

## ◆实验研究论著◆

## 复方丹参片对阿尔茨海默病转基因细胞模型 AChE 表达的影响

周德生<sup>1</sup>, 刘利娟<sup>2</sup>, 胡华<sup>1</sup>, 陈瑶<sup>1</sup>, 孙晓鹏<sup>1</sup>, 覃仁安<sup>3</sup>

1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007
2. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208
3. 广州白云山和记黄埔中药有限公司现代中药研究院, 广东 广州 510515

**[摘要]** 目的: 研究复方丹参片对阿尔茨海默病(AD)转基因细胞模型乙酰胆碱酯酶(AChE)表达的影响。方法: 将SD大鼠60只随机分成复方丹参片0.5、1、2、4倍剂量组, 空白对照组及多奈哌齐对照组。各组大鼠分别灌服相应浓度药液, 空白对照组给予等容积生理盐水, 每天1次, 连续7天。末次给药后1h, 取各组大鼠含药血清培养AD转基因细胞, 于24、48、72h采用Western Blot方法分析AD转基因细胞AChE的表达。结果: 与空白对照组比较, 24、48h时2、4倍复方丹参片组AChE表达明显降低, 差异有非常显著性意义( $P < 0.01$ ), 72h时差异无显著性意义( $P > 0.05$ ); 2、4倍复方丹参片组组内48h与24h比较, AChE表达降低, 差异有非常显著性意义( $P < 0.01$ )。结论: 复方丹参片能在一定程度上减少AD转基因细胞模型AChE的表达。

**[关键词]** 复方丹参片; 乙酰胆碱酯酶; 阿尔茨海默病(AD); 转基因细胞模型

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0256-7415(2014)11-0199-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2014.11.079

## Effect of Compound *Danshen* Tablets on Expression of AChE in Alzheimer's Disease Transgenic Cell Model

ZHOU Desheng, LIU Lijuan, HU Hua, et al

**Abstract:** Objective: To study the effect of compound *Danshen* tablets(CDT)on the expression of acetylcholinesterase (AChE) in Alzheimer's Disease(AD) transgenic cell model. Methods: Sixty SD rats were randomly divided into 6 groups, namely 0.5- fold, 1- fold, 2- fold, 4- fold CDT groups, blank control group and donepezil group. Rats in the medication groups were respectively given relevant concentrations of drugs, and the blank group was given same volume of normal saline, once a day, for 7 consecutive days. One hour after the last administration, serum containing medicine from each group was prepared to cultivate the AD transgenic cells. The levels of AChE protein were detected by Western blotting method after culturing for 24 h, 48 h, and 72 h. Results: Compared with the blank control group, the expression level of AChE was decreased in 2- fold and 4- fold CDT groups on culturing hour 24 and 48 ( $P < 0.01$ ), while difference was insignificant on culturing hour 72( $P > 0.05$ ). The intra-group difference of AChE level in 2- fold and 4- fold CDT groups was significant on culturing hour 24 and 48 respectively( $P < 0.01$ ). Conclusion: Compound *Danshen* tablets can down-regulate the level of AChE in AD transgenic cell model to some degrees.

**Keywords:** Compound *Danshen* tablets; Acetylcholinesterase(AChE); Alzheimer's Disease(AD); Transgenic cell

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)影响大脑记忆、认知功能区域, 导致记忆力、学习能力下降、思维和沟通能力

障碍以及日常生活自理能力降低, 是老年痴呆最常见类型。AD主要病理学改变为 蛋白聚合物如过度磷酸化的微管相关

**[收稿日期]** 2014-04-23

**[基金项目]** 重大新药创制国家科技重大专项项目(编号: 2011X09201-201-01); 湖南省自然科学基金项目(编号: 14JJ6038); 湖南省科学技术厅科技计划资助项目(编号: 2014SK3037)

**[作者简介]** 周德生(1965-), 男, 教授, 研究方向: 中医药防治神经系统疾病研究。

**[通讯作者]** 刘利娟, E-mail: 2478020529@qq.com。

蛋白组成神经纤维缠结<sup>[1]</sup>；由嗜银神经轴索突起包绕  $\beta$  淀粉样变性而形成的神经炎性斑；大脑基底部胆碱能神经元的慢性、进行性缺失并伴有乙酰胆碱神经递质缺失及敏感性降低<sup>[2-3]</sup>。淀粉样前体蛋白(Amyloid precursor protein, APP)是 AD 发病的一种关键蛋白<sup>[4]</sup>, APP 可被  $\beta$ -、 $\gamma$ -蛋白酶连续作用分解产生  $\beta$ -淀粉样蛋白(amyloid  $\beta$ -proteina, A $\beta$ )。A $\beta$  可导致脑内老年斑形成和神经细胞凋亡,是导致 AD 的重要因素。乙酰胆碱酯酶(Acetylcholinesterase, AChE)可将乙酰胆碱水解,降低突触后膜对神经递质敏感性<sup>[5]</sup>;同时 AChE 可促进 A $\beta$  纤维状沉积<sup>[6]</sup>,引发或加重 AD。前期关于复方丹参片治疗 AD 的研究显示,复方丹参片可抑制 AD 转基因细胞模型 APP-mRNA 表达,减少该模型 A $\beta$  生成<sup>[7-8]</sup>。为此可假设复方丹参片可通过影响 AChE 的活性对 AD 产生影响。所以本实验应用 APP 转基因细胞模型复制 AD 模型,采用复方丹参片含药血清干预,观察 AChE 表达及与前期试验中 A $\beta$  的相关性,为中医药防治 AD 进一步提供科学依据。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级 SD 大鼠 60 只,由湖南中医药大学实验动物中心提供,动物许可证号:SCXK(湘)2009-0004,体重 200~250 g,雌雄不拘。

### 1.2 实验方法

1.2.1 细胞复苏 将前期实验参照 Feng L 等<sup>[9]</sup>构建方法构建成功的 AD 转基因细胞模型(美国 Pittsburgh 大学 Perez 博士惠赠,湘雅医学院冯莉博士转赠的 pcDNA3.1/APP595/596 并列突变质粒,稳定转染入人胚肾 HEK293 细胞)冷冻管迅速由液氮转入 37℃水浴箱中,完全解冻后进行细胞培养。

1.2.2 细胞培养 AD 细胞培养于含 10%胎牛血清高糖 DMEM 培养基中,在 37℃、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度下培养,0.25%胰酶消化传代。细胞呈上皮样贴壁生长,取对数生长期细胞用于实验。

1.2.3 含药血清制备 以体重为指标按随机法分为空白对照组和 0.5 倍复方丹参片组、1 倍复方丹参片组、2 倍复方丹参片组、4 倍复方丹参片组、多奈哌齐对照组,共 6 组,每组 10 只大鼠,分别制备对照和含药血清。含药组灌服相应含药溶液 1 mL/100 g,空白对照组灌服等容积生理盐水。剂量根据成人每天临床用量按人与动物之间药物剂量换算而成,即大鼠每天复方丹参片药量为 315.0 mg/kg,多奈哌齐作为阳性对照用药,药量为 5.8 mg/kg。复方丹参片按 0.5 倍、1 倍、2 倍、4 倍剂量喂养,多奈哌齐按 1 倍剂量喂养。每天 1 次,连续 7 天。末次给药后 1 h,在无菌条件下腹主动脉取血,分离血清,过滤除菌,分装,-20℃保存备用。

1.2.4 含药血清培养 AD 细胞模型 将 AD 转基因细胞模型铺板,以  $1 \times 10^5$ /mL 密度,每孔 2 mL 铺六孔板。待细胞的融合率为 85%~90%时,分别添加空白血清及含药血清,添加前,先以无血清的 DMEM 洗细胞 2 次。每次 5 个

复孔,重复 3 次。

1.2.5 Western Blot 法检测 AChE 的表达 各剂量组在培养 24、48、72 h 时分别收集细胞,提取细胞总蛋白后 -80℃保存;严格按说明书进行 AChE 蛋白表达的检测。

1.3 药物 复方丹参片,0.32 g/片(相当于饮片 0.6 g),广州白云山和记黄埔中药有限公司,生产批号:COA002。盐酸多奈哌齐片,每片 5 mg,陕西方舟制药有限公司,生产批号:100801053。

1.4 主要实验试剂及仪器 AChE(1:200,Proteintech 公司),辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)(1:5000,碧云天公司),Western Blot 检测发光试剂盒(Millipore 公司)聚偏二氟乙烯膜(PVDF 膜, Pall Gelman Laboratory 公司),蛋白 Marker(Fermentas 公司),ImageQuant350 化学发光成像仪(美国 GE 公司)。

1.5 统计学方法 采用相对量(即目标带灰密度值/ $\beta$ -actin 灰密度值  $\times 100\%$ )作为统计数据。所有数据使用 SPSS16.0 软件进行处理,计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,所有资料进行正态性、方差齐性检验,检验符合正态分布、方差齐时采用单因素方差分析(One-way ANOVA),用 LSD 法,方差不齐时用 Dunnett's T3 法;不符合正态分布,多组比较时采用 Kruskal-Wallis 检验。

## 2 实验结果

2.1 各组 AD 转基因细胞药物作用后 AChE 灰度扫描比值变化比较 见表 1。与空白对照组比较:0.5、1 倍复方丹参片组在 24、48、72 h 时间点无差异( $P > 0.05$ );2、4 倍复方丹参片组 24、48 h AChE 表达量明显降低( $P < 0.01$ ),72 h 无差异( $P > 0.05$ );多奈哌齐对照组在 24、48 h、72 h 时间点均有差异( $P < 0.01$ )。多奈哌齐对照组与各给药组比较:24、72 h 时与各复方丹参片组比较,差异有非常显著性意义( $P < 0.01$ );48 h 与 0.5、1 倍复方丹参片组比较,差异有非常显著性意义( $P < 0.01$ ),与 2、4 倍复方丹参片组比较无差异( $P > 0.05$ )。多奈哌齐组组内比较:48 h 与 24 h 比较无差异( $P > 0.05$ ),24、48 h 与 72 h 相比,差异均有非常显著性意义( $P < 0.01$ )。复方丹参片各组组内及组间比较:0.5、1 倍复方丹参片组各时间点组内及组间比较均无显著性意义( $P > 0.05$ );2、4 倍复方丹参片组组内比较,48 h 与 24 h 相比 AChE 表达量降低( $P < 0.01$ ),24、48 h 与 72 h 比较,差异有显著性意义( $P < 0.05$ );2、4 倍复方丹参片组组间比较,在 24 h 时 4 倍复方丹参片组 AChE 表达量较 2 倍复方丹参片组降低( $P < 0.05$ ),48、72 h 时无差异( $P > 0.05$ )。2、4 倍剂量组与 0.5、1 倍复方丹参片组组间比较:在 24、48 h 时间点有显著性意义( $P < 0.05$ )。

2.2 各组不同时间 AChE 表达量 Western Blot 条带电泳图见图 1。

## 3 讨论

中枢胆碱能神经系统与学习、记忆等密切相关,乙酰胆碱

表 1 各组 AD 转基因细胞药物作用后 AChE 灰度扫描比值变化比较( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	AChE 表达时间		
	24 h	48 h	72 h
空白对照组	0.906 ± 0.042	0.891 ± 0.047	0.879 ± 0.035
0.5 倍复方丹参片组	0.898 ± 0.034	0.880 ± 0.057	0.876 ± 0.027
1 倍复方丹参片组	0.883 ± 0.049	0.866 ± 0.054	0.874 ± 0.041
2 倍复方丹参片组	0.797 ± 0.032	0.646 ± 0.032	0.871 ± 0.044
4 倍复方丹参片组	0.741 ± 0.022	0.639 ± 0.039	0.870 ± 0.032
多奈哌齐对照组	0.656 ± 0.039	0.604 ± 0.051	0.753 ± 0.034

与同时间空白对照组比较, ① $P < 0.01$ ; 与多奈哌齐对照组同时间比较, ② $P < 0.05$ ; 与多奈哌齐组 72 h 比较, ③ $P < 0.01$ ; 与同组复方丹参片 48 h 比较, ④ $P < 0.01$ ; 与同组复方丹参片 72 h 比较, ⑤ $P < 0.01$ ; 与 2 倍复方丹参片组 24 h 比较, ⑥ $P < 0.05$ ; 与 0.5 倍复方丹参片组、1 倍复方丹参片组同时间比较, ⑦ $P < 0.05$

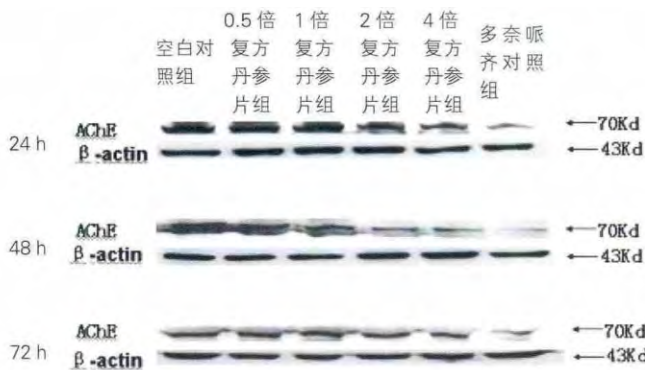


图 1 各组不同时间 AChE 表达量 Western Blot 条带电泳图

(Acetylcholine, ACh)是该系统中重要的神经递质。AD 患者脑组织中 AChE 含量及活性显著升高<sup>[10]</sup>, 使 ACh 水解量增加, 含量下降, 导致大脑功能受损、学习和认知能力下降甚至智力丧失。目前临床上常用于治疗 AD 的西药如多奈哌齐<sup>[11]</sup>即为 AChE 抑制剂, 其效果已受到医师和患者认可, 故选为本实验对照药。研究表明脑基底部胆碱能神经递质的传递、APP 代谢及 Aβ 炎性斑介导神经胶质细胞激活的炎症因子之间存在密切关系, AChE 可以促进 Aβ 纤维状沉积<sup>[6]</sup>; 但 AChE 与 Aβ 相互影响<sup>[12-13]</sup>, 即 Aβ 可以调控 AChE 的表达、聚集、糖基化, 而 AChE 又可促进 Aβ 形成沉积, 形成恶性循环, 使 AD 加重。故能使 Aβ 减少的药物, 在一定程度上亦可使 AChE 表达下降; 而 AChE 抑制剂在某种程度上亦可使 Aβ 减少。

复方丹参片前期试验研究表明, 其可使 AD 模型大鼠脑内 APP 表达减少<sup>[14]</sup>, 并使 AD 转基因细胞模型中 Aβ 生成降低<sup>[6]</sup>。覃仁安等<sup>[15]</sup>亦证实复方丹参片可提高 AD 大鼠模型学习记忆功能; 并可改善全脑缺血再灌注小鼠的学习记忆能力, 对血管性痴呆有保护作用<sup>[16]</sup>。谢明等<sup>[17]</sup>研究显示, 丹参酮对 Aβ1-42 诱导大鼠的学习记忆功能障碍有明显改善作用, 其机制可能与保

护 AD 样大鼠脑内胆碱能神经系统有关。那么复方丹参片是否能通过降低 AChE 的表达, 使 AD 症状减轻, 本实验即以此作为着眼点进行研究。

本实验发现, 在复方丹参片培养 AD 转基因细胞模型 24 h 时, 除 0.5、1 倍复方丹参片组外, 其余各组均能降低 AChE 表达, 与空白对照组有差异( $P < 0.01$ ); 在 48 h 时, 2、4 倍复方丹参片组继续降低 AChE 水平, 与空白对照组比较有差异( $P < 0.01$ ), 同时横向与 24 h 比较亦有明显差异( $P < 0.01$ ), 2、4 倍复方丹参片组间比较则无明显差异( $P > 0.05$ ); 72 h 时各复方丹参片组中 AChE 水平与空白对照组比较均无差异( $P > 0.05$ )。在 48 h, 2、4 倍复方丹参片组与多奈哌齐对照组 AChE 表达量的降低程度相近( $P > 0.05$ )。通过上述研究结果显示, 2、4 倍复方丹参片组可有效抑制 AChE 表达, 并在一定时间范围内随时间延长, 疗效逐渐增加, 在 48 h 时与多奈哌齐效果相似。但到 72 h 时, 复方丹参片对 AChE 的抑制作用几乎消失, 考虑与药物有效浓度及细胞对药物代谢有关。即当药物达到有效浓度时, 能够抑制 AChE 的生成, 并随时间的推移达到最佳的抑制程度, 但随着细胞对药物的代谢, 其作用逐渐降低。

复方丹参片由丹参、三七、冰片 3 味中药组成, 相关药理表明, 丹参有效成分丹参酮可抑制 AChE 活性, 减少 AChE 生成, 对 AD 大鼠脑内胆碱能系统有明显保护作用<sup>[18]</sup>。H.Q. Lin 等<sup>[19]</sup>研究显示丹参的乙醇及水提取物均具有较强的 AChE 抑制作用, 并且呈现出剂量依赖性。三七活性成分(PNF)能下调 AChE 水平, 升高海马内 ACh 含量<sup>[20]</sup>; 冰片透过血脑屏障同时有促透作用<sup>[21]</sup>, 提高丹参、三七有效成分脑部浓度, 提高药物疗效。

本实验研究结果证实复方丹参片可在一定程度上抑制 AD 转基因细胞模型 AChE 蛋白表达, 前期实验表明复方丹参片可降低 AD 转基因细胞模型 Aβ 表达, 实验结果与二者相互影响理论相符, 但复方丹参片在 AChE 和 Aβ 之间的作用机制及在基因水平对 AD 的影响有待进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] Deshpande A, Kawai H, Metherate R, et al. A role for synaptic zinc in activity-dependent Abeta oligomer formation and accumulation at excitatory synapses[J]. J Neurosci, 2009, 29(13): 4004-4015.
- [2] Goverdhan P, Sravanthi A, Mamatha T. Neuroprotective effects of meloxicam and selegiline in scopolamine-induced cognitive impairment and oxidative stress[J]. Int J Alzheimers Dis, 2012, 2012: 974013.
- [3] Whiteaker P, Wilking JA, Bromn RW, et al. Pharmacological and immunochemical characterization of anionic acetylcholine receptors (nAChRs) in mouse

- brain[J]. Acta Pharmacol Sin, 2009, 30(6): 795-804.
- [4] Chohan MO, Haque N, Alonso A, et al. Hyperphosphorylation-induced self assembly of murine tau: a comparison with human tau [J]. J Neural Transm, 2005, 112: 1035-1047.
- [5] Pohanka M. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology [J]. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2011, 155 (3): 219-229.
- [6] 黄春霞, 张志敏.  $\beta$  淀粉样多肽细胞毒性作用的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2009, 18(29): 2414-2417.
- [7] Qin RA, Zhou DS, Wang JJ, et al. Compound Danshen tablets downregulate amyloid protein precursor mRNA expression in a transgenic cell model of Alzheimer's disease[J]. Neural Regen Res, 2012, 7 (9): 659-663.
- [8] 胡华, 周德生, 喻嵘, 等. 复方丹参片对阿尔茨海默病转基因细胞模型 A $\beta$  表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(12): 1663-1666.
- [9] Feng L, Li S, Xiao B, et al. Fluorescence imaging of APP in Alzheimer's disease with quantum dot or Cy3: a comparative study[J]. J Cent South Univ(Med Sci), 2010, 35(9): 903-908.
- [10] Bartolucci C, Siotto M, Ghidini E, et al. Structural determinants of Torpedo californica acetylcholinesterase inhibition by the novel and orally active carbamate based anti-alzheimer drug ganstigmine (CHF-2819)[J]. J Med Chem, 2006, 49(17): 5051-5058.
- [11] Hachiro Sugimoto. The new approach in development of anti-Alzheimer's disease drugs via the cholinergic hypothesis[J]. Chemico-Biological Interactions, 2008, 175: 204-208.
- [12] Benzong WC, Wujek JR, Ward EK, et al. Evidence for glial-mediated inflammation in aged APP (SW) transgenic mice [J]. Neurobiol Aging, 1999, 20 (6): 581-589.
- [13] Gordon MN, Holcomb LA, Jantzen PT, et al. Time course of the development of Alzheimer-like pathology in the doubly transgenic PS1+APP mouse [J]. Exp Neurol, 2002, 173(2): 183-195.
- [14] Qin RA, Yao XX, Huang ZY. Effects of compound danshen tablets on spatial cognition and expression of brain beta-amyloid precursor protein in a rat model of Alzheimer's disease[J]. J Tradit Chin Med, 2012, 32 (1): 63-66.
- [15] 覃仁安, 罗佳波, 黄竹英. 复方丹参片防治 AD 症的实验研究和机理探讨[C]. 广州: 第九届全国中药药理学术交流会, 2005.
- [16] 赵林钢, 方泰惠, 袁冬平. 复方丹参片对血管性痴呆小鼠学习记忆功能的影响[J]. 时珍国医国药, 2006, 17 (6): 959-960.
- [17] 谢明, 成志. 丹参酮对阿尔茨海默病样大鼠海马内诱导型一氧化氮合酶 mRNA 和乙酰胆碱酯酶表达的影响[J]. 中医现代医学杂志, 2008, 18(8): 1005-1007.
- [18] 王佳君, 周德生. 单味中药促智作用机制的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(2): 391-394.
- [19] H.Q.Lin, Michelle T.Ho, Lesleys. Lau, et al. Anti-acetylcholinesterase activities of traditional Chinese medicine for treating Alzheimer's disease[J]. Chenico-Biological Interactions, 2008, 25: 175.
- [20] 张小超, 何波, 陈鹏, 等. 三七皂苷 Rg1 对学习记忆功能障碍的影响[J]. 中药药理与临床, 2008, 24(3): 13-16.
- [21] 周德生, 曾荣, 胡华, 等. 冰片透过血脑屏障之述评[J]. 中国中医急症, 2013, 22(1): 67-70.

(责任编辑: 马力)

## 诚招疼痛门诊加盟 (免费索取样品 试后满意订货)

北京郎郎康打造品质贴剂市场, 铸造诚信膏药品牌, 巨大的利润空间, 让您销售无忧! 郎郎康全国独家乡镇加盟火热招募中! 率先加盟, 抢占先机! 部分县镇已有独家加盟, 详情请来电咨询! 如果您是基层大夫, 请将您的详细地址、姓名和邮编及联系方式发送到 13720052966, 注明“索取样品”或拨打电话: 010-51289113、51289114, 欢迎您的来信来电! 北京郎郎康生物技术有限公司, 地址: 北京市昌平区北郊农场办公楼 729 室, 电话: 010-51289113、51289114; 手机: 13720052966、13520031196。邮局账号: 6221881000060968005, 户名: 黄艳红。网址: <http://www.langlangkang.com>。