



救脑益智方剂水提液对人神经母细胞瘤株 SH-SY5Y 细胞的保护作用

张景燕¹, 张静爽¹, 曹子青², 赵志炜¹, 张旭¹, 吴燕川¹, 王玉兰¹, 王蓉¹

(1. 首都医科大学宣武医院中心实验室, 北京脑重大疾病研究院阿尔茨海默病研究所,
神经变性病教育部重点实验室, 北京 100053; 2. 北京京师中医医院, 北京 100026)

【摘要】 目的 通过观察复方中药救脑益智方剂水提液对人神经母细胞瘤株 SH-SY5Y 细胞生长以及胰岛素信号通路的影响, 探讨其对神经细胞保护作用的机制。**方法** 体外培养 SH-SY5Y 细胞, 分为对照组 (C 组)、救脑益智 1 号方组和 3 号方组, 每组药物剂量分别为 0.0625 mg/mL、0.125 mg/mL、0.25 mg/mL、0.5 mg/mL 和 1 mg/mL, 测定各组细胞的噻唑蓝 (MTT) 代谢率, 选定 0.125 mg/mL 进行细胞免疫荧光染色, 观察细胞形态和胰岛素受体底物-1 (IRS-1)、cAMP 反应元件结合蛋白 (CREB) 表达的变化。**结果** 与对照组相比, 救脑益智组 MTT 代谢率升高 ($P < 0.05$), 细胞形态好, 表现为细胞胞体饱满、贴壁良好、突起延长, IRS-1 和 CREB 表达增加。**结论** 复方中药救脑益智水提液能促进神经细胞生长, 提高神经元胰岛素信号通路相关因子 IRS-1 和 CREB 表达, 推测其神经保护作用机制与胰岛素信号通路有关。

【关键词】 阿尔茨海默病; 复方中药, 救脑益智方剂; 人神经母细胞瘤株 SH-SY5Y

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2015) 04-0058-03

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.004.011

Protective effect of the traditional Chinese medicine prescription, Jiu Nao Yi Zhi water extract, on human neuroblastoma SH-SY5Y cell line

ZHANG Jing-yan¹, ZHANG Jing-shuang¹, CAO Zi-qing², ZHAO Zhi-wei¹,
ZHANG Xu¹, WU Yan-chuan¹, WANG Yu-lan¹, WANG Rong¹

(1. Central Laboratory, Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Key Laboratory for Neurodegenerative Diseases of Ministry of Education, Center of Alzheimer's Disease, Beijing Institute for Brain Disorders, Beijing 100053, China; 2. Beijing Municipal Chinese Medicine Hospital, Beijing 100026, China)

【Abstract】 Objective To observe the protective effect of the traditional Chinese medicine prescription, Jiu Nao Yi Zhi water extract, on human neuroblastoma SH-SY5Y cell line, its effect on expression of insulin signal transduction pathway, and to explore the related mechanisms. **Methods** SH-SY5Y cells cultured in vitro, were divided into control group, Jiu Nao Yi Zhi No. 1 prescription group and No. 3 prescription group. The doses were 0.0625 mg/mL, 0.125 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL and 1 mg/mL. The thiazolyl blue (MTT) metabolic rate of each group was determined.

【基金项目】 北京市自然科学基金 (7132044); 首都卫生发展科研专项项目 (2011-1001-02); 北京市卫生系统高层次卫生技术人才计划资助项目 (2009-3-64)。

【作者简介】 张景燕, 女, 主管技师, 研究方向: 细胞生物学, E-mail: 908436005@qq.com。

【通讯作者】 王蓉, 女, 研究员, 博士研究生导师, 研究方向: 神经元退行性变的发生机制和防治策略。E-mail: rong_wang72@aliyun.com。

The dose of 0.125 mg/mL was chosen for cell immunofluorescence analysis, and to observe the expression of insulin receptor substrates-1 (IRS-1), cAMP response element binding protein (CREB), and the factors of insulin signal transduction pathway. **Results** Compared with the control group, MTT metabolic rates of the Jiu Nao Yi Zhi groups were significantly increased ($P < 0.05$), and the cell morphology was much better in those groups, cell body more plump, well-adherent and neurite extensions were observed. The expressions of IRS-1 and CREB were higher than that in the control group. **Conclusions** The traditional Chinese medicine prescription Jiu Nao Yi Zhi water extract can protect neurons by promoting nerve cell growth, and improving the expression of IRS-1 and CREB, the factors of insulin signal transduction pathway.

【Key words】 Alzheimer's disease; Traditional Chinese medicine prescription, Jiu Nao Yi Zhi; Human neuroblastoma, cell line SH-SY5Y; Neuroprotection

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD, 又称老年性痴呆) 是以认知功能障碍为主要表现的、渐进性加重的神经系统变性病, 临床上 80% 以上的患者属于病因不清、发病机制不明的散发性 AD, 由于缺乏有效的早期诊断和治疗措施, AD 已经成为继心脑血管疾病和恶性肿瘤之后威胁人类健康的第四大杀手^[1-3]。AD 的发病机制十分复杂, 近年来, 脑内神经元胰岛素信号通路障碍在 AD 发生发展中的作用越来越引起学者们的关注^[4-6]。

救脑益智胶囊的主要成分有生黄芪、党参、白术、龟甲、穿山甲、肉苁蓉等, 具有益气养血、滋补肝肾、化痰祛瘀、健脑益智功效, 在临床上对一些脑萎缩病人有较好的治疗作用^[7]。以往研究发现救脑益智胶囊能促进神经元胞体增大和突起延长^[8], 并能促进 SY5Y 神经母细胞存活信号通路中 Akt/PKB, P-CREB 的表达^[9]。本研究拟通过观察救脑益智胶囊的改良配方 (1 号方和 3 号方) 方剂水提液对人神经母细胞瘤株 SH-SY5Y 细胞生长以及胰岛素信号通路的影响, 探讨其对神经细胞保护作用的机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株: 人神经母细胞瘤株 SH-SY5Y 细胞来自瑞典卡罗琳斯卡医学院。

1.1.2 药品与试剂: 救脑益智水提液由救脑益智胶囊制成 (胶囊主要成分包括黄芪、党参、肉苁蓉、龟板、当归、白芍等 20 余味中草药, 形态为粉剂, 使用前用电子天平称重, 然后加蒸馏水煮沸 15 min, 离心取出上清液, 再向沉淀物中加入蒸馏水煮沸 15 min, 离心取出上清液, 将两次取出的上清液混合, 浓度调整为 1 g 生药/3 mL, 即若蒸馏 100 g 生药将得到 300 mL 水提液)。MTT (噻唑蓝, 3-[4, 5-

dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium broide) 系 Sigma 产品。二甲基亚砜 (DMSO) 系北京亚太精细化工公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养: 使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 3 d 换液 1 次, 6 d 传代 1 次。

1.2.2 测定 MTT 代谢率: 将生长状态良好、传代稳定的 SH-SY5Y 细胞以 1×10^4 /mL 的密度接种于 96 孔板 (Nunc 产品) 中, 每孔各加 200 μ L, 培养 48 h 后分为 3 组: 对照组、救脑益智 1 号方组 (主要成分包括黄芪、党参、补骨脂等) 和 3 号方组 (主要成分包括人参、益智仁、鹿角等), 进行后续实验。各药物组所加相应药物的浓度分别为 0.0625 mg/mL、0.125 mg/mL、0.25 mg/mL、0.5 mg/mL 和 1 mg/mL, 各组培养液体积和接种细胞数相等。继续培养 24 h 后加 MTT 溶液 (5 mg/mL) 20 μ L/孔, 于 37℃ 孵育 4 h 后吸出培养液, 再加 DMSO 溶液 200 μ L/孔, 振荡 10 min 后用全波长酶标仪 (Multiskan Spectrum) 测定 550 nm 处吸光度值 (A)。

1.2.3 细胞免疫荧光染色: 将 SH-SY5Y 细胞以 1×10^4 /mL 的密度接种于 24 孔板中, 每孔各加 1 mL, 于培养箱中培养 48 h 后分为以上 3 组进行后续实验, 根据 MTT 结果选用 0.125 mg/mL 药物剂量作用细胞 24 h, 然后吸弃培养液, 用 PBS 漂洗 1 次, 加入 4% 多聚甲醛固定 30 min, 10% 山羊血清封闭 1 h, 加入一抗 (IRS-1 抗体、CREB 抗体, 1:100) 于 4℃ 孵育过夜, 用 PBS 漂洗后加相应二抗 (1:200) 孵育 1 h, PBS 漂洗后于荧光倒置显微镜下观察并采集影像。

1.3 统计学方法

使用 SPSS 17.0 软件进行统计, 计量资料采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多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。

2 结果

2.1 MTT 代谢率测定

MTT 检测结果显示,救脑益智 1 号方组和 3 号方组的 SH-SY5Y 细胞 MTT 代谢率升高,线粒体活性增强,与对照组相比, $P < 0.05$,差异有统计学意义(表 1)。

表 1 救脑益智 1 号方组和 3 号方组对 SH-SY5Y 细胞 MTT 代谢率的影响

Tab.1 Effect of Jiu Nao Yi Zhi No. 1 or No. 3 prescription on the metabolic rate in SH-SY5Y cells

组别 Groups(mg/mL) ▲	噻唑蓝 MTT	
	救脑益智 1 号方组	救脑益智 3 号方组
对照组 Control	0.517 ± 0.005	0.738 ± 0.025
0.0625 剂量组	0.505 ± 0.008 **	0.771 ± 0.012 **
0.125 剂量组	0.484 ± 0.006 **	0.770 ± 0.014 **
0.25 剂量组	0.475 ± 0.005 **	0.779 ± 0.015 **
0.5 剂量组	0.472 ± 0.006 **	0.774 ± 0.016 **
1.0 剂量组	0.443 ± 0.007 **	0.772 ± 0.014 **

$n = 30$ for each group; ** $P < 0.01$ vs. control group.

2.2 细胞免疫荧光染色

从细胞形态上看,救脑益智 1 号方和 3 号方的细胞形态相对好,细胞胞体饱满、贴壁良好、突起延长;另外,与对照组相比,1 号方和 3 号方的细胞中 IRS-1 和 CREB 表达增加。各组 SH-SY5Y 细胞的形态及 CREB、IRS-1 的表达情况分别见图 1、图 2(图 1,2 见文后彩插 5)。

3 讨论

救脑益智胶囊的主要成分有生黄芪、党参、白术、肉苁蓉等,具有益气养血、滋补肝肾、化痰祛瘀、健脑益智功效,可用于气血肝肾亏虚、痰瘀阻滞引起的健忘不寐,神情呆滞,眩晕耳鸣,言语蹇涩,肢体痿软,步履艰难等症候者^[7]。我们曾经研究发现,救脑益智提取液能促进体外培养的人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)生长,推测其机理可能与其促进神经元信号通路中有关蛋白质的表达有关^[9],此后我们一直在研究与之相关的蛋白质及其作用途径。

本研究结果表明,救脑益智水提液能促进 SH-SY5Y 细胞胞体体积的增大和突起的延长,并能提高 MTT 代谢率。MTT 是琥珀酸脱氢酶的作用底物,活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使其还原为不溶于水的蓝紫色结晶甲瓞并沉积在细胞中,而死细胞无此功能。DMSO 溶解细胞中的甲瓞,用全波长酶标仪在 550 nm 波长处测定其光吸收值,可间接反

映活细胞数量。MTT 值越大,代表活细胞数目越多。

众所周知,神经元可通过多条途径使自身存活,而 IRS-PI3K/Akt-BAD-CREB 途径即是其主要途径之一,IRS 磷酸化后激活 PI3K/Akt,最终使 CREB 磷酸化,从而使神经元存活。本室以往的研究结果表明救脑益智胶囊水提液能提高使 SH-SY5Y 细胞存活的 PI3K 信号通路中 Akt 和 p-CREB 的表达水平,而 Akt 表达增加可促进 CREB 磷酸化增加,即与本室得出的研究结果 p-CREB 表达增加一致,而 SY5Y 细胞的存活一方面依赖于 p-CREB 表达水平的提高^[9]。本研究结果表明,救脑益智方剂水提液也可使 IRS-1、CREB 表达增加,由此可以推断救脑益智方剂水提液中含有某些神经营养成分,而且可以通过影响胰岛素信号通路中蛋白的表达水平,而发挥保护神经细胞并促进其生长的作用。但是体外实验有效不等于药物在体内也有效,因此仍需进行充分的体内试验。

参考文献:

- [1] Kalaria RN, Maestre GE, Arizaga R, et al. Alzheimer's disease and vascular dementia in developing countries: prevalence, management, and risk factors [J]. *Lancet Neurol*, 2008, 7(9):812-826.
- [2] Miller G. Epigenetics. A role for epigenetics in cognition [J]. *Science*, 2010, 329(5987): 27-31.
- [3] Guo M, Gao L, Zhang G, et al. Prevalence of dementia and mild cognitive impairment in the elderly living in nursing and veteran care homes in Xi'an, China [J]. *J Neurosci*, 2012, 312(1): 39-44.
- [4] De Felice FG. Alzheimer's disease and insulin resistance: translating basic science into clinical applications [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(2): 531-539.
- [5] Candeias E, Duarte AI, Carvalho C, et al. The impairment of insulin signaling in Alzheimer's disease [J]. *IUBMB Life*, 2012, 64(12): 951-957.
- [6] Giuffrida ML, Tomasello F, Caraci F, et al. Beta-amyloid monomer and insulin/IGF-1 signaling in Alzheimer's disease [J]. *Mol Neurobiol*, 2012, 46(3): 605-613.
- [7] 曹润敏,王仁,曹子青. 救脑益智胶囊治疗脑萎缩临床观察 [J]. *北京中医*, 2000, 5: 61.
- [8] 张景燕,孟艳,赵志炜,等. 救脑益智胶囊对人神经母细胞瘤株 SY5Y 生长的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2002, 22: 82-83.
- [9] 孟艳,张景燕,王蓉,等. 救脑益智胶囊水提物对人神经母细胞瘤株 SY5Y 信号转导的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2003, 28(11): 1076-1077.

[修回日期]2015-02-10