

# 金丝桃苷对 $A\beta_{1-42}$ 介导的血脑屏障体外模型损伤的影响

刘晨阳, 白宽, 于顾然\*

(南京中医药大学附属医院, 南京 210029)

**[摘要]** **目的:**探讨金丝桃苷(hyperoside, Hyp)对淀粉样蛋白( $A\beta_{1-42}$ )介导的血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)体外模型损伤的影响。**方法:**本研究以Hyp干预纤维状 $A\beta_{1-42}$ 介导的bEnd. 3细胞与原代星形胶质细胞(astrocytes, As)BBB体外共培养模型的损伤,通过检测各培养组荧光素钠的通透性,比较各组BBB渗透性的变化,评价Hyp对 $A\beta_{1-42}$ 介导的BBB的通透性的影响;采用噻唑蓝(MTT)比色法检测Hyp对 $A\beta_{1-42}$ 介导的bEnd. 3细胞损伤的细胞活力影响;再以蛋白免疫印迹法(Western blot)检测相关凋亡蛋白,初步探索其保护机制。**结果:**与模型组比较,Hyp低、中、高浓度组均能降低BBB的通透性( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );Hyp中、高浓度组能显著提高bEnd. 3细胞活性( $P < 0.05$ );Western blot结果显示,经Hyp预处理的组别中,Bax/Bcl-2,cleaved 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)/Caspase-3的及细胞色素-C(Cyt-C)的表达量均明显下降,且差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论:**Hyp通过保护脑微血管内皮细胞抑制纤维状 $A\beta_{1-42}$ 诱导的BBB通透性增加。

**[关键词]** 金丝桃苷;纤维状 $A\beta_{1-42}$ ;血脑屏障;通透性;凋亡

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)17-0138-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017170138

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170609.1534.024.html>

**[网络出版时间]** 2017-06-09 15:34

## Effect of Hyperoside on Damaged Blood-brain Barrier Induced by $A\beta_{1-42}$ in Vitro Model

LIU Chen-yang, BAI Kuan, YU Gu-ran\*

(The Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effect of hyperoside (Hyp) on the damaged blood-brain barrier (BBB) induced by amyloid-beta protein ( $A\beta_{1-42}$ ) *in vitro* model. **Method:** In this experiment, Hyp intervention was used for the injury of fibrous  $A\beta_{1-42}$ -mediated bEnd. 3 cells and primary astrocytes (astrocytes, As) BBB co-culture models. By detecting the permeability of sodium fluorescein in various culture groups, BBB permeability changes were compared between various groups to evaluate the effect of Hyp on permeability of  $A\beta_{1-42}$ -mediated BBB; methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) was used to detect cells vitality and uncover the effect of Hyp on it; then in order to explore its protection mechanism, the apoptosis related proteins were detected by Western blot. **Result:** As compared with the model group, BBB permeability was reduced in Hyp low, middle and high dose groups ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); bEnd. 3 cells activity was improved in Hyp middle and high dose groups ( $P < 0.05$ ); Western blot results showed that the ratio of Bax/Bcl-2, cleaved cysteine aspartic acid protease-3 (Caspase-3)/Caspase-3 and the expression levels of cytochrome-C (Cyt-C) were declined obviously in the Hyp groups, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Hyp could inhibit the fibrous  $A\beta_{1-42}$ -induced permeability

**[收稿日期]** 20170315(012)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81573771);江苏省自然科学基金项目(BK20151599)

**[第一作者]** 刘晨阳, 硕士, 从事阿尔茨海默病中药干预的研究, Tel: 13912961366, E-mail: 1563391181@qq.com

**[通讯作者]** \* 于顾然, 教授, 主任中医师, 博士生导师, 从事阿尔茨海默病中药干预的研究, Tel: 025-86663507, E-mail: dr\_ygrdf@163.com

increase of BBB via protecting cerebral microvascular endothelial cells. .

[ **Key words** ] hyperoside (Hyp); fibrous  $A\beta_{1-42}$ ; blood-brain barrier (BBB); permeability; apoptosis

阿尔兹海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种中枢神经系统退行性疾病, 临床表现为认知和记忆功能慢性进行性恶化, 是发病率最高的一种类型, 在年龄 65 岁及以上的人口总数中 AD 患者已达 6%<sup>[1]</sup>。现有研究认为, 淀粉样蛋白 (amyloid-beta protein,  $A\beta$ ) 在脑内过度沉积是 AD 最显著的病理学特征之一,  $A\beta$  产生的神经毒性致使中枢神经系统的胆碱能神经元的大量死亡、丢失是 AD 最关键的致病因素<sup>[2-3]</sup>。而经  $\beta$ -分泌酶与  $\gamma$ -分泌酶切割后产生的  $A\beta$  片段中引起慢性神经毒性的最主要成分是聚集状态的  $A\beta_{1-42}$ <sup>[4]</sup>。血脑屏障 (BBB) 是大脑与外周循环系统的一道重要生理性的屏障, 可以阻止外周有害物质进入脑内。研究表明,  $A\beta$  的慢性毒性作用也介导了 BBB 结构破坏与通透性增加<sup>[5]</sup>。而 BBB 通透性的增加又会促进外周  $A\beta$  穿过 BBB 进入脑内<sup>[6]</sup>。造成 AD 病程的进一步进展, 形成恶性循环。可见, 预防和治疗 AD 的关键是要保护 BBB 的结构及功能的完整性。研究证实, bEnd. 3 细胞与大鼠原代星形胶质细胞 (As) 体外非接触共培养 BBB 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, 可用于进行药物早期筛选方面的研究<sup>[7-8]</sup>。故本实验采用  $A\beta_{1-42}$  介导的 bEnd. 3 细胞与原代 As 非接触式共培养模型损伤来模拟 AD 患者体内受损的 BBB。

江苏省中医院于顾然教授在临床上运用补肾益精方治疗 AD 已取得良好临床疗效, 笔者前期的研究也发现该方的含药血清对神经元细胞及 BBB 均有保护作用<sup>[9-10]</sup>。运用噻唑蓝 (MTT) 比色法, 首先对该方中的单味中药水煎剂进行筛选, 发现补肾益精方君药菟丝子水煎剂可明显抑制  $A\beta_{1-42}$  诱导的 bEnd. 3 细胞的活性损伤。金丝桃苷 (Hyp) 是从菟丝子中提取的最主要的具有生物活性作用的黄酮醇苷类化合物。近年来中外很多文献研究表明 Hyp 具有广泛的药理作用, 包括抗炎镇痛<sup>[11-12]</sup>, 抗凋亡<sup>[13-15]</sup>, 抗肿瘤<sup>[16]</sup>, 抗血栓<sup>[17]</sup>, 抗氧化应激损伤<sup>[18]</sup>, 抗急性肝损伤<sup>[19]</sup> 及抗抑郁<sup>[20]</sup> 等作用。另有研究显示, Hyp 对  $A\beta$  介导的神经元损伤具有保护作用<sup>[21]</sup>, 然而关于 Hyp 对  $A\beta$  介导的 BBB 损伤的影响尚未见报道。本研究致力于筛选与研究对 BBB 具有保护作用的中药单体, 进一步阐明中医药有效预防和治疗 AD 的具体机制。因此, 笔者用  $A\beta_{1-42}$  干

预 bEnd. 3 细胞和 As 体外共培养模型, 模拟 AD 患者 BBB 的损伤, 以探讨 Hyp 对该模型的影响及机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 1 d 的雌性 Wistar 乳鼠, 南京凯基生物科技发展有限公司提供, 合格证号 SCXK (沪) 2013-006, 动物实验符合南京中医药大学动物伦理委员会标准, 标准号 BSK-046-00。

**1.2 药物与试剂** DMEM 高糖培养液及胎牛血清 (美国 Gibco 公司, 批号分别为 11995-065, 10099-141); ECGS 细胞生长因子 (美国 Sciencell 公司, 批号 1052); 0.25% 胰酶细胞消化液 (碧云天生物科技发展有限公司, 批号 C0201); MTT, 荧光素钠 (美国 Sigma 公司, 批号分别为 M2128, F6377); GFAP (武汉博士德公司, 批号 PB0046); B 细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2) 相关 X 蛋白 (Bax), Bcl-2, 细胞色素-C (Cyt-C), 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3) 以及  $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) 抗体 [CST (Cell Signaling Technology) 公司, 批号分别为 2772S, 2876S, 4272S, 9665S, 4970S]; 二抗均为兔抗 (福麦斯生物科技有限公司, 批号 2635054); ECL 化学发光液 (美国 Millipore 公司, 批号 WBKLS0500)。  $A\beta_{1-42}$  (上海强耀生物技术有限公司, 相对分子质量 4 418.05, 纯度为 95.08%, 批号 1932215),  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。用时先在灭菌后的生物安全柜中加入无菌磷酸盐缓冲液 (PBS) 100  $\mu\text{L}$ , 置于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育 5 d 使其成为纤维状, 取出后于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存待用。金丝桃苷 (成都曼思特生物科技有限公司, 分子式  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$ , 相对分子质量 464.38, 纯度  $\geq 98\%$ , 批号 A0215), 以 PBS 稀释成  $0.8\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的溶液, 等量分装,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存待用。

**1.3 仪器** AC2-4S1 型生物安全柜 (新加坡 Esco 公司), C150 型  $\text{CO}_2$  培养箱 (德国 Binder 公司), 3K44410 型三目倒置显微镜 (日本 Olympus 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 型免疫印迹法 (Western blot) 电泳仪转膜仪及 CHEMZDOCX RS + 型 Image Lab 凝胶成像系统 (上海 Bio-Rad 公司)。

**1.4 细胞及细胞培养** 小鼠脑微血管内皮细胞 bEnd. 3 细胞株源购自美国 ATCC 公司。bEnd. 3 细胞用内含 10% 胎牛血清、三抗 (青霉素  $100\text{ U}\cdot$

$\text{mL}^{-1}$ , 链霉素  $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  及两性霉素  $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 美国 Gibco 公司) 的完全培养基置于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$   $5\% \text{ CO}_2$  环境中培养, 2 d 换 1 次液, 待细胞长至 90% 时进行传代, 并选取对数生长期细胞进行实验。

## 2 方法

**2.1 MTT 比色法检测细胞活力** 选取对数生长期的 bEnd. 3 细胞, 胰酶消化后均匀接种于 96 孔板内, 培养液  $200 \text{ } \mu\text{L}$ /孔, 接种密度为  $1 \times 10^4$  个/孔, 待细胞长至铺满孔底 80% 时进行实验。本实验共设置 5 组: 空白组, 模型组 ( $A\beta 30 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), Hyp 低、中、高浓度组 ( $50, 200, 500 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。先以各浓度 Hyp 预处理细胞 2 h 后加入纤维状终浓度为  $30 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $A\beta$  继续损伤 24 h 后用酶标仪进行指标检测。

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

**2.2 As 的分离培养** 无菌条件下取出 Wistar 乳鼠大脑, 分离大脑皮质并去掉大血管组织。先将皮质机械性剪碎, 再用 0.125% 胰蛋白酶于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  培养箱中消化 10 min (每隔 3 min 轻轻摇晃, 以充分消化)。将消化后的乳糜液用 200 目筛网过滤。滤液以  $1\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 离心 3 min。管底沉淀用完全培养液悬浮后, 均匀接种于多聚赖氨酸包被的培养瓶中, 置于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$   $5\% \text{ CO}_2$  环境中培养。

**2.3 As 的鉴定** 从 24 孔板中取出长满 As 的盖玻片, 并用 4% 的多聚甲醛固定 30 min, PBS 浸洗 3 min  $\times 3$ ; 每张玻片滴加 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ -甲醇溶液 2 滴, 室温条件下封闭 10 min, 之后 PBS 浸洗 3 次; 滴加山羊血清  $50 \text{ } \mu\text{L}$ , 室温封闭 30 min; 滴加一抗 GFAP (1:100 稀释)  $50 \text{ } \mu\text{L}$ , 室温湿盒孵育 2 h, 之后 PBS 浸洗 3 次; 滴加二抗 FITC (1:200 稀释)  $50 \text{ } \mu\text{L}$ , 室温避光孵育 1 h, 之后 PBS 浸洗 3 次; 每张玻片滴加 DAPI 染液  $50 \text{ } \mu\text{L}$ , 室温避光放置 5 min。用防萃灭封片胶进行封片; 荧光显微镜下观察细胞中蛋白的表达情况。

**2.4 体外 BBB 模型的建立** 采用 Corning 公司的 transwell 3413 细胞培养池 (孔径  $0.4 \text{ } \mu\text{m}$ ) 作为共培养的支持物建立 bEnd. 3 细胞和 As 非接触式共培养模型。首先将 bEnd. 3 细胞接种于细胞培养池的上室, 并将其置于底部含有 As 的 24 孔板内, 培养 1 周后, 开始测定其电阻。

**2.5 跨内皮细胞电阻的测定** 通过测定模型中跨 bEnd. 3 细胞的电阻值评价体外 BBB 模型中细胞旁转运程度。用 Millicell ERS 测定的共培养模型的跨内皮细胞电阻值 (transendothelial electric resistance, TEER) 为内皮细胞 (TEERec) 与滤过层 (filter) 之

和, 以无细胞的培养池测得的电阻值 TEERf 为对照, 作为滤过层的电阻值, 则单层 bEnd. 3 的电阻值为  $\text{TEERec} = (\text{TEER} - \text{TEERf}) \times S$  (膜面积), 单位为  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ 。

**2.6 BBB 体外模型实验分组** 本实验共分 5 组: 空白组 (无细胞), 模型组 ( $A\beta 30 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), Hyp 低、中、高浓度组 ( $50, 200, 500 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。

**2.7 荧光素钠 (sodium-fluorescein, Na-F) 通透性的测定** 绘制 Na-F 标准曲线, 通过荧光酶标仪测定 Na-F  $0.004, 0.02, 0.1, 0.5, 1, 5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的荧光强度, 并绘制出荧光素钠标准曲线; 测定并计算 Na-F 体外透过单层细胞的量, 首先在上室中分别加入终浓度为  $50, 200, 500 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 Hyp 孵育 4 h, 再加入终浓度为  $30 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $A\beta$  进行造模 2 h, 然后吸出受池与供池中的培养液, 在供池中加入含 Na-F 终质量浓度为  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 hanks 液  $1 \text{ mL}$ , 孵育 1 h 后从接受池中取  $100 \text{ } \mu\text{L}$  溶液, 测定荧光强度; 通过 Na-F 标准曲线, 计算 Na-F 透过共培养模型及无细胞空白组的量; 计算清除体积: 清除体积 ( $\mu\text{L}$ ) =  $(C_A \times V_A) / C_S$ ,  $C_A$  为接受池浓度,  $V_A$  为接受池体积,  $C_S$  为供给池初浓度; 再以清除体积除以时间来表示清除率 ( $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ ), 并以此值表示相应的通透性 ( $P$ )  $\times$  表面积 ( $S$ ); Na-F 体外透过 bEnd. 3 单层细胞的通透性 ( $PeS$ )  $\times$  表面积 ( $S$ ) 可由以下公式计算得到:  $1/PeS = 1/PS_t - 1/PS_f$ , 其中  $PS_t$  表示总的 BBB 的通透性  $\times$  表面积,  $PS_f$  表无细胞培养池对照组的通透性  $\times$  表面积,  $S$  为细胞培养池的膜面积 ( $0.33 \text{ cm}^2$ )。

**2.8 细胞总蛋白提取及 Western blot 法分析蛋白表达量** 选取处于对数生长期的 bEnd. 3 细胞, 以  $1 \times 10^5$  个/mL 的密度均匀接种于细胞培养皿中, 待细胞长至 80% 时, 按照 2.1 项方法进行分组及处理。培养 24 h 后, 取出培养皿, 用预冷的  $1 \times \text{PBS}$  洗 3 次, 加入  $100 \text{ } \mu\text{L}$  配制好的蛋白裂解液 (RIPA 原液-蛋白酶抑制剂-磷酸酶抑制剂-PMSF 1 000:1:10:10), 冰上反复吹打 5 min, 收集蛋白裂解液, 超声裂解 15 s, 于  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min, 取上清液并加入  $5 \times \text{SDS}$  上样量缓冲液, 开水煮 10 min, 电泳并转膜。5% BSA 室温摇床上封闭 1h 后, 在一抗 (1:1 000) 中  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育过夜, TBST 洗 3 次, 室温条件下于摇床上孵育二抗 (1:5 000) 1 h, TBST 洗 3 次, 采用 ECL 化学发光法, 曝光显影。

**2.9 统计学处理** 实验结果均采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 运用 SPSS 22.0 软件对数据进行分析, 实验资料经检

验均服从正态分布,且上述实验过程均重复 3 次以上。2 个独立样本之间的均数比较采用 *t* 检验,多个样本间的均数比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),并以  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 血脑屏障体外模型模式与原代提取的 As 免疫荧光染色鉴定结果** 本研究采用 bEnd.3 细胞与 As 非接触式共培养 BBB 体外模型来模拟体内 BBB 的生理性屏障特性,其模式见图 1。bEnd.3 细胞接种于上室(供池),As 接种于下室(受池)。为了鉴定原代提取的 As 纯度,笔者利用免疫荧光法观察细胞被特异性 GFAP 标记的荧光强度,其结果见图 2,GFAP 是 As 胞质中特有的胶质原纤维酸性蛋白,以 GFAP 标记 As 的细胞质呈现绿色荧光(A),以 DAPI 标记 As 的细胞核呈现蓝色(B), (C) 为 GFAP 与 DAPI 双重标记合成图。结果显示,原代提取的细胞中 As 纯度达 90% 以上。

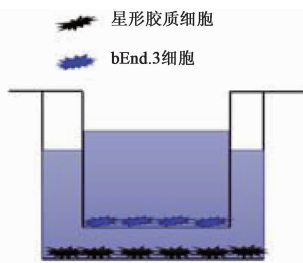


图 1 体外血脑屏障共培养

Fig.1 Schema diagram of BBB co-culture model *in vitro*

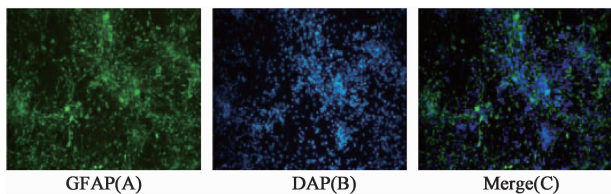


图 2 脑星形胶质细胞鉴定(免疫组化,  $\times 200$ )

Fig.2 Immunohistochemical identification of astrocytes (IAC,  $\times 200$ )

**3.2 体外血脑屏障模型成功建立的评价标准-跨内皮细胞电阻值** 跨细胞单层电阻值在  $300 \Omega \cdot \text{cm}^2$  以上时,能够更好的模拟体内 BBB 的屏障作用<sup>[8]</sup>。本实验跨 bEnd.3 细胞的电阻值为  $(306.57 \pm 14.19) \Omega \cdot \text{cm}^2$ ,符合体外 BBB 模型的要求。

**3.3 Hyp 对  $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} A\beta_{1-42}$  所致的体外 BBB 模型损伤的影响** 与阴性组比较,经  $A\beta_{1-42} 30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  损伤的模型组的通透性明显增加 ( $P < 0.01$ ); 而经 Hyp 预处理的低、中、高浓度组与模型组比较通透性均明显降低,且与浓度呈正相关,差异具有统计学意

义 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。结果表明, Hyp 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。见表 1。

表 1 Hyp 对  $A\beta_{1-42}$  介导的 BBB 损伤及 bEnd.3 细胞活力损伤的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

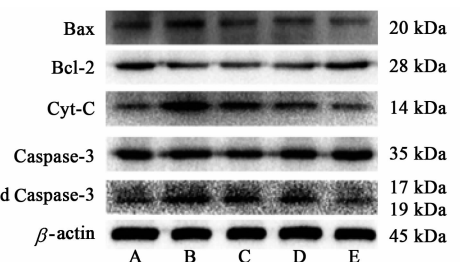
Table 1 Effect of Hyp on BBB damages and bEnd.3 cells activity damages induced by  $A\beta_{1-42}$  ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	通透性(Pe)	细胞活力/%
空白	-	1.2 $\pm$ 0.04	100 $\pm$ 0.015
模型( $A\beta_{1-42}$ )	30	5.01 $\pm$ 0.23 <sup>1)</sup>	57.1 $\pm$ 0.003 <sup>1)</sup>
Hyp	50	3.4 $\pm$ 0.78 <sup>2)</sup>	62.6 $\pm$ 0.007
	200	2.58 $\pm$ 0.07 <sup>3)</sup>	69.1 $\pm$ 0.022 <sup>2)</sup>
	500	1.77 $\pm$ 0 <sup>3)</sup>	88.7 $\pm$ 0.018 <sup>3)</sup>

注:与阴性组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ (表 2 同)。

**3.4 Hyp 对  $A\beta_{1-42}$  介导的 bEnd.3 细胞活力损伤的影响** 与空白组比较,经  $A\beta_{1-42} 30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  损伤的模型组的 bEnd.3 细胞活力明显下降 ( $P < 0.01$ ); 而经 Hyp 预处理的低、中、高浓度组与模型组比较细胞活力均明显增加,且与 Hyp 浓度成正相关。其中中、高剂量组的差异具有统计学意义 ( $P < 0.05, P < 0.001$ )。以上结果说明 Hyp 能够对抗  $A\beta_{1-42}$  的慢性毒性作用,显著提高 bEnd.3 细胞的活力而保证 BBB 的结构完整性。见表 1。

**3.5 Hyp 通过调节相关凋亡蛋白的表达以抑制  $A\beta_{1-42}$  介导 bEnd.3 细胞的凋亡** bEnd.3 细胞经纤维状  $A\beta_{1-42}$  处理 24 h 后,与空白组比较,模型组促凋亡蛋白 Bax, Cyt-C 及 Caspase-3 的表达及活化均明显增加,同时抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达量减少。与模型组比较,经 Hyp 预处理的组别中, Bax/Bcl-2, cleaved Caspase-3/Caspase-3 及 Cyt-C 的表达量明显下降,且与 Hyp 作用浓度成负相关。与模型组比较 Hyp 低、中、高浓度组差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 3,表 2。



A. 空白组; B. 模型( $A\beta_{1-42}$ )组; C - E. Hyp 50, 200, 500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度组

图 3 Hyp 对  $A\beta_{1-42}$  介导 bEnd.3 细胞凋亡蛋白表达的影响

Fig.3 Effect of Hyp on expression of apoptosis proteins induced by  $A\beta_{1-42}$  in bEnd.3 cells

表 2 Hyp 对 Aβ<sub>1-42</sub> 介导 bEnd.3 细胞凋亡蛋白相关水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effect of Hyp on relative levels of apoptosis proteins induced by Aβ<sub>1-42</sub> in bEnd.3 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Bax/Bcl-2	Cyt-C/ $\beta$ -actin	cleaved Caspase-3/Caspase-3
空白	-	100 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0.0
模型 (Aβ <sub>1-42</sub> )	30	304.8 $\pm$ 22.1 <sup>1)</sup>	459.5 $\pm$ 25.2 <sup>1)</sup>	155.0 $\pm$ 3.8 <sup>1)</sup>
Hyp	50	180.8 $\pm$ 16.0 <sup>2)</sup>	392.6 $\pm$ 26.6	135.0 $\pm$ 1.7 <sup>2)</sup>
	200	118.1 $\pm$ 1.7 <sup>2)</sup>	240.1 $\pm$ 9.7 <sup>2)</sup>	100.5 $\pm$ 4.6 <sup>3)</sup>
	500	89.8 $\pm$ 1.2 <sup>3)</sup>	169.5 $\pm$ 3.3 <sup>3)</sup>	67.2 $\pm$ 1.7 <sup>3)</sup>

#### 4 讨论

脑内 Aβ 的过度沉积及其慢性毒性作用导致 BBB 损伤及神经元的丢失是 AD 患者记忆与认知功能的缺失主要病理因素<sup>[22-23]</sup>。当 Aβ 的神经毒性作用致使 BBB 的通透性增加时,外周的 Aβ 更易穿过 BBB 进入脑内,进一步促进脑内 Aβ 的过度沉积,由此造成 AD 病程进展的恶性循环<sup>[5]</sup>。所以保护 BBB 的结构及功能的完整性是预防和治疗 AD 的关键。

笔者前期研究发现,补肾益精方含药血清对 Aβ<sub>1-42</sub> 介导的神经元及 BBB 的损伤有显著的保护作用<sup>[9-10]</sup>。为了进一步明确该方中具体哪味中药的化合物单体保护作用最为显著,以便更好地服务于临床,笔者运用 MTT 法初步对该方中所含的中药单体进行系统的筛选研究发现,Hyp 作为补肾益精方中君药菟丝子的主要有效成分,对 Aβ<sub>1-42</sub> 诱导的 bEnd.3 细胞的损伤具有显著的神经保护作用,为了进一步研究 Hyp 的各浓度梯度的神经保护作用的强弱,笔者根据前期已有的 MTT 筛选结果,最终确定以终浓度分别为 50, 200, 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 Hyp 作为实验浓度。在此基础上,本研究探索了 Hyp 对 Aβ<sub>1-42</sub> 介导的 BBB 体外模型损伤的影响,结果显示 Hyp 低、中、高浓度组对 Aβ<sub>1-42</sub> 引起的 BBB 破坏具有保护作用,均能够明显降低 BBB 的通透性。

Aβ 沉积的慢性毒性作用,可引起氧化应激及炎症损伤等,诱导脑微血管内皮细胞、神经元细胞的凋亡及突触丢失,最终导致认知和记忆能力下降<sup>[24]</sup>。Aβ 引起的氧化应激作用可以诱导线粒体膜电位下降及其膜的通透性增加,并促进 Bax 蛋白表达,导致线粒体内部的 Cyt-C 的释放,及 Caspase-3 的活化<sup>[23]</sup>。而 Caspase-3 是细胞多种凋亡途径级联反应中最关键的执行蛋白酶,它的活化可以切割底物致使细胞凋亡<sup>[25-26]</sup>。现有研究认为,Bcl-2 位于线粒体膜外,可通过减小线粒体膜的通透性,进而抑制 Cyt-C 的释放;此外,Bax 通过与 Bcl-2 结合,增加线粒体膜的通透性,而促进 Cyt-C 的释放<sup>[27]</sup>。而脑微血管

内皮细胞是 BBB 结构和功能的主要承担着,内皮细胞的损伤是造成血脑屏障通透性增加的关键因素,可见保护血脑屏障的关键是要提高脑微血管内皮细胞的活性。本研究利用 MTT 实验发现,Hyp 低、中、高浓度组对 Aβ<sub>1-42</sub> 引起的 bEnd.3 细胞的损伤具有保护作用,其中中、高浓度组能够明显的提高细胞活力。Western blot 实验结果显示,Hyp 能够明显减低 Bax/Bcl-2, cleaved Caspase-3/Caspase-3 及 Cyt-C 的表达量。笔者由此推测,Hyp 对 Aβ<sub>1-42</sub> 引起的 BBB 破坏具有的保护作用可能是通过保护内皮细胞的活性而实现的。

综上,Hyp 不仅能够有效抑制 Aβ<sub>1-42</sub> 诱导的 BBB 的损伤,还可以通过抑制 bEnd.3 细胞凋亡而保护 BBB 的结构完整性。该研究为 Hyp 能够成为一个有效的预防和治疗 AD 的潜在的药物提供了初步的实验依据,接下来笔者将更进一步探索其保护 BBB 的具体的分子生物学机制,为探索治疗 AD 的新剂型提供参考。

#### [参考文献]

[1] SHEN L, LIAO L, CHEN C, et al. Proteomics analysis of blood serums from Alzheimer's disease patients using iTRAQ labeling technology [J]. J Alzheimers Dis, 2017, 56(1): 361-378.

[2] Zlokovic B V. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders [J]. Nat Rev Neurosci, 2011, 12(12): 723-738.

[3] Hosoda T, Nakajima H, Honjo H. Estrogen protects neuronal cells from amyloid beta-induced apoptotic cell death [J]. Neuroreport, 2001, 12(9): 1965-1970.

[4] 陆蔚天, 孙善全, 黄娟, 等. Aβ<sub>25-35</sub> 诱导 PC12 细胞内 Ca<sup>2+</sup> 浓度升高和自噬发生 [J]. 第三军医大学学报, 2014, 4(36): 355-359.

[5] Dickstein D L, Biron K E, Ujiie M, et al. Abeta peptide immunization restores blood-brain barrier integrity in Alzheimer disease [J]. Faseb J, 2006, 20(3): 426-433.

- [ 6 ] Clifford P M, Zarrabi S, SI U G, et al. Abeta peptides can enter the brain through a defective blood-brain barrier and bind selectively to neurons [J]. Brain Res, 2007, 1142(1): 223-236.
- [ 7 ] 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.
- [ 8 ] 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]. J Pharm Nanotechnol, 2012, 101(7): 2468-2478.
- [ 9 ] 史国娟, 贺燕勤, 于顾然. 补肾益精方含药血清对D-半乳糖致原代培养神经元损伤的研究[J]. 江苏中医, 2015, 47(2): 80-82.
- [ 10 ] 王丹丹, 史国娟, 于顾然. 补肾益精方含药血清对 $\beta$ -淀粉样蛋白干预血脑屏障体外模型渗透性的影响[J]. 江苏中医, 2015, 47(10): 72-74.
- [ 11 ] Ku S K, ZHOU W, Lee W, et al. Anti-inflammatory effects of hyperoside in human endothelial cells and in mice [J]. Inflammation, 2015, 2(38): 784-799.
- [ 12 ] 史宁, 郭宏举, 王欢, 等. 金丝桃苷对急性炎症疼痛模型小鼠的抗炎镇痛作用研究 [J]. 药物评价研究, 2016, 5(39): 768-771.
- [ 13 ] XING H, LIU Y, CHEN J. Hyperoside attenuates hydrogen peroxide-induced L02 cell damage via MAPK-dependent Keap1-Nrf2-ARE signaling pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 410(4): 759-765.
- [ 14 ] 吴畏, 于彩平, 李卓恒, 等. 金丝桃苷对高糖和氧化损伤所致内皮细胞凋亡的影响 [J]. 中国药房, 2013, 19(24): 1744-1747.
- [ 15 ] 曾克武, 王学美, 富宏, 等. 金丝桃苷对氯化钴所致的PC12细胞损伤模型的保护作用和机制研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(17): 2409-2412.
- [ 16 ] 王丽敏, 江清林, 毕士有, 等. 金丝桃苷对体外肿瘤细胞增殖的抑制作用研 [J]. 黑龙江医药科学, 2010, 33(1): 73-74.
- [ 17 ] Ku S K, Kim T H, Lee S, et al. Antithrombotic and profibrinolytic activities of isorhamnetin-3-O-galactoside and hyperoside [J]. Food Chem Toxicol, 2013, 53: 197-204.
- [ 18 ] PIAO M J, KANG K A, ZHANG R, et al. Hyperoside prevents oxidative damage induced by hydrogen peroxide in lung fibroblast cells *via* an antioxidant effect [J]. Biochim Biophys Acte, 2008, 1780(12): 1448-1457.
- [ 19 ] Haas J S, Stolz E D, Betti A H. The anti-immobility effect of hyperoside on the forced swimming test in rats is mediated by the D2-like receptors activation [J]. Planta Med, 2011, 77(4): 334-339.
- [ 20 ] ZHENG M, LIU C, PAN F, et al. Antidepressant-like effect of hyperoside isolated from Apocynum venetum leaves: possible cellular mechanisms [J]. Phytomedicine, 2012, 19(2): 145-149.
- [ 21 ] ZENG K, WANG X, Ko H, et al. Hyperoside protects primary rat cortical neurons from neurotoxicity induced by amyloid  $\beta$ -protein via the PI3K/Akt/Bad/BclXL-regulated mitochondrial apoptotic pathway [J]. Eur J Pharmacology, 2011, 672(1/3): 45-55.
- [ 22 ] Blennow K, de Leon M J, Zetterberg H. Alzheimer's disease [J]. Lancet, 2006, 368(9533): 387-403.
- [ 23 ] TU S, Okamoto S, Lipton S A, et al. Oligomeric  $A\beta$ -induced synaptic dysfunction in Alzheimer's disease [J]. Mol Neurodegener, 2014, 9(48): 1750-1762.
- [ 24 ] Brenner C, Kroemer G. Apoptosis. Mitochondria-the death signal integrator [J]. Science, 2000, 289(5482): 1150-1151.
- [ 25 ] 赵彦超, 顾耘. 细胞凋亡通路研究进展[J]. 现代医学, 2013, 41(4): 285-288.
- [ 26 ] Mazumder S, Plesca D, Almasan A. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis [J]. Method Mol Biol, 2015, 414(414): 13-21.
- [ 27 ] Cho E S, Jang Y J, Hwang M K, et al. Attenuation of oxidative neuronal cell death by coffee phenolic phytochemicals [J]. Mutat Res, 2009, 661(1/2): 18-24.

[责任编辑 邹晓翠]