

# 当归芍药散对 AD 细胞模型铜离子介导的 A $\beta$ 聚集的影响

郝徐艺, 罗思, 程淑意, 陈云波\*

(广州中医药大学临床药理研究所, 广州 510405)

**[摘要]** 目的:以  $\beta$  淀粉样蛋白 1-42 ( $A\beta_{1-42}$ ) 和铜离子 ( $Cu^{2+}$ ) 络合物作用的人神经母细胞瘤 (SH-SY5Y) 细胞为阿尔茨海默病 (AD) 模型,探讨  $Cu^{2+}$  对  $A\beta$  聚集方式和神经毒性的影响及当归芍药散对  $Cu^{2+}$  介导的  $A\beta$  毒性的 AD 细胞模型的影响。**方法:**将  $A\beta_{1-42}$  ( $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 与不同浓度硫酸铜 ( $\text{CuSO}_4$ ,  $20, 40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 反应后用硫黄素 T (ThT) 染色法检测  $A\beta$  聚集状态,再进行  $A\beta_{1-42}$ - $Cu^{2+}$  组 ( $20 + 20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 当归芍药散组 ( $1.6, 3.2, 6.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) ThT 染色检测  $A\beta$  聚集状态。培养 SH-SY5Y 细胞,分别孵育不同浓度的  $A\beta_{1-42}$  ( $1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 及当归芍药散 ( $1.6, 3.2, 6.4, 12.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 24 h 后行噻唑蓝 (MTT) 比色法确定  $A\beta_{1-42}$  损伤浓度和当归芍药散保护浓度。随后将 SH-SY5Y 细胞分为空白组,  $A\beta_{1-42}$ - $Cu^{2+}$  组 ( $20 + 20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 当归芍药散组 ( $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} + 20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} + 1.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 空白组加入培养基,共作用 24 h 后行 MTT 比色法检测细胞生存率,显微镜拍摄细胞形态,蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测胞内胞外  $A\beta_{1-42}$  聚集状况。**结果:**与  $A\beta_{1-42}$  组比较,  $Cu^{2+}$  和  $A\beta_{1-42}$  结合成更多更大的  $A\beta$  聚集物。与正常组比较,模型组细胞活力明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 增加细胞内外  $A\beta_{1-42}$  聚集 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); 与模型组比较,当归芍药散能提高  $A\beta_{1-42}$ - $Cu^{2+}$  损伤的 SH-SY5Y 的细胞生存率 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 减少胞外  $A\beta_{1-42}$  蛋白 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。**结论:** $Cu^{2+}$  能够增加  $A\beta$  的聚集及毒性;当归芍药散能明显减轻  $Cu^{2+}$  介导的  $A\beta$  聚集导致的 SH-SY5Y 细胞损伤,使  $A\beta$  内吞,减少胞外  $A\beta$  聚集,提高细胞生存率。

**[关键词]** 当归芍药散;  $\beta$  淀粉样蛋白; 阿尔茨海默病; 铜离子 ( $Cu^{2+}$ ); 聚集

**[中图分类号]** R289; R742; R246.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)06-0045-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20190539

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181204.0942.001.html>

**[网络出版时间]** 2018-12-05 17:25

## Effect of Danggui Shaoyaosan on Copper Ion-mediated $A\beta$ Aggregation in AD Cell Model

HAO Xu-yi, LUO Si, CHENG Shu-yi, CHEN Yun-bo\*

(Institute of Clinical Pharmacology, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of copper ion ( $Cu^{2+}$ ) on the aggregation and neurotoxicity of  $A\beta$ , and affirm the role of Danggui Shaoyaosan *in vitro*, the Neuroblastoma (SH-SY5Y) cells treated with  $\beta$ -amyloid 1-42 ( $A\beta_{1-42}$ ) and  $Cu^{2+}$  were used as a vitro models of Alzheimer's disease (AD). **Method:**  $A\beta_{1-42}$  ( $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) was reacted with different concentrations of copper sulfate ( $\text{CuSO}_4$ ,  $20, 40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), and then the thioflavine T (ThT) staining method was used to detect the  $A\beta$  aggregation state. The  $A\beta$  aggregation status was also detected by ThT staining in the  $A\beta_{1-42}$ - $Cu^{2+}$  group ( $20 + 20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), and Danggui Shaoyaosan groups ( $1.6, 3.2, 6.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). The SH-SY5Y cells were cultured and incubated with different concentrations of  $A\beta_{1-42}$  ( $1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and Danggui Shaoyaosan ( $1.6, 3.2, 6.4, 12.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for 24 h. Subsequently, SH-SY5Y cells were incubated with  $A\beta_{1-42}$  ( $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and

**[收稿日期]** 20180904(011)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81674040);广东省自然科学基金项目(2014A030313399);广州市科技计划项目(1563000302)

**[第一作者]** 郝徐艺,在读硕士,从事脑病的临床和实验研究, E-mail:1024515417@qq.com

**[通信作者]** \* 陈云波,研究员,博士生导师,从事中医药防治脑病的基础研究, E-mail:ybchengz@gzucm.edu.cn

CuSO<sub>4</sub> (20 μmol·L<sup>-1</sup>) in the Aβ<sub>1-42</sub>-Cu<sup>2+</sup> group, and incubated with Aβ<sub>1-42</sub> (20 μmol·L<sup>-1</sup>), Danggui Shaoyaosan (1.6 mg·L<sup>-1</sup>) and CuSO<sub>4</sub> (20 μmol·L<sup>-1</sup>) in Danggui Shaoyaosan group. Control group was added with the medium. After 24 h of co-action, the cell viability was detected by the methylthiazolyl tetrazolium (MTT) assay. The morphology of the cells was photographed by microscopy. The intracellular extracellular Aβ<sub>1-42</sub> aggregation was detected by Western blot. **Result:** Cu<sup>2+</sup> and Aβ<sub>1-42</sub> bound to more and larger Aβ aggregates compared with the Aβ<sub>1-42</sub> group. Compared with the normal group, cell viability was significantly reduced ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) and intracellular and extracellular Aβ<sub>1-42</sub> aggregation was increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) in the model group. Danggui Shaoyaosan can increase the cell viability of SH-SY5Y damaged by Aβ-Cu<sup>2+</sup> ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and reduce Aβ<sub>1-42</sub> protein ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Cu<sup>2+</sup> can increase the aggregation and toxicity of Aβ; Danggui Shaoyaosan can significantly reduce the damage of SH-SY5Y cells induced by Cu<sup>2+</sup>-mediated Aβ aggregation, promote Aβ endocytosis, reduce extracellular Aβ aggregation and increase cell viability.

**[ Key words ]** Danggui Shaoyaosan; amyloid-beta peptides; Alzheimer's disease; copper ion (Cu<sup>2+</sup>); aggregation

阿尔茨海默病(AD)是老年期痴呆中最常见的一种类型,其发病机制复杂,造成了巨大的经济和社会负担,目前国际推荐的一线抗AD药物(胆碱酯酶抑制剂)只对1/3患者有效,且长期疗效也有待进一步证实<sup>[1]</sup>。以β-淀粉样蛋白(Aβ)为主要成分的老年斑(SPs)是AD的重要病理学特征之一<sup>[2]</sup>。正常情况下,Aβ的产生和降解过程维持平衡,但在AD患者脑中这种平衡状态受到破坏,Aβ异常聚集沉积形成SPs<sup>[3]</sup>。正常生理情况下Aβ具有可溶性,低浓度Aβ不表现神经毒性,当可溶性Aβ达到临界浓度,就会发生构象的变化,从单体聚集形成具有稳定构象的寡聚体或纤维。AD患者脑中的Aβ存在形式分为可溶性的单体、寡聚体以及不可溶性的纤维,其中Aβ纤维具有较强的神经毒性,寡聚体毒性最大,可导致患者神经元损伤<sup>[4]</sup>。在AD患者脑中,SPs富集了大量过渡金属离子,其中铜离子(Cu<sup>2+</sup>)异常积累,进而引起代谢紊乱<sup>[5]</sup>,说明AD与Cu<sup>2+</sup>的稳态平衡具有重要联系。体外实验证明,Cu<sup>2+</sup>有促进Aβ聚集的作用<sup>[6]</sup>。Cu<sup>2+</sup>与Aβ结合的能力较强,得到Cu<sup>2+</sup>后,Aβ聚集态又可以被Cu<sup>2+</sup>稳定,形成更多更大的Aβ聚集物。因此,Cu<sup>2+</sup>的代谢紊乱成为了推动AD病程恶化的重要因素之一,维持Cu<sup>2+</sup>的稳态平衡是治疗AD的重要靶点。

当归芍药散出自张仲景所著《金匮要略》,具有养血调肝、健脾利湿的功效,主要应用于妇科痛证的治疗。1980年代后期日本学者水岛宣昭<sup>[7]</sup>首次报道了当归芍药散改善痴呆的临床观察,并受到了国内外学者的广泛关注。中医学认为痴呆的主要病机为本虚标实,本虚主要为肾精亏损和气血不足,标实主要为痰浊阻窍和气滞血瘀。当归芍药散活血养

血、健脾利湿,具有补本虚、祛标实的特点,不仅具有调血脂、抗氧化、保护血管内皮等作用,还能增加脑内乙酰胆碱释放,减少脑内Aβ的沉积,减少神经元的损伤和丢失<sup>[8-11]</sup>。然而当归芍药散是否能通过调节铜离子的稳态平衡来改善Aβ聚集诱导的炎症神经毒性尚不明确,因此,本研究拟通过体外实验,以β淀粉样蛋白1-42(Aβ<sub>1-42</sub>)和Cu<sup>2+</sup>共同损伤的人神经母细胞瘤(SH-SY5Y)细胞为模型,探讨Cu<sup>2+</sup>对Aβ聚集和神经毒性的影响,并考察当归芍药散对Cu<sup>2+</sup>介导Aβ聚集的AD细胞模型的保护作用。

## 1 材料

**1.1 细胞株** SH-SY5Y细胞购自中国科学院上海生命科学研究所以。

**1.2 药物** 当归芍药散由当归、白芍、川芎、茯苓、泽泻、白术等组成,饮片均由广州中医药大学第一附属医院中药房提供,经广州中医药大学中药鉴定教研室吴文如副教授鉴定,均符合2015年版《中国药典》相关项下要求。按照《金匱要略》中的比例[当归-白芍-茯苓-白术-泽泻-川芎(3:16:4:4:8:8)]称取药物,置于圆底烧瓶中,混匀,加8倍量水浸泡30 min,冷凝回流提取1 h,收集药液,将药液倒入容器,剩余药渣中加6倍量水,冷凝回流提取1 h,收集药液;2次药液混合均匀,用4~6层纱布过滤,收集滤液,减压浓缩至生药质量浓度0.64 g·mL<sup>-1</sup>,用4 mL的离心管分装,12 000 r·min<sup>-1</sup>离心15 min,吸取上清,置于-20℃冰箱保存。使用前室温解冻,经0.22 μm滤孔过滤并稀释至所需浓度。

**1.3 试剂** 二甲基亚砜(DMSO,美国MP Biomedicals公司,批号Q5219);二喹啉甲酸(BCA)定量试剂盒(碧云天生物技术研究所,批号

0413181880516); DMEM 高糖培养基, 胎牛血清, 0.25% 胰蛋白酶, 磷酸盐缓冲液 (PBS) (美国 Gibco 公司, 批号分别为 8117294, 42F3371K, 1830857, 8116450);  $A\beta_{1-42}$  [吉尔生化 (上海) 公司, 批号 P160504-180231]; 六氟异丙醇 (HFIP), 硫磺素 T (ThT) (上海源叶生物科技有限公司, 批号分别为 K08A712596, H21A8W42003); 五水硫酸铜晶体 ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 天津百世化工公司, 批号 GB/T 665-2007); 牛血清白蛋白 (BSA), 噻唑蓝 (MTT) (德国 Biofrox 公司, 批号分别为 EZ2811A175, EZ2811D347);  $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin, 美国 Sigma 公司, 批号 064M4789V);  $A\beta_{1-42}$  兔多克隆抗体 (英国 Abcam 公司, 批号 GR108240-15)。

**1.4 仪器** N-1300D-WB 型旋转蒸发器 (日本 Eyela 公司); Multiskan FC 型多功能酶标仪 (美国 Thermo Scientific 公司); 5804R 型台式多功能高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); PowerPac™ HC 型通用电泳仪, Mini-PROTEAN Tetra 型转膜仪, ChemiDoc™ 型 XRS<sup>+</sup> 成像系统 (美国 Bio-Rad 公司); WTB150 型 CO<sub>2</sub> 恒温培养箱 (德国 Binder 公司); ATY-124 型电子天平 (日本岛津公司); DMi8<sup>+</sup> DFC7000T 型荧光显微镜 (德国 Leica 公司)。

## 2 方法

**2.1 ThT 染色法检测  $A\beta$  聚集的情况** 将  $A\beta_{1-42}$  与  $CuSO_4$  的混合液 ( $A\beta_{1-42}$ - $Cu^{2+}$ ) 加入到 96 孔板中, 分为  $A\beta_{1-42}$  组 ( $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),  $A\beta_{1-42}$ - $Cu^{2+}$  低  $Cu^{2+}$  组 ( $20 + 20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )<sup>[12]</sup>,  $A\beta_{1-42}$ - $Cu^{2+}$  高  $Cu^{2+}$  组 ( $20 + 200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 每组均设置 3 个复孔。37 °C 孵育 7 d 后, 加入  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ThT 工作液 25  $\mu\text{L}$ 。荧光显微镜下观察, 调节焦距和曝光时间, 拍照。预实验显示  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $CuSO_4$  单独作用于 SH-SY5Y 的毒性较大, 和  $A\beta_{1-42}$  联用后细胞损伤严重, 给药后未见明显改变, 故后续实验未对  $A\beta_{1-42}$ - $Cu^{2+}$  高  $Cu^{2+}$  组进行研究。将当归芍药散水提液加入  $A\beta_{1-42}$  与  $CuSO_4$  的溶液中, 分为  $A\beta_{1-42}$ - $Cu^{2+}$  组 ( $A\beta_{1-42}$   $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $CuSO_4$   $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 当归芍药散低剂量组 (当归芍药散  $1.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $A\beta_{1-42}$   $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $CuSO_4$   $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 当归芍药散中剂量组 (当归芍药散  $3.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $A\beta_{1-42}$   $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $CuSO_4$   $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 当归芍药散高剂量组 (当归芍药散  $6.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $A\beta_{1-42}$   $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $CuSO_4$   $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。均设 3 个复孔, 37 °C 孵育 7 d, 加入 ThT 工作液 25  $\mu\text{L}$ 。荧光显微镜下观察, 调节焦距

和曝光时间, 拍照。

**2.2 MTT 比色法检测细胞活力** 用含 10% 胎牛血清,  $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  青霉素和  $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  链霉素的 DMEM 培养基在 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 的条件下培养 SH-SY5Y 细胞。当细胞生长处于对数期时, 按  $3 \times 10^3$  个/孔的细胞密度转移到 96 孔板中, 培养 24 h 使其贴壁, 根据实验需要分别设立空白组、各浓度  $A\beta_{1-42}$  造模组 ( $1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 当归芍药散组 ( $1.6, 3.2, 6.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 继续培养 24 h。在孵育好的 96 孔板中每孔加入  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  MTT 溶液 20  $\mu\text{L}$ , 37 °C 孵育 4 h, 小心吸弃孔内的上清液, 每孔加入 DMSO 150  $\mu\text{L}$ , 于酶标仪上震荡 10 min, 于 570 nm 波长处测定吸光度  $A$ , 按公式细胞生存率 =  $A_{\text{实验组}} / A_{\text{空白组}} \times 100\%$  计算细胞的生存率。分别检测  $A\beta_{1-42}$  和  $Cu^{2+}$  对 SH-SY5Y 的影响, 筛选出对 SH-SY5Y 活力无明显影响的  $A\beta_{1-42}$  和  $Cu^{2+}$  浓度, 用该浓度的  $A\beta_{1-42}$  和  $Cu^{2+}$  共同作用于 SH-SY5Y, 观察其对 SH-SY5Y 生存率的影响。

**2.3 细胞形态学观察** 按  $2 \times 10^5$  个/孔的细胞密度接种于 6 孔板中, 培养 24 h 使其贴壁, 根据实验需要分别设立正常组, 各浓度  $A\beta_{1-42}$  造模组, 当归芍药散各水提液处理组, 不同浓度  $CuSO_4$  溶液处理组, 不同比例  $A\beta_{1-42} + Cu^{2+}$  溶液共同处理组, 继续培养 24 h。倒置显微镜下观察细胞的生长情况以及细胞形态结构的变化。

**2.4 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测  $A\beta_{1-42}$  蛋白表达** 各组细胞经药物处理后用预冷的 PBS 洗涤 2 次, 加入细胞裂解液适量, 样品置于冰上裂解 15 min, 于 4 °C,  $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min, 取上清, 采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。取变性后的蛋白样品 60  $\mu\text{g}$  上样电泳, 调节电压至 80 V, 待样品进入分离胶后再调节电压至 120 V; 电转移至聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜 300 mA, 1.5 h, 室温下在 BSA 质量分数为 7% 的 TBST 中封闭 1 h, 加入  $A\beta_{1-42}$  抗体 (1:1 000), 4 °C 环境下孵育过夜; 次日用 TBST 洗涤液充分清洗, 加入山羊抗兔二抗 (1:5 000) 室温环境孵育 1 h, TBST 缓冲液再次清洗, 发光液按 1:1 混匀。沥干的 PVDF 膜整齐放置于平铺的保鲜膜上, 滴加发光液后曝光仪中成像。采用 Western blot 图象处理软件 Quantity One 系统分析  $A\beta_{1-42}$  的灰度值, 计算  $A\beta_{1-42}$  与  $\beta$ -actin 灰度值之间的比值。

**2.5 统计学分析** 实验数据采用 SPSS 17.0 软件

处理,以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1  $\text{Cu}^{2+}$  对  $\text{A}\beta$  聚集及当归芍药散对  $\text{A}\beta_{1-42}$ - $\text{Cu}^{2+}$  解聚的影响** 与  $\text{A}\beta_{1-42}$  组比较,  $\text{A}\beta_{1-42}$ - $\text{Cu}^{2+}$  低  $\text{Cu}^{2+}$  组以及  $\text{A}\beta_{1-42}$ - $\text{Cu}^{2+}$  高  $\text{Cu}^{2+}$  组的  $\text{A}\beta$  斑块明显聚集变大。与  $\text{A}\beta_{1-42}$ - $\text{Cu}^{2+}$  低  $\text{Cu}^{2+}$  组比较,当归芍药散各剂量组的  $\text{A}\beta_{1-42}$  斑块明显分散变少。见图 1。

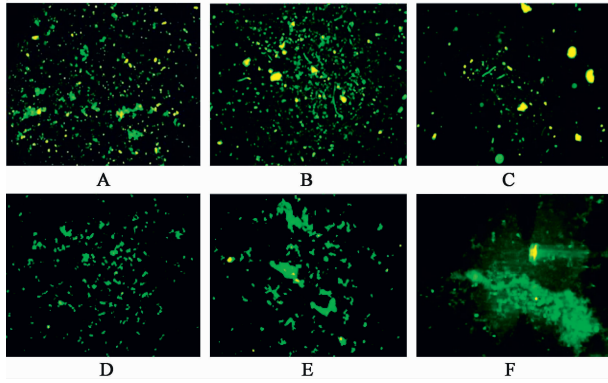


图 1  $\text{Cu}^{2+}$  对  $\text{A}\beta$  聚集及当归芍药散对  $\text{A}\beta_{1-42}$ - $\text{Cu}^{2+}$  解聚的影响 (ThT,  $\times 50$ )  
A.  $\text{A}\beta_{1-42}$  组; B.  $\text{A}\beta_{1-42}$ - $\text{Cu}^{2+}$  低  $\text{Cu}^{2+}$  组; C.  $\text{A}\beta_{1-42}$ - $\text{Cu}^{2+}$  高  $\text{Cu}^{2+}$  组; D. 当归芍药散  $1.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组; E. 当归芍药散  $3.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组; F. 当归芍药散  $6.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组

图 1  $\text{Cu}^{2+}$  对  $\text{A}\beta$  聚集及当归芍药散对  $\text{A}\beta_{1-42}$ - $\text{Cu}^{2+}$  解聚的影响 (ThT,  $\times 50$ )

Fig. 1 Effect of  $\text{Cu}^{2+}$  on  $\text{A}\beta$  aggregation and Danggui Shaoyao san on  $\text{A}\beta_{1-42}$ - $\text{Cu}^{2+}$  depolymerization (ThT,  $\times 50$ )

### 3.2 当归芍药散对 $\text{A}\beta_{1-42}$ - $\text{Cu}^{2+}$ 神经毒性的影响

#### 3.2.1 不同浓度 $\text{A}\beta_{1-42}$ 对 SH-SY5Y 生存率的影响

与空白组比较,  $\text{A}\beta_{1-42}$  浓度为 5, 10, 20, 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时,细胞的生存率有降低趋势,其中  $\text{A}\beta_{1-42}$  浓度在 20, 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时具有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。故采用  $\text{A}\beta_{1-42}$  浓度为 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  作用于 SH-SY5Y 24 h 作为造模条件<sup>[13]</sup>。见表 1。

**3.2.2 当归芍药散对  $\text{A}\beta_{1-42}$  诱导的 SH-SY5Y 损伤模型的保护作用** 与空白组比较,  $\text{A}\beta_{1-42}$  组细胞生存率显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与  $\text{A}\beta_{1-42}$  组比较,当归芍药散质量浓度在 1.6, 3.2, 6.4  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时对 SH-SY5Y 细胞均有显著保护作用,能明显提高细胞生存率 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 2。

**3.2.3  $\text{Cu}^{2+}$  和  $\text{A}\beta$  相互作用对 SH-SY5Y 生存率的影响** 与空白组比较,  $\text{CuSO}_4$  浓度在 10, 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时,其对 SH-SY5Y 生存率无明显影响;  $\text{A}\beta_{1-42}$  浓度在 5, 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时,其对 SH-SY5Y 生存率无明显影响;当二者共同作用于 SH-SY5Y 时,细

表 1  $\text{A}\beta_{1-42}$  对 SH-SY5Y 活力及生存率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	A	细胞生存率/%
空白	-	1.69 $\pm$ 0.17	100.00 $\pm$ 9.99
$\text{A}\beta_{1-42}$	1.25	1.70 $\pm$ 0.12	100.62 $\pm$ 6.99
	2.5	1.74 $\pm$ 0.21	103.11 $\pm$ 12.52
	5	1.63 $\pm$ 0.17	96.67 $\pm$ 9.97
	10	1.57 $\pm$ 0.21	93.41 $\pm$ 11.95
	20	1.31 $\pm$ 0.06	77.96 $\pm$ 3.59 <sup>1)</sup>
	40	1.18 $\pm$ 0.09	69.97 $\pm$ 5.44 <sup>1)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$  (表 3 同)。

表 2 当归芍药散对  $\text{A}\beta_{1-42}$  诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤模型的保护作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	A	细胞生存率/%
空白	-	1.31 $\pm$ 0.06	100.00 $\pm$ 4.16
$\text{A}\beta_{1-42}$	20.0 <sup>4)</sup>	0.99 $\pm$ 0.09	76.11 $\pm$ 8.96 <sup>1)</sup>
当归芍药散	1.6	1.26 $\pm$ 0.13	96.4 $\pm$ 9.52 <sup>2)</sup>
	3.2	1.27 $\pm$ 0.12	96.82 $\pm$ 9.21 <sup>2)</sup>
	6.4	1.35 $\pm$ 0.10	103.27 $\pm$ 7.88 <sup>3)</sup>
	12.8	1.11 $\pm$ 0.05	84.88 $\pm$ 3.72
	25.6	0.96 $\pm$ 0.14	73.59 $\pm$ 10.91

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与  $\text{A}\beta_{1-42}$  组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>3)</sup>  $P < 0.01$ ; <sup>4)</sup> 表示浓度单位为  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

胞生存率显著下降 ( $P < 0.01$ )。见表 3。

表 3  $\text{Cu}^{2+}$  和  $\text{A}\beta$  相互作用对 SH-SY5Y 细胞生存率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	A	细胞生存率/%
空白	-	1.92 $\pm$ 0.18	100.00 $\pm$ 9.54
$\text{CuSO}_4$	10	1.90 $\pm$ 0.21	99.06 $\pm$ 11.01
	20	1.78 $\pm$ 0.23	93.25 $\pm$ 12.36
$\text{A}\beta_{1-42}$	5	1.91 $\pm$ 0.18	99.73 $\pm$ 9.12
	10	2.14 $\pm$ 0.06	111.73 $\pm$ 3.41
$\text{A}\beta_{1-42}$ - $\text{Cu}^{2+}$	5 + 20	1.48 $\pm$ 0.22	77.56 $\pm$ 11.63 <sup>1)</sup>
	10 + 10	1.55 $\pm$ 0.22	81.02 $\pm$ 11.03 <sup>1)</sup>

**3.2.4 当归芍药散对  $\text{A}\beta_{1-42}$ - $\text{Cu}^{2+}$  损伤的 SH-SY5Y 模型细胞生存率的影响** 与空白组比较,  $\text{A}\beta_{1-42}$ - $\text{Cu}^{2+}$  组细胞生存率显著下降 ( $P < 0.01$ ); 与  $\text{A}\beta_{1-42}$ - $\text{Cu}^{2+}$  组比较,当归芍药散质量浓度在 3.2, 6.4  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时 SH-SY5Y 细胞生存率明显升高 ( $P <$

0.05,  $P < 0.01$ )。见表 4。

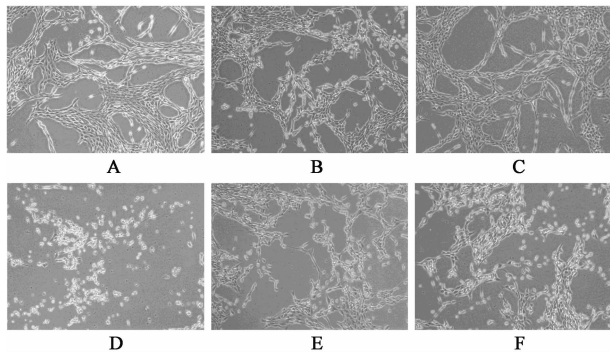
表 4 当归芍药散对  $A\beta_{1-42}$ - $Cu^{2+}$  损伤的 SH-SY5Y 模型的保护作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 4 Protective effect of Danggui Shaoyaosan on  $A\beta_{1-42}$ - $Cu^{2+}$  damaged SH-SY5Y model ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	质量浓度/ $mg \cdot L^{-1}$	A	细胞生存率/%
对照	-	1.05 ± 0.12	100 ± 11.03
$A\beta_{1-42}$ - $Cu^{2+}$	20 <sup>4)</sup>	0.51 ± 0.10	48.99 ± 9.89 <sup>1)</sup>
当归芍药散	1.6	0.61 ± 0.05	58.47 ± 4.95
	3.2	0.73 ± 0.09	69.15 ± 8.39 <sup>3)</sup>
	6.4	0.81 ± 0.07	77.07 ± 6.74 <sup>3)</sup>
	12.8	0.54 ± 0.06	51.04 ± 5.42

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与  $A\beta_{1-42}$ - $Cu^{2+}$  组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ ;<sup>4)</sup> 表示浓度单位为  $\mu mol \cdot L^{-1}$  (表 5 同)。

**3.2.5 当归芍药散对  $A\beta_{1-42}$ - $Cu^{2+}$  共同损伤的模型细胞形态的影响** 空白组细胞圆润饱满。与空白组比较, $A\beta_{1-42}$  组细胞有一定的损伤,损伤较小,少部分细胞开始出现皱缩,变圆; $CuSO_4$  组中细胞损伤较小,细胞形态接近空白组; $A\beta_{1-42}$ - $Cu^{2+}$  组中出现很明显的细胞损伤,大量细胞变圆,凋亡;当归芍药散 3.2, 6.4  $mg \cdot L^{-1}$  组的细胞形态明显改善,当归芍药散水提液明显增加了细胞的活性,提高了细胞间的紧密性,增加了细胞密度,使细胞形态趋于正常。提示当归芍药散对  $A\beta_{1-42}$ - $Cu^{2+}$  共同作用的 SH-SY5Y 有很明显的保护作用。见图 2。



A. 空白组; B.  $A\beta_{1-42}$  组; C.  $CuSO_4$  组; D.  $A\beta_{1-42}$ - $Cu^{2+}$  组; E. 当归芍药散 3.2  $mg \cdot L^{-1}$  组; F. 当归芍药散 6.4  $mg \cdot L^{-1}$  组

图 2 当归芍药散对  $A\beta_{1-42}$ - $Cu^{2+}$  损伤细胞模型形态的影响 (倒置显微镜,  $\times 100$ )

Fig. 2 Effect of Danggui Shaoyaosan on morphology of  $A\beta_{1-42}$ - $Cu^{2+}$  damaged cell model (inverted microscope,  $\times 100$ )

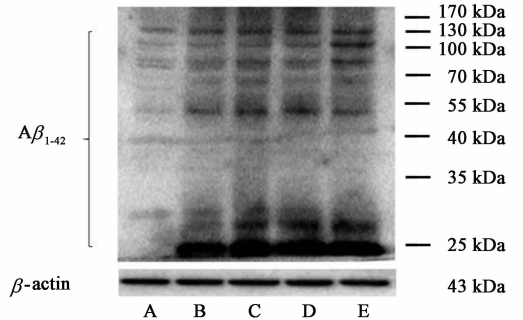
**3.3 当归芍药散对 SH-SY5Y 细胞  $A\beta$  代谢的影响** 与空白组比较, $A\beta_{1-42}$ - $Cu^{2+}$  组细胞内、细胞外上清

$A\beta_{1-42}$  蛋白表达均显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与  $A\beta_{1-42}$ - $Cu^{2+}$  组比较,当归芍药散 3.2, 6.4  $mg \cdot L^{-1}$  组细胞内  $A\beta_{1-42}$  蛋白明显增多 ( $P < 0.05$ ), 细胞外上清  $A\beta_{1-42}$  蛋白明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 5, 图 3, 4。

表 5 当归芍药散对  $A\beta_{1-42}$ - $Cu^{2+}$  诱导的 SH-SY5Y 胞内外  $A\beta_{1-42}$  蛋白的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 5 Effect of Danggui Shaoyaosan on  $A\beta_{1-42}$ - $Cu^{2+}$ -induced intracellular and extracellular  $A\beta_{1-42}$  protein in SH-SY5Y cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度/ $mg \cdot L^{-1}$	$A\beta_{1-42}/\beta$ -actin	
		细胞内	细胞上清
空白	-	0.71 ± 0.10	0.33 ± 0.10
$A\beta_{1-42}$ - $Cu^{2+}$	20 <sup>4)</sup>	2.85 ± 0.16 <sup>1)</sup>	1.89 ± 0.13 <sup>1)</sup>
当归芍药散	1.6	3.32 ± 0.12	1.43 ± 0.01 <sup>2)</sup>
	3.2	3.36 ± 0.06 <sup>2)</sup>	1.22 ± 0.09 <sup>2)</sup>
	6.4	3.85 ± 0.24 <sup>2)</sup>	0.82 ± 0.06 <sup>3)</sup>



A. 空白组; B.  $A\beta_{1-42}$ - $Cu^{2+}$  组; C. 当归芍药散 1.6  $mg \cdot L^{-1}$  组; D. 当归芍药散 3.2  $mg \cdot L^{-1}$  组; E. 当归芍药散 6.4  $mg \cdot L^{-1}$  组 (图 4 同)

图 3  $A\beta_{1-42}$ - $Cu^{2+}$  诱导的 SH-SY5Y 细胞内  $A\beta_{1-42}$  蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of  $A\beta_{1-42}$ - $Cu^{2+}$ -induced intracellular  $A\beta_{1-42}$  protein in SH-SY5Y cells

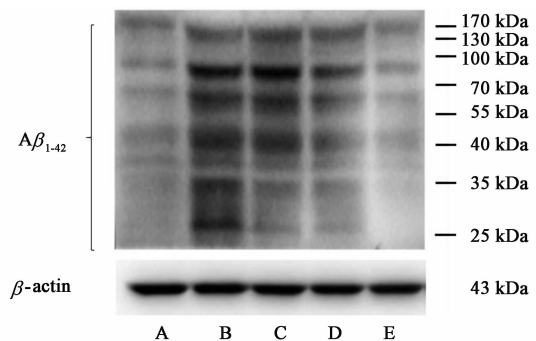


图 4  $A\beta_{1-42}$ - $Cu^{2+}$  诱导的 SH-SY5Y 细胞上清  $A\beta_{1-42}$  蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of  $A\beta_{1-42}$ - $Cu^{2+}$ -induced  $A\beta_{1-42}$  protein in SH-SY5Y cell supernatant

#### 4 讨论

AD 患者脑中过量的  $A\beta$  在脑内累积,进行寡聚以及纤维化作用最终沉积形成斑块,可导致神经元的损害和死亡。有研究表明  $Cu^{2+}$  能参与细胞膜上的氧化还原反应并产生活性氧(ROS),而高浓度的  $Cu^{2+}$  在  $A\beta$  聚集过程中起重要作用<sup>[14]</sup>。AD 患者血浆与脑脊液中的  $Cu^{2+}$  含量均较正常人高,而皮层组织中的  $Cu^{2+}$  外流导致细胞内  $Cu^{2+}$  相对缺乏以及细胞间隙液高铜<sup>[15]</sup>。脑组织细胞中铜的缺乏导致 AD 患者体内铜结合蛋白活性降低,包括铜锌超氧化物歧化酶和细胞色素 C 氧化酶,从而导致机体抗氧化能力的下降以及线粒体功能的紊乱<sup>[16-17]</sup>。而细胞外  $Cu^{2+}$  含量的升高则加速了  $A\beta$  的聚集,且  $Cu^{2+}$  在与  $A\beta$  结合后被还原为  $Cu^+$ ,同时产生过氧化氢,并通过后续的 Fenton 反应和 Haber-Weiss 反应产生高毒性的羟自由基,加重了神经元的氧化损伤<sup>[18]</sup>。因此,由于  $Cu^{2+}$  的代谢紊乱导致  $A\beta$  聚集产生神经毒性和氧化应激损伤,成为推动 AD 病程恶化的重要因素。寻找可以抑制  $A\beta$  聚集或者将已经形成的寡聚体或纤维解聚的药物,维持  $Cu^{2+}$  的稳态平衡,将对于 AD 的预防和治疗有非常重要的意义。

当归芍药散具有抗氧自由基和减少  $A\beta$  的沉积的作用<sup>[19-20]</sup>。近年来有学者研究表明,很多中药中的抗氧化成分都是铜等金属离子的螯合剂<sup>[21]</sup>。而当归芍药散在前期的研究中已被证明具有较好的抗氧化、清除自由基的效果,其主要单体成分阿魏酸、白芍苷、芍药苷等都具有抗氧化的功效,其中阿魏酸的糖酯化物已被证明具有螯合金属离子的作用<sup>[22-23]</sup>。在此基础上,本研究从体外入手探究当归芍药散对 AD 细胞模型铜离子介导的  $A\beta$  聚集的影响。实验结果显示,  $Cu^{2+}$  增加了  $A\beta$  的聚集和神经毒性。当归芍药散能有效降解  $A\beta_{1-42}$ - $Cu^{2+}$  聚集物的能力,提高  $A\beta_{1-42}$ - $Cu^{2+}$  损伤的细胞生存率。此外,当归芍药散能够增加细胞内的  $A\beta$  含量,减少胞外即上清中  $A\beta$  蛋白含量。研究表明  $A\beta$  内吞后清除的主要方式是通过溶酶体的降解<sup>[24]</sup>。因此  $A\beta$  的清除,通过细胞摄取  $A\beta$ ,再到清除的过程,是一种普遍且高效的方式。提示当归芍药散可能是通过增加神经细胞对  $A\beta$  的摄取,减少  $A\beta$  在胞外的沉积从而达到保护细胞的作用。本实验结果进一步揭示当归芍药散对  $Cu^{2+}$  介导的  $A\beta$  聚集导致的 SH-SY5Y 细胞的保护作用,但其具体保护作用机制尚有待进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] Akiyama H, Barger S, Barnum S, et al. Inflammation and Alzheimer's disease[J]. *Neurobiol Aging*, 2000, 21(3): 383-421.
- [2] Dickson D W. Neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease: a perspective from longitudinal clinicopathological studies[J]. *Neurobiol Aging*, 1997, 18(4): 21-26.
- [3] Alvirabotero X, Carro E M. Clearance of amyloid- $\beta$  peptide across the choroid plexus in Alzheimer's disease[J]. *Curr Aging Sci*, 2010, 3(3): 219-229.
- [4] Lambert M P, Barlow A K, Chromy B A, et al. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from  $A\beta_{1-42}$  are potent central nervous system neurotoxins[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(11): 6448-6453.
- [5] CHEN W T, LIAO Y H, YU H M, et al. Distinct effects of  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ , and  $Al^{3+}$  on amyloid-beta stability, oligomerization, and aggregation: amyloid-beta destabilization promotes annular protofibril formation[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(11): 9646-9656.
- [6] Hureau C, Faller P.  $A\beta$ -mediated ROS production by Cu ions: structural insights, mechanisms and relevance to Alzheimer's disease[J]. *Biochimie*, 2009, 91(10): 1212-1217.
- [7] 水島宣昭. トウキ・シヤクヤク散は老年痴呆にする作用[J]. 和汉以薬学雑誌, 1989, 6(3): 456-457.
- [8] 阎艳丽, 吉梅, 宋晓宇, 等. 当归芍药散对血脂异常大鼠抗氧化能力及动脉壁血管细胞黏附分子-1 基因表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2007, 13(2): 25-28.
- [9] QIAN Y F, WANG H, YAO W B, et al. Aqueous extract of the Chinese medicine, Danggui-Shaoyao-San, inhibits apoptosis in hydrogen peroxide-induced PC12 cells by preventing cytochrome c release and inactivating of caspase cascade[J]. *Cell Biol Int*, 2008, 32(2): 304-311.
- [10] HU Z Y, LIU G, CHENG X R, et al. JD-30, an active fraction extracted from Danggui-Shaoyao-San, decreases  $\beta$ -amyloid content and deposition, improves LTP reduction and prevents spatial cognition impairment in SAMP8 mice[J]. *Exp Gerontol*, 2012, 47(1): 14-22.
- [11] KOU J, ZHU D N, YAN Y Q. Neuroprotective effects of the aqueous extract of the Chinese medicine Danggui-Shaoyao-san on aged mice[J]. *J Ethnopharmacol*, 2005, 97(2): 313-318.
- [12] Arredondo M, Espinoza A, Pizarro F, et al. Searching for specific responses to copper exposure: an *in vitro* copper challenge in peripheral mononuclear cells[J]. *Biol Trace*

- Elem Res, 2011, 142(3):407-414.
- [13] SONG N, YANG H, PANG W, et al. Mulberry extracts alleviate  $A\beta$  25-35-induced injury and change the gene expression profile in PC12 cells [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2014, doi: 10. 1155/2014/150617.
- [14] Gaggelli E, Kozlowski H, Valensin D, et al. Copper homeostasis and neurodegenerative disorders (Alzheimer's, prion, and Parkinson's diseases and amyotrophic lateral sclerosis) [J]. Chem Rev, 2006, 106(6):1995-2044.
- [15] Crouch P J, Barnham K J, et al. Therapeutic treatments for Alzheimer's disease based on metal bioavailability [J]. Drug News Perspect, 2006, 19(8):469-474.
- [16] Desai V, Kaler S G. Role of copper in human neurological disorders [J]. Am J Clin Nutr, 2008, 88(3):855-858.
- [17] Bush A I, Pettingell W H, et al. Rapid induction of Alzheimer A beta amyloid formation by zinc [J]. Science, 1994, 265(5177):1464-1467.
- [18] Hureau C, Faller P. A beta-mediated ROS production by Cu ions: structural insights, mechanisms and relevance to Alzheimer's disease [J]. Biochimie, 2009, 91(10):1212-1217.
- [19] Egashira N, Iwasaki K, Akiyoshi Y, et al. Protective effect of Toki-shakuyaku-san on amyloid beta25-35-induced neuronal damage in cultured rat cortical neurons [J]. Phytother Res, 2005, 19(5):450-453.
- [20] 钟树志, 马世平, 洪宗元, 等. 基于抗炎作用的当归芍药散抗阿尔茨海默氏症的实验研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(22):3155-3160.
- [21] 赵保路, 万莉. 金属离子代谢平衡失调与阿尔茨海默病早期发病机制 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2012, 39(8):756-763.
- [22] 巩仔鹏, 胡建春, 李梅, 等. 基于大鼠脑缺血再灌注损伤模型建立辛芍组方中灯盏乙素和芍药苷的 PK-PD 结合模型 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(1):74-78.
- [23] 赵冰, 张可, 王静, 等. 阿魏酸糖酯体外抗氧化性质的研究 [J]. 食品科学, 2010, 31(21):94-97.
- [24] LI J, Kanekiyo T, Shinohara M, et al. Differential regulation of amyloid-beta endocytic trafficking and lysosomal degradation by apolipoprotein E isoforms [J]. J Biol Chem, 2012, 287(53):44593-44601.

[责任编辑 孙丛丛]