

基于均匀设计实验的栀子-三七主要有效成分抗 $A\beta_{1-42}$ 诱导 SH-SY5Y 细胞损伤的配伍研究

岳钰茗¹, 杨冰^{2,3,4}, 周福军^{2,3,4}, 王泽凡^{2,3,4}, 周钰通^{2,3,4}, 付庆¹, 单洪^{2,3,4}, 徐旭^{2,3,4}

(1 天津中医药大学, 天津 300193; 2 药物成药性评价与系统转化全国重点实验室(原释药技术与药动学国家重点实验室), 天津 300301; 3 天津市中药质量标志物重点实验室, 天津 300301; 4 天津药物研究院, 天津 300301)

[摘要] **目的:** 采用均匀设计实验方法, 探索栀子和三七中 5 个主要有效成分的有效配伍比例, 为临床治疗阿尔茨海默病提供初步实验依据。**方法:** 建立 β -淀粉样蛋白 ($A\beta_{1-42}$) 诱导 SH-SY5Y 细胞损伤模型, 以细胞存活率为指标, 研究主要有效成分抗 $A\beta_{1-42}$ 诱导 SH-SY5Y 神经细胞损伤的有效浓度, 以损伤恢复率为指标选出 5 种药效较好的成分。在此基础上筛选出的 5 种药效良好的成分分别为自变量 X_1, X_2, X_3, X_4, X_5 , 损伤恢复率 (%) 为因变量 Y , 选用 $U_{21}(21^5)$ 均匀设计表和线性、二次多项式 2 种数学模型, 以逐步回归方法筛选变量, 确定 5 种有效成分的有效配伍比例。**结果:** 栀子-三七主要有效成分除京尼平外均能提高 $A\beta_{1-42}$ 诱导 SH-SY5Y 细胞损伤的细胞存活率, 并呈浓度依赖性。筛选得到 5 种药效良好的成分为三七皂苷 R1、人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Rg1、栀子苷、京尼平龙胆双糖苷。均匀设计实验结果经回归分析得到 $Y = 12.77501992 - 0.4938270427X_2 + 0.07063466558X_1X_2 - 0.022126968533X_1X_5 + 0.05300069195X_3X_4$ ($r = 0.8574, F = 11.1059, P = 0.002$), 均匀设计实验验证得到最佳配伍比例为三七皂苷 R1: 人参皂苷 Rb1: 人参皂苷 Rg1: 栀子苷: 京尼平龙胆双糖苷 = 1:1:1:1:0。行为学试验显示与模型组小鼠比较, 盐酸多奈哌齐组、栀子-三七最优配伍的测试次数和记忆错误次数均显著降低。ROS 和 Western blot 结果显示与模型组比较, 盐酸多奈哌齐组、栀子-三七最优配伍可以有效降低 ROS 的荧光强度和 RAGE 蛋白的表达。**结论:** 运用均匀设计筛选获得的最优配伍比例可有效改善阿尔茨海默病, 其作用机制可能为抑制 RAGE-ROS 通路的激活发挥抗阿尔茨海默病的作用, 为治疗阿尔茨海默病提供了实验依据。

[关键词] 阿尔茨海默病; 栀子苷; 三七皂苷 R1; 人参皂苷 Rb1; 人参皂苷 Rg1; 配伍

[中图分类号] R965 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)18-1882-11

Compatibility study of the main active components of Gardenia-Panax notoginseng against $A\beta_{1-42}$ -induced damage to SH-SY5Y cells based on uniform design experiments

YUE Yu-ming¹, YANG Bing^{2,3,4}, ZHOU Fu-jun^{2,3,4}, WANG Ze-fan^{2,3,4}, ZHOU Yu-tong^{2,3,4}, FU Qing¹, SHAN Qi^{2,3,4}, XU Xu^{2,3,4}

(1 Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China; 2 National Key Laboratory of Drug Evaluation and Systematic Transformation (State Key Laboratory of Original Drug Release Technology and Pharmacokinetics), Tianjin 300301, China; 3 Tianjin Key Laboratory of Quality Marker of Traditional Medicine, Tianjin 300301, China; 4 Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300301, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effective compatibility ratio of the 5 main active ingredients in Gardenia and Panax notoginseng by uniform design test method thus to provide preliminary experimental evidence for clinical

[基金项目] 释药技术与药动学国家重点实验室(天津药物研究院)开放课题资助(010161003)

[作者简介] 岳钰茗, 男, 硕士研究生, 研究方向: 中药新药研发。E-mail: yueyuming123@163.com。

[通讯作者] 单洪, 男, 博士, 研究方向: 天然药物新药研发。E-mail: shanq@tjpr.com。徐旭, 男, 硕士生导师, 研究员, 研究方向: 中药产品开发和中药药理研究。E-mail: xux@tipr.com.cn。

treatment of Alzheimer's disease. **Methods:** A model of SH-SY5Y cell injury induced by β -amyloid ($A\beta_{1-42}$) was established, and the cell survival rate was used as an indicator to study the effective concentrations of the main active ingredients against $A\beta_{1-42}$ -induced SH-SY5Y neuronal injury, and according to the damage recovery rate, five ingredients with better efficacy were selected. On this basis, the five components with good efficacy were used as independent variables X_1, X_2, X_3, X_4 and X_5 , respectively, the injury recovery rate (%) as the dependent variable Y , $U_{21}(21^5)$ uniform design table and 2 mathematical models of linear and quadratic polynomials were selected, and the variables were screened by stepwise regression method to determine the effective compatibility ratio of the 5 active ingredients. **Results:** The main active components of Gardenia-Panax notoginseng, except genipin, could increase the cell survival rate of SH-SY5Y cells induced by $A\beta_{1-42}$ in a concentration-dependent manner. 5 ingredients with good efficacy were identified as notoginsenoside R1, ginsenoside Rb1, ginsenoside Rg1, geniposide, and genipin gentiobiglycoside. The results of uniform design experiments were obtained by regression analysis and $Y = 12.775\ 019\ 92 - 0.493\ 827\ 042\ 7X_2 + 0.070\ 634\ 665\ 58X_1X_2 - 0.022\ 126\ 968\ 533X_1X_5 + 0.053\ 000\ 691\ 95X_3X_4$ ($r = 0.857\ 4, F = 11.105\ 9, P = 0.002$), and the uniform design test verified that the best combination ratio was notoginsenoside R1: ginsenoside Rb1: ginsenoside Rg1: geniposide: genipin gentiobiglycoside = 1:1:1:1:0. Behavioral experiments showed that compared with the model group, the number of tests and memory errors of donepezil hydrochloride group and gardenia-Panax notoginseng optimal matching were significantly reduced. The results of ROS and Western blot showed that compared with the model group, the optimal combination of donepezil hydrochloride group and gardenia-Panax notoginseng could effectively reduce the fluorescence intensity of ROS and the expression of RAGE protein. **Conclusion:** The optimal matching ratio obtained by uniform design screening can effectively improve Alzheimer's disease, and its mechanism of action may play an anti-Alzheimer's effect by inhibiting the activation of RAGE-ROS pathway, which provides an experimental basis for the treatment of Alzheimer's disease.

[Key words] Alzheimer's disease; geniposide; notoginsenoside R1; ginsenoside Rb1; ginsenoside Rg1; compatibility

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种常见的隐匿性神经退行性疾病^[1],根据世界阿尔茨海默病2020年报告公布的数据,全球约有5 000万例AD患者,而我国就约有1 000万例AD患者^[2],随着人类平均寿命增长,老年化社会加剧,AD的患病率也在不断上升。临床上以认知障碍、学习和记忆功能损害、行为能力反常、痴呆等表现为特征^[3],最终致使患者生活自理能力完全丧失,严重影响老年人生活质量,高额医疗费用也给家人及社会带来沉重经济负担。目前AD的机制涉及多种假说,主要有 β -淀粉样蛋白(β -amyloid, $A\beta$)级联假说、Tau蛋白过度磷酸化、胆碱能系统异常、胰岛素假说、氧化应激、炎症反应、神经细胞凋亡以及神经递质紊乱等^[4-6]。目前对AD并没有可以治愈的药物,但有效的药物治疗如盐酸多奈哌齐、美金刚、维生素E、银杏叶提取物、石杉碱甲、人参、熟地黄、栀子、三七等^[7-9]均可改善患者症状。

药物化学研究表明栀子中主要活性成分是环烯醚萜类化合物,主要含栀子苷、京尼平龙胆双糖苷、去乙酰车叶草苷酸甲酯以及京尼平等,具有改善认知功能^[10]和神经保护作用^[11];三七中主要活性成

分为三七总皂苷,包括三七皂苷R1、人参皂苷Rb1、人参皂苷Rg1和人参皂苷Re等,在心脑血管疾病中具有抗氧化和抑制脑神经细胞凋亡的作用^[12]。多项药理研究表明,栀子-三七按一定剂量配伍具有协同防治AD的作用^[13-14]。推测栀子-三七对AD的防治作用可能是其有效成分栀子苷、京尼平龙胆双糖苷、去乙酰车叶草苷酸甲酯、京尼平、三七皂苷R1、人参皂苷Rb1、人参皂苷Rg1以及人参皂苷Re配伍作用的结果。

本研究以 $A\beta_{1-42}$ 诱导SH-SY5Y细胞的AD损伤模型为研究对象,通过均匀设计实验方法研究栀子-三七主要有效成分抗 $A\beta_{1-42}$ 诱导SH-SY5Y细胞损伤的有效配伍比例,并通过体内模型进一步验证其配伍比例以及探究体内外的作用机制,为进一步开发应用栀子-三七有效成分的配伍及提高中医药防治AD的疗效提供实验依据。

材料与方法

1 细胞株及动物

人神经母细胞瘤SH-SY5Y细胞株(武汉普诺塞生命科技有限公司);3月龄雌性APP/PS1双转

基因小鼠 30 只、同月龄雌性 C57BL/6J 小鼠 6 只(与 APP/PS1 小鼠具有相同遗传背景)均购自北京华阜康生物科技股份有限公司,SPF 级,许可证编号:SCXK(京)2019-0008,实验动物伦理批号:2022090701。实验动物遵照国家实验动物饲养和使用指南。

2 药品与试剂

栀子苷(质量分数 $\geq 95\%$)、京尼平龙胆双糖苷(质量分数 $\geq 85\%$)、三七皂苷 R1(质量分数 $\geq 92.5\%$)、人参皂苷 Rg1(质量分数 $\geq 98\%$)、人参皂苷 Re(质量分数 $\geq 96\%$)、人参皂苷 Rb1(质量分数 $\geq 98\%$)均为实验室自制;京尼平(成都克洛玛生物科技有限公司,货号:CHB-J-037,质量分数 $\geq 98\%$);去乙酰车叶草苷酸甲酯(货号:Z1708X45939,质量分数 $\geq 98\%$)、盐酸多奈哌齐(货号:D23J11X119360,质量分数 $\geq 98\%$)购于上海源叶生物科技有限公司;MEM/F12 培养基(武汉普诺塞生命科技有限公司,货号:WH1021U081);0.25% 胰蛋白酶(货号:2403073)、胎牛血清(FBS,货号:2409427P)、青霉素-链霉素双抗(货号:147173)均购于美国 Gibco 公司;二甲基亚砜(DMSO,货号:710N0319)、PBS 缓冲液(货号:202110927)、Hank's 缓冲液(货号:20210408)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(货号:PC0020)均购于北京索莱宝科技有限公司;CellTiter 96[®] Aqueous 工作液(美国 Promega 公司,货号:0000447332);A β_{1-42} [吉尔生化(上海)有限公司,货号:P220613-SY052487];羧甲基纤维素钠(天津市凯信化学工业有限公司,货号:20170303);六氟异丙醇(上海麦克林生化科技有限公司,货号:C13534418);活性氧(ROS)检测试剂盒(Biosharp 公司,货号:BL714A);RAGE 抗体(美国 Abcam 公司,货号:GR3402053-19);GAPDH Ab(货号:86v4590)、Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)HRP(货号:S0001)、Goat Anti-Mouse IgG(H+L)HRP(货号:S0002)购于 Affinity 公司。

3 实验仪器

Series II 型二氧化碳培养箱、超微量移液器、Multiskan Go 全自动酶标仪、-80℃超低温冰箱均购于美国 Thermo 公司;CKX-41 型倒置显微镜(天津微仪光学仪器有限公司);全自动细胞计数仪(BIORAD 公司);生物安全柜(Heal Froce 公司);常温低速离心机(长沙高新技术产业开发区湘仪离心机仪器有限公司);电子天平(Sartorius 公司);快速水分测定仪(Agilent 公司);小鼠 Y 型迷宫、小鼠 Y

迷宫箱体、Y 迷宫刺激器均购于安徽正华生物仪器设备有限公司;超灵敏全自动成像分析仪(Protein-simple 公司)。

4 细胞培养

SH-SY5Y 细胞用含 15% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素混合溶液的 MEM/F12 完全培养液培养,置于 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度的培养箱中,待细胞浓度为 80%~90% 后传代,每 2 d 换液一次,待细胞进入对数生长期即可用于实验。

5 主要试剂的配制

5.1 A β_{1-42} 寡聚体制配

将六氟异丙醇置于冰上预冷,取 A β_{1-42} (M = 4514.14)粉末 1 mg 溶于 1 mL 的六氟异丙醇,于快速水分测定仪中冻干成寡聚态后取出溶于 22.15 μ L 的 DMSO,加入 2.769 mL 的 MEM/F12 培养基制备成 80 μ mol \cdot L⁻¹ 的母液,37℃、5% CO₂ 细胞培养箱孵育老化 10 d。

5.2 样品溶液母液的配制

栀子苷母液配制:精密称取栀子苷(M = 388.37) 5.86 mg,加 10.5 mL 的 MEM/F12 培养基溶解,0.22 μ mol \cdot L⁻¹ 无菌滤膜过滤,得母液浓度为 1.5 mmol \cdot L⁻¹,放于 -20℃ 冰箱备用。

京尼平龙胆双糖苷母液配制:精密称取京尼平龙胆双糖苷(M = 550.51) 5.54 mg,加 10 mL 的 MEM/F12 培养基溶解,0.22 μ mol \cdot L⁻¹ 无菌滤膜过滤,得母液浓度为 1 mmol \cdot L⁻¹,放于 -20℃ 冰箱备用。

去乙酰车叶草苷酸甲酯母液配制:精密称取去乙酰车叶草苷酸甲酯(M = 404.37) 2.24 mg,加 14 mL 的 MEM/F12 培养基溶解,0.22 μ mol \cdot L⁻¹ 无菌滤膜过滤,得母液浓度为 400 μ mol \cdot L⁻¹,放于 -20℃ 冰箱备用。

京尼平母液配制:精密称取京尼平(M = 226.23) 5.14 mg,加 11 mL 的 Hank's 溶解,0.22 μ mol \cdot L⁻¹ 无菌滤膜过滤,得母液浓度为 2 mmol \cdot L⁻¹,放于 -20℃ 冰箱备用。

三七皂苷 R1 母液配制:精密称取三七皂苷 R1(M = 933.16) 3.36 mg,加 90 μ L 的 DMSO 充分溶解,加入 9 mL 的 MEM/F12 培养基溶解,0.22 μ mol \cdot L⁻¹ 无菌滤膜过滤,得母液浓度为 400 μ mol \cdot L⁻¹,放于 -20℃ 冰箱备用。

人参皂苷 Rb1 母液配制:精密称取人参皂苷 Rb1(M = 1109.29) 3.18 mg,加 167 μ L 的 DMSO 充分溶解,加入 7 mL 的 MEM/F12 培养基溶解,0.22

$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 无菌滤膜过滤,得母液浓度为 $400\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 放于 $-20\ ^\circ\text{C}$ 冰箱备用。

人参皂苷 Rg1 母液配制:精密称取人参皂苷 Rg1 ($M=800$) $4.13\ \text{mg}$,加 $163\ \mu\text{L}$ 的 DMSO 充分溶解,加入 $5\ \text{mL}$ 的 MEM/F12 培养基溶解, $0.22\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 无菌滤膜过滤,得母液浓度为 $1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,放于 $-20\ ^\circ\text{C}$ 冰箱备用。

人参皂苷 Re 母液配制:精密称取人参皂苷 Re ($M=947.12$) $2.43\ \text{mg}$,加 $114\ \mu\text{L}$ 的 DMSO 充分溶解,加入 $6\ \text{mL}$ 的 MEM/F12 培养基溶解, $0.22\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 无菌滤膜过滤,得母液浓度为 $400\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,放于 $-20\ ^\circ\text{C}$ 冰箱备用。

6 $\text{A}\beta_{1-42}$ 适宜浓度的选择

将浓度为 3×10^6 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 SH-SY5Y 细胞接种于 96 孔板,放入细胞培养箱中培养至细胞贴壁。对照组加入 MEM/F12 培养基,损伤组加入终浓度分别为 $5, 10, 20, 40\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $\text{A}\beta_{1-42}$ 溶液,每组 5 个复孔,每孔 $100\ \mu\text{L}$ 。培养 48 h 后,每孔加入 $20\ \mu\text{L}$ 的 CellTiter 96[®] AQueous 工作液置于 $37\ ^\circ\text{C}$ 培养箱中孵育 2.5 h,采用酶标仪于 $490\ \text{nm}$ 下检测吸光度 (OD) 值;计算 SH-SY5Y 细胞存活率。

细胞存活率/% = (实验组 OD 值 - 空白组 OD 值)/(对照组 OD 值 - 空白组 OD 值) $\times 100\%$

7 栀子-三七主要有效成分的剂量选择

将浓度为 3×10^6 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 SH-SY5Y 细胞接种于 96 孔板,放入细胞培养箱中培养至细胞贴壁。将细胞分为对照组 MEM/F12 (含 15% FBS + 1% 双抗) 培养基,终浓度为 $6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的栀子苷、京尼平龙胆双糖苷、去乙酰车叶草苷酸甲酯、京尼平、三七皂苷 R1、人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Rg1 和人参皂苷 Re 组,每组 5 个复孔,每孔 $100\ \mu\text{L}$ 。培养 48 h 后,每孔加入 $20\ \mu\text{L}$ 的 CellTiter 96[®] AQueous 工作液置于 $37\ ^\circ\text{C}$ 培养箱中孵育 2.5 h,采用酶标仪于 $490\ \text{nm}$ 下检测 OD 值;计算 SH-SY5Y 细胞存活率。

8 栀子-三七主要有效成分的选择

将浓度为 3×10^6 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 SH-SY5Y 细胞接种于 96 孔板,放入细胞培养箱中培养至细胞贴壁。将细胞分为对照组 (MEM/F12 培养基)、 $\text{A}\beta_{1-42}$ 模型组 ($20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、京尼平组 ($6.25, 12.5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} + 20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{A}\beta_{1-42}$)、栀子苷、京尼平龙胆双糖苷、去乙酰车叶草苷酸甲酯、三七皂苷 R1、人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Rg1 组以及人参皂苷 Re 组 ($12.5,$

$25, 50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} + 20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{A}\beta_{1-42}$), 每组 5 个复孔,每孔 $100\ \mu\text{L}$ 。培养 48 h 后,每孔加入 $20\ \mu\text{L}$ 的 CellTiter 96[®] AQueous 工作液置于 $37\ ^\circ\text{C}$ 培养箱中孵育 2.5 h,采用酶标仪于 $490\ \text{nm}$ 下检测 OD 值;计算 SH-SY5Y 细胞存活率以及损伤恢复率。

损伤恢复率/% = (实验组细胞存活率 - 模型组细胞存活率)/模型组细胞存活率 $\times 100\%$

9 栀子-三七主要有效成分抗 $\text{A}\beta_{1-42}$ 诱导 SH-SY5Y 细胞损伤的均匀设计实验

9.1 均匀设计方案

通过上述实验结果,以三七皂苷 R1、人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Rg1、栀子苷、京尼平龙胆双糖苷作为考察因素,分别用 X_1, X_2, X_3, X_4, X_5 表示。每个因素设置 21 个水平,根据中国数学会均匀设计分会官网中的均匀设计表选取 $U_{21}(21^5)$, $CD^2 = 0.009\ 015$,见表 1。利用 DPS 7.05 软件对各变量进行多元线性方程与二次多项式回归方程分析得到回归方程式。

表 1 均匀设计表

实验分组	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5
1	15	20	5	4	14
2	19	12	3	10	4
3	4	15	2	14	18
4	16	1	12	13	5
5	11	13	16	21	16
6	17	8	6	17	20
7	7	11	11	1	21
8	3	10	19	18	3
9	21	18	10	19	11
10	18	14	18	2	8
11	20	4	14	7	17
12	9	19	20	9	19
13	14	7	21	15	13
14	8	3	4	20	7
15	13	16	15	12	1
16	2	17	7	6	6
17	5	2	17	5	12
18	6	21	13	16	9
19	12	9	1	8	10
20	1	5	9	11	15
21	10	6	8	3	2

9.2 均匀设计各药物剂量的确定

在上述实验探索的有效浓度的基础上,确定三七皂苷 R1、人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Rg1、栀子苷、京尼平龙胆双糖苷的剂量范围为 $0\sim 25\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,按照均匀设计表格安排各因子及各浓度,进行各因

子各浓度的组合,共得到 21 组实验方案,见表 2。以 CellTiter 96[®] AQueous 工作液检测细胞存活率,通过计算得到的损伤恢复比为因变量 Y 。将细胞分为对照组 (MEM/F12 培养基)、 $A\beta_{1-42}$ 模型组 ($20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、均匀设计实验各组,每组 5 个复孔,每孔 $100 \mu\text{L}$ 。培养 48 h 后,每孔加入 $20 \mu\text{L}$ 的 CellTiter 96[®] AQueous 工作液置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱中孵育 2.5 h,采用酶标仪于 490 nm 下检测 OD 值;计算 SH-SY5Y 细胞存活率以及损伤恢复率。

表 2 均匀设计各因子水平的取值方案

实验 分组	$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$				
	三七皂 苷 R1	人参皂 苷 Rb1	人参皂 苷 Rg1	栀子苷	京尼平龙 胆双糖苷
1	10	22.5	1	0.5	7.5
2	20	4.5	0.2	3.5	0.5
3	0.5	10	0.1	7.5	17.5
4	12.5	0	4.5	5	1
5	4	5	12.5	25	12.5
6	15	2.5	1.5	15	22.5
7	2	4	4	0	25
8	0.2	3.5	20	17.5	0.2
9	25	17.5	3.5	20	4
10	17.5	7.5	17.5	0.1	2.5
11	22.5	0.5	7.5	2	15
12	3	20	22.5	3	20
13	7.5	2	25	10	5
14	2.5	0.2	0.5	22.5	2
15	5	12.5	10	4.5	0
16	0.1	15	2	1.5	1.5
17	1	0.1	15	1	4.5
18	1.5	25	5	12.5	3
19	4.5	3	0	2.5	3.5
20	0	1	3	4	10
21	3.5	1.5	2.5	0.2	0.1

9.3 均匀设计验证实验

根据均匀设计实验结果得到的最优配伍比例,将细胞分为对照组 (MEM/F12 培养基)、 $A\beta_{1-42}$ 模型组 ($20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、理论最优配伍组 (三七皂苷 R1: 人参皂苷 Rb1: 人参皂苷 Rg1: 栀子苷: 京尼平龙胆双糖苷 = 1: 1: 1: 1: 0, $12.5, 25, 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} + 20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} A\beta_{1-42}$)、三七皂苷 R1 组 ($12.5, 25, 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} + 20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} A\beta_{1-42}$)、人参皂苷 Rb1 组 ($12.5, 25, 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} + 20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} A\beta_{1-42}$)、人参皂苷 Rg1 组 ($12.5, 25, 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} + 20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} A\beta_{1-42}$)、栀子苷组 ($12.5, 25, 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} + 20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} A\beta_{1-42}$)、

京尼平龙胆双糖苷组 ($12.5, 25, 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} + 20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} A\beta_{1-42}$), 每组 5 个复孔, 每孔 $100 \mu\text{L}$ 。培养 48 h 后, 每孔加入 $20 \mu\text{L}$ 的 CellTiter 96[®] AQueous 工作液置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱中孵育 2.5 h, 采用酶标仪于 490 nm 下检测 OD 值; 计算 SH-SY5Y 细胞存活率以及损伤恢复率。

9.4 ROS 检测

将细胞分为对照组 (MEM/F12 培养基)、 $A\beta_{1-42}$ 模型组 ($20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、最优配伍组 (三七皂苷 R1: 人参皂苷 Rb1: 人参皂苷 Rg1: 栀子苷: 京尼平龙胆双糖苷 = 1: 1: 1: 1: 0, $12.5, 25, 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} + 20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} A\beta_{1-42}$), 每组 5 个复孔, 每孔 $100 \mu\text{L}$ 。培养 48 h 后, 按照 ROS 试剂盒操作, 于倒置荧光显微镜下观察细胞 (激发波长: 488 nm , 发射波长: 530 nm)。

9.5 动物验证实验

9.5.1 分组及给药 将 6 只雌性 C57BL/6J 小鼠作为正常组 (C), 20 只雌性 APP/PS1 双转基因小鼠随机分为模型组 (M)、盐酸多奈哌齐组 ($Y, 3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)、最优配伍低剂量组 (COM-L, $40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)、中剂量组 (COM-M, $80 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) 以及高剂量组 (COM-H, $160 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), 每组灌胃给药 4 周后, 进行相关行为学指标检测。

9.5.2 Y 型电迷宫 “固定次数随机不休息法”是一种相对简便可靠的方法^[15]。具体步骤如下: 将 Y 迷宫的 3 个支臂分别标记为 A, B, C, 迷宫底部为铜棒, 三臂顶端各装有 15 W 的信号灯。实验前随机将小鼠放入 1 个臂的末端适应 3 min, 训练组小鼠在起步区予以电击致其逃至安全区, 灯光持续 15 s, 然后以所在支臂作为下次测试的起始位置进行下一次测试。对每只小鼠进行训练, 凡小鼠在受电击后 10 s 内一次性从起步区逃至安全区的反应称为“正确反应”, 否则为“错误反应”。电压参数: 电压 30 V; 延时 5 s。以连续 10 次电击中正确反应达 9 次或以上定为学会标准。达到学会标准所需的电击次数表示学习记忆成绩, 电击次数少说明学习能力强^[16]。

学习能力检测 24 h 后, 依照上述方法对小鼠连续进行 15 次测试, 记录小鼠在 15 次测试中的错误次数作为记忆成绩。

9.5.3 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 取小鼠脑组织, 使用 RIPA 组织裂解液处理, 取上清液, 用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定总蛋白浓度, 将蛋白样品与 $5 \times$ loading buffer 按 4: 1 比例混合均匀后沸水浴变性 10 min, 放于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱储存备用。SDS-

聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)将蛋白按照相对分子质量的大小分离成不同的条带,将内参蛋白和目的蛋白转移到PVDF膜上,5%脱脂奶粉封闭1h,加一抗RAGE(1:1 000)、GAPDH(1:1 000)4℃冰箱振摇过夜,加TBST缓冲液清洗后,加入Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)HRP(1:3 000)和Goat Anti-Mouse IgG(H+L)HRP(1:3 000),室温振摇孵育1h后,继续清洗,加入超特敏ECL化学发光试剂,使用超灵敏全自动成像分析仪进行扫描分析。

10 统计学分析

实验数据以IBM SPSS Statistics 21.0软件处理,以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), $P < 0.05$ 为显著性

差异, $P < 0.01$ 为极显著差异。均匀设计及验证实验数据用 \bar{x} 表示,多元线性回归、二次多项式逐步回归分析采用DPS 7.05统计软件进行分析。方程的差异性检验,采用非参数卡方检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

1 $A\beta_{1-42}$ 适宜浓度的选择

1.1 $A\beta_{1-42}$ 对SH-SY5Y细胞状态影响

从显微镜下观察发现,对照组SH-SY5Y细胞形态正常,突触明显。模型组中随着 $A\beta_{1-42}$ 浓度的增加,SH-SY5Y细胞形态变圆,突触收缩,细胞呈悬浮状,见图1。

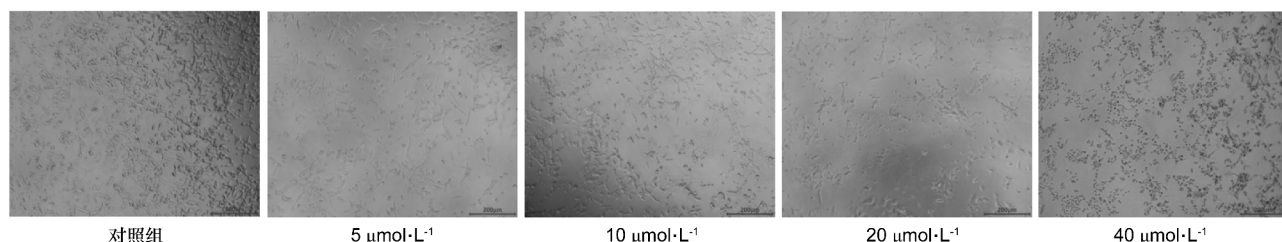


图1 SH-SY5Y细胞的形态变化

1.2 $A\beta_{1-42}$ 适宜浓度的选择

如表3所示,随着 $A\beta_{1-42}$ 浓度的增加,细胞存活率逐渐降低,且20和40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $A\beta_{1-42}$ 与对照组相比均具有极显著性差异($P < 0.01$),表明20和40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $A\beta_{1-42}$ 对细胞具有明显的损伤效果,其中,20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $A\beta_{1-42}$ 损伤效果适中,故后续实验选择20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $A\beta_{1-42}$ 作为诱导SH-SY5Y损伤的最佳浓度。

表3 $A\beta_{1-42}$ 对SH-SY5Y细胞的影响

$\bar{x} \pm s, n = 5$		
组别	药物浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞存活率/%
对照组	0	100.00 ± 5.08
$A\beta_{1-42}$	5	100.20 ± 8.33
	10	97.28 ± 3.76
	20	83.95 ± 3.86 ^a
	40	75.71 ± 2.09 ^a

与对照组比较, a: $P < 0.01$

2 梔子-三七主要有效成分的剂量选择

除京尼平外[在6.25 ~ 12.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度范围内与对照组相比,无显著性差异($P > 0.05$)],梔子

苷、京尼平龙胆双糖苷、去乙酰车叶草苷酸甲酯、三七皂苷R1、人参皂苷Rb1、人参皂苷Rg1和人参皂苷Re在6.25 ~ 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度范围内与对照组相比,均无显著性差异($P > 0.05$),提示在此浓度范围内对SH-SY5Y细胞不产生毒性作用,具体结果见表4。

表4 梔子-三七主要有效成分对SH-SY5Y

细胞毒性影响		$\bar{x} \pm s, n = 5$
组别	药物浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞存活率/%
对照组	0	100.00 ± 4.55
梔子苷	6.25	96.15 ± 6.23
	12.5	102.62 ± 4.24
	25	105.39 ± 7.02
	50	94.27 ± 6.19
	100	96.07 ± 5.61
	200	96.53 ± 5.17
京尼平龙胆双糖苷	400	94.90 ± 5.46
	6.25	107.10 ± 7.33
	12.5	109.02 ± 10.06
	25	102.46 ± 3.74
	50	106.32 ± 12.81
	100	103.83 ± 6.93
	200	96.55 ± 4.57
	400	93.31 ± 6.76

续表 4

组别	药物浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞存活率/%
去乙酰车叶草苷酸甲酯	6.25	102.34 ± 4.46
	12.5	103.32 ± 4.94
	25	102.45 ± 6.54
	50	97.58 ± 5.72
	100	95.09 ± 6.06
	200	97.99 ± 4.61
	400	96.49 ± 4.61
京尼平	6.25	97.50 ± 7.54
	12.5	94.60 ± 6.44
	25	72.67 ± 5.38 ^a
	50	66.74 ± 2.46 ^a
	100	72.67 ± 1.52 ^a
	200	58.98 ± 1.79 ^a
	400	39.98 ± 1.52 ^a
三七皂苷 R1	6.25	95.65 ± 4.56
	12.5	96.95 ± 5.33
	25	98.33 ± 3.45
	50	97.14 ± 6.96
	100	100.12 ± 10.46
	200	95.81 ± 6.44
	400	103.96 ± 7.01
人参皂苷 Rb1	6.25	93.84 ± 6.03
	12.5	94.84 ± 5.44
	25	92.66 ± 7.37
	50	95.52 ± 5.76
	100	106.55 ± 14.33
	200	90.01 ± 10.08
	400	93.76 ± 6.32
人参皂苷 Rg1	6.25	93.99 ± 6.25
	12.5	94.53 ± 5.44
	25	98.38 ± 4.94
	50	105.21 ± 5.20
	100	104.79 ± 7.76
	200	98.88 ± 4.42
	400	95.91 ± 5.15
人参皂苷 Re	6.25	92.69 ± 6.34
	12.5	91.95 ± 7.83
	25	95.31 ± 5.22
	50	96.28 ± 4.33
	100	94.58 ± 5.87
	200	94.12 ± 8.45
	400	95.91 ± 5.15

与对照组比较, a: $P < 0.01$

3 栀子-三七主要有效成分的选择

$\text{A}\beta_{1-42}$ 诱导 SH-SY5Y 细胞损伤后细胞存活率显著降低 ($P < 0.01$)。栀子-三七主要有效成分中, 栀子苷、京尼平龙胆双糖苷、去乙酰车叶草苷酸甲酯、三七皂苷 R1、人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Rg1 在 $12.5 \sim 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度范围内均能有效提高 $\text{A}\beta_{1-42}$ 诱导 SH-SY5Y 细胞损伤后的存活率 ($P < 0.05$), 并且随着浓

度增加, 细胞存活率升高, 损伤恢复率也升高, 呈现良好的量效关系, 去乙酰车叶草苷酸甲酯在 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 下有效 ($P < 0.05$), 京尼平在 $6.25 \sim 12.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度范围内与模型组比较, 无统计学差异 ($P > 0.05$), 人参皂苷 Re 在 $25 \sim 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度范围内有效 ($P < 0.05$)。通过比较损伤恢复率: 发现在 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 下, 人参皂苷 Rb1 > 三七皂苷 R1 > 人参皂苷 Rg1 > 京尼平龙胆双糖苷 > 栀子苷 > 人参皂苷 Re > 去乙酰车叶草苷酸甲酯, 在 $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 下, 人参皂苷 Rb1 > 三七皂苷 R1 > 人参皂苷 Rg1 > 京尼平龙胆双糖苷 > 栀子苷 > 人参皂苷 Re; 在 $12.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 下, 京尼平龙胆双糖苷 > 三七皂苷 R1 > 人参皂苷 Rg1 > 人参皂苷 Rb1 > 栀子苷, 具体结果见表 5。故选择栀子苷、京尼平龙胆双糖苷、三七皂苷 R1、人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Rg1 作为研究对象。为保证均匀设计实验最大终浓度不超过各单体最高有效浓度的 2 倍, 所以其浓度范围均设定为 $0 \sim 25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

表 5 栀子-三七主要有效成分的选择 $\bar{x} \pm s, n = 5$

组别	药物浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞存活率/%	损伤恢复率/%
对照组	0	100.00 ± 3.15	—
模型组 ($\text{A}\beta_{1-42}$)	20	82.69 ± 2.99 ^b	—
栀子苷	12.5	92.91 ± 3.74 ^d	13.45 ± 4.57
	25	97.10 ± 2.62 ^d	18.56 ± 3.20
京尼平龙胆双糖苷	50	104.74 ± 4.64 ^d	27.90 ± 5.67
	12.5	99.13 ± 3.21 ^d	21.15 ± 3.93
	25	102.14 ± 4.43 ^d	24.83 ± 5.42
去乙酰车叶草苷酸甲酯	50	105.92 ± 5.03 ^d	29.45 ± 6.15
	12.5	86.34 ± 1.42 ^b	3.77 ± 1.71
	25	89.63 ± 2.95 ^a	7.72 ± 3.54
京尼平	50	91.06 ± 0.27 ^{bc}	9.44 ± 0.32
	6.25	80.81 ± 1.88	-1.24 ± 2.30
	12.5	86.08 ± 5.20 ^a	5.20 ± 2.21
三七皂苷 R1	25	—	—
	50	—	—
	12.5	99.21 ± 1.92 ^d	16.87 ± 2.26
人参皂苷 Rb1	25	106.42 ± 7.71 ^d	25.37 ± 9.08
	50	112.17 ± 2.06 ^{ad}	32.15 ± 2.43
	12.5	97.49 ± 1.01 ^d	14.85 ± 1.19
人参皂苷 Rg1	25	112.10 ± 7.11 ^d	29.89 ± 8.38
	50	112.78 ± 1.30 ^{bd}	32.86 ± 1.53
	12.5	95.70 ± 4.16 ^d	16.85 ± 5.08
人参皂苷 Re	25	102.56 ± 4.52 ^d	25.24 ± 5.52
	50	107.87 ± 3.05 ^{ad}	31.72 ± 3.73
	12.5	88.06 ± 4.65	9.85 ± 5.80
人参皂苷 Rg1	25	92.83 ± 2.52 ^c	15.80 ± 3.14
	50	95.64 ± 4.03 ^c	19.30 ± 5.03

与对照组比较, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$; 与模型组 ($\text{A}\beta_{1-42}$) 比较, c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$

4 均匀设计实验结果及回归分析

采用 DPS 7.05 统计软件将响应值(Y)与各因素进行多元线性回归和二次多项式逐步回归分析。通过相关系数(r)、 F 值和 P 值对模型进行评价。用多元线性方程回归拟合,回归系数 t 检验,自变量 X_1, X_2, X_3, X_4, X_5 回归系数检验均 $P > 0.05$,说明因素各剂量之间的变化对损伤恢复比关系不是单纯的线性关系,不能用多元线性回归模型进行回归分析。用二次多项式逐步回归方法,根据 r, F 值, P 值综合考虑,对回归方程参数进行纳入与剔除后得到适合的二次多项式回归方程以及 Y 取最大值时各因素组合值,得出 $Y = 12.775\ 019\ 92 - 0.493\ 827\ 042\ 7X_2 + 0.070\ 634\ 665\ 58X_1X_2 - 0.022\ 126\ 968\ 533X_1X_3 + 0.053\ 000\ 691\ 95X_3X_4, r = 0.857\ 4, F = 11.105\ 9, P = 0.002 < 0.05$ 。 Y 取最大值时,三七皂苷 R1、人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Rg1、栀子苷 $25\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,京尼平龙胆双糖苷 $0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,即三七皂苷 R1:人参皂苷 Rb1:人参皂苷 Rg1:栀子苷:京尼平龙胆双糖苷 = 1:1:1:1:0。结果见表 6。

表 6 均匀设计各组细胞存活率与损伤恢复比

$\bar{x} \pm s, n = 5$

实验分组	细胞存活率/%	损伤恢复率/%
对照组	100.00 ± 1.89	—
模型组($A\beta_{1-42}$)	79.69 ± 3.85 ^b	—
1	90.82 ± 5.16 ^c	13.70 ± 6.46
2	90.35 ± 3.11 ^{ac}	13.11 ± 3.90
3	83.02 ± 3.11 ^b	3.94 ± 4.14
4	100.32 ± 11.83 ^c	25.60 ± 14.81
5	102.07 ± 5.39 ^d	27.78 ± 6.75
6	88.11 ± 2.16 ^{bc}	10.31 ± 2.70
7	91.58 ± 6.43 ^c	14.65 ± 8.05
8	102.57 ± 5.67 ^c	28.99 ± 7.13
9	107.90 ± 6.58 ^d	35.69 ± 8.27
10	99.89 ± 2.81 ^d	25.61 ± 3.54
11	81.99 ± 1.18 ^b	3.11 ± 1.48
12	87.82 ± 0.68 ^{bc}	10.44 ± 0.85
13	99.03 ± 0.98 ^d	24.54 ± 1.23
14	81.34 ± 0.72 ^b	2.28 ± 0.90
15	88.57 ± 4.45 ^{ac}	11.18 ± 5.59
16	81.68 ± 1.65 ^b	2.53 ± 2.07
17	87.29 ± 2.90 ^{bc}	9.56 ± 3.64
18	87.65 ± 1.97 ^{bc}	10.00 ± 2.47
19	87.73 ± 1.12 ^{bd}	10.11 ± 1.41
20	89.29 ± 3.47 ^{bd}	12.07 ± 4.36
21	94.56 ± 5.30 ^c	18.68 ± 6.66

与对照组比较, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$; 与模型组($A\beta_{1-42}$)比较, c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$

5 均匀设计验证实验

理论最优配伍组即三七皂苷 R1:人参皂苷 Rb1:人参皂苷 Rg1:栀子苷:京尼平龙胆双糖苷 = 1:1:1:1:0 在 $12.5 \sim 50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的终浓度下均可以提高 $A\beta_{1-42}$ 诱导 SH-SY5Y 细胞损伤后的存活率($P < 0.01$),具有良好的量效关系。且同一浓度下,理论最优配伍组的细胞存活率以及损伤恢复率均高于各单体组(浓度为 $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, $P < 0.05$)。证明了均匀设计实验得到的配伍为三七皂苷 R1:人参皂苷 Rb1:人参皂苷 Rg1:栀子苷:京尼平龙胆双糖苷 = 1:1:1:1:0 为最优配伍组。结果见表 7。

表 7 均匀设计验证实验各组细胞存活率与损伤恢复率

$\bar{x} \pm s, n = 5$

组别	药物浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞存活率/%	损伤恢复率/%
对照组	0	100.00 ± 2.33	—
模型组($A\beta_{1-42}$)	20	79.38 ± 2.61 ^b	—
理论最优配伍	12.5	99.01 ± 4.53 ^{ad}	24.73 ± 5.71
	25	104.09 ± 1.12 ^d	31.13 ± 1.41
	50	111.82 ± 1.44 ^d	40.87 ± 1.81
栀子苷	12.5	91.21 ± 6.00 ^c	14.19 ± 7.51
	25	95.35 ± 1.67 ^{bd}	19.91 ± 2.10
	50	101.35 ± 0.83 ^{df}	27.22 ± 1.04
京尼平龙胆双糖苷	12.5	96.81 ± 6.52 ^c	21.20 ± 8.16
	25	98.59 ± 2.50 ^{de}	23.99 ± 3.15
	50	102.16 ± 2.47 ^{df}	28.24 ± 3.11
三七皂苷 R1	12.5	92.70 ± 0.62 ^{ad}	16.06 ± 0.78
	25	100.12 ± 1.84 ^{de}	25.91 ± 2.32
	50	104.80 ± 2.49 ^{de}	31.56 ± 3.13
人参皂苷 Rb1	12.5	91.24 ± 0.12 ^{bde}	14.23 ± 0.15
	25	103.49 ± 3.27 ^d	30.14 ± 4.11
	50	105.79 ± 3.06 ^{de}	32.80 ± 3.85
人参皂苷 Rg1	12.5	92.60 ± 2.36 ^{ad}	15.93 ± 2.96
	25	99.98 ± 1.63 ^{de}	25.73 ± 2.06
	50	103.86 ± 2.38 ^{df}	30.38 ± 2.99

与对照组比较, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$; 与模型组($A\beta_{1-42}$)比较, c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$; 与理论最优配伍组比较, e: $P < 0.05$, f: $P < 0.01$

6 ROS 检测

由图 2 所示,与对照组比较,模型组 ROS 荧光强度明显升高;与模型组比较,不同浓度的最优配伍组处理后均可以有效降低 ROS 荧光强度。

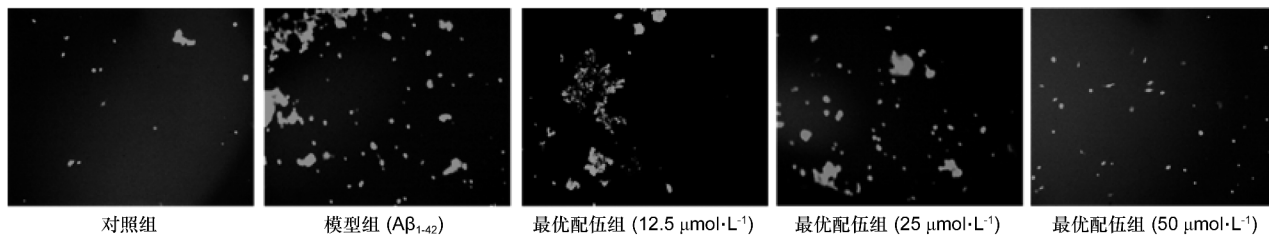


图 2 ROS 荧光强度 (标尺 = 100 μm)

7 均匀设计动物验证实验

7.1 栀子-三七最优配伍对 APP/PS1 双转基因小鼠的学习记忆的影响

与对照组相比,模型组小鼠测试次数和记忆错误次数均显著增加 ($P < 0.01$),说明模型组小鼠学习和记忆能力均较差。与模型组相比,盐酸多奈哌齐组、最优配伍中剂量组以及高剂量组的小鼠测试次数和记忆错误次数均显著降低 ($P < 0.01$),说明给药后小鼠学习和记忆能力均有效改善。且随着最优配伍组的浓度增加,小鼠学习和记忆能力改善效果越好。

表 8 栀子-三七最优配伍对 APP/PS1 双转基因小鼠学习记忆能力的影响

组别	学习次数/次	记忆错误次数/次
C	15.50 ± 2.65	2.5 ± 0.71
M	28.25 ± 4.03 ^b	5.33 ± 0.58 ^a
Y	17.67 ± 2.52 ^c	3.25 ± 1.26 ^c
COM-L	25.50 ± 3.70 ^b	3.75 ± 1.26
COM-M	22.00 ± 1.63 ^{bc}	2.25 ± 0.96 ^d
COM-H	18.20 ± 2.17 ^d	1.60 ± 0.55 ^d

与对照组比较, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$; 与模型组 ($A\beta_{1-42}$) 比较, c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$

7.2 栀子-三七最优配伍对 APP/PS1 双转基因小鼠 RAGE 通路蛋白的影响

如图 3 所示,检测栀子-三七最优配伍对 APP/PS1 双转基因小鼠 RAGE 蛋白的变化,结果表明,模型组中的 RAGE 蛋白含量明显增加,给予盐酸多奈哌齐以及栀子-三七最优配伍中剂量和高剂量后,均能够有效降低 RAGE 蛋白的含量。

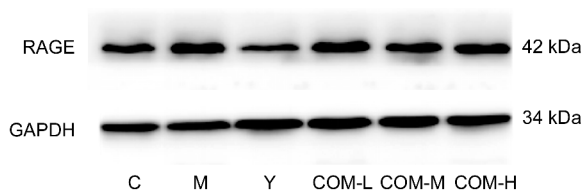


图 3 RAGE 蛋白表达

表 9 RAGE 蛋白表达

组别	RAGE/GAPDH
C	0.68 ± 0.07
M	2.20 ± 0.04 ^b
Y	1.38 ± 0.18 ^{ad}
COM-L	1.88 ± 0.04 ^{bc}
COM-M	0.78 ± 0.09 ^d
COM-H	0.82 ± 0.05 ^d

与 C 组比较, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$; 与 M 组比较, c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$

讨 论

栀子为茜草科植物栀子 (*G. jasminoides* Ellis) 的干燥成熟果实,具有泻火除烦、清热利尿、凉血解毒、益智开窍的功效。用以保护大脑神经、改善学习认知功能、增强脑部神经功能^[17]。三七为五加科植物三七 [*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen] 的干燥根和根茎,具有散瘀止血、消肿定痛的功效。用以补血、活血化瘀、保护心脑血管、抗神经元凋亡以及抗氧化应激^[18]。

脑内老年斑的形成是 AD 发生的标志性病理改变,主要由 $A\beta$ 聚集而成。 $A\beta$ 是一种含有 39 ~ 43 个氨基酸的多肽^[19],是 β -淀粉样前体蛋白 (APP) 在 β -分泌酶和 γ -分泌酶的作用下水解产生,分泌至细胞外形成老年斑,与 $A\beta_{1-40}$ 相比, $A\beta_{1-42}$ 容易发生聚集,且神经毒性更强,是老年斑形成的核心^[20]。因此本实验以 $A\beta_{1-42}$ 损伤 SH-SY5Y 细胞模拟 AD 模型,细胞存活率与浓度成正比例关系,且以 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $A\beta_{1-42}$ 损伤效果适中,故选择此浓度为造模浓度。

有研究证明栀子主要有效成分与三七总皂苷均可以改善小鼠的学习记忆功能,降低小鼠海马内 $A\beta$ 的表达从而减少 $A\beta$ 的合成,改善 AD^[21-22]。栀子中主要活性成分是环烯醚萜类化合物,主要含栀子苷、京尼平龙胆双糖苷、去乙酰车叶草苷酸甲酯以及京尼平;三七中主要活性成分为三七总皂苷,包括三

七皂苷 R1、人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Rg1 和人参皂苷 Re。本实验通过 MTS 法检测栀子-三七中主要有效成分对正常 SH-SY5Y 细胞的安全用药范围以及对 $A\beta_{1-42}$ 诱导损伤的保护作用,结果显示除京尼平外,栀子-三七主要有效成分对正常 SH-SY5Y 细胞无明显不良反应,各成分不同浓度下均可以有效提高 $A\beta_{1-42}$ 诱导损伤的细胞存活率和损伤恢复率,且与浓度呈正相关性,并筛选出 5 种药效良好的成分分别为三七皂苷 R1、人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Rg1、栀子苷、京尼平龙胆双糖苷。

均匀设计是考虑实验点在实验范围内均匀散布的一种方法,只需要进行与水平数等同的实验次数就可以获得较为全面有效的结果,克服了正交实验中因素和水平数受限、实验次数多的弊端^[23]。均匀设计实验数的确定与回归分析能够采用的模型息息相关,根据实验目的的不同采用线性、曲线或者非参数回归模型来表达变量间的关系所需的实验数是不同的,从数理上来说,实验数越多拟合的方程越准确,能反映出来药物配伍相互关系也就越多^[24]。本实验以筛选出的栀子-三七 5 个主要有效成分为考察因素,每个成分的有效给药浓度范围设定为 $0 \sim 12.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,因变量过多且各成分之间可能会存在相互交叉作用,故选择线性和二次多项式 2 个回归模型进行分析,为使模型拟合方程更加准确,本实验每个因素选 21 个水平, CD^2 为 0.009 015。建立了考察变量与效应指标(损伤恢复率)之间的二次多项式逐步回归方程 $Y = 12.775\ 019\ 92 - 0.493\ 827\ 042\ 7X_2 + 0.070\ 634\ 665\ 58X_1X_2 - 0.022\ 126\ 968\ 533X_1X_3 + 0.053\ 000\ 691\ 95X_3X_4$,得到最优配伍比例为三七皂苷 R1: 人参皂苷 Rb1: 人参皂苷 Rg1: 栀子苷: 京尼平龙胆双糖苷 = 1: 1: 1: 1: 0,换算成质量比为 2.4: 2.86: 2.05: 1: 0。均匀设计实验验证实验结果显示在同一浓度下,最优配伍组对 $A\beta_{1-42}$ 诱导损伤的细胞存活率和损伤恢复率均大于各个成分,进一步说明了整体观的中药药效是各活性成分协同作用的结果,而均匀设计实验方法也能较好反映不同配伍的量效关系。

当 AD 发生时, $A\beta$ 在脑内沉积,导致细胞产生过量的 ROS^[25],本实验研究发现栀子-三七有效成分最优配伍组可提高 SH-SY5Y 细胞清除氧自由基的能力,降低 ROS 的水平,进而减轻大脑内过氧化反应造成的损伤。研究表明晚期糖基化终末产物受体 RAGE 属于免疫球蛋白超家族的跨膜蛋白,当神

经元上的 RAGE 受体与配体 $A\beta$ 结合,可以释放 ROS 产生氧化应激^[26-27]。结合体内外实验,本研究发现栀子-三七有效成分最优配伍可能是通过抑制 RAGE-ROS 通路的激活发挥抗 AD 的作用。

本研究通过均匀设计实验筛选多成分之间的最优配伍比例,为进一步开发应用栀子-三七有效成分的配伍及提高中医药防治 AD 的疗效提供实验依据,同时也为研究中药配伍关系提供了一种研究思路与方法,但是其具体的作用机制尚不明确,还需要进一步的实验研究。

[参 考 文 献]

- [1] 管志远,王永红. 阿尔茨海默症临床治疗的研究进展[J]. 现代医药卫生, 2021, 37(13): 2240-2244, 2289.
- [2] ZEISEL J, BENNETT K, FLEMING R. World Alzheimer Report 2020: Design, dignity, dementia: Dementia-related design and the built environment[S]. 2020
- [3] NGUYEN TT, GIAU VV, VO TK. Current advances in transdermal delivery of drugs for Alzheimer's disease[J]. *Indian J Pharmacol*, 2017, 49(2): 145-154.
- [4] 朱振霞,于浩,谢文丽. 阿尔茨海默症发病机制及治疗药物研究进展[J]. 武警后勤学院学报(医学版), 2021, 30(5): 146-149.
- [5] 王莹,付羽鸿,高昕媛. 2 型糖尿病胰岛素抵抗与阿尔茨海默病[J]. 临床与病理杂志, 2021, 41(3): 673-677.
- [6] 李依晓,鲁元,王旭,等. Toll 样受体家族在神经炎症性疾病中的作用机制研究进展[J]. 中国新药杂志, 2022, 31(16): 1602-1607.
- [7] OSSENKOPPELE R, SCHONHAUT DR, SCHÖLL M, et al. Tau PET patterns mirror clinical and neuroanatomical variability in Alzheimer's disease[J]. *Brain*, 2016, 139(Pt 5): 1551-1567.
- [8] 田文国,王春芳,陈金鹏,等. 中药抗阿尔茨海默病的作用及其机制研究进展[J]. 中草药, 2022, 53(10): 3195-3208.
- [9] 孙紫彤,马盼,陈华飞,等. 抗阿尔茨海默病药物研究进展[J]. 现代盐化工, 2019, 46(2): 45-46.
- [10] LIU SN, ZHENG ML, LI YX, et al. The protective effect of Geniposide on diabetic cognitive impairment through BTK/TLR4/NF- κ B pathway[J]. *Psychopharmacology*, 2020, 237(2): 465-477.
- [11] 黄家情,闻妩,吕馨,等. 栀子苷对尾静脉注射链脲佐菌素引起的痴呆样小鼠的保护作用[J]. 中国新药杂志, 2021, 30(12): 1103-1109.
- [12] 林晨,陈闯. 三七总皂苷对创伤性脑损伤大鼠神经元凋亡的保护作用[J]. 中华全科医学, 2021, 19(6): 932-935.
- [13] 谭琰. “解毒通络”方药栀子与三七配伍防治阿尔茨海默症的作用效果和机制探究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
- [14] 林森相,姚娜,华茜,等. 三七和栀子有效成分对 APP 转基因小鼠脑内淀粉样蛋白的作用[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(7): 1976-1980.
- [15] 冯婷,李峰,宋月晗,等. Y 型电迷宫在学习记忆研究方面的改良[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(6): 1164-1166.
- [16] 徐卫平,龚珊,蒋星红,等. Y 迷宫训练对成年大鼠海马齿状回细胞的增殖作用[J]. 苏州大学学报(医学版), 2005,

- 25(3): 366 - 369.
- [17] 胡清宇. 栀子的化学成分与药理作用[J]. 化工管理, 2021(29): 94 - 95.
- [18] 张运辉, 周小青, 杨梦琳. 淫羊藿、三七及其有效成分防治阿尔茨海默病的研究概况[J]. 亚太传统医药, 2019, 15(8): 191 - 194.
- [19] 刘伟, 张誉丹, 王梦真, 等. A β 通道在阿尔茨海默症发病过程中的作用及其机制[J]. 生理科学进展, 2022, 53(3): 167 - 172.
- [20] NARAYAN P, GANZINGER KA, MCCOLL J, *et al.* Single molecule characterization of the interactions between amyloid- β peptides and the membranes of hippocampal cells[J]. *J Am Chem Soc*, 2013, 135(4): 1491 - 1498.
- [21] 董璐萌. 中药栀子对 APP/PS1/Tau 三转基因阿尔茨海默症小鼠药理活性研究[D]. 遵义: 遵义医学院, 2018.
- [22] 钟振国, 吴登攀, 王进声, 等. 三七总皂苷对老年性痴呆动物模型快速老化小鼠大脑 A β ₁₋₄₀、A β ₁₋₄₂ 表达的影响[J]. 中药材, 2009, 32(1): 82 - 85.
- [23] 王玉珊, 林德贵, 林珈好. 中药组方优化试验设计方法概述[J]. 畜牧兽医学报, 2021, 52(3): 565 - 575.
- [24] XIE MY, FANG KT. Admissibility and minimaxity of the uniform design measure in nonparametric regression model[J]. *J Stat Plan Inference*, 2000, 83(1): 101 - 111.
- [25] LEUNER K, MÜLLER WE, REICHERT AS. From mitochondrial dysfunction to amyloid beta formation: novel insights into the pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. *Mol Neurobiol*, 2012, 46(1): 186 - 193.
- [26] 牛波, 汪海涛, 徐江平. RAGE 受体在阿尔茨海默病中的作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2018, 32(9): 698 - 699.
- [27] 孙晨华, 季艺, 张华清, 等. 脑靶向纳米递药策略在阿尔茨海默病治疗中的研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2021, 52(12): 1561 - 1574.

编辑: 毕晓帆/接受日期: 2022 - 12 - 29