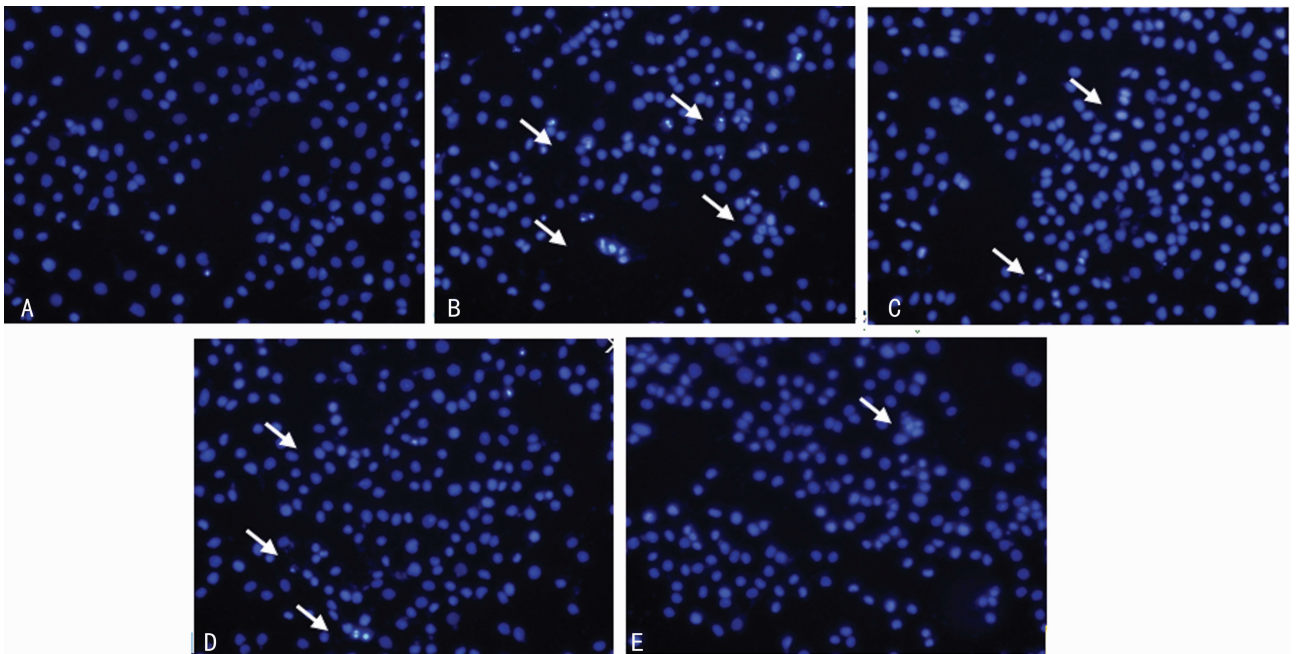
**2.1 CTS 与 DON 合用对 A $\beta$ 42 诱导 SH-SY5Y 细胞存活率的影响** CTS 与 DON 均能抑制 A $\beta$ 42 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤,联合组尤其明显( $P<0.05$ ),见图 1。



<sup>a</sup>:  $P<0.05$ , 与对照组比较; <sup>b</sup>:  $P<0.05$ , 与 A $\beta$ 42 组比较; <sup>c</sup>:  $P<0.05$ , 与联合组比较。

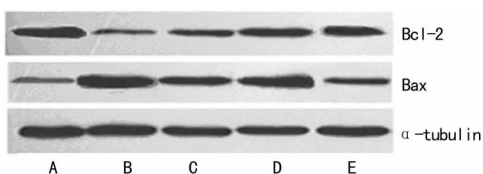
图 1 各组 SH-SY5Y 细胞存活率比较

**2.2 CTS 与 DON 合用对 A $\beta$ 42 诱导 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响** 对细胞进行 Hoechst 染色,荧光显微镜下可见正常皮层细胞核呈圆形或椭圆形,染色均匀(图 2A),A $\beta$ 42 损伤后部分细胞可见凋亡特征性改变,如细胞核固缩,边缘不整齐,呈碎块状致密浓染(图 2B)。CTS 与 DON 合用能降低凋亡的细胞数,减轻凋亡的程度,见图 2C、D、E。



A: 对照组; B: A $\beta$ 42 组; C: CTS 组; D: DON 组; E: 联合组。

图 2 各组 SH-SY5Y 细胞凋亡比较(箭头所指为凋亡,×200)



A: 对照组; B: A $\beta$ 42 组; C: CTS 组; D: DON 组; E: 联合组。

图 3 各组细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达。

**2.3 CTS 与 DON 合用对 Bcl-2 及 Bax 表达的影响** Bcl-2 家族是重要的凋亡调节因子, A $\beta$ 42 可抑制 Bcl-2 的表达,增加 Bax 表达,导致 Bcl-2/Bax 比值下降,CTS 与 DON 合用后增加 Bcl-2 的表达,减少 Bax 表达,使 Bcl-2/Bax 比值上升,其比值高于 CTS 及 DON 组,见图 3。

## 3 讨论

AD 主要的病理特征包括神经细胞外以 A $\beta$  沉积为核心形

成的老年斑、细胞内以磷酸化的 Tau 蛋白为核心形成的神经纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFTs) 及神经细胞丢失等。由于 AD 的病因复杂, 单一药物只能改善其症状, 不能延缓病情进展, 因此, 多种药物联合使用应当是合理而有效的选择。联合用药可以对疾病的多种致病途径实现同时干预, 并可在较低剂量达到治疗作用。对一些病因复杂的疾病如癌症、艾滋病, 现在临床上多使用几种药物联合治疗, 目的在于提高疗效, 降低不良反应<sup>[7]</sup>。目前, 在临床实践中已经有使用不同的药物对 AD 进行联合治疗<sup>[8]</sup>, 但是, 还缺乏大量临床试验来验证其疗效。现有的临床证据表明, 对中、重度 AD 患者的随机双盲实验发现, 美金刚与乙酰胆碱酯酶抑制剂合用比单一药物治疗疗效更佳<sup>[9]</sup>, 它们联合应用具有协同作用, 患者耐受性良好, 无严重的药物不良反应。但有学者在成年大鼠上发现 DON 与美金刚联用时, DON 增加了美金刚的神经毒性<sup>[10]</sup>。AD 的发病率高, 病程长, 患者需长期服药, 美金刚与乙酰胆碱酯酶抑制剂合用比单一药物治疗疗效好, 但还缺乏大量的临床试验, 并且已经有研究发现该联合用药对患者的生存期无影响。因此, 寻找新的药物联合应用, 增加药物的疗效, 彻底地治愈 AD 成为当前 AD 治疗研究的热点<sup>[11]</sup>。CTS 作为中药单体在临床前实验研究发现其已经表现出良好的抗 AD 的作用, 在本课题的前期研究中利用 APP/PS1 双转基因模型小鼠, 发现 CTS 通过上调  $\alpha$ -分泌酶来减少 A $\beta$  的生成从而发挥抗 AD 的作用<sup>[12]</sup>, 并且 CTS 作为多靶点的药物还具有中和氧自由基、抗凋亡的作用。

细胞凋亡的发生受到细胞内凋亡调节蛋白的调控, 这些凋亡调节蛋白分为促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白两大类, 细胞凋亡的发生是这两类相互拮抗的蛋白之间平衡丧失的结果<sup>[13]</sup>。在目前已知的凋亡蛋白中, Bcl-2 蛋白家族起着重要的作用, 属于凋亡过程的调控者。Bcl-2 存在于细胞中的线粒体、核膜、内质网膜上, 并抵抗各种凋亡的刺激而对细胞起保护作用, 它在神经系统发育过程中广泛存在<sup>[14]</sup>。Bcl-2 蛋白的生理功能主要是抑制细胞凋亡, 延长细胞寿命, 而不影响细胞周期和分化, 这对于维持体内某些需长期生存的细胞神经元具有重要意义。有研究表明, Bcl-2/Bax 的比率决定细胞凋亡是否发生, Bax 增高, 促进细胞凋亡; Bcl-2 增高, 抑制细胞凋亡<sup>[15-16]</sup>。本研究结果显示, CTS 与 DON 合用后, Bcl-2/Bax 的比率较单独用药组高, 表明这两种药物合用后可协同调节 Bcl-2 蛋白。

本实验通过荧光显微镜观察到, A $\beta$  造模后在 Hoechst 染色时出现部分染色质浓缩和高度凝聚等典型细胞凋亡特征, 证实 CTS 与 DON 合用能发挥协同抗凋亡作用。进一步通过 Western blot 方法对细胞凋亡相关蛋白进行了检测, 发现 CTS 与 DON 合用后, Bcl-2 蛋白表达较单一药物升高, 而 Bax 蛋白表达较单一药物降低, 提示 CTS 与 DON 联合应用协同抗凋亡作用可能与影响 Bcl-2 和 Bax 对细胞凋亡过程的调控有关。

#### 参考文献:

[1] Landau SM, Mintun MA, Joshi AD, et al. Amyloid deposition, hypometabolism, and longitudinal cognitive decline [J]. *Ann Neurol*, 2012, 72(4): 578-586.

[2] Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics[J]. *Science*, 2002, 297(5580): 353-356.

[3] Zhou L, Zuo Z, Chow MS. Danshen: an overview of its

chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use[J]. *J Clin Pharmacol*, 2005, 45(12): 1345-1359.

[4] Kim DH, Jeon SJ, Jung JW, et al. Tanshinone congeners improve memory impairments induced by scopolamine on passive avoidance tasks in mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 574(2/3): 140-147.

[5] 赵瑾, 王延江, 张涛, 等. 安理申治疗阿尔茨海默病的临床研究[J]. *重庆医学*, 2008, 37(7): 716-717.

[6] 郭静静, 廖红. 阿尔茨海默病治疗药物的研究进展[J]. *中国药科大学学报*, 2010, 47(5): 395-400.

[7] Boffito M, Fox J, Bowman C, et al. Safety, immunogenicity and efficacy assessment of HIV immunotherapy in a multi-centre, double-blind, randomised, Placebo-controlled Phase Ib human trial [J]. *Vaccine*, 2013, 31(48): 5680-5686.

[8] Cornelli U. Treatment of Alzheimer's disease with a cholinesterase inhibitor combined with antioxidants [J]. *Neurodegener Dis*, 2010, 7(1/2/3): 193-202.

[9] Tariot PN, Farlow MR, Grossberg GT, et al. Memantine treatment in patients with moderate to severe Alzheimer disease already receiving donepezil: a randomized controlled trial [J]. *JAMA*, 2004, 291(3): 317-324.

[10] Creeley CE, Wozniak DF, Nardi A, et al. Donepezil markedly potentiates memantine neurotoxicity in the adult rat brain [J]. *Neurobiol Aging*, 2008, 29(2): 153-167.

[11] Gao J, Inagaki Y, Li X, et al. Research progress on natural products from traditional Chinese medicine in treatment of Alzheimer's disease [J]. *Drug Discov Ther*, 2013, 7(2): 46-57.

[12] Mei Z, Zhang F, Tao L, et al. Cryptotanshinone, a compound from *Salvia miltiorrhiza* modulates amyloid precursor protein metabolism and attenuates beta-amyloid deposition through upregulating alpha-secretase in vivo and in vitro [J]. *Neurosci Lett*, 2009, 452(2): 90-95.

[13] 王彤, 刘存志, 刘玉珍, 等. Bcl-2/bax 基因调控机体细胞凋亡的机制研究进展 [J]. *中国老年学杂志*, 2008, 28(16): 1658-1660.

[14] Chen SD, Yin JH, Hwang CS, et al. Anti-apoptotic and anti-oxidative mechanisms of minocycline against sphingomyelinase/ceramide neurotoxicity: implication in Alzheimer's disease and cerebral ischemia [J]. *Free Radic Res*, 2012, 46(8): 940-950.

[15] Liu XA, Liao K, Liu R, et al. Tau dephosphorylation potentiates apoptosis by mechanisms involving a failed dephosphorylation/activation of Bcl-2 [J]. *J Alzheimers Dis*, 2010, 19(3): 953-956.

[16] Yu Y, Zhou L, Sun M, et al. Xylocoside G reduces amyloid- $\beta$  induced neurotoxicity by inhibiting NF- $\kappa$ B signaling pathway in neuronal cells [J]. *J Alzheimers Dis*, 2012, 30(2): 263-275.