

积雪草乙酸乙酯提取物对 $A\beta_{25-35}$ 片段所致的 PC12 细胞损伤模型及 SAMP8 小鼠脑内 SOD, GSH-Px 的影响

李霏¹, 黄金兰², 崔雯³, 张雯艳³, 冯颖琴³, 郭尔楚³, 陈奔³, 郭茜茜³, 钟振国^{3*}

(1. 广西桂东卫生学校, 广西 贺州 543100; 2. 徐州医学院, 江苏 徐州 221004;

3. 广西中医药大学, 南宁 530001)

[摘要] **目的:**研究积雪草乙酸乙酯提取物对 β 淀粉样蛋白 25-35 片段 ($A\beta_{25-35}$) 所致的 PC12 细胞损伤模型及快速老化模型小鼠 (SAMP8) 脑内超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 的影响。**方法:**细胞以 1×10^4 个/mL 密度接种, 预防实验在接种 24 h 后同时给予含不同质量浓度的药物培养液和终浓度为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $A\beta_{25-35}$ 溶液, 治疗实验在接种 24 h 后给予终浓度为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $A\beta_{25-35}$ 溶液, 24 h 后给予含不同质量浓度的药物培养液, 作用 72 h 后采用 MTT 法检测积雪草乙酸乙酯提取物对 $A\beta_{25-35}$ 片段所造成的 PC12 细胞老年性痴呆 (AD) 损伤模型的预防和治疗作用; Hoechst 33258 荧光显微镜染色法观察积雪草乙酸乙酯提取物作用 $A\beta_{25-35}$ 片段所致 PC12 细胞 AD 损伤模型的形态学变化, SAMP8) 40 只随机分为模型对照组、积雪草乙酸乙酯提取物高、中、低剂量组 (以生药量计为 40, 20, 10 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 和石杉碱甲组 (0.386 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 8 只/组, 连续 ig 给药 2 个月后, ELISA 法测定积雪草乙酸乙酯提取物对 SAMP8 大脑组织 SOD 和 GSH-Px 的影响。**结果:** $A\beta_{25-35}$ 片段所致的 PC12 细胞 AD 模型的预防和治疗实验中, 不同浓度的积雪草乙酸乙酯提取物对 $A\beta_{25-35}$ 片段所致 PC12 细胞 AD 损伤有不同程度的保护作用; 荧光显微镜观察到用药组的凋亡细胞数少于模型对照组与 MTT 的结果相符; ELISA 结果显示除低剂量组外, 其他各组的 SAMP8 大脑组织的 SOD 均高于模型对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 中剂量组和石杉碱甲组 SAMP8 大脑组织的 GSH-Px 比模型对照组高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论:**积雪草乙酸乙酯提取物在体外对由 $A\beta_{25-35}$ 片段所致的 PC12 细胞损伤有较好的保护和治疗作用, 并能通过提高 SAMP8 脑内 SOD, GSH-Px 水平起到抗氧化, 清除体内自由基而延缓衰老的作用。

[关键词] 积雪草乙酸乙酯提取物; PC12 细胞株; $A\beta_{25-35}$; 快速老化模型小鼠 SAMP8; 超氧化物歧化酶; 谷胱甘肽过氧化物酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)04-0111-04

[doi] 10.11653/syjf2014040111

Effect of Ethyl Acetate Extract from *Centella asiatica* on PC12AD Cell Model and SOD, GSH-Px of SAMP8

LI Fei¹, HUANG Jin-lan², CUI Wen³, ZHANG Wen-yan³, FENG Ying-qin³, GUO Er-chu³,

CHEN Ben³, GUO Qian-qian³, ZHONG Zhen-guo^{3*}

(1. Guangxi Guidong Healthy School, Hezhou 543100, China;

2. Xuzhou Medical College, Xuzhou 221004, China;

3. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of ethyl acetate extract from *Centella asiatica* on PC12 cell Alzheimer's disease (AD) model induced by β amyloid 25-35 fragment ($A\beta_{25-35}$) and the levels of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in the brain of SAMP8. **Method:** The cell suspension

[收稿日期] 20130417(020)

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81160512); 广西自然科学基金项目 (2010GXNSFD013050); 广西创新研究团队项目 (2011GXNSFF018006)

[第一作者] 李霏, 硕士, 从事中药抗老年痴呆研究, Tel:15240701210, E-mail:793980@qq.com

[通讯作者] * 钟振国, 医学博士, 教授, 从事教学与中药新药的研究与开发, Tel:0771-3132106, 13317712838, E-mail:zhongzg@gxtcmu.edu.cn

(1×10^4 cell/mL) was seeded into 96-well plates for 24 h. For preventive trial, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} A\beta_{25-35}$ and drugs were added into 96-well plates. For treatment trail, drugs were added 24 h after $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} A\beta_{25-35}$ was added into the cells. After 72 h, MTT assay was used to detect the prevention and treatment effect of AD model which made in PC12 cell induced by $A\beta_{25-35}$ fragment after treated with ethyl acetate extract of *C. asiatica*, and fluorescence microscopy was applied to observe the morphological changes of the PC12 cells. For animal trail, forty senescence accelerated mouse-prone 8 (SAMP8) were divided into 5 groups. There were 8 mice in each group. Each mouse was intragastrically administrated for 2 months. The contents of SOD and GSH-Px in the brain of SAMP8 were determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Result:** Different concentrations of ethyl acetate extract had different degrees of protection on PC12 cells, the results of fluorescence microscope was the same as MTT. ELISA demonstrated that the contents of SOD in high, mid-dosage ethyl acetate extract and Huperzine (Hup-A) groups were higher than that in control group, and the contents of GSH-Px treatment with mid-dosage ethyl acetate extract and Hup-A increased compared with control group. **Conclusion:** Ethyl acetate extracts of *C. asiatica* shows some degree of protective and therapeutic effects on the damage of PC12 cell caused by the $A\beta_{25-35}$ fragments *in vitro*. Furthermore, ethyl acetate extracts of *C. asiatica* has antioxidant, scavenging oxygen free radicals effects which results in delaying senescence via enhancing the contents of SOD and GSH-Px.

[**Key words**] ethyl acetate extract of *Centella asiatica*; senescence accelerated mouse-prone 8; PC12 cell; $A\beta_{25-35}$; SOD; GSH-Px

积雪草为伞形科植物的干燥全草,苦、辛、寒,归肝、脾、肾经,有清热利湿,解毒消肿功效,用于湿热黄疸,中暑腹泻,石淋血淋,痛肿疮毒,跌打损伤^[1]。研究资料表明积雪草总苷对于胃溃疡具有一定的预防及治疗作用^[2],复方积雪草连续灌胃 30 d 老年性痴呆模型大鼠,学习记忆能力显著升高^[3]。积雪草提取物不仅可以调节大脑中内源性的氧化应激损伤,对神经毒诱导的氧化应激亦有调节作用^[4]。本研究拟在小鼠肾上腺嗜铬瘤 PC12 细胞株上应用 β 淀粉样蛋白 25-35 片段 ($A\beta_{25-35}$) 片段诱导建立老年性痴呆细胞模型,以快速老化痴呆性小白鼠 SAMP8 为动物模型,初步评价积雪草乙酸乙酯提取物治疗老年性痴呆的作用。

1 材料

1.1 细胞株 小鼠肾上腺嗜铬瘤细胞株 PC12,购自上海细胞生物研究所细胞库。

1.2 动物 健康快速老化痴呆模型小鼠 SAMP8 40 只,体重 20 ~ 30 g。实验动物均由天津中医药大学提供,合格证号 SCXX(津)2008-0001。

1.3 药物与试剂 积雪草 *Centella asiatica* (L.) Urban 由广西中医药大学刘寿养教授鉴定,积雪草乙酸乙酯提取物为广西中医药大学新药研究开发中心自提;石杉碱甲 (Hup-A, 浙江震元制药有限公司,批号 110401);谷胱甘肽-过氧化物酶试剂盒 (Mouse GSH-Px Elisa kit, R&D 公司,批号 201112);超氧化物歧化酶试剂盒 (Mouse SOD Elisa kit, 为 R&D 产品,批

号 201112);四甲基嘧啶蓝 (MTT, 美国 Amresco 公司,批号 0793);胎牛血清 (FBS, 美国 Hyclone 公司,批号 0707);马血清 (HBS, 美国 GIBCO 公司,批号 201404);RPMI 1640 培养基 (美国 GIBCO 公司,批号 1120708);胰蛋白酶 (Trypsin, 上海西宝生物科技有限公司,批号 900207D);二甲基亚砜 (DMSO, 天津汇英化学试剂有限公司,批号 20070526); $A\beta_{25-35}$ 片段 (美国 GIBCO 公司,批号 050M4765)。

1.4 仪器 381 型 CO_2 培养箱 (Thermo Forma, 美国产), CK40 型倒置显微镜 (Olympus, 日本产), MULTISKANMK3 型酶标仪 (Biozell, 美国产), 4K15 型低温高速离心机 (德国 Sigma 公司)。

2 方法

2.1 对 $A\beta_{25-35}$ 片段所致的 PC12 细胞 AD 模型的预防和作用。

2.1.1 预防给药 取对数生长期的 PC12 细胞,胰酶消化,调整密度为 10^4 个/mL 的单细胞悬液,接种于 96 孔培养板中,200 μL /孔,预防实验:24 h 后分别加入不同浓度的药物培养液及终浓度为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $A\beta_{25-35}$ 溶液,对照组加入等体积溶剂的培养液。

2.1.2 治疗给药 细胞接种 24 h 后加入终浓度为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $A\beta_{25-35}$ 溶液,对照组加入等体积溶剂的培养液,待 $A\beta_{25-35}$ 作用 24 h 后再分别加入不同浓度的药物培养液及终浓度为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $A\beta_{25-35}$ 溶液,每组设 3 个复孔,置培养箱中培养 72 h,终止

前每孔加入 200 μL 新鲜配制的含 $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT 的无血清培养液,继续培养 4 h 后弃上清液,每孔加入 200 μL DMSO,振荡混匀后,在酶标仪上以波长为 570 nm 测定吸光度(A),计算细胞存活率。

存活率 = (实验组细胞 A/空白对照组细胞 A) \times 100%

2.2 荧光显微镜观察形态学变化 取对数生长期的 PC12 细胞,胰酶消化后调整细胞密度为 1×10^4 个/mL,细胞接种于 96 孔培养板中,每孔加入细胞悬液 100 μL ,预防组和治疗组的前处理同 2.1,在药物作用 72 h 后,弃掉原培养液,用细胞固定液 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 固定 5 min,蒸馏水稍冲洗后,加入 Hoechst 33258 工作染液, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光染色 10 min,蒸馏水冲洗,封片剂封片后荧光显微镜观察。

2.3 对 SAMP8 脑内 SOD、GSH-Px 的影响 SAMP8 40 只,随机分为模型对照组、积雪草乙酸乙酯提取物高、中、低剂量组(以生药量计为 40, 20, 10 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)和石杉碱甲组(0.386 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,参考临床成人用量:每天 0.3 $\text{mg}/70 \text{ kg}$)8 只/组,连续 ig 给药 2 个月后,颈椎脱臼处死,于冰台上迅速剥离大脑组织, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 预冷的生理盐水漂洗,滤纸吸干多余水分后置于电子天平上称重,按 1:9(质量/体积)加入冰冷生理盐水,用高速分散匀质机制成 10% 的脑匀浆,取上清液按 SOD、GSH-Px 试剂盒操作说明进行各指标测定。

2.4 统计学处理 所有结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 11.5 统计软件包,计量资料采用单因素方差分析(两两比较用 SNK 法)。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对 $A\beta_{25-35}$ 片段所致的 PC12 细胞 AD 模型的预防作用 以正常对照组细胞的存活率作为基数(即 100%),仅含 $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $A\beta_{25-35}$ 溶液的 PC12 细胞的存活率为 73.73%,两者相比有显著的差异($P < 0.01$),说明 AD 细胞造模成功。积雪草乙酸乙酯提取物在 $5 \sim 80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对含有 $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $A\beta_{25-35}$ 溶液的 PC12 细胞的增殖均有不同程度的促增长作用($P < 0.05$),见表 1。

3.2 对 $A\beta_{25-35}$ 片段所致的 PC12 细胞 AD 模型的治疗作用 以正常对照组细胞的存活率作为基数(即 100%),仅含 $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $A\beta_{25-35}$ 溶液的 PC12 细胞的存活率为 71.18%,两者相比有显著的差异($P < 0.01$),说明 AD 细胞造模成功。积雪草乙酸乙酯提取物在质量浓度 $10 \sim 80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对含有 $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $A\beta_{25-35}$ 溶液的 PC12 细胞的增殖均有不同程度的促增长作用($P < 0.05$),见表 2。

表 1 不同浓度的积雪草乙酸乙酯提取物对 $A\beta_{25-35}$ 片段所致 PC12 细胞 AD 模型的预防作用($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	A	存活率 /%	凋亡率 /%
正常对照	-	0.768 \pm 0.060	-	3.22 \pm 2.29
模型 ⁴⁾	-	0.566 \pm 0.020 ¹⁾	73.73	15.20 \pm 7.15 ¹⁾
积雪草提取物 ⁴⁾	5	0.653 \pm 0.052 ²⁾	115.38	10.33 \pm 3.79
	10	0.680 \pm 0.032 ³⁾	120.04	6.74 \pm 1.90 ³⁾
	20	0.755 \pm 0.079 ³⁾	133.39	4.75 \pm 1.70 ³⁾
	40	0.759 \pm 0.038 ²⁾	134.10	3.77 \pm 2.21 ³⁾
	80	0.713 \pm 0.026 ²⁾	125.83	7.57 \pm 2.21 ³⁾

注:与正常对照组相比¹⁾ $P < 0.01$;与模型组相比²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$; ⁴⁾ $A\beta_{25-35}$ 浓度为 $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (表 2 同)。

表 2 积雪草乙酸乙酯提取物对 $A\beta_{25-35}$ 片段所致 PC12 细胞 AD 模型的治疗作用

组别	质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	A	存活率 /%	凋亡率 /%
正常对照	-	0.822 \pm 0.050	-	2.38 \pm 2.63
模型	-	0.585 \pm 0.023 ¹⁾	71.18	13.52 \pm 4.19 ¹⁾
积雪草提取物	5	0.635 \pm 0.025	108.43	9.32 \pm 3.93 ²⁾
	10	0.682 \pm 0.053 ²⁾	116.43	8.07 \pm 3.47 ³⁾
	20	0.690 \pm 0.056 ³⁾	117.88	5.53 \pm 1.83 ³⁾
	40	0.754 \pm 0.117 ²⁾	128.82	2.52 \pm 1.27 ³⁾
	80	0.652 \pm 0.057 ²⁾	111.45	9.25 \pm 3.41 ²⁾

3.3 对 $A\beta_{25-35}$ 片段所致的 PC12AD 模型细胞凋亡的影响 荧光显微镜下观察到正常对照组细胞界限清晰,胞浆丰富,细胞核呈弥散均匀荧光,凋亡细胞的细胞核或细胞质内可见浓染致密的蓝色颗粒块状荧光及明显形态改变,并可见不规则、强荧光的细胞核碎片。在 $\times 40$ 倍光镜下随机选择表达区内 10 个无重叠视野,计算细胞凋亡率。结果显示,在预防和治疗实验中,无 $A\beta_{25-35}$ 溶液的 PC12 细胞凋亡率与仅含 $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $A\beta_{25-35}$ 溶液的 PC12 细胞凋亡率相比均有显著性差异,再次证明了 $A\beta_{25-35}$ 造模成功。

在预防实验,含有 $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $A\beta_{25-35}$ 溶液的药物组中,除 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 药物组外,其他各药物浓度与 $A\beta_{25-35}$ 组比较,有显著性差异($P < 0.01$)。在治疗实验中,各药物浓度与 $A\beta_{25-35}$ 组比较有显著差异(见表 1~2)。

3.4 SAMP8 小鼠脑内 SOD、GSH-Px 的影响 除积雪草乙酸乙酯提取物低剂量组外,其余给药组 SAMP8 脑内的 SOD 均高于模型对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);Hup-A 和中剂量组 SAMP8 脑内的 GSH-

Px 比模型对照组高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 见表 3。

表 3 积雪草乙酸乙酯提取物对 SAMP8 脑内 SOD 和 GSH-Px 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

实验组别	剂量 /g·kg ⁻¹	SOD /U·mg ⁻¹	GSH-Px /U·mg ⁻¹
模型对照	-	66.4 ± 13.3	112.8 ± 19.4
Hup-A	3.86 × 10 ⁻⁴	82.7 ± 16.5 ²⁾	130.6 ± 14.0 ¹⁾
积雪草乙酸乙酯提取物	40	81.6 ± 16.3 ¹⁾	122.1 ± 15.9
	20	92.3 ± 18.5 ²⁾	142.6 ± 16.6 ²⁾
	10	74.8 ± 15.0	116.9 ± 14.4

注:与模型对照组相比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

老年性痴呆(AD)是多因素引起的一种原发性大脑神经退行性病变,其典型病理学表现为大脑皮质细胞外出现由 Aβ 类淀粉多肽 (amyloid β, Aβ) 构成的老年斑 (senile plaques, SP) 和细胞内出现由 tau 蛋白构成的神经原纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFT)^[5-6]。神经病理学证明,在 AD 患者的大脑中,神经原纤维缠结或老年斑中及部分脑血管壁中均有 Aβ 沉积物,正常生理情况下,Aβ 具有营养因子的作用,但高浓度的长链 Aβ 往往具有神经毒性^[7],引发神经元凋亡等,进而产生一系列临床表现。PC12 细胞株源于一种可移植的鼠嗜铬细胞瘤,属神经嵴源性,在细胞形态、结构和功能上与神经元有相似的特点,能够代替原代培养的神经细胞^[8]。故能促进 PC12 细胞生长的药物,在一定程度上也能治疗 AD。本研究选用经老化的水溶性 Aβ₂₅₋₃₅ 片段作用于 PC12 细胞,建立 AD 细胞模型。

体外的预防和治疗实验结果表明,5 ~ 80 mg·L⁻¹ 积雪草乙酸乙酯提取物均对 PC12 细胞的增殖具有不同程度的促进作用。荧光显微镜下观察,药物处理后的 PC12 细胞明显较未用药的对照组 PC12 细胞出现的凋亡细胞少,且呈现典型的凋亡特征的凋亡细胞少,这与 MTT 法所得的实验结果组吻合。

AD 发病与自由基损伤有一定的相关性。SAMP8 具备均一的遗传背景和稳定老化病态特征,其快速老化自然产生,与临床痴呆的渐进性发生极为相似,尤其能在大脑形成 Aβ 沉积,表达量随着年

龄增加而增加,是目前研究 AD 的较理想模型^[10]。本研究结果显示,积雪草乙酸乙酯提取物高、中剂量组和 Hup-A 组 SAMP8 脑内的 SOD 明显高于模型对照组,中剂量组和 Hup-A 组 SAMP8 脑内的 GSH-Px 水平亦明显高于模型对照组,提示积雪草乙酸乙酯提取物对快速老化痴呆模型所致的 SOD, GSH-Px 水平低下具有保护作用,使 SOD, GSH-Px 水平升高,增强机体抗氧化能力,清除自由基而发挥其抗痴呆作用。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:266.
- [2] 施之琪, 杜建平, 杜铁良. 积雪草总苷抗乙酸致大鼠胃溃疡的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(12):122.
- [3] 陈明亮, 房娜, 葛振英, 等. 复方积雪草对阿尔茨海默病大鼠学习记忆的影响[J]. 河南外科学杂志, 2007, 13(4):6.
- [4] 杨玉琴, 丁永辉, 夏玉凤. 积雪草活性成分的分析方法及药理作用研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2010, 29(3):6.
- [5] Hardy J. The relationship between amyloid and tau [J]. J Mol Neurosci, 2003, 20(2):203.
- [6] LaFerla F M, Oddo S. Alzheimer's disease: Aβ, tau and synaptic dysfunction[J]. Trends Mol Med, 2005, 11(4):170.
- [7] Mattson M P, Guo Q, Furukawa K, et al. Presenilins, the endo-plasmic reticulum, and neuronal apoptosis in Alzheimer's disease [J]. J Neurochem, 1998, 70(1):1.
- [8] 黄文超, 李云峰, 罗质璞. 单胺递质对皮质酮所致的 PC12 细胞损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2003, 19(1):103.
- [9] 方中冗. 自由基与酶[M]. 北京: 科技出版社, 1989:272.
- [10] 于建春, 韩景献. 快速老化痴呆模型小白鼠 SAMP8 和 SAMP10 老化特征及其相关研究进展[J]. 实验动物科学与管理, 2004, 21(3):51.

[责任编辑 聂淑琴]