

# 花旗松素对 $\beta$ -淀粉样肽损伤神经元的保护作用及机制

王秋月\*, 高翔, 王晓玲, 张玲艳  
(天津医科大学第二医院, 天津 300211)

**[摘要]** **目的:**研究花旗松素对  $\beta$ -淀粉样肽( $\beta$ -amyloid peptide, A $\beta$ )损伤神经元的保护作用及其机制。**方法:**从新生乳鼠大脑皮层中分离纯化神经元,与 A $\beta$ (5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、不同浓度花旗松素(20 ~ 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )共同孵育 24 h, CCK8 法检测细胞存活率, Hoechst 33258 染色和 Annexin V-FITC/PI 检测细胞凋亡, 分光光度法检测半胱天冬酶-3(caspase-3)活性的变化。**结果:**在细胞活力实验中,与正常组相比,模型组细胞活力显著下降(49.2  $\pm$  1.3)%,不同浓度的花旗松素可以提高神经元活力,其中 80  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  花旗松素给药组细胞活力增至(68.7  $\pm$  3.2)%,与模型组相比有极显著差异;细胞凋亡结果显示,与正常组比较,模型组细胞凋亡率为(50.8  $\pm$  1.5)%( $P < 0.01$ ),不同浓度的花旗松素给药组可以降低细胞凋亡率,其中 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  花旗松素凋亡率为(41.5  $\pm$  2.7)%,与模型组比较呈显著性差异( $P < 0.05$ );凋亡酶 caspase-3 的活性与正常组(0.12  $\pm$  0.02)  $\text{U}\cdot\mu\text{g}^{-1}$  比较,模型组的 caspase-3 的活性升高(2.37  $\pm$  0.16)  $\text{U}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ ,  $P < 0.01$ ,与模型组相比,40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  花旗松素组 caspase-3 显著降低(1.77  $\pm$  0.07)  $\text{U}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ ,  $P < 0.01$ 。花旗松素能明显提高 A $\beta$  损伤神经元的细胞活力,抑制神经元的凋亡,降低凋亡酶 caspase-3 的活性。**结论:**花旗松素对 A $\beta$  损伤神经元具有保护作用,其机制可能与抑制 caspase-3 活性从而实现抗凋亡作用有关。

**[关键词]** 花旗松素; 神经元;  $\beta$ -淀粉样肽; 凋亡

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)24-0164-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014240164

## Neuroprotective Effects and Mechanism of Taxifolin Against Neural Damage Induced by A $\beta$

WANG Qiu-yue\*, GAO Xiang, WANG Xiao-ling, ZHANG Ling-yan  
(The Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the neuroprotective effects and mechanism of taxifolin against A $\beta$  induced neural damage. **Method:** Primary neurons were isolated and purified from cerebral cortex of suckling mouse. The neurons were co-cultured with A $\beta$  and taxifolin for 24 h. CCK8 method was used to test cell viability. The apoptosis was examined by Hoechst 33258 nuclear staining, Annexin V-FITC/PI double staining and caspase-3 activity. **Result:** In cell viability, compared with the normal group, cell viability of model group decreased significantly (49.2  $\pm$  1.3)%, different concentrations of taxifolin could improve the neuronal activity, the cell viability of 80  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  taxifolin increased to (68.7  $\pm$  3.2)%, compared with the model group. Compared with the normal group, the apoptosis rate of model group was (50.8  $\pm$  1.5)%( $P < 0.01$ ), different concentrations of taxifolin could reduce the cell apoptosis rate, 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  taxifolin apoptosis rate was (41.5  $\pm$  2.7)%, compared with the model group ( $P < 0.05$ ). Compared with the normal group, in model group, caspase-3 activity was (2.37  $\pm$  0.16)  $\text{U}\cdot\mu\text{g}^{-1}$  ( $P < 0.01$ ), compared with the model group, 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  taxifolin group decreased the caspase-3 activity (1.77  $\pm$  0.07)  $\text{U}\cdot\mu\text{g}^{-1}$  ( $P < 0.01$ ). CCK8 assay displayed that taxifolin obviously increased cell viability. Hoechst 33258 nuclear staining and Annexin V-FITC/PI double staining showed that taxifolin could significantly decrease apoptotic rate compared with the A $\beta$  treated group. Taxifolin also inhibited caspase-3 activity

**[收稿日期]** 20140501(011)

**[通讯作者]** \*王秋月, 中药师, 从事中药药理研究, E-mail: yueyue-cc@163.com

of neurons induced by  $A\beta$ . **Conclusion:** Taxifolin possesses the neuroprotective effects on  $A\beta$  damaged neurons, which may be associated with inhibition of caspase-3 activity in neurons to against apoptosis.

[**Key words**] taxifolin; neurons;  $\beta$ -amyloid peptide; apoptosis

阿尔茨海默病是一种以老年斑形成、神经纤维缠结、神经元丢失为主要病理特征的中枢神经系统神经退行性疾病,主要表现为进行性的认知功能下降。 $\beta$ -淀粉样肽( $\beta$ -amyloid peptide,  $A\beta$ )的生成、代谢及毒性作用被认为是阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)病理机制。 $A\beta$ 的病理性聚积会激活小胶质细胞和星形胶质细胞,诱导炎症介质释放增加,继而将诱导型一氧化氮合酶激活,产生一氧化氮及活性氧簇,这种过氧化物能对细胞产生很强的毒性,从而引发细胞凋亡。花旗松素(taxifolin)是一种二氢黄酮醇类化合物,是土茯苓、水红花子等中药的主要成分<sup>[1-2]</sup>。近年来研究发现其对心肌缺血再灌注损伤有显著的保护作用<sup>[3]</sup>,并且能抑制丙型肝炎病毒、抗氧化应激、抗炎症反应达到保肝的作用<sup>[4]</sup>。但尚未见花旗松素对神经元作用的相关报道。本研究研究了花旗松素对 $A\beta$ 导致的小鼠原代神经元损伤的保护作用,并对其作用机制进行探讨。

## 1 材料

**1.1 动物** 出生3 d的乳鼠(BALB/c), SPF级,合格证号SCXK(京)2012-0001,购自天津医科大学实验动物中心。

**1.2 仪器与试剂** MR-96A型酶标仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司), BX61型荧光显微镜(日本Olympus公司), 流式细胞仪(美国MilliPore公司)。DMEM高糖培养基(批号12491-015)、胎牛血清(Gibco公司,批号GUC0066); $\beta$ -淀粉样肽( $A\beta$ ,批号919437)、4,6-联脒-2-苯基吡啶(DAPI)(批号1886001,百灵威)、Hoechst 33258染料(批号B-2883)、阿糖胞苷(批号366272,百灵威)、多聚赖氨酸(批号1014318,西亚试剂);兔抗小鼠中相对分子质量神经丝蛋白(NF-M)抗体(Stem-Cell Technologies)(批号YH03349m,上海研卉);异硫氰酸荧光素(FITC)标记羊抗兔免疫球蛋白G(IgG, American Qualex)(批号A102FN); Cell Counting Kit(CCK-8)试剂盒(北京庄盟生物技术有限公司,批号DV652); Bradford蛋白浓度测定试剂盒(批号P0006, Beyotime); 半胱天冬酶(caspase-3)活性检测试剂盒(批号sc-65496, Santa Cruz Biotechnology); 磷酸缓冲液(phosphate buffer solution, PBS, 批号J1223A); 花旗松素(纯度>98.9%, 批号111816-

201102, 中国食品药品检定研究院)。

## 2 方法

**2.1 神经元原代培养**<sup>[5]</sup> 取新生乳鼠BALB/c, 常规消毒后无菌条件下断头取脑, 分离其大脑皮层, 剪碎、消化、过70  $\mu$ m细胞筛网、洗涤; 加入含10%胎牛血清、青霉素( $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、链霉素( $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )的DMEM高糖培养基中, 调整细胞密度为 $1 \times 10^4/\text{L}$ , 接种于96孔培养板中(培养板预先用多聚赖氨酸浸泡);  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ 培养, 隔3 d换1次液; 第5天加入阿糖胞苷(终浓度为 $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )培养3 d以上, 抑制神经胶质细胞及杂细胞生长, 至第12天用于试验。

**2.2 神经元鉴定** 用4%多聚甲醛固定原代培养的神经元30 min, PBS洗涤3次。0.1%聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)通透15 min, PBS洗涤3次, 弃去液体; 加入一抗(NF-M, 1:100)  $4^\circ\text{C}$ 过夜。次日晨再加入FITC标记二抗(1:200, green)室温孵育60 min, PBS洗涤、封片, 倒置荧光显微镜下观察拍照。

**2.3 检测细胞活力** 神经元培养至第12天成熟时, 加入 $A\beta$ (终浓度为 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )制备神经元损伤模型, 同时加入不同浓度花旗松素(终浓度为20, 40, 60, 80, 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 共同孵育24 h, 终止培养。每孔加入CCK8试剂10  $\mu\text{L}$ ,  $37^\circ\text{C}$ 孵育1 h, 酶标仪测定490 nm处吸光度(A)。

$$\text{细胞活力} = A_{\text{给药组}} / A_{\text{空白组}} \times 100\%$$

**2.4 检测细胞凋亡**<sup>[6]</sup> 用Hoechst 33258对细胞核进行染色, 可以显示细胞核的变化和凋亡小体。成熟神经元加入 $A\beta$ (终浓度为 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )和花旗松素(终浓度为20, 40, 80  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )处理, 共同孵育24 h后, PBS洗2遍, 每次3 min; 4%多聚甲醛重悬细胞, 固定; 0.1% Triton X-100通透; 再加入Hoechst 33258 ( $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 7.4)室温下10 min, PBS洗涤, 封片, 倒置荧光显微镜下观察。

成熟神经元经过 $A\beta$ (终浓度为 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )和花旗松素(终浓度为20, 40, 80  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )处理, 共同孵育24 h后, 收集各组细胞, 冷PBS洗2次, Annexin V避光染色10 min, 离心, 弃上清, 加入 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的PI工作液100  $\mu\text{L}$ , 染色10 min, 离心, 弃上清。缓冲液重悬细胞, 流式细胞仪检测细胞凋

亡情况。

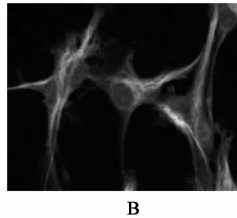
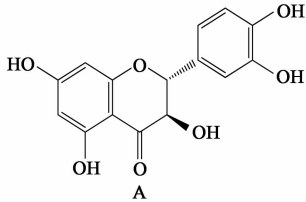
**2.5 caspase-3 酶活性测定**<sup>[7]</sup> 成熟神经元经过  $A\beta$  (终浓度为  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和花旗松素 (终浓度为 20, 40, 80  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 处理, 共同孵育 24 h 后, 收集各组细胞, 冷 PBS 洗两次, 提取蛋白, Bradford 法测定蛋白的量, 分光光度法检测各组 caspase-3 酶活性。

**2.6 统计学处理** 数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 16.0 软件进行单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  为有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 神经元的鉴定** 培养至第 12 天时, 神经元已呈成熟状态, 采用免疫荧光法鉴定, 显示荧光染色阳性细胞数占总数 90% 以上 (图 1)。

**3.2 对神经元活力的影响** CCK8 法检测结果显示,  $A\beta$  处理后与空白组比较细胞活力明显降低 ( $49.2 \pm 1.3$ )%, 而花旗松素能不同程度提高细胞活力, 其中 80  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  使细胞活力达 ( $68.7 \pm 3.2$ )%, 显著高于  $A\beta$  造模组 ( $P < 0.01$ ), 说明花旗松素对  $A\beta$  损伤神经元具有保护作用, 见表 1。



(绿色: NF-M<sup>+</sup>; 蓝色: DAPI<sup>+</sup> 细胞核;  $\times 40$ )

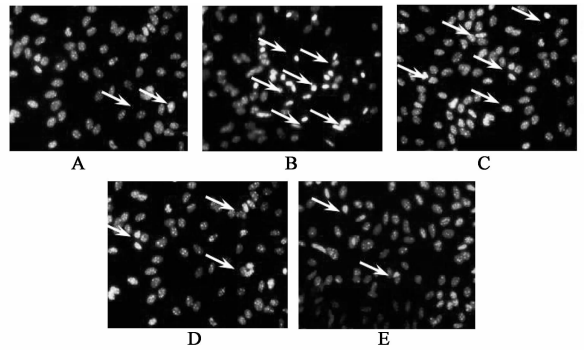
图 1 花旗松素结构式 (A) 和神经元 (B) 鉴定

**3.3  $A\beta$  诱导的神经元凋亡的影响**  $A\beta$  处理后, 以皱缩、明亮为特征的凋亡细胞核明显增多; 而花旗松素治疗组, 随着花旗松素浓度的增加, 凋亡核数量逐渐减少 (图 2)。另外 Annexin V/PI 凋亡检测也证实了这个结果。  $A\beta$  模型组的凋亡率为 ( $50.8 \pm 1.5$ )%, 与空白组比较明显增加 ( $P < 0.01$ ), 20, 40, 80  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  花旗松素治疗组的凋亡率分别为 ( $47.8 \pm 3.2$ )%, ( $41.5 \pm 2.7$ )%, ( $32.8 \pm 2.4$ )%, 表明花旗松素具有抑制  $A\beta$  诱导的神经元凋亡的作用。见表 1。

**3.4 对 caspase-3 酶活性的影响** 与正常组相比,  $A\beta$  明显提高 caspase-3 酶的活性 ( $P < 0.01$ ); 花旗松素 ( $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 抑制了 caspase-3 的活性, 与模型组相比差异显著 ( $P < 0.01$ )。见表 1。

### 4 讨论

作者通过 CCK8 法对  $A\beta$  有效的毒性剂量进行



A. 正常组; B. 模型组; C. taxifloin 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; D. taxifloin 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; E. taxifloin 80  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   
图 2 花旗松素对  $A\beta$  诱导的神经元凋亡的影响 (Hoechst 33258 染色,  $\times 40$ , 箭头所指是凋亡神经元)

表 1 花旗松素对细胞活力、细胞凋亡和 caspase-3 活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

分组	花旗松素浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞活力 / %	神经元凋亡 / %	caspase-3 活性 / $\text{U}\cdot\mu\text{g}^{-1}$
正常	-	$100.2 \pm 1.9$	$2.5 \pm 2.1$	$0.12 \pm 0.02$
模型	-	$49.2 \pm 1.3^{1)}$	$50.8 \pm 1.5^{1)}$	$2.37 \pm 0.16^{1)}$
taxifolin	20	$51.7 \pm 1.5$	$47.8 \pm 3.2$	$2.19 \pm 0.12$
	40	$55.6 \pm 2.0^{2)}$	$41.5 \pm 2.7^{2)}$	$1.77 \pm 0.07^{3)}$
	60	$56.1 \pm 3.2^{2)}$	-	-
	80	$68.7 \pm 3.2^{3)}$	$32.8 \pm 2.4^{3)}$	$1.57 \pm 0.09^{3)}$
	100	$69.1 \pm 3.6^{3)}$	-	-

注: 与正常组相比<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>3)</sup>  $P < 0.01$ 。

筛选, 发现  $5 \sim 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的  $A\beta$  对神经元有明确的毒性作用,  $6 \sim 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的  $A\beta$  严重降低神经元的成活率, 因此本实验采用  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的  $A\beta$  用于后续实验。

CCK8 实验结果证实花旗松素能明显改善  $A\beta$  损伤神经元的生长状态, 使其存活率显著升高。通过 Hoechst 33258 染色观察到了高剂量花旗松素干预的神经元浓缩核减少, 形态规则, 荧光强度较弱, 从形态上证明了花旗松素可以抑制神经元的凋亡。Annexin V-PI 流式细胞仪检测进一步证实了花旗松素神经保护作用是通过抑制细胞凋亡为实现的。

半胱-天冬酶 (caspase) 家族是参与细胞凋亡过程一类重要的蛋白酶, 其中最重要的是 caspase-3<sup>[8]</sup>。Harada<sup>[9]</sup> 通过大鼠皮质神经元的原代培养证明  $\beta$  淀粉样蛋白可以导致 caspase-3 含量升高。因此作者检测了 caspase-3 酶的含量, 验证花旗松素对神经元是否具有抗凋亡作用。结果发现,  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  花旗松素可以显著抑制  $A\beta$  诱导神经元 caspase-3 酶

的活性,证明了花旗松素可以抑制 AD 细胞模型中神经元的凋亡。

综上所述,花旗松素对  $A\beta$  诱导神经元损伤具有保护作用,其作用机制是通过影响 caspase-3 的活性达到抑制神经元凋亡。

#### [参考文献]

[1] 张元桐,翟延君,康廷国,等. HPLC 测定不同地区水红花子中花旗松素含量[J]. 中国中药杂志,2007, 32(20):2190.

[2] 袁久志,窦德强,陈英杰,等. 土茯苓二氢黄酮醇类成分研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(9):867.

[3] Wang Y H, Wang W Y, Chang C C, et al. Taxifolin ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats through its anti-oxidative effect and modulation of NF-kappa B activation [J]. J Biomed Sci, 2006, 13(1):127.

[4] Polyak S J, Morishima C, Lohmann V, et al. Identification of hepatoprotective flavonolignans from silymarin [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107

(13):5995.

[5] 辛岗,苏芸,王革非,等. 新生 BALB/c 小鼠大脑皮质神经元细胞培养方法的建立[J]. 生物技术通讯, 2011,22(1):85.

[6] 张华军,万茜,徐天舒. 银杏叶提取物对  $A\beta$  诱导神经毒性的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2011, 17(2):209.

[7] 陈晓宇,黄仁彬. 玉郎伞多糖对快速老化小鼠额叶和海马神经元 caspase-3 表达及活性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(13):208.

[8] Dey S, Mactutus C F, Booze R M, et al. Cocaine exposure *in vitro* induces apoptosis in fetal locus coeruleus neurons by altering the Bax/Bcl-2 ratio and through caspase-3 apoptotic signaling [J]. Neuroscience, 2007, 144(2):509.

[9] 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.

[责任编辑 聂淑琴]

## 《中国医药导报》杂志 欢迎订阅 欢迎投稿

《中国医药导报》杂志是国家卫生和计划生育委员会主管、中国医学科学院主办的医药卫生期刊,现为旬刊,国内统一刊号:CN11-5539/R,国际标准刊号 ISSN1673-7210,邮发代号:80-372,本刊系中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)、美国化学文摘(CA)收录期刊、解放军医学图书馆中文生物医学期刊文献数据库收录期刊,所刊登的文章被万方数据、中国知网、中文科技期刊数据库全文收录。每期定价 20 元,全年 36 期优惠价 540 元。

本刊设专家论坛、综述、论著、实验研究、药理与毒理、临床研究、药物与临床、麻醉与镇痛、医学检验、病理分析、影像与介入、病例报告、医疗器械、中医中药、生物医药、药品检验、制剂与技术、药师与临床、不良反应监测、药物经济学、调查研究、护理研究、教育研究、科研管理、法规与标准、卫生研究、医疗管理、产业与市场、医药监管、工作探讨等栏目。是广大医药卫生科研、教育、医护、药事、经营管理等人员了解医药研究进展、发展动态,展示医药科研成果,学习先进经验,探讨工作难题,交流和提高业务学术水平的得力助手,也是发表医药学术论文的阵地。在本刊发表的论文可获得继续教育学分。本刊订户凭订阅单复印件投稿优先发表。

社址:北京市朝阳区通惠家园惠润园(壹线国际)5-3-601 邮编:100025

投稿热线:010-59679061 59679063 发行热线:010-59679533

传真:010-59679056 投稿信箱:yydb@vip.163.com

网址:www.yiyaodaobao.com.cn