

- [20] Lapin I P, Oxenkrug G F. Intensification of the central serotonergic processes as a possible determinant of the thymoleptic effect[J]. *Lancet*, 1969, 1(7586): 132-136.
- [21] Zwilling D, Huang S Y, Sathyaikumar K V, et al. Kynurenine 3-monooxygenase inhibition in blood ameliorates neurodegeneration[J]. *Cell*, 2011, 145(6): 863-874.
- [22] Niinistö P, Raitala A, Pertovaara M, et al. Indoleamine 2, 3-dioxygenase activity associates with cardiovascular risk factors: the Health 2000 study[J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2008, 68(8): 767-770.
- [23] Claes S, Myint A M, Domschke K, et al. The kynurenine pathway in major depression: haplotype analysis of three related functional candidate genes [J]. *Psychiatry Res*, 2011, 188(3): 355-360.
- [24] Schwarcz R, Bruno J P, Muchowski P J, et al. Kynurenines in the mammalian brain: when physiology meets pathology [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2012, 13(7): 465-477.
- [25] Myint A M, Kim Y K, Verkerk R, et al. Kynurenine pathway in major depression: evidence of impaired neuroprotection [J]. *J Affect Disord*, 2007, 98(1-2): 143-151.
- [26] Halaris A, Myint AM, Savant V, et al. Does escitalopram reduce neurotoxicity in major depression? [J]. *J Psychiatr Res*, 2015, 66-67: 118-126.

当归芍药散含药血清对 $A\beta_{1-42}$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞周期和凋亡的影响

贺春香, 余婧萍, 李富周, 贺旭, 李平, 成绍武, 宋祯彦*
(湖南中医药大学, 中西医结合心脑血管疾病防治湖南省重点实验室, 湖南长沙 410208)

摘要: 目的 研究当归芍药散含药血清对 $A\beta_{1-42}$ 诱导的人神经母细胞瘤细胞 (SH-SY5Y) 细胞周期和细胞凋亡的调控作用。方法 利用 $A\beta_{1-42}$ (10 $\mu\text{mol/L}$) 处理 SH-SY5Y 细胞 24 h 构建 AD 细胞模型, 给予不同浓度当归芍药散含药血清 (2.5%、5%、10%) 干预 24 h。分别采用 MTT、流式细胞术和免疫荧光分别检测细胞存活率、细胞周期和细胞凋亡; 采用 Western blot 检测凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 和细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1) 表达。结果 与空白对照组比较, $A\beta_{1-42}$ 处理后 SH-SY5Y 细胞存活率下降, 凋亡率增高, 细胞周期 S 期细胞数增加, G_2/M 期细胞数量减少 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 给予 5%、10% 当归芍药散含药血清干预后, 细胞存活率上升 ($P < 0.01$), 凋亡率降低 ($P < 0.01$), 且促凋亡蛋白 Bax 表达下降, 抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达上升 ($P < 0.01$), S 期细胞数量减少, G_2/M 期细胞数量增加, Cyclin D1 蛋白表达降低 ($P < 0.01$)。结论 当归芍药散可以有效改善 $A\beta_{1-42}$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞存活率, 抑制 $A\beta$ 诱导的细胞周期再进入和细胞凋亡。

关键词: 当归芍药散; 阿尔兹海默病; β -淀粉样蛋白; 细胞凋亡; 细胞周期

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2020)11-2875-08

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.11.010

Effects of Danggui Shaoyao Powder medicated serum on the cycle and apoptosis of $A\beta_{1-42}$ -induced SH-SY5Y cells

HE Chun-xiang, YU Jing-ping, LI Fu-zhou, HE Xu, LI Ping, CHENG Shao-wu, SONG Zhen-yan*

(Hunan Provincial Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Prevention and Treatment of Cardio-Cerebral Diseases, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

收稿日期: 2020-05-16

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81774129); 湖南省自然科学基金面上项目 (2018JJ2296, 2019JJ50441); 湖南省中医药管理局科研项目 (2018025); 湖南省教育厅科研项目 (19K065, 18B246)

作者简介: 贺春香 (1995—), 女, 硕士生, 从事中西医结合神经退行性疾病防治研究。Tel: (0731) 88458257, E-mail: 1450887043@qq.com

* 通信作者: 宋祯彦 (1988—), 男, 硕士, 实验师, 从事中西医结合神经退行性疾病防治研究。Tel: (0731) 88458257, E-mail: songzhenyan2013@hnuucm.edu.cn

ABSTRACT: AIM To investigate the regulatory effect of Danggui Shaoyao Powder medicated serum on the cycle and apoptosis of $A\beta_{1-42}$ -induced SH-SY5Y cells. **METHODS** SH-SY5Y cells exposed to 24 hours $A\beta_{1-42}$ (10 $\mu\text{mol/L}$) were developed into Alzheimer's disease cell models for another 24 hours treatment of different concentrations of Danggui Shaoyao Powder medicated serum (2.5%, 5%, 10%). The cells were subjected to detection of cell viability, cell cycle and apoptosis by MTT, flow cytometry and immunofluorescence; and determination of the expression of apoptosis-related proteins Bax, Bcl-2 and Cyclin D1 (Cyclin D1) by Western blot. **RESULTS** Compared with the blank control group, the groups with the $A\beta_{1-42}$ treated SH-SY5Y cells had decreased survival rate, increased apoptosis rate, increased number of cells in the S phase of the cell cycle, and decreased number of cells in the G_2/M phase ($P < 0.01$). In contrast to the model group, the groups with their SH-SY5Y cells intervened with either 5% or 10% Danggui Shaoyao Powder medicated serum shared increased cell survival rate ($P < 0.01$), decreased apoptosis rate ($P < 0.01$), decreased expression of pro-apoptotic protein Bax, increased expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 ($P < 0.01$), decreased number of cells in S phase, increased number of cells in G_2/M phase, and decreased expression of Cyclin D1 protein ($P < 0.01$). **CONCLUSION** Danggui Shaoyao Powder medicated serum can effectively improve the survival rate of $A\beta_{1-42}$ -induced SH-SY5Y cells via inhibition of both cell cycle re-entry and $A\beta$ -induced apoptosis.

KEY WORDS: Danggui Shaoyao Powder; Alzheimer's disease; amyloid- β ; apoptosis; cell-cycle

阿尔兹海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种与衰老相关的进行性发展的神经系统退行性疾病, 临床上以认知功能障碍, 特别是记忆障碍和视空间技能损害为主要特点。随着人口老龄化日趋明显, AD 在老年人群的患病率逐年上升, 我国 65 岁老人中患病率高达 6.6%^[1]。细胞外神经纤维斑块和细胞内神经原纤维缠结是 AD 的主要病理特征, 诱导这些致病转化的分子机制尚不清楚^[2]。脑内沉积的 β -淀粉样蛋白 (amyloid-beta, $A\beta$) 被认为是 AD 的关键病理过程^[3]。 $A\beta$ 是由淀粉样前体蛋白 (Amyloid precursor protein, APP) 经 β -和 γ -分泌酶的蛋白水解作用而产生的含有 39~43 个氨基酸的多肽, 其在脑内的沉积形成不溶性斑块引发神经毒性作用是神经元凋亡的重要原因^[4]。 $A\beta_{1-42}$ 处理的原代神经元在细胞周期标记物、DNA 复制和有丝分裂突变方面存在异常表达^[5]。研究表明, $A\beta$ 刺激可以促进神经元的分化抑制蛋白 1 (inhibitor of differentiation-1, Id1)、音猬因子 (sonic hedgehog, SHH) 和 Cyclin D1 等细胞周期进程相关因子的异常表达, 参与诱导终末分化的神经元细胞周期异常激活导致神经元脆裂、变性和死亡^[6]。 $A\beta$ 也可引起神经元活性氧产生增多、DNA 损伤^[7], 使得防止神经元细胞周期再入的周期蛋白依赖性激酶 5 (Cyclin Dependent Kinase 5, Cdk5) 表达下降, 在与 $A\beta$ 的共同刺激下, 促使神经元细胞周期再入, 一方面, 作为细胞周期启动蛋白 Cyclin D1 过表达激活成视网膜细胞瘤蛋白

(Retinoblastoma protein, Rb) 使其磷酸化, 并向 S 期过渡; 另一方面, 过度损伤的 DNA 导致 PARP (poly ADP-ribose polymerase) 和 p38 (Thr 180/Tyr 182) 的激活, 使得 caspase3 激活增多, Bax 表达量升高以及 Bcl-2/Bax 比率的下降, 从而导致神经元凋亡^[8]。这种在进入细胞周期的合成阶段之前, 在 G_1 至 S 点出现神经元细胞死亡, 被经典地称为 "abortive cell cycle reentry", 其特征是细胞周期和凋亡蛋白的上调^[9-10]。因此, 研究干扰 $A\beta$ 依赖信号途径的药物对于预防 AD 脑内神经元细胞周期失调和凋亡引起的神经退行性病变具有一定的临床意义。当归芍药散出自东汉张仲景的《金匮要略》, 临床观察证明当归芍药散是治疗 AD 的有效方剂^[11-12], 实验研究发现当归芍药散改善 AD 的认知功能主要与抗炎、抗氧化损伤、增强脑组织的能量代谢、促进突触形成等相关^[13-15]。本研究利用 $A\beta_{1-42}$ 诱导人神经母细胞瘤细胞 (SH-SY5Y) 构建 AD 细胞模型来研究当归芍药散对 $A\beta_{1-42}$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞周期和凋亡的影响。

1 材料

1.1 细胞 SH-SY5Y 细胞株购自武汉普诺赛生物有限公司 (货号 CL-0208), 用含 10% 胎牛血清, 100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素 (美国 Gibco 公司, 货号分别为 10270-106, 15070063) 的 DMEM/F12 培养基 (美国 Hyclone 公司, 货号 SH30023.01) 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的条件下培养。

1.2 动物 SD 大鼠, 10 只, SPF 级, 雄性, 体

质量 250~300 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK(湘) 2013-0004, 饲养于湖南中医药大学第一附属医院实验动物中心。动物实验方案通过湖南中医药大学第一附属医院伦理委员会的批准(ZYFY20190905)。

1.3 药物与试剂 当归芍药散由当归 7 g、白芍 37.2 g、茯苓 9.3 g、白术 9.3 g、泽泻 18.6 g、川芎 18.6 g 组成, 所有药材均购自湖南中医药大学第一附属医院药剂科, 由药剂科主任戴冰教授鉴定为正品。 $\text{A}\beta_{1-42}$ (美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 货号 03112); 噻唑蓝 (MTT) 和乳酸脱氢酶 (LDH) 活性检测试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司, 货号 M8180、BC0685); 一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (绿色荧光) (上海碧云天生物技术有限公司, 货号 C1086); 细胞周期染色试剂盒 (杭州联科生物技术股份有限公司, 货号 CCS012); Bax、Bcl-2、Cyclin D1、 β -actin (北京博奥森公司, 货号分别为 bs-0127M、bs-0032R、bs-0623R、bs-0061R); 山羊抗兔二抗、山羊抗小鼠二抗 (美国 Sigma-Aldrich 公司, 货号分别为 AP132P、AP124)。

1.4 仪器 Z36HK 超速冷冻离心机 (德国 Hermle 公司); Series 8000 WJ CO_2 培养箱 (美国 Thermo Fisher 公司); Axio Vert. A1 倒置显微镜 (德国 ZEISS 公司); Cytation3 多功能酶标仪 (美国 BioTek 公司); Gel Doc XR+凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司); A1+共聚焦激光显微镜 (日本 Nikon 公司); MoFlo XDP 超速流式分选系统 (美国贝克曼库尔特有限公司)。

2 方法

2.1 当归芍药散冻干粉制备 当归芍药散采用水提法制备冻干粉^[13]。按处方比例称取药材 100 g (当归 7 g、白芍 37.2 g、茯苓 9.3 g、白术 9.3 g、泽泻 18.6 g、川芎 18.6 g), 用 5 倍体积蒸馏水浸泡药物 2 h, 100 °C 煮沸 0.5 h, 小火煨 1 h, 收集滤液。使用 3 倍体积蒸馏水按照上述步骤再次提取。2 次提取物混合后, 用旋转蒸发器浓缩成浸膏。最后, 将浸膏装入冻干机真空冷冻干燥得到当归芍药散冻干粉。

2.2 含药血清制备 取雄性 SD 大鼠 10 只随机分为 2 组, 给药组大鼠灌胃给予当归芍药散浓缩液 (生药 24 g/kg), 正常对照组给予同体积蒸馏水。灌胃 7 d 后, 于末次灌胃后 2 h 后以 3% 水合氯醛 (10 mL/kg) 麻醉大鼠, 暴露腹主动脉, 用负压采

血管采集全血 5 mL 至无抗凝剂的普通采血管中, 静置过夜, 3 000 r/min 离心 10 min, 收集上清, 经 0.22 μm 滤膜过滤, -80 °C 冻存备用。

2.3 $\text{A}\beta_{1-42}$ 处理构建 AD 细胞模型 SH-SY5Y 细胞生长处于对数期时, 接种到培养板中培养 24 h 贴壁, 根据课题组前期研究^[16], 给予 10 $\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{1-42}$ 处理 24 h 构建 AD 细胞模型。

2.4 分组及当归芍药散含药血清干预 细胞分组为空白对照组 (空白血清), 模型组 (10 $\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{1-42}$ +空白血清), 当归芍药散含药血清低、中、高干预组 (10 $\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{1-42}$ 造模后分别给予 25、50、100 mL/L 含药血清干预 24 h, 即每升完全培养基中分别含有 25、50、100 mL 当归芍药散含药血清, 体积分数分别为 2.5%、5%、10%), 采用“体积分数+受试药物含药血清”的方式表达^[13]。

2.5 细胞活率和 LDH 活性检测 96 孔板中按 8×10^3 /孔密度接种细胞培养贴壁, 按方法 10 $\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{1-42}$ 处理 24 h 后, 根据 MTT 试剂盒和 LDH 活性检测试剂盒说明书方法检测每个孔的细胞存活情况和 LDH 活性。

2.6 TUNEL 染色检测细胞凋亡 6 孔板中放入盖玻片接种 4×10^5 /孔细胞使细胞爬片, 经试验处理 24 h 后, 用 4% 多聚甲醛室温固定 10 min, PBS 清洗细胞, 0.3% Triton-X 透膜 5 min, 将 TUNEL 反应混合物加入细胞, 37 °C 孵育 1 h, DAPI 染核 5 min, PBS 清洗后使用尼康 A1+ 共聚焦显微镜 10 倍物镜下扫描成像。随机选取 5 个视野, 采用 Image J 分析每组平均荧光强度, 统计细胞凋亡率。

2.7 流式细胞术检测细胞周期 6 孔板接种 4×10^5 /孔细胞培养至贴壁, 经试验处理 24 h 后, 按照细胞周期染色试剂盒所述方法操作。收集细胞离心弃上清, 轻弹管壁, 使沉淀重悬在残余的液体中, 加入 1 mL 室温下的 PBS。将细胞缓慢加入至 3 mL 无水乙醇 (-20 °C 预冷) 中, 边加边高速搅拌。-20 °C 固定过夜。检测当天, 将固定细胞离心, 弃去乙醇, 轻弹管壁使沉淀松散, 加入 5 mL 室温下的 PBS, 放置 15 min 使细胞再次水化。离心, 弃上清。加入 1 mL PI 染色液, 室温避光孵育 30 min。选择最低上样速度, 在贝克曼 MoFlo XDP 流式细胞仪上进行检测, 488 nm 激发光源, 使用 FL2-RPE (578 nm) 通道检测。流式结果使用 Modfit 软件进行分析。

2.8 Western blot 检测细胞周期和凋亡相关蛋白表达 细胞经实验处理后使用 RIPA 法裂解细胞,

30 Hz 超声 10 s 断裂 DNA, 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清, BCA 法检测定量蛋白浓度, 每孔上样 30 μg /孔, 100 V 电泳 100 min, 0.45 μm PVDF 膜 200 A 湿转 90 min, 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 封闭后一抗用 TBST 1 : 1000 稀释, β -actin 为内参, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 二抗 (1 : 10 000) 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 1 h, ECL 化学发光法显影, Gel Doc XR+凝胶成像系统成像计算灰度值统计分析。

2.9 统计学分析 采用 SPSS 21.0 进行数据的统计与分析, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 先进行正态性分析和方差齐性检验, 两两比较方差齐者用 LSD 检验, 方差不齐者用 Tamhane's T2 法检验, 以 $P \leq 0.05$ 为差异

有统计学意义。

3 结果

3.1 当归芍药散含药血清对 $\text{A}\beta_{1-42}$ 处理的 SH-SY5Y 细胞形态的影响 明场下观察 SH-SY5Y 细胞生长情况 (图 1), 空白对照组细胞生长良好, 细胞细长呈梭形或者椭圆形, 有树枝状轴突, 细胞饱满透亮。 $\text{A}\beta_{1-42}$ 处理 24 h 后 SH-SY5Y 细胞出现损伤, 细胞密度有所下降, 树枝状轴突消失, 细胞部分皱缩, 部分包膜出现破裂, 细胞光泽变暗, 细胞间隙增大。 当归芍药散含药血清干预后, 细胞形态有所恢复, 部分细胞恢复呈梭形或者椭圆形, 细胞间隙变小。

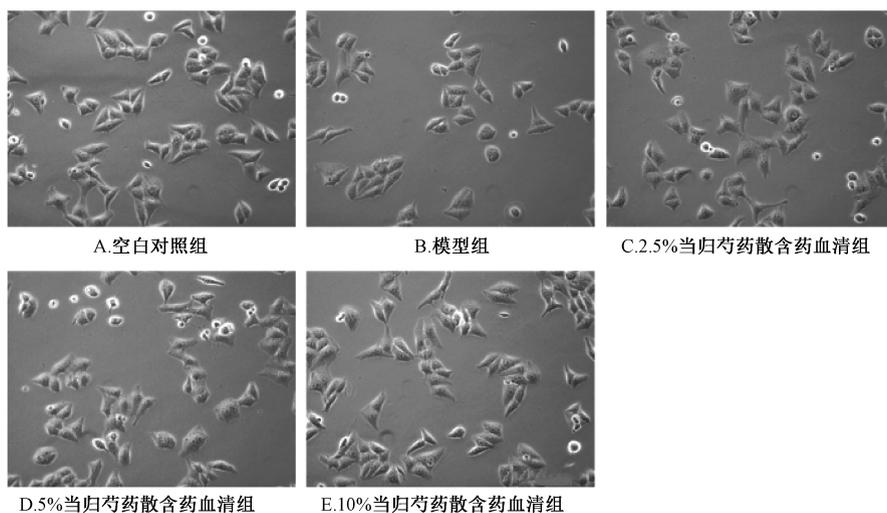
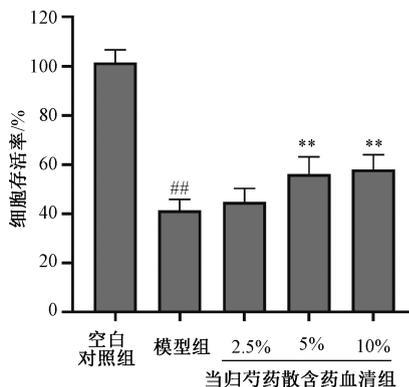


图 1 不同浓度当归芍药散含药血清干预 $\text{A}\beta_{1-42}$ 处理后 SH-SY5Y 细胞的形态学变化

Fig. 1 Morphological changes of $\text{A}\beta_{1-42}$ -induced SH-SY5Y cells due to Danggui Shaoyao Powder medicated serum treatment at different concentrations

3.2 当归芍药散含药血清对 $\text{A}\beta_{1-42}$ 处理的 SH-SY5Y 细胞存活率和 LDH 活性的影响 MTT 检测结果 (图 2) 显示, 与空白对照组比较, 模型组的 SH-SY5Y 细胞存活率下降 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 给予当归芍药散含药血清干预 24 h 后, 5%、10% 当归芍药散含药血清组的 SH-SY5Y 细胞的细胞存活率均提高 ($P < 0.01$)。LDH 漏出率检测结果 (图 3) 显示, 与空白对照组比较, 模型组的 SH-SY5Y 细胞 LDH 漏出率升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 当归芍药散含药血清能一定程度降低模型组细胞 LDH 漏出率, 5%、10% 当归芍药散含药血清组均具有统计学意义 ($P < 0.01$)。

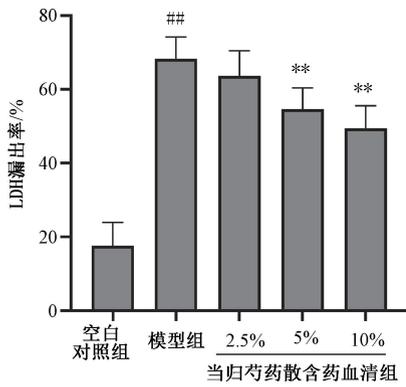
3.3 当归芍药散含药血清对 $\text{A}\beta_{1-42}$ 处理的 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响 细胞凋亡结果显示 (图 4) 当归芍药散含药血清呈浓度依赖性抑制 $\text{A}\beta_{1-42}$ 介导



注: 与空白对照组比较, $\#\# P < 0.01$; 与模型组比较, $\#\#\# P < 0.01$ 。

图 2 不同浓度当归芍药散含药血清对 $\text{A}\beta_{1-42}$ 处理后 SH-SY5Y 细胞存活率的影响 ($n = 6$)

Fig. 2 Effects of Danggui Shaoyao Powder medicated serum at different concentrations on the cell viability of $\text{A}\beta_{1-42}$ -induced SH-SY5Y cells ($n = 6$)



注：与空白对照组比较，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{**} $P < 0.01$ 。

图3 不同浓度当归芍药散含药血清对 $A\beta_{1-42}$ 处理后SH-SY5Y细胞LDH活性的影响 ($n=6$)

Fig. 3 Effects of Danggui Shaoyao Powder medicated serum at different concentrations on the LDH activity of $A\beta_{1-42}$ -induced SH-SY5Y cells ($n=6$)

示(表1),与空白对照比较,10 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{1-42}$ 处理SH-SY5Y细胞24 h后,细胞凋亡率增高 ($P < 0.05$),细胞凋亡率为 $(48.12 \pm 5.28)\%$ 。与模型组比较,5%、10%当归芍药散含药血清干预24 h后细胞凋亡率为 $(17.69 \pm 4.26)\%$ 、 $(15.64 \pm 4.15)\%$, $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

表1 不同浓度当归芍药散含药血清对 $A\beta_{1-42}$ 处理后SH-SY5Y细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab. 1 Effects of Danggui Shaoyao Powder medicated serum at different concentrations on the apoptosis rate of $A\beta_{1-42}$ -induced SH-SY5Y cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/($\text{mL} \cdot \text{L}^{-1}$)	细胞凋亡率/%
空白对照组	-	10.21 \pm 3.56
模型组	-	48.12 \pm 5.28 ^{##}
当归芍药散含药血清低剂量组	25	41.54 \pm 6.83
当归芍药散含药血清中剂量组	50	17.69 \pm 4.26 ^{**}
当归芍药散含药血清高剂量组	100	15.64 \pm 4.15 ^{**}

注：与空白对照组比较，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{**} $P < 0.01$ 。

的SH-SY5Y细胞凋亡。荧光强度统计分析结果显

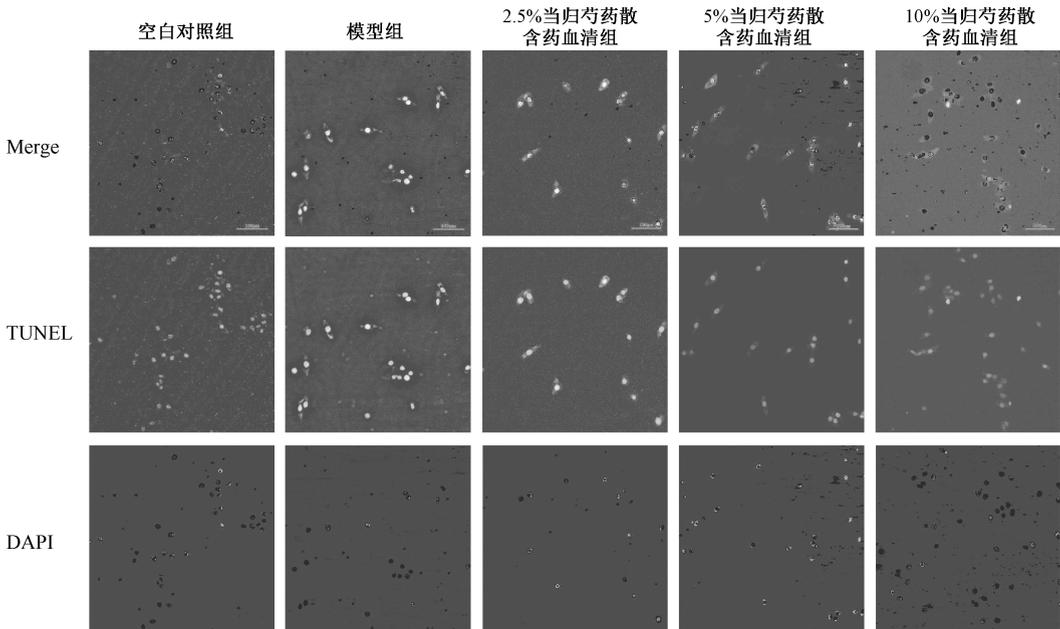


图4 TUNEL染色检测不同浓度当归芍药散含药血清对 $A\beta_{1-42}$ 处理后SH-SY5Y细胞凋亡的影响

Fig. 4 Effect of Danggui Shaoyao Powder medicated serum at different concentrations on the apoptosis of $A\beta_{1-42}$ -induced SH-SY5Y cells using TUNEL

3.4 当归芍药散含药血清对 $A\beta_{1-42}$ 处理的SH-SY5Y细胞周期的影响 流式细胞术检测细胞周期结果显示(表2、图5),与空白对照组比较,模型组SH-SY5Y细胞在10 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{1-42}$ 处理24 h后, G_0/G_1 期细胞数量无变化,S期细胞数量增加 ($P < 0.05$), G_2/M 期细胞数量下降 ($P < 0.05$)。与模型组比较,2.5%当归芍药散含药血清组细胞周期 G_0/G_1 、S、 G_2/M 期均差异无统计学意义;5%、

10%当归芍药散含药血清干预后 G_0/G_1 期细胞数量无变化,S期细胞数量减少 ($P < 0.05$), G_2/M 期细胞数增加 ($P < 0.05$)。提示 $A\beta_{1-42}$ 处理后SH-SY5Y细胞大量进入细胞周期,停滞于S期,细胞周期阻滞;5%、10%当归芍药散含药血清干预后能改善 $A\beta_{1-42}$ 对SH-SY5Y细胞周期的影响。

3.5 当归芍药散含药血清干预后周期蛋白Cyclin D1和凋亡相关蛋白的表达 Western blot结果显示

表2 不同浓度当归芍药散含药血清对 $A\beta_{1-42}$ 处理后 SH-SY5Y 细胞周期的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Tab.2 Effects of Danggui Shaoyao Powder medicated serum at different concentrations on the cell cycle of $A\beta_{1-42}$ -induced SH-SY5Y cells ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	剂量/(mL·L ⁻¹)	细胞周期/%		
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
空白对照组	-	45.15±1.03	28.48±0.85	26.37±0.89
模型组	-	47.25±1.17	33.35±0.83 ^{##}	19.40±0.81 ^{##}
当归芍药散含药血清低剂量组	25	47.39±0.54	32.61±0.69	20.00±1.06
当归芍药散含药血清中剂量组	50	46.83±0.85	29.66±0.49 ^{**}	23.51±0.78 ^{**}
当归芍药散含药血清高剂量组	100	46.93±0.89	29.26±0.58 ^{**}	23.81±0.76 ^{**}

注:与空白对照组比较,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{**} $P<0.01$ 。

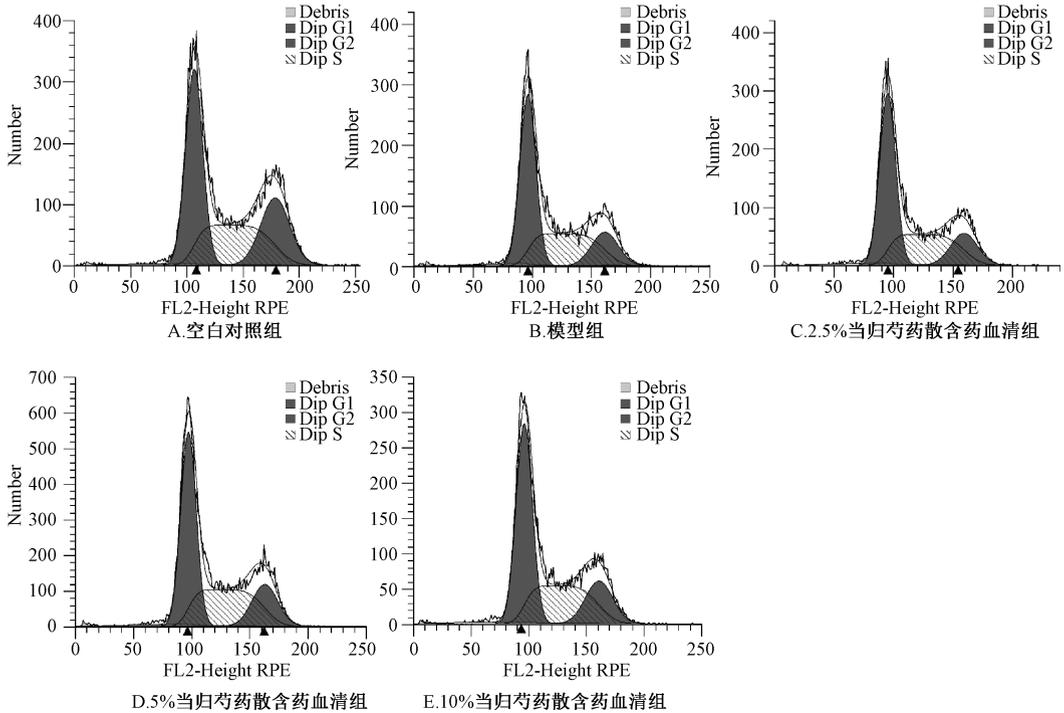


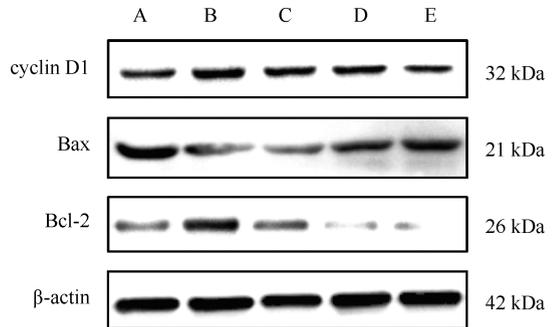
图5 不同浓度当归芍药散含药血清对 $A\beta_{1-42}$ 处理后 SH-SY5Y 细胞周期的影响

Fig.5 Effect of Danggui Shaoyao Powder medicated serum at different concentrations on the cell cycle of $A\beta_{1-42}$ -induced SH-SY5Y cells

(图6、表3),与空白对照组比较, $A\beta_{1-42}$ 处理后周期相关蛋白 Cyclin D1 表达上调 ($P<0.01$),抑制凋亡蛋白 Bcl-2 表达下降,促凋亡蛋白 Bax 表达升高 ($P<0.01$);与模型组比较,5%、10%当归芍药散含药血清干预后 Cyclin D1 蛋白表达降低 ($P<0.05$),Bcl-2 蛋白表达升高 ($P<0.01$),Bax 蛋白表达下降 ($P<0.01$)。

4 讨论

中医学认为痴呆病位在脑,与肝、肾、脾三脏密切相关,肝失疏泄,脾失健运,肾乏气化,分清泌浊失司,酿生痰浊血瘀,痰瘀互结,蒙蔽神明^[17]。中医认为治疗老年痴呆当以养肝补肾为主,当归芍药散方中重用白芍养血调肝,当归充补肝血以补肾精;川芎活血通络,引血上行;白术、茯



注: A~E 分别为空白对照组、模型组、2.5%当归芍药散含药血清组、5%当归芍药散含药血清组、10%当归芍药散含药血清组。

图6 Western blot 检测各组蛋白表达

Fig.6 Detection of the protein expression of each group by Western blot

表3 当归芍药散含药血清对 $A\beta_{1-42}$ 处理后 SH-SY5Y 细胞 Cyclin D1 和凋亡相关蛋白的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Tab.3 Effects of Danggui Shaoyao Powder medicated serum on the apoptosis related proteins and Cyclin D1 of $A\beta_{1-42}$ -induced SH-SY5Y cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/(mL·L ⁻¹)	蛋白相对表达量		
		Cyclin D1	Bax	Bcl-2
空白对照组	-	1.03±0.12	0.98±0.16	1.01±0.20
模型组	-	2.12±0.46 ^{##}	1.86±0.23 ^{##}	0.41±0.12 ^{##}
当归芍药散含药血清低剂量组	25	1.84±0.33	1.55±0.18 [*]	0.33±0.16
当归芍药散含药血清中剂量组	50	1.25±0.27 ^{**}	1.12±0.33 ^{**}	0.74±0.12 ^{**}
当归芍药散含药血清高剂量组	100	1.14±0.25 ^{**}	0.88±0.26 ^{**}	0.86±0.09 ^{**}

注:与空白对照组比较,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$ 。

苓、泽泻健脾利湿,有化痰排浊功效,利于肾浊排出,诸药合用具有滋补肝肾,活血化瘀,化痰通络。上世纪80年代,日本学者首先发现当归芍药散能改善AD患者的运动障碍和认知功能下降^[18],随后国内外许多当归芍药散抗衰老的临床报道和实验室研究资料表明^[19-20],当归芍药散具有抗衰老作用,主要表现为提高学习记忆能力,清除自由基、抗氧化,增强海马神经突触可塑性等^[15],本研究结果表明,当归芍药散能抑制 $A\beta$ 引起细胞周期失调和细胞凋亡,具有神经保护作用。

本研究重点考察当归芍药散通过对 $A\beta$ 所导致的神经元细胞周期再入和细胞凋亡的调控作用,探索中药复方当归芍药散防治神经退行性疾病的作用机制,故采用 $A\beta_{1-42}$ 处理 SH-SY5Y 细胞构建 AD 细胞模型。 G_1/S -特异性周期蛋白-D1 (Cyclin D1),与细胞周期激活和 G_1/S 期进展相关。当细胞进入 S 期后,可 CyclinD1 过表达可使细胞缩小,缩短 G_1 期,加速进入 S 期。 $A\beta$ 使 CyclinD1 水平的增加并使细胞脱离有丝分裂后期,重新进入细胞周期^[21]。而正常的成年神经元细胞不再进入细胞周期(而是停留在 G_0 期),属于永久性的有丝分裂后细胞,神经元细胞周期的异常激活会导致细胞的死亡^[22]。在 AD 患者大脑中,CyclinD1 的积累与细胞周期激活相关,并最终导致细胞的死亡^[23]。同样有研究发现用 $A\beta$ 作用于 SH-SY5Y 后,细胞周期进展不会超过 S 期,并伴随着细胞的凋亡^[24]。此外,CyclinD1 的核定位功能使神经元能保持为终末分化状态,同时它的核入口调节功能在神经元细胞周期退出中起到重要作用^[25]。通过流式细胞术检测细胞周期结果显示, $A\beta_{1-42}$ 处理后,SH-SY5Y 细胞 S 期细胞数量显著增加, G_2/M 期显著减少,表明 $A\beta$ 能促进 SH-SY5Y 细胞进入细胞周期,但大量停留在 S 期而没有进入 G_2/M 期,表现为细胞周期阻滞,并可能进一步诱发细胞凋亡^[26]。当归芍药散含药血清干预后与模型组比较,S 期细胞数

量显著减少, G_2/M 期细胞数量显著增加,提示当归芍药散含药血清干预后能改善 $A\beta_{1-42}$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞周期再进入。课题组推测,可能的机制是由神经元中 $A\beta$ 的刺激,迫使神经元进入细胞周期,然而,细胞周期功能失调阻碍了神经元的成功分裂,或者使它们变得脆弱,导致神经元变性,最终死亡,而当归芍药散能有效的减轻 $A\beta$ 引起的 SH-SY5Y 细胞周期再进入和神经元凋亡。

抗凋亡蛋白 Bcl-2 是线粒体凋亡的中心调控因子并阻止 Bax 和 Bak 的同质寡聚化,在 AD 患者大脑中会出现下调^[27]。Bax 是 Bcl-2 家族的促凋亡蛋白,Bax 的过度表达可拮抗 Bcl-2 的保护效应而使细胞趋于死亡。研究表明 Bax 易位(激活)参与 $A\beta$ 诱导的细胞凋亡过程^[28-29]。Bax/Bcl-2 2 种蛋白之间的比率是决定对细胞凋亡抑制作用强弱的关键因素。研究发现, $A\beta$ 会通过改变线粒体核裂变和核聚变蛋白质促进氧化应激介导的线粒体动力学损伤最终导致 SH-SY5Y 细胞凋亡,并伴随着 Bax/Bcl-2 比率的升高^[30]。同时体内实验发现 $A\beta$ 诱导的神经毒性的大鼠海马区的 Bax mRNA 水平出现上升^[31]。通过 Western blot 对蛋白 Bax 和 Bcl-2 进行检测,结果显示 $A\beta_{1-42}$ 处理后促凋亡蛋白 Bax 表达显著升高,Bax 激活增多,抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达,使其表达显著下降,与模型组比较,当归芍药散含药血清干预后 Bax 蛋白表达出现不同程度下降,对 Bcl-2 蛋白的抑制作用降低,Bcl-2 蛋白的表达出现不同程度升高。说明 $A\beta$ 通过对 Bax/Bcl-2 的调节诱导 SH-SY5Y 细胞凋亡的发生,当归芍药散对 $A\beta$ 诱导的细胞凋亡具有保护作用。

本研究采用 $A\beta_{1-42}$ 处理 SH-SY5Y 细胞构建 AD 细胞模型,给予不同浓度当归芍药散含药血清干预。结果提示当归芍药散能明显减轻 $A\beta_{1-42}$ 引起的 SH-SY5Y 细胞损伤,抑制细胞周期再进入和细胞凋亡,发挥神经保护作用。

参考文献:

- [1] Jia J, Wei C, Chen S, *et al.* The cost of Alzheimer's disease in China and re-estimation of costs worldwide [J]. *Alzheimers Dement*, 2018, 14(4): 483-491.
- [2] Cloutier M, Gauthier-Loiselle M, Gagnon-Sanschagrin P, *et al.* Institutionalization risk and costs associated with agitation in Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Dement (N Y)*, 2019, 5: 851-861.
- [3] Sherrington R, Rogaev E I, Liang Y, *et al.* Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease [J]. *Nature*, 1995, 375(6534): 754-760.
- [4] Reiman E M. Alzheimer's disease: attack on amyloid- β protein [J]. *Nature*, 2016, 537(7618): 36-37.
- [5] Giovanni A, Wirtz-Brugger F, Keramaris E, *et al.* Involvement of cell cycle elements, cyclin-dependent kinases, pRb, and E2F x DP, in *B*-amyloid-induced neuronal death [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(27): 19011-19016.
- [6] Chao A C, Chen C H, Chang S H, *et al.* Id1 and sonic hedgehog mediate cell cycle reentry and apoptosis induced by amyloid β -peptide in post-mitotic cortical neurons [J]. *Mol Neurobiol*, 2019, 56(1): 465-489.
- [7] Chen K, Lu Y, Liu C, *et al.* Morroniside prevents H_2O_2 or $A\beta_{1-42}$ -induced apoptosis via attenuating JNK and p38 MAPK phosphorylation [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 834: 295-304.
- [8] Manickam V, Dhakshinamoorthy V, Perumal E. Iron oxide nanoparticles induces cell cycle-dependent neuronal apoptosis in mice [J]. *J Mol Neurosci*, 2018, 64(3): 352-362.
- [9] Park D S, Morris E J, Bremner R, *et al.* Involvement of retinoblastoma family members and E2F/DP complexes in the death of neurons evoked by DNA damage [J]. *J Neurosci*, 2000, 20(9): 3104-3114.
- [10] Chen M J, Ng J M, Peng Z F, *et al.* Gene profiling identifies commonalities in neuronal pathways in excitotoxicity: evidence favouring cell cycle re-activation in concert with oxidative stress [J]. *Neurochem Int*, 2013, 62(5): 719-730.
- [11] 赵庆新, 胡优红, 卢燕许, 等. 当归芍药散治疗老年性痴呆 42 例 [J]. *中医研究*, 2000, 13(5): 56-57.
- [12] 刘孟渊, 王达平, 刘玉平, 等. 加味当归芍药散治疗老年性痴呆的疗效观察 [J]. *广州中医药大学学报*, 2001, 18(1): 30-33.
- [13] 余婧萍, 贺春香, 成绍武, 等. 当归芍药散通过调控 NF- κ B 炎性通路改善 H_2O_2 诱导的 SH-SY5Y 细胞氧化损伤的作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(10): 1-7.
- [14] 宋祯彦, 陈易璇, 余婧萍, 等. 当归芍药散活性成分治疗阿尔茨海默病作用机制的生物网络分析 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2018, 20(6): 834-846.
- [15] Fu X, Wang Q, Wang Z, *et al.* Danggui-Shaoyao-San: new hope for Alzheimer's disease [J]. *Aging Dis*, 2016, 7(4): 502-513.
- [16] 宋祯彦, 余婧萍, 贺春香, 等. 不同阶段阿尔茨海默病患者海马 CA1 区基因表达的生物信息学分析 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2019, 21(9): 1791-1798.
- [17] 黄智超, 杨芳艳. 当归芍药散近 10 年研究综述 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2015, 17(8): 213-215.
- [18] Enomoto K, Higashida H, Maeno T. Effects of toki-shakuyakusan (Tsumura TJ-23) on electrical activity in neuroblastoma cells and frog neuromuscular junctions [J]. *Neurosci Res*, 1992, 15(1-2): 81-89.
- [19] 高德义, 黄贾生, 何宏文. 当归芍药散治疗老年性痴呆 36 例临床研究 [J]. *中国全科医学*, 2004, 7(11): 782-783.
- [20] 叶玉红. 当归芍药散治疗老年性痴呆的临床分析 [J]. *北方药学*, 2016, 13(2): 100-101.
- [21] Tsai M C, Lin S H, Hidayah K, *et al.* Equol pretreatment protection of SH-SY5Y cells against $A\beta$ (25-35) -induced cytotoxicity and cell-cycle reentry via sustaining estrogen receptor alpha expression [J]. *Nutrients*, 2019, 11(10): 2356-2368.
- [22] Herrup K. The involvement of cell cycle events in the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Res Ther*, 2010, 2(3): 13.
- [23] Malik B, Currais A, Andres A, *et al.* Loss of neuronal cell cycle control as a mechanism of neurodegeneration in the presenilin-1 Alzheimer's disease brain [J]. *Cell Cycle*, 2008, 7(5): 637-646.
- [24] Frasca G, Chiechio S, Vancheri C, *et al.* β -amyloid-activated cell cycle in SH-SY5Y neuroblastoma cells: correlation with the MAP kinase pathway [J]. *J Mol Neurosci*, 2004, 22(3): 231-236.
- [25] 谢朝阳, 祝其锋. 细胞周期调控与阿尔茨海默病的研究进展 [J]. *中国老年学杂志*, 2004, 24(4): 379-381.
- [26] Luo H, Hu J, Wang Y, *et al.* *In vivo* and *in vitro* neuroprotective effects of *Panax ginseng* glycoproteins [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 113: 607-615.
- [27] Satou T, Cummings B J, Cotman C W. Immunoreactivity for Bcl-2 protein within neurons in the Alzheimer's disease brain increases with disease severity [J]. *Brain Res*, 1995, 697(1): 35-43.
- [28] Zhang H, Wu S, Xing D. YAP accelerates $A\beta_{25-35}$ -induced apoptosis through upregulation of Bax expression by interaction with p73 [J]. *Apoptosis*, 2011, 16(8): 808-821.
- [29] Oseki K T, Monteforte P T, Pereira G J, *et al.* Apoptosis induced by $A\beta_{25-35}$ peptide is Ca^{2+} -IP3 signaling-dependent in murine astrocytes [J]. *Eur J Neurosci*, 2014, 40(3): 2471-2478.
- [30] Ahmed M E, Selvakumar G P, Kempuraj D, *et al.* Synergy in disruption of mitochondrial dynamics by $A\beta$ (1-42) and Glia Maturation Factor (GMF) in SH-SY5Y cells is mediated through alterations in fission and fusion proteins [J]. *Mol Neurobiol*, 2019, 56(10): 6964-6975.
- [31] Yalcin A, Soddu E, Turunc Bayrakdar E, *et al.* Neuroprotective effects of engineered polymeric nasal microspheres containing hydroxypropyl- β -cyclodextrin on β -amyloid (1-42) -induced toxicity [J]. *J Pharm Sci*, 2016, 105(8): 2372-2380.