

# 琐琐葡萄多糖对阿尔茨海默病细胞模型 APP 表达的影响

袁芳, 周勇, 盛磊, 胡汉华\*

(新疆医科大学基础医学院, 乌鲁木齐 830011)

**[摘要]** 目的:观察琐琐葡萄多糖(polysaccharide from *Vitis vinifera*, VTP)对 $\beta$ -淀粉样蛋白<sub>25-35</sub>( $A\beta_{25-35}$ )诱导 PC12 细胞 $\beta$ -淀粉样前体蛋白(beta-amyloid precursor protein, APP)基因表达的影响,探讨 VTP 在阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)发病机制中的作用。方法:体外培养 PC12 细胞,分为对照组,AD 模型组(20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $A\beta_{25-35}$  作用 24 h),VTP 低、中、高剂量组质量浓度分别为 20,40,80  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。VTP 作用 24 h 后,检测细胞活性、超氧化物歧化酶(SOD)活力、丙二醛(MDA)含量和细胞超微结构,采用实时荧光定量 PCR(real-time PCR)检测 APP mRNA 表达。结果:与正常组比较,模型组细胞活性及 SOD 活力降低( $P < 0.01$ ),MDA 含量及 APP mRNA 表达增高( $P < 0.01$ ),细胞超微结构明显异常;与模型组比较,给药组细胞活性及 SOD 活力增强( $P < 0.05$ ),MDA 含量及 APP mRNA 表达下降( $P < 0.01$ ),减轻神经细胞损伤。结论:VTP 对  $A\beta_{25-35}$  诱导的氧化损伤有保护作用,通过抗氧化和调节 APP mRNA 表达,抑制  $A\beta$  形成,保护神经细胞,起到防治 AD 的作用。

**[关键词]** 阿尔茨海默病; 琐琐葡萄多糖; PC12 细胞; 氧化损伤;  $\beta$ -淀粉样前体蛋白

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)18-0107-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.2015180107

## Effect of Polysaccharide from *Vitis vinifera* on Expression of APP in Alzheimer's Disease Cell Model

YUAN Fang, ZHOU Yong, SHENG Lei, HU Han-hua\* (College of Basic Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate protective effect of polysaccharide from *Vitis vinifera* (VTP) on expression of beta-amyloid precursor protein (APP) in PC12 cells induced by  $\beta$ -amyloid protein<sub>25-35</sub> ( $A\beta_{25-35}$ ), in order to discuss the mechanism of VTP in pathogenesis of Alzheimer's disease (AD). **Method:** Alzheimer's disease (AD) cell model was established by inducing PC12 cells with 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $A\beta_{25-35}$  for 24 h and intervened with different concentrations of VTP (20, 40, 80  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Cell viability was detected by CCK-8. The activities of dismutase superoxide (SOD) and malondialdehyde (MDA) were measured. The expression of APP mRNA was quantified by real-time PCR. **Result:** Compared with the normal group, the model group showed decreases in cell viability and SOD activity ( $P < 0.01$ ) and increases in MDA content and APP mRNA expression ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, cell viability and SOD activity were increased ( $P < 0.05$ ), MDA content and APP mRNA expression were decreased in VTP groups ( $P < 0.05$ ), indicating the relief in neuronal injury. **Conclusion:** VTP has a protective effect in the oxidative injury induced by  $A\beta_{25-35}$  and plays a role in preventing and treating AD by resisting oxidation, adjusting APP mRNA expression, inhibiting  $A\beta$  formation and protecting neurocytes.

**[Key words]** Alzheimer's disease; polysaccharide from *Vitis vinifera*; PC12 cells; oxidative damage; beta-amyloid precursor protein

阿尔茨海默病(AD)亦称老年痴呆,以慢性进行性不可逆记忆减退、认知障碍和人格改变为主要

临床特征。随着老龄化社会的进程,老年痴呆、帕金森病等神经退行性疾病严重威胁着老年人的身体健

**[收稿日期]** 20150104(016)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81360568);新疆维吾尔自治区高校科研计划重点项目(XJEDU2012125)

**[第一作者]** 袁芳,博士,副教授,从事维吾尔药物的应用基础研究,Tel:0991-4362465,E-mail:yuanfang398@163.com

**[通讯作者]** \*胡汉华,博士,教授,从事维吾尔医药药理机制的研究,Tel:0991-4362225,E-mail:huhuanhuaster@gmail.com

康和生活质量,给社会和家庭带来了沉重的负担。因此,对于 AD 的预防与治疗是当前老年人群保健急需解决的问题。随着对 AD 发病机制的深入研究,天然药物预防和治疗 AD 的作用成为研究热点。琐琐葡萄(*Vitis vinifera*)在我国主产于新疆吐鲁番、和田等地,是药用葡萄品种之一。本课题组从琐琐葡萄提取了多糖、黄酮、三萜等活性物质,研究其抗突变、抗氧化、抗肿瘤、抗病毒、抗衰老等医药保健功能<sup>[1-3]</sup>。本研究采用  $A\beta_{25-35}$  (beta-amyloid protein<sub>25-35</sub>) 诱导 PC12 细胞氧化损伤建立 AD 细胞模型,探讨琐琐葡萄多糖(VTP)通过调节  $\beta$ -淀粉样前体蛋白(APP)表达对 AD 的保护作用及机制。

## 1 材料

**1.1 药物与试剂** 琐琐葡萄购自新疆维吾尔自治区吐鲁番维药市场,新疆药物研究所张彦福研究员鉴定为 *Vitis vinifera* 的成熟干燥果实,刘涛教授提取及纯化 VTP (葡萄多糖及其提取方法和应用,马龙等,发明专利 200710201354),含量为 8.19%,VTP 批号 20101025。 $A\beta_{25-35}$  (美国 Sigma 公司,批号 108k4794, $A\beta_{25-35}$  溶于超纯水浓度为  $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , $37^\circ\text{C}$  老化 7 d,临用前稀释),DMEM 高糖培养液(Hyclone 公司),胎牛血清(杭州四季青公司),超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(批号 20120706),丙二醛(MDA)试剂盒(批号 20120703)由南京建成生物研究所提供,CCK-8 检测试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,AR1160),Trizol (Invitrogen,批号 50175111),逆转录试剂盒(TaKaRa,批号 D6110A),荧光定量试剂(Invitrogen)。

**1.2 仪器** 3110 型水套系列二氧化碳培养箱(美国 Thermo 公司),Heraguard ECO 型超净工作台(美国 Thermo 公司),680 型全自动酶标仪(美国 Bio-Rad 公司),DU800 型紫外-可见分光光度计(美国 Beckman 公司),9700 型 PCR 仪(美国 ABI 公司),7700 型 Real Time PCR System (美国 ABI 公司),JEOL1230 型透射电镜(日本 JEOL 公司)。

**1.3 细胞** PC12 细胞(高分化)具有神经内分泌细胞特性,为大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤的细胞株,购自中国科学院上海细胞生物学研究所细胞库。细胞培养液含 10% 灭活胎牛血清 1% 双抗的 DMEM 高糖培养液,培养条件  $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$ ,隔天换液,2~3 d 传代。

## 2 方法

**2.1  $A\beta_{25-35}$  诱导 PC12 细胞损伤建立 AD 模型** 培养 PC12 细胞至对数生长期,接种于 96 孔板,每孔

$5 \times 10^3$  个细胞,培养细胞贴壁后,加入终浓度 0,10,20,30,40  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $A\beta_{25-35}$ ,继续培养 24 h 后 CCK-8 试剂盒检测细胞活性。

**2.2 AD 模型细胞活性的测定** 对数生长期的 PC12 细胞  $5 \times 10^4/\text{mL}$  接种于 96 孔板,每孔 100  $\mu\text{L}$ ,培养至贴壁,设对照组,模型组,实验组(20,40,80  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  VTP),各组均为 5 复孔,实验组加入 VTP 预处理 4 h 后,除对照组外均加入  $A\beta_{25-35}$ ,使之终浓度为 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,继续培养 24 h,CCK-8 试剂盒检测 PC12 细胞活性。

**2.3 细胞电镜标本制备** 对数生长期 PC12 细胞  $5 \times 10^4/\text{mL}$  接种到 6 孔板,每孔 1 mL,按上述方法分组处理细胞后,收集细胞 PBS 洗 2 次,加入血清离心,戊二醛前固定,制备电镜标本,超薄切片机切片,电子染色,透射电镜观察、摄片,观察  $A\beta_{25-35}$  对细胞超微结构的影响,以及药物对细胞损伤的保护作用。

**2.4 SOD,MDA 的测定** 细胞接种于 48 孔板, $1 \times 10^4$  个/孔,细胞培养至贴壁后,分组进行处理( $n = 5$ ),收集细胞上清液,按照试剂盒说明紫外分光光度计检测 SOD,MDA。

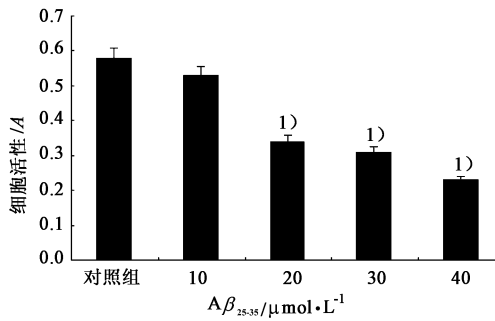
**2.5 AD 细胞模型 APP mRNA 表达的测定** 对数生长期细胞接种到 6 孔板,每孔细胞数  $5 \times 10^4$  个,按照实验分组处理细胞( $n = 5$ ),胰酶消化收集细胞,Trizol 法提取总 RNA,紫外分光光度计检测 RNA 浓度和纯度。逆转录合成 cDNA,加入荧光定量 PCR 反应体系,反应条件  $94^\circ\text{C}$  5 min, $94^\circ\text{C}$  30 s, $57 \sim 52^\circ\text{C}$  30 s, $72^\circ\text{C}$  30 s, $72^\circ\text{C}$  10 min,35 个循环。通过 GenBank,应用软件 Primer 5.0 设计引物序列,由鼎国昌盛生物技术有限责任公司合成。 $\beta$ -actin 及 APP 引物序列分别为 5'-AGACCTTCAACACCCCAGCC-3', 5'-CGTCAGGCAGCTCATAGCTC-3', 5'-TTGAAGCCATGCTCAATGAC-3', 5'-GTTCATGCCCTCGTAGATCA-3',扩增的目的基因片段分别为 362,245 bp。采用双标准曲线法,计算待测组目的基因相对于对照组的表达差异倍数。

**2.6 数据处理** 试验数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS 18.0 软件进行统计处理,组间比较用  $t$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1  $A\beta_{25-35}$  对 PC12 细胞活性的影响** 与对照组细胞比较, $A\beta_{25-35}$  与 PC12 细胞作用 24 h 后,随着  $A\beta_{25-35}$  浓度的增加细胞活性逐渐降低,20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  以上浓度  $A\beta_{25-35}$  均对细胞造成损伤( $P < 0.01$ ),见

图 1. AD 细胞模型建立条件为  $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{A}\beta_{25-35}$  作用 PC12 细胞 24 h。



与对照组相比<sup>1)</sup>  $P < 0.01$

图 1 不同浓度  $\text{A}\beta_{25-35}$  对 PC12 细胞活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 1 Effects of different concentrations  $\text{A}\beta_{25-35}$  on cell viability in PC12 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

**3.2 VTP 对 PC12 细胞活性的影响** 与对照组比较,模型组细胞生长受到抑制,细胞活性下降 ( $P < 0.01$ );与模型组相比,VTP 各组细胞活性有明显增加 ( $P < 0.05$ ),表现剂量相关性。见表 1。

表 1 VTP 对  $\text{A}\beta_{25-35}$  诱导的 PC12 细胞活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 1 Effects of VTP on cell viability in PC12 cells induced by  $\text{A}\beta_{25-35}$  ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

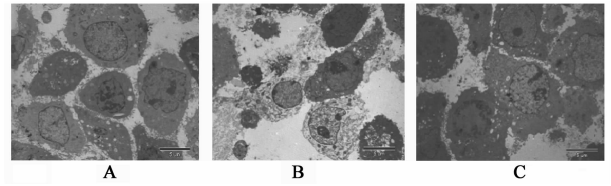
组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞活性/A	细胞存活率/%
对照	-	$0.610 \pm 0.017$	100.00
模型	-	$0.415 \pm 0.017^{1)}$	68.03
VTP	20	$0.483 \pm 0.029^{2)}$	79.18
	40	$0.521 \pm 0.087^{2)}$	85.41
	80	$0.555 \pm 0.032^{3)}$	90.98

注:与对照组相比<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组相比<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

**3.3 VTP 对 PC12 细胞超微结构的影响** 对照组 PC12 细胞结构正常,模型组和对照组比较,细胞明显损伤,细胞形态不规则,细胞皱缩,胞质内细胞器肿胀,有空泡形成,核内异染色质增多,凝聚成块状,细胞核固缩,核仁消失,呈现细胞凋亡初期形态改变;VTP 组和模型组比较,损伤细胞明显减少,细胞形态趋于正常。见图 2。

**3.4 VTP 对 PC12 细胞 SOD,MDA 的影响** 模型组与对照组比较,细胞的 SOD 活力降低,MDA 含量明显增加 ( $P < 0.01$ );VTP 各剂量组与模型组相比,细胞 SOD 活力增加,MDA 含量明显降低 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

**3.5 VTP 对 PC12 细胞 APP mRNA 表达的影响** Real-time PCR 结果显示,与正常对照组相比,模型



A. 对照组;B. 模型组;C. VTP  $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组

图 2 VTP 对  $\text{A}\beta_{25-35}$  所致 PC12 细胞损伤超微结构的影响 (透射电镜,  $\times 4000$ )

Fig. 2 Effects of VTP on cellular ultrastructure in PC12 cells induced by  $\text{A}\beta_{25-35}$  (transmission electron microscopy,  $\times 4000$ )

表 2 VTP 对  $\text{A}\beta_{25-35}$  诱导的 PC12 细胞 SOD 活性,MDA 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 2 Effects of VTP on SOD activity and MDA content in PC12 cells induced by  $\text{A}\beta_{25-35}$  ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	SOD/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	MDA/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
对照	-	$29.24 \pm 2.03$	$10.18 \pm 0.58$
模型	-	$15.67 \pm 2.13^{1)}$	$17.92 \pm 1.62^{1)}$
VTP	20	$19.90 \pm 2.08^{2)}$	$15.14 \pm 0.28^{2)}$
	40	$24.17 \pm 2.44^{3)}$	$13.11 \pm 1.08^{3)}$
	80	$27.76 \pm 2.10^{3)}$	$9.06 \pm 1.68^{3)}$

组 APP mRNA 表达下降 ( $P < 0.01$ );与模型组相比,VTP 各剂量组 APP mRNA 表达升高,差异显著 ( $P < 0.05$ ),见表 3。

表 3 VTP 对  $\text{A}\beta_{25-35}$  诱导 PC12 细胞 APP mRNA 相对表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 3 Effects of VTP on APP mRNA expression in PC12 cells induced by  $\text{A}\beta_{25-35}$  ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	APP mRNA 相对表达/倍
对照	-	$1.00 \pm 0.00$
模型	-	$5.46 \pm 0.81^{1)}$
VTP	20	$2.63 \pm 0.17^{3)}$
	40	$0.88 \pm 0.14^{3)}$
	80	$0.79 \pm 0.26^{3)}$

## 4 讨论

AD 的特征性的病理改变为:神经细胞外以  $\text{A}\beta$  为主要成分的老斑 (senile plaque, SP),神经细胞内主要成分为 tau 蛋白的神经元纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NET)。目前,在 AD 发病机制的众多假说中,最受关注的“ $\text{A}\beta$  级联假说”认为 AD 是一种神经变性过程, $\text{A}\beta$  的沉积和聚集在 AD 发病过程中是关键因素<sup>[4]</sup>。 $\text{A}\beta$  所引起的氧化应激、细胞凋亡以及突触障碍、轴突生长异常等神经病

理学变化,最终导致了AD。在AD发病机制及药物筛选研究中,常用 $A\beta$ 诱导建立体内体外模型<sup>[5-6]</sup>。本研究采用 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $A\beta_{25-35}$ 作用于PC12细胞24 h,构建AD细胞模型,实验结果显示,模型组细胞活性,SOD活性下降,MDA含量增高( $P < 0.01$ ),细胞超微结构明显损伤,表明此模型可以作为评价VTP保护作用的神经损伤体外模型。

AD发生的主要危险因素是年龄,随着机体的衰老,氧自由基生成增多,而抗氧化防御能力降低。脑部神经细胞是自由基最容易侵袭的靶点,膜上含有大量的不饱和脂肪酸,对脂质过氧化作用很敏感,相比其他部位更容易受到氧化应激的影响。AD的发病与氧化应激密切相关,中药有效成分可通过抗氧化作用治疗AD<sup>[7-8]</sup>。琐琐葡萄中含有含量较高的多糖,具有较强的抗氧化能力<sup>[9]</sup>。实验结果显示,模型组细胞活性及SOD活性下降,MDA含量增高( $P < 0.01$ ),细胞氧化损伤;VTP干预后细胞活性及SOD活性升高,MDA含量下降( $P < 0.01$ ),细胞形态趋向正常,缓解细胞的氧化应激损伤。

$A\beta$ 是由APP经分泌酶裂解产生,由于神经细胞膜的损伤,或APP基因的过度表达及代谢异常均可引起 $A\beta$ 的聚集<sup>[10]</sup>。APP转基因AD动物模型建立的基础,就是小鼠脑中过量表达APP, $A\beta$ 产生增多聚集形成老年斑,导致神经毒害作用,损伤学习记忆能力,从而造成小鼠AD转基因动物模型。在AD体外模型研究中也发现APP的过度表达,导致神经细胞死亡<sup>[11]</sup>。 $A\beta$ 可以在体内和体外诱导氧化应激。氧化应激促进 $A\beta$ 的生成和聚集, $A\beta$ 又反过来诱导氧化应激,从而进一步增加 $A\beta$ 的沉积,如此形成恶性循环,促进AD的发生<sup>[12]</sup>。氧化应激能通过多种途径诱导 $A\beta$ 生成,如激活细胞内腺苷酸环化酶,活化第二信使cAMP,促进APP的大量生成,APP经分泌酶加工后形成 $A\beta$ <sup>[13]</sup>。通过调节APP的表达和代谢从而减少产生 $A\beta$ ,减轻 $A\beta$ 的神经毒性,是防治AD的有效途径。本研究通过荧光定量PCR检测VTP对AD细胞模型APP基因表达的影响,结果显示:与对照组比较,模型组细胞APP mRNA表达上调,有显著性差异( $P < 0.01$ ),而VTP能下调细胞APP mRNA的表达。

综上所述,VTP对 $A\beta_{25-35}$ 诱导PC12细胞的AD模型具有神经保护作用,通过增强SOD活性、降低MDA含量,缓解细胞氧化损伤,抑制PC12细胞APP

mRNA的表达,减轻 $A\beta$ 毒性作用,保护神经元,这可能是VTP防治AD的作用机制之一。

#### [参考文献]

- [1] 袁芳,刘涛,马龙. 琐琐葡萄齐墩果酸对 $A\beta_{25-35}$ 诱导PC12细胞损伤的保护作用[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(17):4922-4924.
- [2] 刘涛,赵军,李海波,等. 琐琐葡萄多糖体外抗乙型肝炎病毒作用的实验研究[J]. 中国药理学通报, 2011, 27(1):147-148.
- [3] 马龙,洪玉,周晓辉,等. 葡萄皮提取物抗痴呆作用的实验研究[J]. 卫生研究, 2006, 35(3):300-303.
- [4] Reitz C. Alzheimer's disease and the amyloid cascade hypothesis: a critical review[J]. Int J Alzheimers Dis, 2012;369808. doi:10.1155/2012/369808.
- [5] 张英,雍慧媛,史小婷,等. 姜黄素对 $A\beta_{25-35}$ 致PC12细胞损伤的保护作用[J]. 中华医学杂志, 2013, 93(35):2826-2829.
- [6] He F, Cao Y P, Che F Y, et al. Inhibitory effects of edaravone in  $\beta$ -amyloid induced neurotoxicity in rats [J]. Biomed Res Int, 2014, 4:370368.
- [7] 夏星,钟振国,冯丹霞. 三七总皂苷保护PC12细胞对抗过氧化氢损伤的作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(4):216-219.
- [8] 陈晓宇,荣延平,焦杨,等. 玉郎伞多糖对 $\beta$ 淀粉样蛋白所致PC12细胞损伤的影响[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(4):776-778.
- [9] 刘涛,马龙,赵军,等. 琐琐葡萄多糖的提取及抗氧化能力研究[J]. 新疆医科大学学报, 2007, 30(11):1230-1232.
- [10] Zhang Y W, Thompson R, Zhang H, et al. APP processing in Alzheimer's disease[J]. Mol Brain, 2011, 4:3-4.
- [11] 廖冬燕,肖颖梅,屈泽强,等. 三七总皂苷在氧化应激的PC12细胞中抑制 $A\beta$ 蛋白生成的作用[J]. 中成药, 2014, 36(4):665-669.
- [12] Robinson R A, Cao Z, Williams C. Oxidative stress in CD90<sup>+</sup> T-cells of  $A\beta$ PP/PS-1 transgenic mice [J]. J Alzheimers Dis, 2013, 37(4):661-666.
- [13] Canepa E, Domenicotti C, Marengo B, et al. Cyclic adenosine monophosphate as an endogenous modulator of the amyloid- $\beta$  precursor protein metabolism[J]. Iubmb Life, 2013, 65(2):127-133.

[责任编辑 聂淑琴]