

## 知母总皂苷对 $\beta$ 淀粉样蛋白诱导的 PC12 细胞 Bcl-2 表达的影响

王艳杰<sup>1</sup>, 柳春<sup>1\*</sup>, 王艳<sup>1</sup>, 赵丹玉<sup>1</sup>, 冯晓帆<sup>1</sup>, 宋少江<sup>2</sup>, 李刚<sup>3</sup>

(1. 辽宁中医药大学生物化学与分子生物学教研室, 沈阳 110032;

2. 沈阳药科大学中药学院, 沈阳 110016; 3. 日本三益制药株式会社, 福冈 8100000)

**[摘要]** **目的:** 观察知母总皂苷对  $\beta$  淀粉样蛋白 ( $\beta$ -amyloid,  $A\beta$ )  $A\beta_{25-35}$  诱导的 PC12 细胞中抗凋亡基因 Bcl-2 表达的影响。**方法:** 培养 PC12 细胞, 分为 6 组: 正常组、模型组、知母低、中、高剂量组、盐酸多奈哌齐组。模型组加入终浓度为  $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $A\beta_{25-35}$  的培养基, 作用 48 h; 知母低、中、高剂量组和盐酸多奈哌齐分别加入含有低、中、高剂量知母总皂苷 ( $5, 10, 20 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 及盐酸多奈哌齐 ( $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和  $A\beta_{25-35}$  (终浓度为  $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的培养基共同作用于 PC12 细胞 48 h。然后采用 MTT 检测各组细胞活力的变化; 采用 RT-PCR 检测各组细胞中 Bcl-2 的 mRNA 表达变化; 采用 Western blotting 技术检测各组细胞中 Bcl-2 蛋白的表达变化。**结果:** 和正常组比较, 模型组细胞活力降低 ( $P < 0.01$ ); 和模型组比较, 高、中、低剂量知母总皂苷能显著升高 PC12 细胞活力 ( $P < 0.05$ ); 和正常组比较 ( $0.476 \pm 0.072, 0.14 \pm 0.02$ ), 模型组抗凋亡基因 Bcl-2 的 mRNA ( $0.316 \pm 0.026$ ) 和蛋白 ( $0.08 \pm 0.01$ ) 表达水平降低 ( $P < 0.01$ ); 和模型组比较, 高、中、低剂量知母总皂苷能显著性升高抗凋亡基因 Bcl-2 的 mRNA ( $0.447 \pm 0.016, 0.465 \pm 0.043, 0.472 \pm 0.023$ ) 和蛋白 ( $0.17 \pm 0.01, 0.19 \pm 0.02, 0.13 \pm 0.01$ ) 的表达水平 ( $P < 0.05$ )。**结论:** 知母总皂苷能升高  $A\beta_{25-35}$  诱导的 PC12 细胞的活力降低, 其机制可能是升高 Bcl-2 的表达水平。

**[关键词]** 知母总皂苷; 阿尔茨海默病;  $\beta$  淀粉样蛋白

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)12-0208-04

**[doi]** 10.11653/syfj2013120208

## Elevating Expression of Bcl-2 by Anemarrhena Total Saponins in PC12 Cell Injury Induced by Beta-amyloid

WANG Yan-jie<sup>1</sup>, LIU Chun<sup>1\*</sup>, WANG Yan<sup>1</sup>, ZHAO Dan-yu<sup>1</sup>, FENG Xiao-fan<sup>1</sup>, SONG Shao-jiang<sup>2</sup>, LI Gang<sup>3</sup>

(1. Liaoning University of Traditional Chinese medicine, Shenyang 110032, China;

2. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;

3. San Yi Pharmaceutical Co Lt, Fukuoka 8100000, Japan)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the elevating expression of Bcl-2 by anemarrhena total saponins on beta-amyloid ( $A\beta$ )-induced PC12 cell injury. **Method:** PC12 cells were randomly divided into 6 group as following: normal group, model group, anemarrhena total saponins groups ( $5, 10, 20 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), the donepezil HCl group. Excluding the normal group, the PC12 cells in others groups were exposed to DMEM containing beta-amyloid ( $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) and anemarrhena total saponins groups ( $5, 10, 20 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , the donepezil HCl ( $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ). The mRNA and protein expression level of the Bcl-2 were detected using semi-quantitative reverse transcriptase PCR (RT-PCR) and western blot respectively. The cell survival were measured by MTT methods. **Result:** Anemarrhena total saponins significantly attenuated  $A\beta$ -induced PC12 cell injury, and elevated the mRNA and protein expression of Bcl-2, compared with model group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Anemarrhena total

**[收稿日期]** 20130101(007)

**[第一作者]** 王艳杰, 副教授, 硕士生导师, 从事中医药对脏腑调控作用的信号转导机制研究, E-mail: wangyj76@yahoo.com.cn

**[通讯作者]** \* 柳春, 教授, 博士生导师, 从事中医药对脏腑调控作用的信号转导机制研究, E-mail: liuchun5@yahoo.com.cn

saponins can inhibit PC12 cell injury induced by  $A\beta_{25-35}$ , and the mechanism maybe involving in increasing, the expression levels of Bcl-2 mRNA and protein.

[Key words] anemarrhena total saponins; Alzheimer's disease;  $\beta$ -amyloid

随着全球人类年龄结构日益老龄化,老年期痴呆症成为威胁人类健康的第四大杀手,其中阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)占了大多数<sup>[1]</sup>。中药知母属于清热泻火药,具有清热泻火,生津润燥的功效,现代药理学研究表明其在改善记忆方面具有显著功效。因此本研究旨在观察知母总皂苷对 $A\beta_{25-35}$ 诱导PC12细胞损伤的保护作用,并进一步探讨其作用机制。

## 1 材料

**1.1 细胞** PC12细胞株,购自中科院上海生化所。将PC12细胞接种于培养瓶中,采用含10%胎牛血清,100 U·mL<sup>-1</sup>青霉素和100 mg·L<sup>-1</sup>链霉素的DMEM培养基,37℃,5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养,采用对数生长期的细胞进行实验。

**1.2 试剂** 知母总皂苷(沈阳药科大学提供,其纯度>85%), $A\beta_{25-35}$ (北京博奥森),Annexin V-EGFP细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基),RNAiso plus, RT-PCR试剂,Bcl-2引物, $\beta$ -actin引物盒,大连宝生物);兔抗大鼠Bcl-2多克隆抗体,DAB显色试剂盒,过氧化物酶标记二抗(武汉博士德)。

## 2 方法

**2.1 细胞分组** 将实验细胞分为6组:正常组、模型组、知母低、中、高剂量组、盐酸多奈哌齐组。流式细胞技术检测的细胞接种于6孔培养板,Western blotting实验的细胞接种于25 cm<sup>2</sup>培养瓶。模型组加入20  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>  $A\beta_{25-35}$ 作用48 h,知母低、中、高剂量组、盐酸多奈哌齐组分别加入含有5, 10, 20 mg·L<sup>-1</sup>知母总皂苷或1  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>的盐酸多奈哌齐和20  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>  $A\beta_{25-35}$ 的培养液作用48 h。

**2.2 测定细胞活力的变化** 取对数生长期的PC12细胞,以 $1 \times 10^5$ /mL的密度接种于96孔细胞培养板,培养24 h后加入含有20  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>  $A\beta_{25-35}$ 和不同终浓度的知母总皂苷和盐酸多奈哌齐的培养基,每组6复孔,48 h后倒置相差显微镜下观察其形态变化。每孔加入20  $\mu$ L MTT继续孵育4 h,弃去培养基并加入DMSO 150  $\mu$ L,37℃振荡10~15 min,酶标仪测定490 nm的吸光度( $A_{490}$ ),并计算细胞存活率

$$\text{细胞存活率} = (\text{实验组} A - \text{空白组} A) / (\text{对照组} A - \text{空白组} A) \times 100\%$$

**2.3 Bcl-2的mRNA表达变化** 按照RNAiso Plus说明书提取总RNA,微量紫外分光光度计检测 $A_{260}$ 、 $A_{280}$ ,取 $A_{260}/A_{280}$ 在1.8~2.0样品进行实验,并计算总RNA浓度。引物序列Bcl-2: Forward 5'-CTTCCAGCCTGAGAGCAACC-3', Reverse 5'-CATCCCAGCCTCCGTTATCC--3' (430 bp);  $\beta$ -actin: Forward 5'-TGTATGCCTCTGGTCGTACCAC-3', Reverse 5'-ACAGAGTACTTGCCTCAGGAG-3' (592 bp)。94℃反应2 min;94℃反应30 s,65℃反应30 s,72℃反应1 min,30个循环;最后72℃反应5 min。PCR产物用1.5%的琼脂糖凝胶分离检测。将凝胶从电泳槽内取出,用WD-9413B凝胶成像分析仪进行拍照,利用Gelpro 32软件,对于目的基因及内参 $\beta$ -actin的平均A进行测量,并计算目的基因和内参的平均A的比值,该比值反应的是Bcl-2的mRNA表达水平。

**2.4 Bcl-2的蛋白表达变化** 用含1% PMSF的蛋白裂解液提取蛋白,并按BCA蛋白测定说明书对每组蛋白含量进行测定。样品经12%的凝胶电泳分离,转膜,封闭,将膜与溶于封闭液中的一抗(兔抗大鼠Bcl-2多克隆抗体1:100,兔抗大鼠GAPDH多克隆抗体1:100)室温孵浴2 h洗涤,将膜浸入以1:1 000体积比用封闭液稀释的二抗稀释液,室温孵浴2 h洗涤,DAB显色,扫描,用Gelpro 32软件分析,分析各组目的蛋白和内参平均光密度值的比值,该比值反应的是目的蛋白的表达水平。

**2.5 统计方法** 采用SPSS 18.0统计软件,各组数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间的比较采用单因素方差分析,两两比较,采用相关分析中的双变量简单分析法测定两变量间的相关性。以 $P < 0.05$ 为显著性差异。

## 3 结果

**3.1 对 $A\beta_{25-35}$ 诱导PC12细胞活力的影响** 如表1所示,和正常组比较,模型组细胞活力显著降低( $P < 0.01$ );和模型组比较,知母低、中、高剂量组细胞活力显著升高( $P < 0.01$ ),并呈现一定剂量依赖关系,盐酸多奈哌齐组细胞活力也显著升高( $P < 0.01$ )。

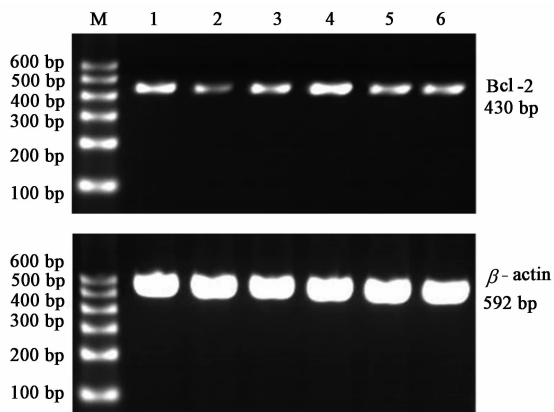
**3.2 对 $A\beta_{25-35}$ 诱导PC12细胞Bcl-2的mRNA表达水平的影响** 如图1和表2所示:与正常组相比,模型组Bcl-2的mRNA表达量显著降低( $P < 0.01$ ),而

表 1 知母总皂苷对  $A\beta_{25-35}$  诱导 PC12 细胞活力的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	质量浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	A	生存率/%
正常	-	0.531 ± 0.049	100 ± 0.09
模型	-	0.344 ± 0.022 <sup>1)</sup>	65 ± 0.04 <sup>1)</sup>
知母总皂苷	5	0.447 ± 0.016 <sup>3)</sup>	84 ± 0.03 <sup>3)</sup>
	10	0.465 ± 0.043 <sup>3)</sup>	88 ± 0.08 <sup>3)</sup>
	20	0.472 ± 0.023 <sup>3)</sup>	89 ± 0.04 <sup>3)</sup>
盐酸多奈派齐 <sup>4)</sup>	1	0.456 ± 0.038 <sup>3)</sup>	86 ± 0.07 <sup>3)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ,  
<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ ; <sup>4)</sup> 浓度单位为  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  (表 2~3 同)。

4 个干预组与模型组相比均有显著性升高 ( $P < 0.05$ )。和盐酸多奈派齐组相比,3 个知母组与西药组之间无显著性差异。



上图图 Bcl-2 的电泳照片,下图为  $\beta$ -actin 的电泳照片,  
M 为 Marker,1. 正常组,2. 模型组,3. 知母 5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组,  
4. 知母 10  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组,5. 知母 20  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组,  
6. 盐酸多奈派齐 1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组

图 1 知母总皂苷对  $A\beta_{25-35}$  诱导的

PC12 细胞中 Bcl-2 mRNA 表达的影响

表 2 知母总皂苷对  $A\beta_{25-35}$  诱导的 PC12 细胞中  
Bcl-2 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

分组	质量浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	Bcl-2 mRNA/ $\beta$ -actin 平均光密度
正常	-	0.476 ± 0.072
模型	-	0.316 ± 0.026 <sup>1)</sup>
知母总皂苷	5	0.500 ± 0.089 <sup>3)</sup>
	10	0.539 ± 0.044 <sup>3)</sup>
	20	0.423 ± 0.076 <sup>2)</sup>
盐酸多奈派齐 <sup>4)</sup>	1	0.469 ± 0.047 <sup>3)</sup>

3.3 对  $A\beta_{25-35}$  诱导 PC12 细胞中 Bcl-2 蛋白表达水平的影响 如图 2 和表 3 所示:与正常组相比,模型

组 Bcl-2 蛋白/GAPDH 蛋白平均 A 会显著降低,表明其表达量显著降低,与正常组比较有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。而 4 个干预组与模型组相比均有显著升高 ( $P < 0.01$ )。与盐酸多奈派齐组比,3 个知母组无显著性差异。

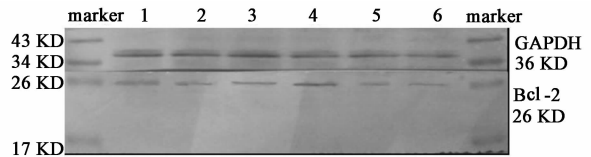


图 2 知母总皂苷对  $A\beta_{25-35}$  诱导的  
PC12 细胞中 Bcl-2 蛋白表达影响

表 3 知母总皂苷对  $A\beta_{25-35}$  诱导 PC12 细胞  
Bcl-2 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

分组	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	Bcl-2 相对含量
正常	-	0.14 ± 0.02
模型	-	0.08 ± 0.01 <sup>1)</sup>
知母总皂苷	5	0.17 ± 0.01 <sup>3)</sup>
	10	0.19 ± 0.02 <sup>3)</sup>
	20	0.13 ± 0.01 <sup>3)</sup>
盐酸多奈派齐	1	0.15 ± 0.02 <sup>3)</sup>

#### 4 讨论

阿尔茨海默病是一种好发于老年期的以进行性痴呆为主要表现的全脑萎缩性病变,属中医“健忘”、“痴呆”、“呆病”范畴<sup>[2]</sup>。中医认为这类疾病多属于衰老性疾病,与五脏虚损,特别是肾虚关系密切<sup>[3]</sup>。但是随着王永炎院士“浊毒”的提出,结合现代研究总结出虚、疲、浊、毒是导致衰老和 AD 的主要病因病机,其病位在脑,病因病机不离虚实两端,本虚标实兼挟多见。脾肾两虚为其本,淤、浊、毒为其标。瘀血、痰浊、毒邪既是脏气虚衰的结果,又是主要的致病因素,虚与瘀血、浊、毒相互影响,交互为患,成为 AD 复杂的病机<sup>[4]</sup>。可见浊毒是 AD 发病中的主要致病因素之一,清热解毒药物在改善认知功能方面的应用已受到重视,如黄连、泽泻、栀子、白花蛇舌草、金银花、蔓荆子、夏枯草等药物,已经越来越多的用于改善记忆功能<sup>[5]</sup>。

现代研究发现 AD 其特征性病理改变为脑神经细胞外出现  $\beta$ -淀粉样蛋白( $\beta$ -amyloid,  $A\beta$ ) 聚集形成的老年斑 (senile plaque, SP)、脑神经元内 tau 蛋白异常聚集形成的纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFT)、脑皮质细胞有不同程度的减少以及星形胶质细胞的增生及肥大<sup>[6]</sup>,最终导致神经元死亡<sup>[7]</sup>。老

年斑的主要成分是 $A\beta$ , $A\beta_{25-35}$ 作为 $A\beta_{1-40}$ 和 $A\beta_{1-42}$ 形成 $\beta$ 折叠的核心片段,拥有 $A\beta$ 大部分的神毒性<sup>[8]</sup>。赵保胜等<sup>[9]</sup>研究证明 $A\beta_{25-35}$ 能够诱导体外培养的NG108-15产生TNF- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 等炎症因子的表达,表明 $A\beta$ 诱导AD发病可能与免疫性炎症有关。脑中慢性炎症长期存在,引发大量的神经细胞的死亡<sup>[10]</sup>。Yankner等<sup>[11]</sup>证明, $A\beta_{25-35}$ 对体外培养的PC12细胞及海马神经元具有神经毒性。由此可见 $A\beta$ 应属于中医内生“浊毒”的范畴。而知母属于清热解毒药物,具有清热泻火,生津润燥之功效。现代研究证明,在大鼠体内知母皂苷能促进脑内M受体的形成,提高脑源性神经生长因子,改善痴呆模型大鼠的学习记忆效果<sup>[12]</sup>等作用。研究发现<sup>[13]</sup>知母皂苷水溶物能提高VD大鼠的学习记忆能力,机制可能与保护缺血后的神经元损伤、炎性损伤有关。因此本课题组提出知母能够清除AD发病中的内生“浊毒”,从而对神经细胞产生保护作用,因此本课题组观察了知母总皂苷对于 $A\beta_{25-35}$ 诱导的PC12凋亡的保护作用,进一步探索其对阿尔茨海默病的治疗机制,对于开发防止阿尔茨海默病的中药新药具有重要意义。

Bcl-2基因是一种重要的原癌基因,目前发现,细胞凋亡过程中的最重要的调节因子就是Bcl-2家族,该家族根据功能不同分为两类,一是促凋亡成员如Bax,Bad等,另外是抗凋亡成员如Bcl-2,Bcl-xl等。正如自然界中大多数平衡系统一样,抗凋亡基因和促凋亡基因也组成一个重要的平衡体系,当有内在或者外在的因素破坏这一平衡体系时,就会导致细胞对外界的敏感性大大增加,从而容易破坏其原有的结构和功能。在阿尔茨海默病患者中,对于患者海马进行检测,结果表明,患者神经元内的Bcl-2表达量极少<sup>[14]</sup>。而围绕老年斑附近被激活的胶质细胞中,Bcl-2有会过度表达,由此推测Bcl-2对于激活的胶质细胞是否存活起有一定作用。根据本实验MTT结果表明,知母总皂苷对 $A\beta_{25-35}$ 能诱导PC12细胞活力降低具有明显改善作用,并呈现一定剂量依赖关系。本实验RT-PCR及Western blotting结果显示,与正常组比,模型组Bcl-2 mRNA和蛋白表达水平均显著性降低,再次证明了 $A\beta_{25-35}$ 能降低Bcl-2的表达水平,表明了 $A\beta_{25-35}$ 对PC12细胞的毒性很可能是通过降低抗凋亡蛋白Bcl-2的表达水平而发挥作用。而与模型组相比,4个干预组Bcl-2 mRNA表达水平以及Bcl-2蛋白表达水平均显著升高,3个知母组与盐酸多奈哌齐组无显著差异。根

据此结果推测,知母总皂苷能升高 $A\beta_{25-35}$ 诱导的PC12细胞的活力降低作用,很有可能是通过升高抗凋亡蛋白Bcl-2的表达水平而发挥作用。

## [参考文献]

- [1] Beydoun M A. Association of adiposity status in early to mid-adulthood with incidence of alzheimer's disease [J]. *Am J Epidemiol*, 2008, 168(10):1179.
- [2] 丁向东,张沁园,孙强三,等.升黄益智颗粒治疗阿尔茨海默病的临床研究[J].*中国老年学杂志*, 2009, 29(8):2023.
- [3] 黎巍威,王学美.中医从“肾”防治阿尔茨海默病的现代研究[J].*中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(13):227.
- [4] 刘明芳,李浩,刘剑刚,等.中医虚痰浊毒与老年性痴呆[J].*中医杂志*, 2010, 51(7):651.
- [5] 苏芮,韩振蕴,范吉平.阿尔茨海默病中医病因病机探讨[J].*中华中医药杂志*, 2010, 25(5):743.
- [6] 黄克维,王鲁宁.神经病理学[M].北京:人民卫生出版社,1989:183.
- [7] 董丽华,胡国华.阿尔茨海默病的蛋白质组学研究进展[J].*中国老年学杂志*, 2004, 24(4):377.
- [8] 郑春艳,章海燕,唐希灿. $\beta$ -淀粉样蛋白的细胞内毒性与线粒体通透性转变孔道[J].*科学通报:生命科学版*, 2008, 20(4):593.
- [9] 赵保胜,马群,艾璐,等. $A\beta_{25-35}$ 刺激对海马神经细胞株NG108-15 Toll样受体3、4表达的影响[J].*中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(5):178.
- [10] 黄德弘,刘孟渊,闫小峰,加味当归芍药散对纤维状 $A\beta$ 诱导脑内炎症因子及磷酸化MAPK信号分子表达的影响[J].*中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(2):143.
- [11] Yankner B A, Duffy L K, Kirschner D A. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachinin neuropeptides [J]. *Science*, 1990, 250(4978):279.
- [12] 陈勤,胡雅儿,夏宗勤.知母皂苷元对脑内注射 $\beta$ 淀粉样痴呆模型大鼠的影响[J].*上海第二医科大学学报*, 2001, 21(5):401.
- [13] 张治强,李霞,孙连娜.知母皂苷及其苷元在中枢神经系统的药理作用[J].*医药导报*, 2009, 28(10):1318.
- [14] Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, et al. Correlative memory deficits, A beta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice [J]. *Science*, 1996, 274(5284):99.

[责任编辑 聂淑琴]