

四君子汤调控 $A\beta$ 跨血脑屏障转运 相关蛋白的作用研究

郭园园, 郑琴*, 吴玲, 张明霞, 张科楠, 肖帅, 李文静, 杨明
(江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004)

摘要 中医认为“脾主运化”,与机体物质代谢、能量代谢密切相关。研究表明,阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种代谢性疾病,与糖脂代谢和能量代谢有关,中药健脾方剂能够改善AD动物模型的学习记忆。四君子汤来源于《太平惠民和剂局方》,具有补气、益气健脾之功效,是健脾补脾基础方。该实验采用人脑微血管内皮细胞(HBMEC)与四君子汤水提液($0.25, 0.5, 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)预孵育2 h,而后加入 $A\beta_{25-35}$ 寡聚体(终浓度 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)共培养22 h,考察四君子汤水提液对 $A\beta_{25-35}$ 寡聚体损伤细胞活性及相关蛋白表达的影响。首先运用Q-TOF-LC-MS对四君子汤水提液进行主要成分分析;然后采用MTT法研究四君子汤水提液对HBMEC细胞增殖情况的影响;采用实时荧光定量PCR技术(RT-qPCR)检测 $A\beta$ 跨血脑屏障转运相关蛋白基因葡萄糖转运体1(GLUT1)、晚期糖基化终产物受体(RAGE)、低密度脂蛋白受体相关蛋白1(LRP1)mRNA的表达,采用免疫印迹(Western blot)法测定 $A\beta$ 跨血脑屏障转运相关蛋白RAGE, LRP1的表达。研究发现 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $A\beta_{25-35}$ 寡聚体能够诱导内皮细胞损伤,使细胞存活率降低, RAGE mRNA及蛋白表达增加, GLUT1 mRNA表达减少, LRP1 mRNA及蛋白表达减少;四君子汤水提液能够减弱 $A\beta_{25-35}$ 寡聚体诱导的HBMEC细胞毒性,能降低RAGE mRNA及蛋白表达,升高GLUT1 mRNA表达,升高LRP1 mRNA及蛋白表达。结果表明,四君子汤水提液对 $A\beta_{25-35}$ 寡聚体诱导的HBMEC细胞损伤有改善作用,并且能够调控 $A\beta$ 跨血脑屏障转运相关蛋白GLUT1, RAGE, LRP1,达到调控 $A\beta$ 在血脑屏障上转运的作用。

关键词 四君子汤; 阿尔茨海默病; 人脑微血管内皮细胞(HBMEC); 晚期糖基化终产物受体; 低密度脂蛋白受体相关蛋白1; 葡萄糖转运蛋白1

Effect of Sijunzi Decoction on regulation of $A\beta$ -related proteins across blood-brain barrier

GUO Yuan-yuan, ZHENG Qin*, WU Ling, ZHANG Ming-xia, ZHANG Ke-nan, XIAO Shuai, LI Wen-jing, YANG Ming
(Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] According to traditional Chinese medicine, "spleen transport" is closely related to the metabolism of substance and energy. Studies have shown that Alzheimer's disease (AD) is a disease related to glucose and lipid metabolism and energy metabolism. The traditional Chinese medicine Jiangpi Recipe can improve the learning ability and memory of AD animal model. Sijunzi Decoction originated from *Taiping Huimin Hefang Prescription* is the basic prescription for strengthening and nourishing the spleen, with the effects of nourishing Qi and strengthening the spleen. In this experiment, human brain microvascular endothelial cells (HBMEC) and Sijunzi Decoction water extract ($0.25, 0.5, 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) were pre-incubated for 2 h, and then $A\beta_{25-35}$ oligomers (final concentration $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) was added for co-culture for 22 hours. The effect of Sijunzi Decoction on the activity of $A\beta_{25-35}$ oligomer injured cells and the expression of related proteins were investigated. Q-TOF-LC-MS was used first for principal component analysis of Sijunzi Decoction water extract. Then MTT assay was used to investigate the effect of Sijunzi Decoction water extract on the proliferation of HBMEC cells. Real-

收稿日期 2019-12-11

基金项目 国家自然科学基金项目(81860874); 江西省教育厅科学技术研究重点项目(GJJ170699)

通信作者 * 郑琴, 博士生导师, 主要从事中药新制剂与新技术研究, E-mail: zhengqin912006@163.com

作者简介 郭园园, 硕士, 主要从事中药新制剂与新技术研究, E-mail: 2949665189@qq.com

time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) was employed to detect the mRNA expression of GLUT1, RAGE, and LRP1. The expression of $A\beta$ -related proteins across blood-brain barrier (RAGE, LRP1) was detected by Western blot. The results showed that $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $A\beta_{25-35}$ oligomers could induce endothelial cell damage, reduce cell survival, increase expression of RAGE mRNA and RAGE protein, and reduce expression of GLUT1 mRNA, LRP1 mRNA, and LRP1 protein. Sijunzi Decoction water extract could reduce the $A\beta_{25-35}$ oligomer-induced cytotoxicity of HBMEC, decrease the expression of RAGE mRNA and RAGE protein, and increase the expression of GLUT1 mRNA, LRP1 mRNA and LRP1 protein. The results indicated that Sijunzi Decoction could reduce the injury of HBMEC cells induced by $A\beta_{25-35}$ oligomer, and regulate the transport-related proteins GLUT1, RAGE and LRP1, which might be the mechanism of regulating $A\beta_{25-35}$ transport across the blood-brain barrier.

[Key words] Sijunzi Decoction; Alzheimer's disease; human brain microvascular endothelial cells (HBMEC); advanced glycation end products; low density lipoprotein receptor-related protein 1; glucose transporter 1

doi: 10.19540/j.cnki.cjcm.20200217.402

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种进行性认知功能障碍和行为损害为特征的中枢神经退行性病变,是痴呆最常见的一种类型,占有痴呆的50%~60%,属中医“老年呆病”范畴^[1]。随着社会的人口老龄化,AD的发病率也不断上升,但目前尚缺乏有效的防治药物。AD的病因尚不清楚,发病机制非常复杂,近年来基于单一靶点或机制的药物研究频频失败。因此,基于新靶点、多靶点的AD研究成为新热点。

AD的发生与体内能量代谢^[2]和淀粉样蛋白($A\beta$)血脑屏障上的转运^[3]密切相关。中医认为“脾主运化”,与体内代谢密切相关。近年来,有学者提出“从脾胃论治”阿尔茨海默病,并发现健脾方药对AD有一定的作用^[4]。南京中医药大学战丽彬团队运用滋补脾阴法对AD、糖尿病认知功能障碍进行实验研究,确立了脾阴虚及滋补脾阴法在中枢神经系统损伤修复中的重要地位^[5-6]。

四君子汤来源于《太平惠民和剂局方》,由人参、茯苓、白术、甘草4味药组成,有补气、益气健脾之功效,是健脾补脾基础方。有研究表明^[7],四君子汤能改善AD大鼠的行为,促进AD大鼠中枢能量生成,改善中枢的能量代谢紊乱。然而,关于四君子汤调控 $A\beta$ 跨血脑屏障和能量代谢的研究未见报道。本研究以 $A\beta_{25-35}$ 寡聚体诱导的人脑微血管内皮细胞模拟AD损伤模型,探讨四君子汤水提物对 $A\beta$ 跨血脑屏障转运相关蛋白晚期糖基化终产物受体(RAGE)、低密度脂蛋白受体相关蛋白1(LRP1)以及与能量代谢密切相关的转运蛋白——葡萄糖转运蛋白1(GLUT1)的影响,旨在揭示四君子汤水提物在调控 $A\beta$ 跨血脑屏障转运和细胞内葡萄糖转运的作用机制,为后期挖掘其预防AD的作用奠定基础。

1 材料

四君子汤由人参(批号180903)、茯苓(批号181014)、白术(批号181010)、炙甘草(批号180513)组成,购自江西江中中药饮片有限公司,经江西中医药大学药学院刘荣华教授鉴定为正品。

$A\beta_{25-35}$ (美国Sigma公司,货号A4559); MTT(北京索莱宝公司,批号1117X057); 含丙酮酸钠的DMEM高糖培养基(北京索莱宝公司,货号A4995); BCA蛋白试剂盒(北京索莱宝有限公司,批号20180926); Difco Skim Milk(BD公司,批号ser3106120); M5 Universal RNA Mini Kit, M5 First Strand cDNA Synthesis Kit, 2×Real-time PCR Super mix(北京聚合酶生物科技有限公司,批号分别为19Ba2706, 19Da3005, 19Ca0702); 胎牛血清(美国Gibco公司,批号10099-141); 小鼠单克隆抗RAGE, LRP1抗体及PVDF膜(Millipore公司,批号分别为3043677, Q2787527, R8BA8116C); 小鼠单克隆抗GAPDH(Proteintech公司,批号10004129); 羊抗小鼠IgG-HRP(北京索莱宝公司,批号20190115)。

Forma311型二氧化碳恒温培养箱(美国Thermo Electron Corporation公司); Sartorius BT25S型1/10万电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司); 3-18K型高速冷冻离心机(德国Sigma公司); SW-CJ-2F型超净工作台(苏州净化设备有限公司); Varioskan Flash多功能酶标仪(美国赛默飞世尔科技公司); LightCycler® 96实时荧光定量PCR仪器(Roche公司); THZ-92C型恒温振荡器(上海博迅实业有限公司医疗设备厂); GZX-9030MBE型电热鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂); LDZM-80KCS型立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂); TS100型倒置相差显微镜(Nikon Eclipse公

司); WIX-EP600 通用电泳仪电源(北京韦克斯科技有限公司); A100 PCR 基因扩增仪(杭州朗基仪器有限公司)。

人脑微血管内皮细胞(HBMEC)(北京北纳创联生物技术研究院,引种于美国 Sciencell 细胞库),实验所用为 5~10 代;培养条件为含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液,置于 37 °C,5% CO₂ 的培养箱中培养,2~3 d 传代。

2 方法

2.1 药物制备及溶液配制 $A\beta_{25-35}$ 寡聚体的制备^[9]:将 1 mg $A\beta_{25-35}$ 溶解于 943 μL 灭菌的去离子水中,配成 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 母液,置于 37 °C 培养箱孵育 7 d,使之老化,分装,于 -20 °C 冻存,用前稀释至所需浓度。

四君子汤水提液的制备:各取一定量的人参(去芦)、白术、茯苓、炙甘草中药饮片于中药粉碎机进行粉碎,将药材粉末按 3:3:3:2(人参 36.249 g,白术 36.060 g,茯苓 36.342 g,炙甘草 24.255 g)加入 10 倍量水浸泡 1 h 后,提取 1.5 h,提取 2 次,合并滤液,过滤、离心、抽滤,浓缩、冷冻干燥,得到冻干粉(得粉率 38.26%);取冻干粉适量于 5 mL 量瓶中,加入 DMEM,制成一定浓度药物储备液。

MTT 溶液的配制:精密称取 MTT 250.00 mg 于 50 mL 量瓶中,加入无菌的 HBSS 将其溶解,制得 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 MTT 溶液。

2.2 四君子汤主成分分析 色谱条件:采用 ACE EXCEL 5 C₁₈-AR 色谱柱(2.1 mm×150 mm,5 μm),流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~3 min,5%~23% B;3~11 min,23%~35% B;11~23 min,35%~70% B;23~25 min,70%~90% B;25~27 min,95% B;27~30 min,5% B),柱温 40 °C,进样量 10 μL ,流速 0.3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

质谱条件:采用电喷雾离子源(ESI),正、负离子模式检测。质量扫描范围 m/z 100~1 250,喷雾电压(ISVF) 5.5 kV,离子源温度(TEM) 500 °C,去簇电压(DP) 100 eV,碰撞能量(CE) 45 eV(-45 eV),碰撞能量叠加(CES) 15 eV,气帘气压力(CUR) 40 psi(1 psi≈6.895 kPa),雾化气(GS1)和辅助气(GS2)压力均为 50 psi。

2.3 细胞活力的测定^[9-11] 培养 HBMEC 至对数生长期,以 $2.5\times 10^5\sim 3.0\times 10^5$ 个/mL 接种于 96 孔板,每孔 100 μL ,每组 6 孔,细胞接种 24 h 后,分别

加入 120 μL 预先配制的不同浓度的药物($A\beta_{25-35}$ 溶液:2.5,5,10,20,40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;四君子汤水提液:2,1,0.5,0.25,0.125,0.062 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$),继续培养 24 h 后,每孔加入 100 μL 配制好的 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ MTT,37 °C 培养箱中继续孵育 3~4 h 后,去掉上清液,每孔加入 DMSO 150 μL ,振荡 10 min 后,在酶标仪于 490 nm 处测各孔吸光度(A),计算存活率。存活率 = $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

2.4 $A\beta_{25-35}$ 致细胞损伤模型的制备 培养 HBMEC 至对数生长期,以 $2.5\times 10^5\sim 3.0\times 10^5$ 个/mL 接种于 96 孔板,每孔 100 μL ,每组 6 孔,细胞接种 24 h 后,加入 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $A\beta_{25-35}$ 溶液 120 μL ,培养 24 h 后,每孔加入 100 μL 配制好的 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ MTT,37 °C 培养箱中继续孵育 3~4 h 后,去掉上清液,每孔加入 DMSO 150 μL ,振荡 10 min 后,在酶标仪于 490 nm 处测各孔的 A,计算存活率(计算方法同 2.3),细胞存活率降至 50% 左右,即 $A\beta_{25-35}$ 的半数抑制浓度 IC₅₀,说明造模成功。

2.5 四君子汤对 $A\beta_{25-35}$ 致细胞损伤模型的作用研究 培养 HBMEC 至对数生长期,以 $2.5\times 10^5\sim 3.0\times 10^5$ 个/mL 接种于 96 孔板,每孔 100 μL ,每组 4 孔,细胞接种 24 h 后,对照组、模型组加入 120 μL DMEM 培养液,四君子汤给药组加入四君子汤水提液(0.125,0.25,0.5,1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 120 μL ,2 h 后,对照组、模型组加入 120 μL DMEM 培养液,四君子汤给药组分别加入 120 μL $A\beta_{25-35}$ 溶液(终浓度 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),共培养 22 h 后,每孔加入 100 μL 配制好的 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ MTT,37 °C 培养箱中继续孵育 3~4 h 后,去掉上清液,每孔加入 DMSO 150 μL ,振荡 10 min 后,在酶标仪于 490 nm 处测各孔的 A,计算存活率(计算方法同 2.3)。

2.6 Real-time qPCR 法检测各组细胞中 GLUT1,LRP1,RAGE mRNA 的表达水平 取对数生长期细胞,以 $2.5\times 10^5\sim 3.0\times 10^5$ 个/mL 接种于 24 孔板,每孔 1.5 mL。将细胞按照 2.5 项下方法进行分组、造模、给药预处理。用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,采用酶标仪测定 RNA 浓度和纯度;取 0.6 μg ,采用 cDNA 试剂盒反转录合成 cDNA;以 GAPDH 为内参,分别对 GLUT1,LRP1,RAGE 进行扩增,引物序列见表 1。Real-time qPCR 扩增反应体系为 20 μL ,反应条件为 95 °C 预变性 1 min;95 °C 变性 5 s,45 °C 退火 10 s,72 °C 延伸 15 s,共 55 个循环。以 GAPDH 作为

参比基因,运用相对定量法($2^{-\Delta\Delta C_t}$) [11],计算各目标基因的相对表达量。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence of PCR

引物	序列(5'-3')	产物/bp
GAPDH	上游 CCGCATCTTCTTTTGGCTCG	94
	下游 CGCCCAATACGACCAATCC	
GLUT1	上游 GCTGTCTGGCATCAACGCTGTC	147
	下游 CCTGCTCGCTCCACCACAAAC	
LRP1	上游 TTGCTGCTGCTGCTGTTCTG	99
	下游 CCCGTTGGTCATCCGTTGGTG	
RAGE	上游 CCCGTCACCTTCTCTCTGTAG	140
	下游 TGCTCCACCTTCTGGCTCCAC	

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot) 检测各组细胞中 LRP1 和 RAGE 蛋白的表达水平,取对数生长期细胞,以 $2.5 \times 10^5 \sim 3.0 \times 10^5$ 个/mL 接种于 6 孔板,每孔 1.5 mL。将细胞按照 2.5 项下方法进行分组、造模、给药预处理。经药物处理过的细胞,每孔加入 150 μL 裂解液,4 $^\circ\text{C}$ 冰箱 30 min,细胞裂解产物吸至 1.5 mL EP 管中,4 $^\circ\text{C}$,13 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min,将上清液移至新的 0.2 mL 离心管中,并取适量蛋白,用 BCA 试剂盒进行浓度测定。取蛋白 12 μg ,经 SDS-PAGE 电泳后转移至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶粉封闭 90 min 后,TBST 洗涤 3 次(每次 10

min),分别加入 LRP1(1:2 000),RAGE(1:800),内参 GAPDH 抗体(1:5 000),于 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱静置 12 h;TBST 洗涤 3 次(每次 10 min),加入二抗(1:5 000),室温摇床孵育 1 h;TBST 洗涤 3 次(每次 10 min),采用 ECL 试剂盒曝光显色,在黑暗中孵育约 2 min 后置于凝胶成像仪中显影。用 ImageJ 180 软件分析目的蛋白的相对综合灰度值,用其与内参的比值表示其表达水平。

2.8 统计分析 数据采用 SPSS 21.0 软件进行统计,通过单因素方差分析组间差异的统计学显著性,方差齐时,组间比较采用 LSD 最小显著性差异法;方差不齐时,选择 Tamhane's $T^2(M)$ 检验进行组间比较。所有结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

3 结果

3.1 四君子汤主要化学成分分析 称取一定量的四君子汤冻干粉溶于超纯水中,12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上清液,采用 Q-TOF-LC-MS 进行主要成分分析,采用正、负离子模式,梯度洗脱,总离子流图见图 1。从水提液中共鉴定主要成分 17 种,主要为人参皂苷、黄酮类(主要是甘草苷类)、三萜皂苷类(主要是甘草酸类)、茯苓三萜类、白术内酯几大类,见表 2。

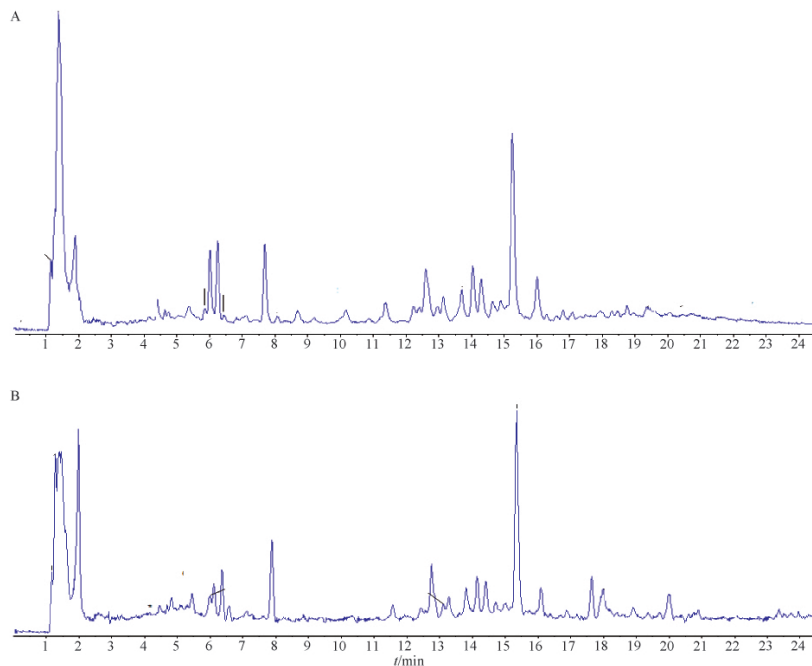


图 1 四君子汤水提液负离子模式(A)和正离子模式(B)总离子流图

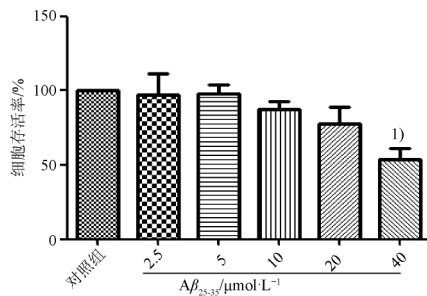
Fig.1 Total ion chromatograms of water extraction of Sijunzi Decoction by negative mode (A) and positive mode (B)

表 2 四君子汤主要化学成分解析

Table 2 The main chemical constituents identified in extracts from Sijunzi Decoction

No.	[M-I] ⁻			[M+I] ⁺			化合物	相对质量 分数/%	分子式
	<i>t_R</i> / min	相对分子 质量	碎片离子(<i>m/z</i>)	<i>t_R</i> / min	相对分子 质量	碎片离子(<i>m/z</i>)			
1	1.400	430	429.125/383.074	—	—	—	7-methy glycyrrhizin [13]	31.22	C ₂₂ H ₂₂ O ₉
2	—	—	—	1.981	268	269.573	coumestrol	12.67	C ₁₅ H ₈ O ₅
3	5.369	514	497.331/417.116	—	—	—	25-hydroxyprotocatechuic acid H [13]	1.62	C ₃₁ H ₄₇ O ₆
4	6.011	550	549.155	—	—	—	isoliquiritin apioside	2.99	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃
5	6.245	418	417.116/255.065	—	—	—	neoliquiritin	3.31	C ₂₁ H ₂₂ O ₉
6	—	—	—	6.364	256	165.069/147.042/137.022	liquiritigenin	2.1	C ₁₅ H ₁₂ O ₄
7	7.687	946	783.482/475.372	—	—	—	ginsenoside Re	3.55	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈
8	12.244	800	637.428/475.373	—	—	—	ginsenoside Rg ₁	0.92	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄
9	—	—	—	12.31	162	118.921/105.073	7-hydroxycoumarin	0.41	C ₉ H ₆ O ₃
10	—	—	—	12.756	528	529.346/511.334/469.332/423.322	protocatechuic acid DM [13]	3.34	C ₃₂ H ₄₈ O ₆
11	13.703	1 078	945.538/783.482	—	—	—	ginsenoside Rc	2.25	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂
12	14.299	838	837.384/51.055	—	—	—	licoricesaponin G	2.5	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇
13	—	—	—	14.408	486	487.341/405.315	protocatechuic acid G	1.98	C ₃₀ H ₄₆ O ₅
14	15.254	822	821.388/351.055	—	—	—	glycyrrhizic acid	11.43	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆
15	—	—	—	15.347	470	471.347/453.337/407.330	16 α -hydroxytrametenolic acid	11.53	C ₃₀ H ₄₆ O ₄
16	—	—	—	16.096	808	633.395/457.369/439.357	licoricesaponin B [13]	1.35	C ₄₂ H ₆₄ O ₁₅
17	—	—	—	17.977	249	250.151/213.128/175.076/163.073	atractylenolide III	2.95	C ₁₅ H ₂₀ O ₃

3.2 $A\beta_{25-35}$ 对 HBMEC 细胞活性的影响 [14] 结果表明,与对照组比较,当 $A\beta_{25-35}$ 浓度增加到 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,细胞存活率下降至 53.60%,有显著性差异 ($P < 0.01$),见图 2,故选择 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} A\beta_{25-35}$ 为造模浓度。



与对照组比较¹⁾ $P < 0.01$ (表 3 同)。

图 2 不同浓度 $A\beta_{25-35}$ 对 HBMEC 细胞活性的影响

Fig.2 Effects of different concentrations of $A\beta_{25-35}$ on cell viability in HBMEC

3.3 四君子汤对 HBMEC 细胞活性的影响 四君子汤水提液质量浓度低于 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,对 HBMEC 细胞活性无影响,见表 3。因此设置质量浓度为 $0.25, 0.5, 1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的四君子汤水提液分别为低、中、高剂量给药组。

2928

表 3 四君子汤水提液对细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of water extract of Sijunzi Decoction on cell viability ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	细胞存活率/%
对照	0	100.00 $\pm$ 0.00
四君子汤水提液	0.062 5	97.75 $\pm$ 4.84
	0.125	100.59 $\pm$ 7.82
	0.25	97.86 $\pm$ 7.04
	0.5	96.02 $\pm$ 5.22
	1	97.13 $\pm$ 4.64
	2	89.24 $\pm$ 7.13 ¹⁾

3.4 四君子汤对 $A\beta_{25-35}$ 诱导 HBMEC 损伤的影响 与对照组相比,模型组($A\beta_{25-35}$ 终浓度 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 细胞存活率明显降低,有极显著性差异 ($P < 0.001$); 与模型组相比,四君子汤质量浓度为 $0.125 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,细胞存活率无统计学差异,当质量浓度为 $0.25, 0.5, 1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,细胞存活率显著升高 ($P < 0.05, P < 0.001$),见表 4。故以质量浓度 $0.25, 0.5, 1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的四君子汤水提液为低、中、高剂量组进行下一步实验。

3.5 四君子汤对正常 HBMEC 中 GLUT1, LRP1, RAGE mRNA 表达的影响 与对照组相比,用各种浓度的四君子汤水提液处理细胞 24 h 后, GLUT1, LRP1, RAGE mRNA 的表达无显著性差异,见表 5。

表4 四君子汤水提液对 $A\beta_{25-35}$ 诱导 HBMEC 损伤的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)Table 4 Effect of water extract of Sijunzi Decoction on the damage of HBMEC induced by $A\beta_{25-35}$ ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	$A\beta_{25-35}$ 浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	药物质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	细胞 存活率/%
对照	—	—	100.00 $\pm$ 0.00
模型	40	—	45.00 $\pm$ 2.96 ¹⁾
四君子汤水提液	40	0.125	47.71 $\pm$ 3.22
	40	0.25	51.71 $\pm$ 3.29 ²⁾
	40	0.5	61.70 $\pm$ 6.20 ³⁾
	40	1	73.90 $\pm$ 4.71 ³⁾

注: 与对照组比较¹⁾ $P<0.001$; 与模型组比较²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.001$ 。

3.6 四君子汤对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 HBMEC 损伤细胞中 GLUT1, LRP1, RAGE mRNA 表达的影响 实验组采用四君子汤水提液孵育 2 h, 然后与 $A\beta_{25-35}$ 寡聚体共孵育 22 h。Real-time qPCR 结果显示, 与对

表5 四君子汤水提液对正常 HBMEC 中 GLUT1, LRP1, RAGE mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 5 Effect of water extract of Sijunzi Decoction on the mRNA expression of GLUT1, LRP1, RAGE in normal HBMEC ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	mRNA 相对表达		
		GLUT1	LRP1	RAGE
对照	—	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
四君子汤	0.25	0.94 $\pm$ 0.15	0.94 $\pm$ 0.13	0.96 $\pm$ 0.26
水提液	0.5	0.87 $\pm$ 0.15	1.10 $\pm$ 0.20	1.00 $\pm$ 0.28
	1	0.94 $\pm$ 0.22	0.96 $\pm$ 0.00	1.15 $\pm$ 0.31

照组相比, 模型组 ($A\beta_{25-35}$ 终浓度 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) GLUT1 和 LRP1 mRNA 表达显著下降 ($P<0.01$), RAGE mRNA 表达显著升高 ($P<0.01$); 与模型组相比, 四君子汤中、高剂量组 GLUT1 和 LRP1 mRNA 表达显著升高 ($P<0.05, P<0.01, P<0.001$), RAGE mRNA 表达显著下降 ($P<0.05, P<0.01$), 见表 6。

表6 四君子汤水提液对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 HBMEC 损伤细胞中 GLUT1, LRP1, RAGE mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 6 Effect of water extract of Sijunzi Decoction on GLUT1, LRP1, RAGE mRNA expression in $A\beta_{25-35}$ -induced HBMEC injured cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	$A\beta_{25-35}$ 浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	药物质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	mRNA 相对表达		
			GLUT1	LRP1	RAGE
对照	—	—	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
模型	40	—	0.54 $\pm$ 0.08 ¹⁾	0.47 $\pm$ 0.05 ¹⁾	1.52 $\pm$ 0.11 ¹⁾
四君子汤水提液	40	0.25	0.58 $\pm$ 0.15	0.43 $\pm$ 0.05	1.59 $\pm$ 0.33
	40	0.5	0.79 $\pm$ 0.10 ³⁾	0.62 $\pm$ 0.04 ²⁾	1.12 $\pm$ 0.18 ²⁾
	40	1	0.98 $\pm$ 0.16 ⁴⁾	0.72 $\pm$ 0.11 ⁴⁾	1.04 $\pm$ 0.07 ³⁾

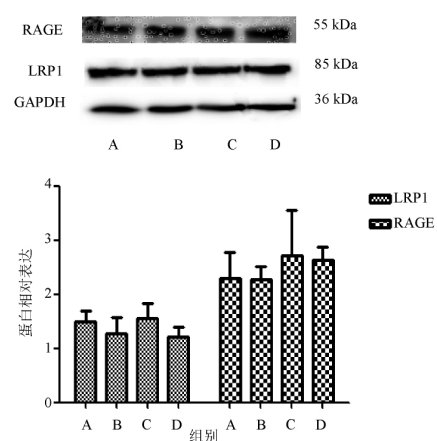
注: 与对照组比较¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$, ⁴⁾ $P<0.001$ 。

3.7 四君子汤对正常 HBMEC 中 LRP1 和 RAGE 蛋白表达的影响 Western blot 结果显示, 与对照组相比, 用各种浓度的四君子汤水提液处理细胞 24 h 后, LRP1 和 RAGE 蛋白的表达无显著性影响, 见图 3。

3.8 四君子汤对 $A\beta_{25-35}$ 诱导 HBMEC 中 LRP1 和 RAGE 蛋白表达的影响 实验组采用四君子汤水提液孵育 2 h, 然后与 $A\beta_{25-35}$ 寡聚体共孵育 22 h。Western blot 结果显示, 与对照组相比, 模型组 ($A\beta_{25-35}$ 终浓度 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) LRP1 表达显著减少 ($P<0.01$), RAGE 表达显著增加 ($P<0.05$); 与模型组相比, 四君子汤水提液高剂量组 LRP1 表达显著增加 ($P<0.01$), RAGE 表达显著减少 ($P<0.05$), 见图 4。

4 讨论

阿尔茨海默病 (AD) 是一种进行性神经退行性



A. 对照组; B. 四君子汤水提液低剂量组; C. 四君子汤水提液中剂量组; D. 四君子汤水提液高剂量组。

图3 四君子汤水提液对正常 HBMEC 中 LRP1 和 RAGE 蛋白表达的影响

Fig.3 Effect of water extract of Sijunzi Decoction on the protein expression of RAGE and LRP1 in normal HBMEC

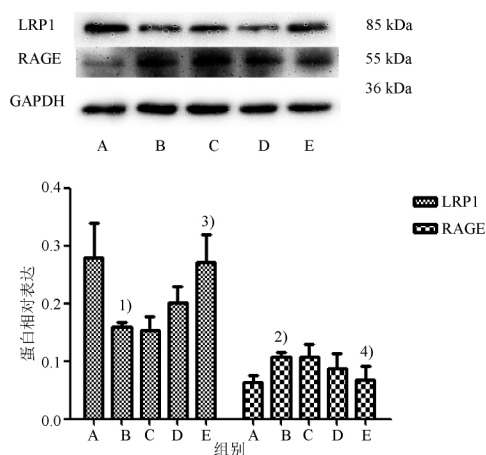


图4 四君子汤水提物对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 HBMEC 损伤细胞中 LRP1 和 RAGE 蛋白表达的影响

Fig.4 Effect of water extract of Sijunzi Decoction on the protein expression of LRP1, RAGE in $A\beta_{25-35}$ -induced HBMEC injured cells

疾病,其特征在于 $A\beta$ 沉积和神经原纤维缠结,研究显示 90% 以上的 AD 患者均存在血脑屏障(BBB)损伤, $A\beta$ 损伤脑微血管内皮细胞而引起 BBB 破坏,可能是 AD 新的特征性病理改变^[13]。BBB 在清除脑内可溶性的 $A\beta$ 肽过程中起重要作用^[14]。内皮细胞上的多种蛋白都参与 $A\beta$ 的代谢过程,RAGE 是 BBB 上参与 $A\beta$ 转运的重要载体,LRP1 参与 $A\beta$ 由脑到循环的转运清除过程^[15]。另有文献指出,AD 存在着葡萄糖摄取及代谢损害^[16]。GLUT1 是葡萄糖跨越 BBB,为大脑提供基本能量支持的主要载体,也参与维持体内血脑屏障完整性,是血脑屏障发育成熟的重要指标^[17]。WINKLER E A 等^[18] 研究发现, GLUT1 的缺失会引起小鼠大脑中葡萄糖摄入的减少,行为缺失,神经异常以及 β 淀粉样蛋白的增加等。本研究发现,四君子汤水提液对 $A\beta_{25-35}$ 诱导 HBMEC 细胞损伤模型具有保护作用,并能够上调模型组的 LRP1 蛋白,以及 LRP1 mRNA 和 GLUT1 mRNA 的表达,同时能够下调 RAGE 蛋白和 RAGE mRNA 的表达。然而,四君子汤水提液对正常 HBMEC 内上述蛋白的表达无显著性影响。研究结果提示,四君子汤水提液在血脑屏障损伤的情况下,可能通过调控血脑屏障上 $A\beta$ 和葡萄糖的转运,达到

改善脑内能量代谢,减少 $A\beta$ 损伤的作用。

四君子汤水提液中成分分析结果显示,主要为人参皂苷、黄酮类(主要是甘草苷类)、三萜皂苷类(主要是甘草酸类)、茯苓三萜类、白术内酯几大类。人参皂苷类可以通过改善学习和记忆能力、干扰 β -淀粉样蛋白生成,抗 β -淀粉样蛋白毒性、抑制 Tau 蛋白过度磷酸化、抗氧化应激反应、促进神经营养作用、促进神经细胞分化等几大机制达到抗 AD 的作用^[21],甘草黄酮类对一些代谢性疾病有治疗效果,如 2 型糖尿病、胰岛素抵抗等^[22-23]。甘草酸二铵体内和体外均可保护 $A\beta_{1-42}$ 诱导的 AD 模型^[24]。茯苓三萜类化合物是茯苓主要活性成分之一,可使胰岛素的分泌诱导活性显著增强^[25]。白术内酯是白术的主要活性成分之一,具有抗老年痴呆症的作用,对损伤细胞有保护作用^[26],还可以通过作用于 AMP 活化的蛋白激酶(AMPK)和 PI3K/AKT 通路,影响葡萄糖的摄取^[27]。上述这些成分,与四君子汤水提液对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 HBMEC 细胞损伤模型的保护作用和调控 $A\beta$ 在血脑屏障上的转运密切相关。

综上所述,四君子汤水提液能提高 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 HBMEC 损伤细胞的活性,调控 GLUT1, LRP1, RAGE mRNA 和 LRP1 蛋白、RAGE 蛋白的表达,有助于 $A\beta$ 跨血脑屏障转运,减少 $A\beta$ 在脑内的聚集,这可能是防治 AD 的潜在机制。

参考文献

- [1] 李林. 中国阿尔茨海默病研究进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2015, 29(5): 765.
- [2] 文雯, 高丽娟, 魏江平, 等. 能量代谢与阿尔茨海默病研究进展 [J]. 世界科学技术——中医现代化, 2018, 20(12): 2145.
- [3] STORCK S E, MEISTER S, NAHRATH J, et al. Endothelial LRP1 transports amyloid- β (1-42) across the blood-brain barrier [J]. J Clin Invest, 2016, 126(1): 123.
- [4] 卢阳佳, 陈俊琦, 黄泳, 等. 从脾胃论治阿尔茨海默病概述 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(5): 1217.
- [5] ZHANG L, LI M, ZHAN L B, et al. Plasma metabolomic profiling of patients with diabetes-associated cognitive decline [J]. PLoS ONE, 2015, 10(5): e0126952.
- [6] ZHU L, ZHANG L, ZHAN L, et al. The effects of Zibu Piyin Recipe components on scopolamine-induced learning and memory impairment in the mouse [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 151(1): 576.
- [7] 刘旭东, 王凌志, 刘慧慧, 等. 四君子汤对阿尔茨海默病大鼠行为学及海马神经元能量代谢功能的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(16): 1.
- [8] 李超, 毕鹏翔, 董妍, 等. 姜黄素类似物对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 AD 细

- 胞模型细胞凋亡的影响 [J]. 中国现代医生, 2017, 55(10): 1.
- [9] 王博林, 宣玲, 戴世杰, 等. β -细辛醚对 $A\beta_{1-42}$ 联合 2-VO 致 AD 大鼠的保护作用及机制初探 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(24): 4847.
- [10] WAN W, CAO L, LIU L, et al. EGb761 provides a protective effect against $A\beta_{1-42}$ oligomer-induced cell damage and blood-brain barrier disruption in an *in vitro* bEnd.3 endothelial model [J]. PLoS ONE, 2014, 9(11): e113126.
- [11] 马天红, 盛涛, 田崇梅, 等. 虎杖醇提物通过 NLRP3/ASC/caspase-1 轴干预小鼠急性痛性关节炎的作用研究 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(3): 546.
- [12] 赵艳敏, 刘素香, 张晨曦, 等. 基于 HPLC-Q-TOF-MS 技术的甘草化学成分分析 [J]. 中草药, 2016, 47(12): 2061.
- [13] 康安, 郭锦瑞, 谢彤, 等. UPLC-LTQ-Orbitrap 质谱联用技术分析茯苓中的化学成分 [J]. 南京中医药大学学报, 2014, 30(6): 561.
- [14] ZHENG X L, XIE Z H, ZHU Z Y, et al. Methyllycaconitine alleviates amyloid- β peptides-induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells [J]. PLoS ONE, 2014, 9(10): e111536.
- [15] 赵昊, 宋军营, 宫洪涛, 等. 阿尔茨海默病血脑屏障研究进展 [J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(14): 3595.
- [16] 张明勇, 刘敏, 洪战英, 等. 阿尔茨海默病的中药治疗和血脑屏障转运蛋白功能变化研究进展 [J]. 中国药理学杂志, 2018, 53(7): 490.
- [17] PIETRZIK C, JAEGER S. Functional role of lipoprotein receptors in Alzheimers disease [J]. Curr Alzheimer Res, 2008, 5(1): 15.
- [18] 郑琴, 罗俊, 章德林, 等. 基于糖代谢、脂代谢和能量代谢探讨脾脏与阿尔茨海默病的关系 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(5): 178.
- [19] 许兵, 张俞, 杜久林. 血脑屏障的研究进展 [J]. 生理学报, 2016, 68(3): 306.
- [20] WINKLER E A, NISHIDA Y, SAGARE A P, et al. GLUT1 reductions exacerbate Alzheimer's disease vasculo-neuronal dysfunction and degeneration [J]. Nat Neurosci, 2015, 18(4): 521.
- [21] 白卫国, 张仰君, 徐凯, 等. 人参提取物治疗阿尔茨海默病药理作用及机制研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志, 2016, 23(9): 126.
- [22] 钟永恒, 贾仕杰, 郝同江, 等. 甘草黄酮类化合物生理功能及其在食品中应用研究 [J]. 中国林副特产, 2016(3): 91.
- [23] GUO Z H, NIU X L, XIAO T, et al. Chemical profile and inhibition of α -glycosidase and protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) activities by flavonoids from licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch) [J]. J Funct Foods, 2015, 14: 324.
- [24] ZHU X L, CHEN C, YE D, et al. Diammonium glycyrrhizinate upregulates PGC-1 α and protects against $A\beta_{1-42}$ -induced neurotoxicity [J]. PLoS ONE, 2012, 7: e35823.
- [25] 林斌, 何艳梅. 茯苓三萜化合物的药理作用研究进展 [J]. 黑龙江科技信息, 2014(31): 77.
- [26] 姚兆敏, 陈卫东, 仰忠华, 等. 白术研究进展及其质量标志物 (Q-marker) 的预测分析 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4796.
- [27] CHAO C L, HUANG H C, LIN H C, et al. Sesquiterpenes from Baizhu stimulate glucose uptake by activating AMPK and PI3K [J]. Am J Chin Med, 2016, 44(5): 963.

责任编辑 马超一