

玉郎伞多糖对 $A\beta_{25-35}$ 所致 PC12 细胞损伤细胞内钙离子浓度的影响

陈晓宇, 黄仁彬

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号:30960504)

作者单位: 530021 南宁, 广西壮族自治区人民医院药学部(陈晓宇); 530021 南宁, 广西医科大学药学院(黄仁彬)

作者简介: 陈晓宇(1978-), 男, 药理学硕士, 主管药师, 研究方向: 抗老年性痴呆药物研究。E-mail: 1534746296@qq.com

通讯作者: 黄仁彬(1955-), 男, 药理学博士, 教授, 研究方向: 抗老年性痴呆药物和抗糖尿病药物研究。E-mail: huangrenbin518@163.com

[摘要] 目的 观察 $A\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞凋亡损伤模型胞内钙浓度的变化及 YLSP 的影响。方法 采用 $A\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞凋亡损伤模型, 石杉碱甲作为对照药, 给予 YLSP 预处理后, 加入 Flu-3/AM, 用流式细胞仪(FCM)测定各组细胞的平均荧光强度。结果 各组 PC12 细胞内钙离子含量存在显著性差异($F = 14.051, P < 0.01$), 其中, $A\beta_{25-35}$ 作用 PC12 细胞后, PC12 细胞内钙离子含量显著升高($P < 0.01$), 经 YLSP 处理后, PC12 细胞内钙离子含量较模型组细胞显著降低($P < 0.01$), 其中, YLSP 高剂量组的 PC12 细胞内钙离子含量显著低于石杉碱甲组($P < 0.01$)。结论 YLSP 能对抗 $A\beta$ 引起的细胞内钙离子浓度升高, 防止钙超载的发生。

[关键词] 玉郎伞多糖; $A\beta_{25-35}$; PC12 细胞; 钙离子

[中图分类号] R 96 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2013)07-0613-03

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2013.07.01

Effects of YLS polysaccharides on intracellular calcium concentration in AD cell model CHEN Xiao-yu, HUANG Ren-bin. Department of Pharmacy, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To study the effects of YLS polysaccharides on intracellular calcium concentration in AD cell model. **Methods** PC12 cells were treated with $A\beta_{25-35}$ to establish a cell model of Alzheimer's disease. After pretreated with Huperzine and YLSP, the concentration of intracellular calcium were examined by FCM. **Results** The concentration of intracellular calcium in the model group were increased significantly compared with the control group($P < 0.01$), in the Huperzine and YLSP groups, concentration of intracellular calcium were observed obviously lower($P < 0.01$) than the model group, and the high-dose YLSP group was lower than Huperzine group($P < 0.01$). **Conclusion** YLSP protect PC12 cells from calcium overload damage induced by $A\beta_{25-35}$.

[Key words] YLS polysaccharides; $A\beta_{25-35}$; PC12 cell; Calcium

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)又称早老性痴呆,是以进行性认知功能障碍和记忆损害为特征的原发性中枢神经系统退行性疾病,目前尚无特效治疗方法^[1]。AD 的发病率随着年龄的增长而增长,严重威胁着老年人的健康和生存质量,该病的防治已成为国内外医学界研究的热点^[2]。玉郎伞[Millettia Pulchra Kurz var. Laxior(Dunn) Z Wei. YLS]是广西壮族习用药材,具有补气、补血、抗衰

老、抗应激、改善大脑记忆等功能。临床用于治疗老年健忘、小儿智力低下、体弱多病等症。其成分复杂,主要活性成分有多糖、黄酮、皂苷类等^[3-5]。本研究从 YLS 提取多糖成分,研究玉郎伞多糖(YLSP)对 $A\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞凋亡的保护作用。

1 材料与方法

1.1 神经元细胞株 PC12 细胞(大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤克隆株)购于中科院上海细胞所。

1.2 主要药品与试剂 YLSP 由广西医科大学药理学教研室提供(批号:20110302,纯度 93.1%);DMEM 高糖培养基(Gibco 公司,批号:866169);DMEM 低糖培养基(Hyclone 公司,批号:NVJ0306);A β_{25-35} (Sigma 公司,批号:05OM4765);胎牛血清(Hyclone 公司,批号:A64905-0972);石杉碱甲标准品(中国药品生物制品检定所,批号:100243-200401,纯度 99.5%);Fluo-3/AM(sigma 公司,批号:S1039);其他试剂均为国产分析纯。

1.3 主要仪器 371 型 CO₂ 细胞培养箱(Thermo Scientific 公司);HF safe-900 型生物安全柜(Heal Force 公司);TDL-5-A 型低速离心机(上海安亭科学仪器厂);CKX41 型倒置相差显微镜(OLYMPUS 公司);流式细胞仪(Becton Dickinson 公司)。

1.4 实验方法 取对数生长期的 PC12 细胞,以 2×10^5 个 $\cdot \text{ml}^{-1}$ 细胞密度接种于 6 孔培养板,每孔 2 ml, 37 °C, 5% CO₂ 条件下培养 24 h。实验共分 6 组,每组 6 孔。对照组:每孔加入 2 ml 无血清 DMEM 低糖培养基;模型组:每孔分别加入用无血清 DMEM 低糖培养基配制的终浓度为 10 μM 的 A β_{25-35} 溶液 2 ml;石杉碱甲组:用无血清 DMEM 低糖培养基配制的 2 ml 石杉碱甲溶液至终浓度为 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。YLSP 分低、中、高组,各组分别加入用无血清 DMEM 低糖培养基

配制的 YLSP 溶液至终浓度为 0.01、0.1、1.0 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$,再加入 A β_{25-35} 至终浓度为 10 μM ,各孔终体积为 2 ml。将孔板置于 37 °C, 5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h 后,收集细胞,PBS 洗 2 次,细胞用 1 ml PBS 调成细胞悬液后,每管加入 Fluo-3/AM,使其终浓度为 5 μM ,设阴性对照管,阴性对照管加等体积的 PBS 溶液,混匀后置 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中孵育 40 min, 每 10 min 轻轻振荡一次,1 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 去上清,加入 PBS 洗 2 遍,用流式细胞仪检测细胞的平均荧光强度,激发波长 448 nm,发射波长 515 nm。

1.5 统计学方法 应用 SPSS11.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两样本均数比较采用 *t* 检验,多样本均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

各组间 PC12 细胞内钙离子含量比较,差异有统计学意义($P < 0.01$);两两比较,模型组 PC12 细胞内钙离子含量较对照组有显著性的升高($P < 0.01$),而石杉碱甲组、YLSP 各剂量组的 PC12 细胞内钙离子含量较模型组细胞显著的降低(P 均 < 0.01),其中,YLSP 高剂量组的 PC12 细胞内钙离子含量显著低于石杉碱甲组($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 各组间 PC12 细胞内钙离子含量比较 [$n=6, (\bar{x} \pm s)$]

组别	剂量	[Ca ²⁺] _i (荧光强度)	与对照组比(%)	<i>t</i>	<i>P</i>
对照组	-	54.3 $\pm$ 9.3	100.0	-	
模型组	-	187.6 $\pm$ 19.7*	345.5	9.152	<0.01
石杉碱甲组	1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	93.3 $\pm$ 16.1 [▲]	171.8	8.408	<0.01
YLSP 组	0.01 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	111.3 $\pm$ 13.4 [▲]	205.0	7.836	<0.01
	0.1 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	102.9 $\pm$ 14.5 [▲]	189.5	8.003	<0.01
	1.0 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	72.8 $\pm$ 12.2 ^{▲*}	134.1	8.987	<0.01
				6.231	<0.01
<i>F</i>	-	14.051	-		
<i>P</i>	-	<0.01	-		

注:与对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[▲] $P < 0.01$;与石杉碱甲组比较,^{*} $P < 0.01$

3 讨论

钙离子与神经细胞的代谢活动有关,其参与调节神经细胞的兴奋性和损伤修复,神经细胞内 Ca²⁺ 的水平受很多因素调节,如配体/电压门控性钙通道、能量依赖性钙泵、内质网钙库等。细胞内钙离子浓度持续升高将会导致以下结果的发生:(1)激活钙依赖性蛋白酶,破坏神经细胞结构。(2)激活磷

脂酶 A2,产生大量氧自由基(ROS),导致脂质过氧化,破坏细胞膜的完整性。ROS 能破坏多种细胞器,如细胞膜、线粒体膜以及内质网,导致胞外 Ca²⁺ 大量内流,引起胞内 Ca²⁺ 浓度变化,胞内 Ca²⁺ 浓度升高反过来可激活其他的酶来进一步增加 ROS 的水平,因此 ROS 可以间接地导致更多的氧化物产生而进一步促进线粒体 Ca²⁺ 水平升高。(3)Ca²⁺ 的升

高活化蛋白激酶 C(PKC):PKC 即 Ca^{2+} 、磷脂依赖性的蛋白激酶 C,是一种分子量为 80~90 KD 的蛋白激酶。PKC 信号传导通路被认为是细胞凋亡的信号传导系统中重要的负性调节机制。该酶含有一个疏水区和一个亲水区,疏水区可以与 Ca^{2+} 相互作用,亲水区具有催化活性,PKC 的底物非常广泛,其中包括某些生长因子。 Ca^{2+} 可活化 PKC 参与细胞凋亡,以及参与生长因子和细胞因子与受体结合活化 PKC 的过程,PKC 激活后引起原癌基因的表达,参与细胞凋亡。(4) Ca^{2+} 的升高激活钙调蛋白依赖的蛋白激酶(Cal-PK):钙调蛋白(CAM)是一个非常重要的钙结合蛋白,是细胞内多功能的钙结合受体,存在于所有真核细胞中。CAM 是 184 个氨基酸组成的单链蛋白,分子量约为 17 KD,含有约 150 个高度保守的氨基酸残基,有四个高亲和力的 Ca^{2+} 结合位点, Ca^{2+} 与 CAM 结合可引起 CAM 构象发生改变,从而使之激活,并通过 Ca^{2+} /CAM 依赖的 Cal-PK 的介导起作用。Cal-PK 是由若干成员组成的一个家族,它的磷酸化位点是靶细胞上特定的 Ser/thr 残基,靶细胞对胞浆 Ca^{2+} 浓度增加所作出的应答主要取决于细胞内有哪些 Cal-PK 的靶蛋白。CAM 激酶 II 是一种多功能激酶,存在于许多动物细胞内,且能剂量依赖性的被凋亡刺激因子如 TNF- α 所激活。死亡相关蛋白激酶(DAPK)是 Cal-PK 家族的一员,破坏内质网可以诱导 DAPK 的过表达从而诱导 caspase 的活性,说明细胞内 Ca^{2+} 的增加,通过 DAPK 诱导细胞凋亡。(5)激活 Ca^{2+} 依赖性蛋白激酶 II,使突触蛋白 I 发生磷酸化,导致兴奋性递质谷氨酸大量释放。(6)线粒体的功能被抑制,能量代谢发生障碍。当神经细胞受到损伤性因素刺激时,大量 Ca^{2+} 涌入细胞内,线粒体外室 Ca^{2+} 浓度也将随之升高。线粒体内膜上 MPTP 孔的周期性开放,可使外室里的正离子有控制地进入内室。钙超载可导致 MPTP 孔的破坏,导致线粒体通透性改变,释放出称为凋亡诱导因子(apoptosis-inducing factor, AIF)

的可溶性蛋白而诱发凋亡。(7)核酸内切酶被激活,DNA 发生降解,直接促使细胞发生凋亡。细胞发生凋亡时,其染色质 DNA 在内源性核酸内切酶的作用下被分解成若干个 180~200 bp 或其整数倍的寡核苷酸片段。这种核酸内切酶被认为是 Ca^{2+} / Mg^{2+} 依赖性的, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 能增强其活性, Zn^{2+} 能抑制其活性。细胞内 Ca^{2+} 浓度升高可激活细胞内原有的无活性的 Ca^{2+} / Mg^{2+} 依赖性核酸内切酶,从而促进细胞凋亡。(8)影响神经长时程突触增强的形成,降低神经细胞的可塑性,导致记忆障碍的发生^[6~8]。本研究结果表明,A β 可以造成 AD 细胞模型细胞内钙离子浓度显著升高,也充分说明钙失衡在 AD 发病过程中起到了重要的作用。YLSP 在一定程度上对抗 A β 引起的细胞内钙离子浓度升高,防止钙超载的发生。因而,维持钙离子平衡可能是 YLSP 防治 AD,保护神经细胞的机制之一。

参考文献

- 1 关青,王春艳,王利群.多重干预对早中期老年性痴呆患者综合能力改善的影响[J].中国老年学杂志,2009,29(14):1836-1837.
 - 2 程为平,张洋,马莉.中药益气活血养脑法治老年性痴呆的基础研究[J].中医药学报,2008,36(3):19-21.
 - 3 孔晓龙,蒋伟哲,黄仁彬,等.龙眼参对自发性高血压大鼠和 SD 大鼠血压的影响[J].中草药,2001,32(8):727-728.
 - 4 蒋伟哲,孔晓龙,段小群,等.龙眼参对机体氧自由基清除作用的研究[J].中国药房,2001,12(8):453-454.
 - 5 孔晓龙,蒋伟哲,林自中.龙眼参提取物对环磷酸腺苷所致小鼠免疫功能低下的影响[J].中国药房,2004,15(6):335-336.
 - 6 Smith-Swintosky VL, Matton MP. Glutamate β -amyloid precursor proteins and calcium mediated neurofibrillar degeneration[J]. J Neurol Transm, 1994, 44(suppl):29-45.
 - 7 祁金顺,乔健天. β -淀粉样蛋白的神经毒性与跨膜离子转运[J].神经解剖学杂志,2000,16(2):163.
 - 8 Joanne M, Rirka G, Anna J, et al. Inositol stereoisomer stabilize an oligomeric aggregate of Alzheimer β -amyloid induced toxicity[J]. J Biol Chem, 2000, 275(24):18495.
- [收稿日期 2013-04-01][本文编辑 杨光 韦所苏]