

六味地黄丸含药血清对 β -淀粉样蛋白损伤PC12细胞中FoxO3a/p-FoxO3a蛋白表达的影响^{*}

袁 永, 宋军营, 王丛笑, 贾亚泉, 谢治深, 蔡 菊, 房红锴, 张振强^{**}

(河南中医药大学中医药科学院 郑州 450046)

摘 要:目的 观察不同浓度 β -淀粉样蛋白(amyloid β -protein25-35, $A\beta_{25-35}$)和六味地黄丸含药血清(medicated serum of Liuwei Dihuang Pill, MSLDP)对PC12(pheochromocytoma cells)细胞及FoxO3a(Forkhead box protein O 3a)、p-FoxO3a蛋白表达的影响,研究六味地黄丸含药血清预处理对 $A\beta_{25-35}$ 损伤AD(Alzheimer's disease)细胞模型的保护作用。方法 配制 $A\beta_{25-35}$ 母液和制备六味地黄丸含药血清,用含有不同浓度的 $A\beta_{25-35}$ (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和六味地黄丸含药血清(2.5%、5%、10%、20%、30%)的培养基培养PC12细胞,噻唑蓝(MTT)法检测细胞活力,同时观察细胞形态的变化,免疫印迹法检测细胞中FoxO3a及p-FoxO3a蛋白表达量的变化。取合适浓度的六味地黄丸含药血清预处理 $A\beta_{25-35}$ 诱导的AD细胞模型,观察细胞形态、活力及FoxO3a、p-FoxO3a表达量的变化。结果 ① $A\beta_{25-35}$ 显著降低PC12细胞存活率($P<0.01$),并造成细胞形态的改变,细胞内p-FoxO3a表达量降低,而FoxO3a的表达升高。②六味地黄丸含药血清显著提高PC12细胞存活率($P<0.01$),并促使细胞增加分化趋势,细胞内FoxO3a表达降低,而p-FoxO3a的表达随着血清浓度的增加而增加。③六味地黄丸含药血清预处理能够明显降低 $A\beta_{25-35}$ 对PC12细胞的损伤,与模型组相比,六味地黄丸含药血清干预组FoxO3a的蛋白表达降低($P<0.01$),p-FoxO3a的蛋白表达显著升高($P<0.05$)。结论 六味地黄丸含药血清能够提高AD细胞模型的细胞活性,对PC12细胞具有明显的保护作用,磷酸化FoxO3a蛋白表达水平的提高可能是其相关的作用机制。

关键词:六味地黄丸 阿尔茨海默病 $A\beta_{25-35}$ FoxO3a/p-FoxO3a 保护作用

doi: 10.11842/wst.20200930008 中图分类号: R285.5 文献标识码: A

阿尔茨海默病是一种发生于老年人中的中枢神经系统退行性疾病,是老年痴呆最常见的类型。多年来,该病发病率呈逐年上升趋势,严重危害老年人的身心健康和生活质量^[1,2]。“ β -淀粉样蛋白级联假说”是基于 $A\beta$ (amyloid β -protein, $A\beta$)异常沉积这一病理特征所建立的AD病因假说,该假说认为,脑内 $A\beta$ 的积累具有神经毒性,过量的 $A\beta$ 会造成神经细胞的氧化应激、突触改变、Tau蛋白磷酸化、神经递质丢失等,以及胶质细胞的增生和炎症反应^[3-4]。这些改变能够进

一步引起神经系统的病理损伤,如老年斑块形成、神经纤维缠结等,造成神经元功能障碍甚至变性和死亡,进而导致AD的发生。根据AD发生的过程,降低细胞内氧化应激,抑制神经细胞变性、凋亡,促进神经细胞修复等已成为研究热点^[5]。

FoxO3a作为一种重要的叉头蛋白转录因子,能够通过与其所识别DNA元件相结合,调控靶基因的转录和翻译,在调控细胞周期、凋亡、活性氧清除、自噬、细胞稳态和氧化应激反应等方面发挥重要作用^[6-7]。有

收稿日期:2020-09-30

修回日期:2021-12-14

^{*} 河南省科技厅河南省科技攻关项目(212102311084):六味地黄丸通过调控FoxO3a靶点防治早期AD的抗氧化功效研究,负责人:宋军营;河南省科技厅中原科技创新领军人才计划资助项目(204200510022):六味地黄丸介导PPAR γ /Nrf2/TXNIP信号通路防治早期老年痴呆的作用机制,负责人:张振强;河南省教育厅河南省高校科技创新团队支持计划项目(21IRTSTHN026):中西医结合防治重大慢病,负责人:张振强。

^{**} 通讯作者:张振强,教授,主要研究方向:中医药防治神经退行性疾病。

研究表明,血清中FoxO3a水平的变化可用来区分AD与轻度认知障碍(Mild Cognitive Impairment, MCI)以及AD与正常衰老(geriatric control, GC),可能成为治疗AD的潜在新靶点^[8-9]。FoxO3a和Bim(Bcl-2 interacting mediator of cell death)在神经细胞中过表达,会导致A β 的产生并过度积累,进而引起神经毒性,该过程是AD的病理发展重要因素^[10]。另有研究发现,在H₂O₂诱导的人神经母瘤细胞(SH-SY5Y)模型中,有多种药物可通过SIRT/FoxO3a通路提升超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和过氧化氢酶(catalase, CAT)的酶活性,减少细胞内的ROS,降低氧化应激造成的细胞死亡,从而保护神经细胞不受氧化应激损伤^[11,12]。磷酸化是Forkhead转录因子家族成员重要的上游修饰途径,激活AKT(Protein Kinase B)可使FoxO3a磷酸化,磷酸化的FoxO3a从细胞核转运至细胞质,经过泛素化修饰而降解,失去其转录活性,从而导致细胞增殖,反之亦然^[13,14]。因此,通过FoxO3a与磷酸化FoxO3a(p-FoxO3a)的转化,间接调节下游凋亡相关基因的表达,是干预神经细胞的凋亡的方式之一。

中医认为老年痴呆的病因多以内因为主,或因肾精亏耗,气血不足,痰瘀互阻,脑髓失养;或因七情内伤,久病耗损,年迈体虚,致气、血、痰、郁、瘀等病邪为患。在痴呆的辨证分型方面主要以肾虚和痰证为主,治疗也多以补肾益髓、化痰止痰、补肾活血等为主要方法^[15,16]。现代中西医结合研究证实,大脑皮质及海马区的神经细胞大量减少是其主要病理特征之一,而脑内A β 不断积累所造成的神经细胞氧化应激、凋亡等是造成这一特征的重要原因。

六味地黄丸是宋代钱仲阳依据《金匱要略》所载崔氏八味丸去桂枝、附子而成,是中医填精、滋阴、补肾的经典方剂。在临床应用中发现,六味地黄丸可以通过调节内分泌、降压降脂、降血糖等来防治痴呆、高血压、糖尿病等老年疾病,在改善AD患者的记忆、智力、精神和行为等方面具有较明显的效果,其机理可能与改善脑内代谢,抗氧化,减少神经细胞凋亡有关^[17,18]。在减轻A β 的神经细胞毒性方面,六味地黄丸也具有显著效果^[19]。有研究表明,六味地黄丸在改善AD模型小鼠的记忆和认知功能方面有明显效果,可以不同程度地改善或延缓AD病程的发展,甚至达到预防早期老年性痴呆的功效,但是其对AD发挥作用

的分子机理还不明确^[20]。

本课题组综合文献资料,在前期应用六味地黄丸对AD的保护作用基础上,进一步研究其对神经细胞内FoxO3a/p-FoxO3a的影响,探讨应用六味地黄丸预防和治疗阿尔茨海默病的分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

PC12细胞由昆明理工大学医学部白洁教授赠予。SPF级雄性SD大鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司〔合格证编号:SCXK(京)2012-0001〕。六味地黄丸浓缩丸为河南省宛西制药股份有限公司产品(批号:110316)。

1.2 主要试剂

FoxO3a/p-FoxO3a抗体(美国Epitomics公司,货号分别为3280-1,7205-1),A β ₂₅₋₃₅(美国SIGMA公司,货号:A4559),兔抗鼠 β -actin抗体(Abways公司,货号:P60709),山羊抗兔抗体(博士德生物工程有限公司,货号:BA1055),MTT[3-(4,5-二甲基-2-噻唑)-2,5-二苯基溴化四氮唑噻唑蓝]、RIPA裂解液(RIPA Lysis Buffer)、蛋白酶抑制剂(北京索莱宝科技有限公司,货号分别为298-93-1,P0100,P1250),其余均为国产分析纯试剂。

1.3 主要仪器设备

多功能全波长酶标仪(美国Thermo Fisher公司,型号:MultiskanGO);高速冷冻离心机(美国BeckmanCoulter公司,型号:Microfuge®20R);电泳仪(美国Bio-Rad公司,型号:JY200C);蛋白转印系统(美国BioRad公司,型号:Mini-Protean);倒置荧光显微镜(德国Leica公司,型号:DFC450C)。

1.4 实验方法

1.4.1 六味地黄丸含药血清(MSLDP)制备

用纯水将粉碎后的六味地黄丸浓缩丸溶解,制备混悬液,将SD大鼠适应性饲养1周后,分为给药组和对照组,给药组以1.08 g·kg⁻¹剂量进行灌胃,对照组以等体积的生理盐水灌胃,2次/天,连续灌胃6次。第7次灌胃1 h后,以10%水合氯醛麻醉动物,打开大鼠腹腔,腹主动脉采血。所采全血在室温下静置2 h后,3000 r·min⁻¹离心10 min,取血清,56℃水浴灭活30 min,再用0.22 μ m无菌滤器过滤除菌,分装后-80℃保存备用。

1.4.2 $A\beta_{25-35}$ 配制

将 $A\beta_{25-35}$ 用超纯水配制成 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的母液, 吹打混匀后 37°C 静置“老化”5天, 分装成 $100 \mu\text{L}/\text{管}$, -80°C 保存备用。

1.4.3 MTT 法检测 PC12 细胞存活率

(1) **细胞培养** 将 RPMI 1640 基础培养基中加入 5% 胎牛血清、10% 马血清及 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青/链霉素双抗配制成完全培养基, 在 37°C 、5% CO_2 、饱和湿度的培养箱中培养 PC12 细胞, 每隔 24 h 换液, 3-4 天传代 1 次, 实验中各组均取处于对数生长期的细胞。

(2) **MTT 法检测细胞存活率** 以 2×10^4 个/孔的量将处于对数生长期的 PC12 细胞加入到 96 孔细胞培养板中, 置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养; 将 3 个 96 孔板按以下方法处理: 第 1 个先用 RPMI 1640 完全培养基培养 24 h, 再用含有 0、10、20、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $A\beta_{25-35}$ 的培养基培养 24 h; 第 2 个分别用含有 0、2.5%、5.0%、10.0%、20.0%、30.0% MSLDP 的培养基培养 48 h; 第 3 个分为正常对照组 (不加 $A\beta_{25-35}$ 和 MSLDP 培养 48 h)、模型组 (先常规培养 24 h, 再用含 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $A\beta_{25-35}$ 的培养基处理 24 h)、MSLDP 预处理组 (先用含 20% MSLDP 的培养基培养 24 h, 再用含 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $A\beta_{25-35}$ 的培养基处理 24 h); 每个浓度设 3 个复孔。培养结束后先在倒置显微镜下观察各组 PC12 细胞的形态, 再向各孔加入 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 MTT $20 \mu\text{L}$, 37°C 静置 4 h。结束后 $1500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 吸出培养基, 向各孔加入 $150 \mu\text{L}$ 二甲基亚砜 (DMSO), 用移液器轻轻吹打各孔使结晶紫完全溶解后, 检测各孔 590 nm 波长处的吸光值。细胞存活率 = 实验组吸光值 / 对照组吸光值 $\times 100\%$ 。

1.5 Western blot 法检测 FoxO3a/p-FoxO3a 表达水平

以 5×10^4 个/mL 的密度将处于对数生长期的 PC12 细胞接种于 6 孔细胞板中, 培养 24 h 后, 分别加入含有 0、10、20、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $A\beta_{25-35}$ 的 RPMI 1640 培养基培养 24 h, 同时, 用含有 0、2.5%、5.0%、10.0%、20.0%、30.0% MSLDP 的培养基培养另一组细胞 48 h; 另取一个六孔板分为正常对照组、模型组、MSLDP 预处理组按 (2) 方法处理细胞。收集细胞至 1.5 mL 离心管内, $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, PBS 洗 2 次, 加入含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液重悬细胞, 置冰上裂解 30 min 后, $13000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清即为总蛋白, 采用标准曲线法测定总蛋白浓度。各组分别取 $10 \mu\text{g}$ 蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳, 300 mA

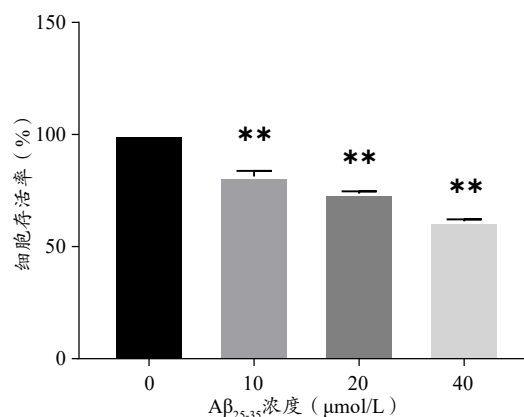


图1 $A\beta_{25-35}$ 对 PC12 细胞存活率的影响

转膜 70 min。用 5% 的脱脂奶 4°C 封膜过夜; PBST 洗膜 3 次, 加入一抗 (1:1000 稀释) 室温摇床上孵育 2 h; PBST 洗膜 3 次, 再加入二抗 (1:3000 稀释) 孵育 1 h; PBST 洗膜 5 次, 加入 ECL 化学发光试剂显影, 上机检测。

1.6 统计学分析

各组实验结果分别使用 Image J1.8.0、GraphPad Prism 8.0 进行图像分析及数据处理。多组实验比较使用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 组内较以最小显著性差异法进行比较。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 实验结果

2.1 $A\beta_{25-35}$ 对 PC12 细胞存活率的影响

用 MTT 法将采用不同浓度 $A\beta_{25-35}$ 处理的 PC12 细胞的存活率进行比较, 结果表明, 不添加 $A\beta_{25-35}$ 组的细胞存活率明显高于 10、20、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $A\beta_{25-35}$ 处理组, 且随着 $A\beta_{25-35}$ 浓度的增高, 细胞存活率逐渐降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$) (图 1)。

在倒置显微镜下观察 $A\beta_{25-35}$ 处理后 PC12 细胞的形态, 各组处理后的细胞与不经 $A\beta_{25-35}$ 处理细胞相比, 随着 $A\beta_{25-35}$ 浓度的增高, 各孔内的细胞数目逐渐减少, 细胞的形态也变得不规则, 并伴随有细胞碎片, 凋亡/死亡细胞逐渐增多 (图 2)。结果表明 $A\beta_{25-35}$ 对 PC12 细胞毒性损伤与剂量在一定范围内呈正相关。

2.2 $A\beta_{25-35}$ 对 PC12 细胞 FoxO3a/p-FoxO3a 蛋白表达的影响

将不同浓度 $A\beta_{25-35}$ 处理的 PC12 细胞中 FoxO3a、p-FoxO3a 表达水平进行比较, 低浓度 (0、10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处

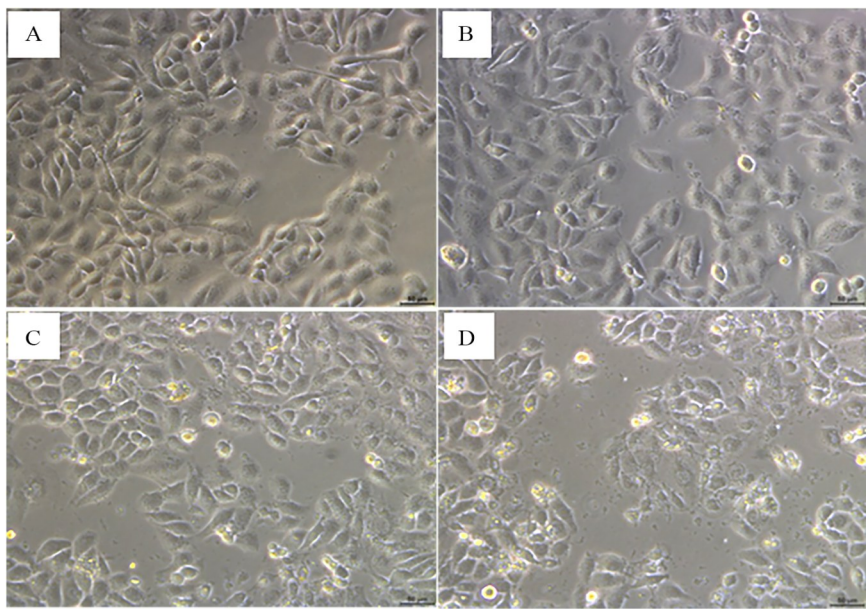


图2 Aβ₂₅₋₃₅对PC12细胞形态的影响

注:A-D:含0、10、20、40 μmol·L⁻¹ Aβ₂₅₋₃₅培养细胞。

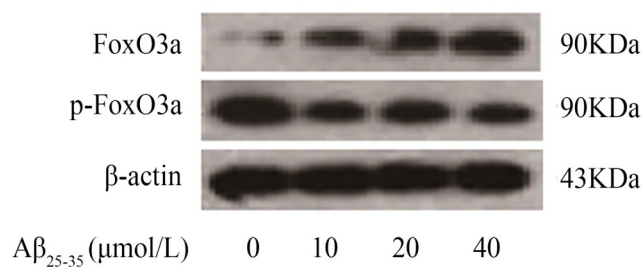


图3 Aβ₂₅₋₃₅对PC12细胞FoxO3a/p-FoxO3a蛋白表达的影响

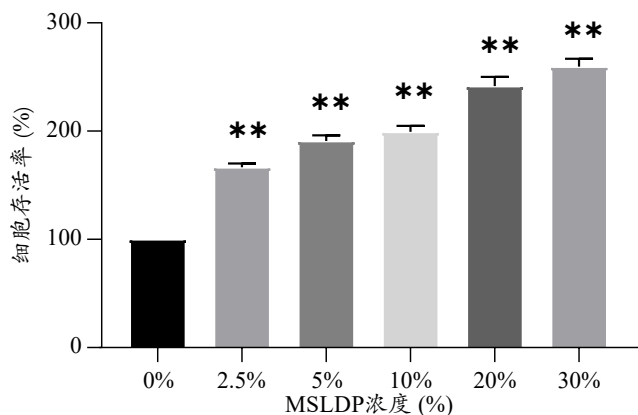


图4 MSLDP对PC12细胞活性的影响

理组的p-FoxO3a蛋白表达量明显高于高浓度(20、40 μmol·L⁻¹)处理组,FoxO3a蛋白表达量则低于高浓度组,差异具有统计学意义($P<0.01$)。实验结果显示,p-FoxO3a蛋白表达明显呈剂量依赖降低,而FoxO3a

的蛋白表达随Aβ₂₅₋₃₅浓度的增加而增加(图3)。

2.3 不同浓度MSLDP对PC12细胞存活率的影响

将不同浓度MSLDP处理后的PC12细胞存活率进行比较,未使用MSLDP处理组的PC12细胞存活率明显低于各MSLDP处理组,差异有统计学意义($P<0.01$)(图4)。

倒置显微镜下观察各组细胞显示:未使用MSLDP处理组的PC12细胞形态不规则,有细胞碎片出现;采用2.5%、5%MSLDP培养PC12细胞后,各孔内细胞量增多,细胞大小均一,形态规则;10%MSLDP组培养的细胞量进一步增加,聚集成片状生长,细胞形态有拉伸趋势;20%、30%MSLDP组的PC12细胞形态拉伸更加明显,并且细胞长出了小的棘突,明显形成分化趋势(图5)。实验结果表明,MSLDP具有明显的促进PC12细胞增殖的作用

2.4 不同浓度MSLDP处理对PC12细胞FoxO3a、p-FoxO3a蛋白表达影响

将采用不同浓度MSLDP处理的PC12细胞中FoxO3a、p-FoxO3a蛋白表达量进行比较,结果显示,低浓度MSLDP处理组细胞内的p-FoxO3a表达水平低于高浓度组,而FoxO3a表达量则高于各高浓度MSLDP处理组,差异有统计学意义($P<0.01$)(图6)。实验结果表明,FoxO3a、p-FoxO3a蛋白表达量均对MSLDP浓度呈剂量依赖性。

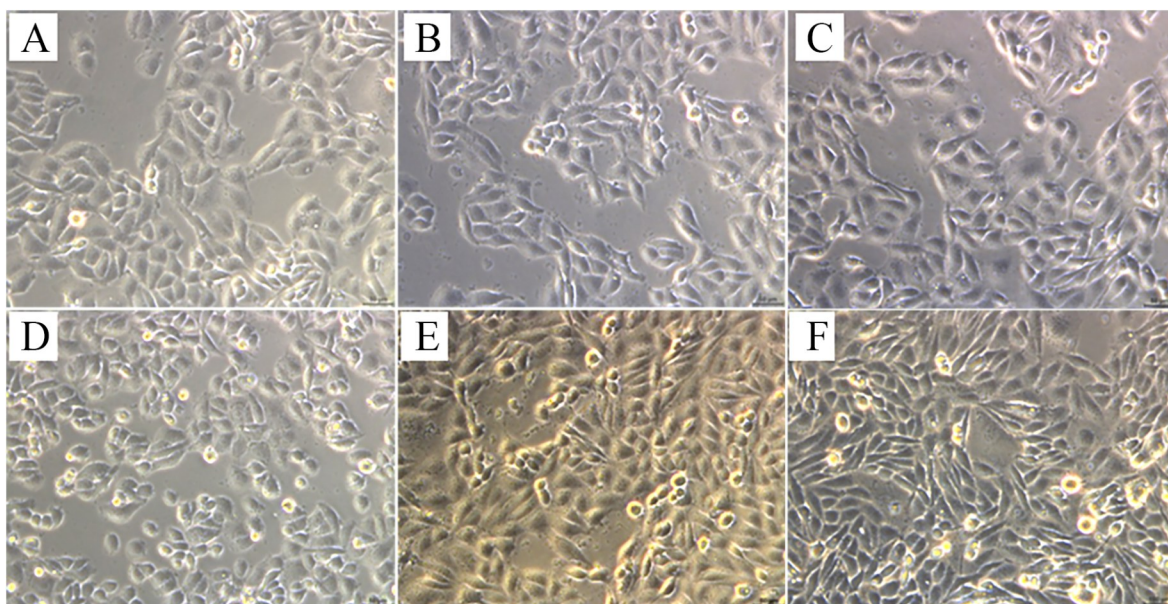


图5 MSLDP对PC12细胞形态的影响

注: A-F: 含0、2.5%、5.0%、10.0%、20.0%、30.0%MSLDP培养细胞。

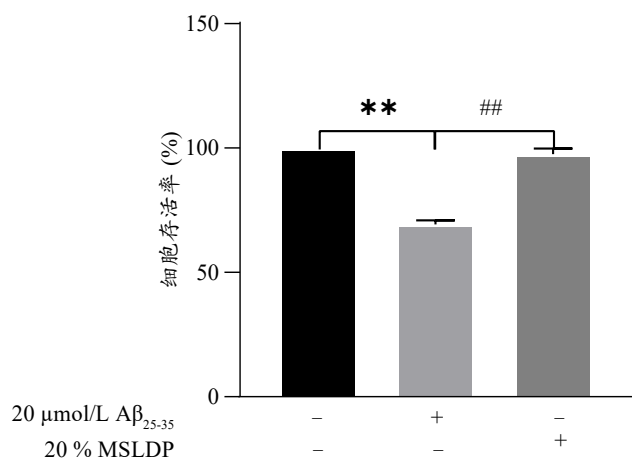


图7 MSLDP预处理对PC12细胞活性的影响

2.5 MSLDP对AD模型细胞存活率的影响

参考文献资料,并综合考虑Aβ₂₅₋₃₅和MSLDP对PC12细胞存活率以及二者对FoxO3a、p-FoxO3a蛋白表达量影响,本课题组选用20 μmol·L⁻¹ Aβ₂₅₋₃₅和20%MSLDP来建立试验用细胞模型。将各组采用不同方法处理的PC12细胞进行MTT法检测,结果表明,正常组、MSLDP干预组的PC12细胞存活率高于AD模型组,差异有统计学意义($P<0.05$)(图7)。

倒置显微镜下观察各组细胞形态,Aβ₂₅₋₃₅处理的模型组细胞与正常对照组相比,细胞数量减少,形态不规则,细胞膜相对不完整,细胞碎片增多。MSLDP处理组细胞与模型对照组相比,凋亡、死亡的细胞数

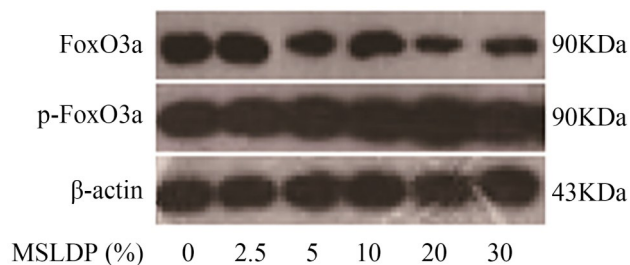


图6 不同浓度MSLDP对PC12细胞FoxO3a、p-FoxO3a蛋白表达的影响

减少,活细胞增多(图8),MSLDP对AD细胞模型的有明显的保护作用。

2.6 MSLDP对AD细胞模型中FoxO3a、p-FoxO3a蛋白表达影响

将三组采用不同方法处理的PC12细胞中FoxO3a、p-FoxO3a蛋白表达量进行免疫印迹检测,正常对照组细胞中p-FoxO3a蛋白表达量高于模型组,FoxO3a蛋白表达量则低于模型组;MSLDP干预组细胞中的p-FoxO3a蛋白表达量高于模型组细胞,而FoxO3a蛋白表达水平低于模型组(图9)。结果表明,MSLDP对Aβ₂₅₋₃₅所造成的神经细胞损伤具有较好的保护作用。

3 讨论与结论

本课题组以Aβ₂₅₋₃₅诱导神经细胞损伤着手,通过

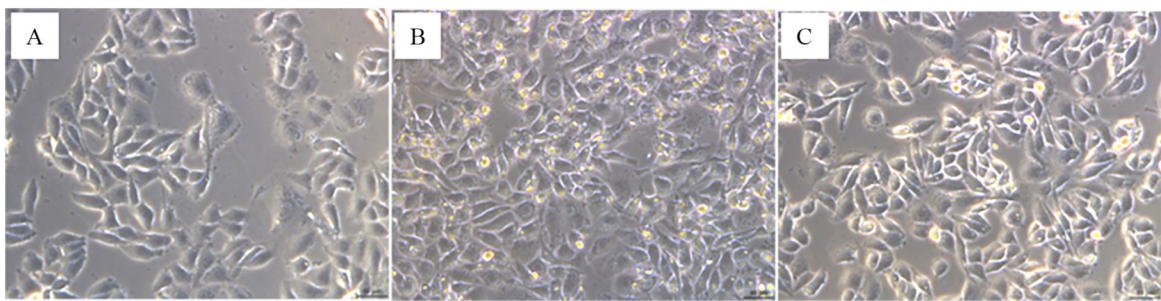


图8 MSLDP预处理对PC12细胞形态的影响

注:A:空白对照;B:Aβ₂₅₋₃₅损伤细胞;C:MSLDP+Aβ₂₅₋₃₅处理细胞。

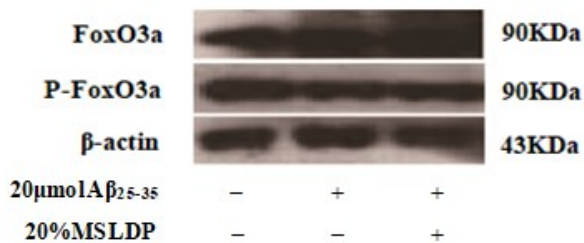


图9 MSLDP对AD细胞模型的FoxO3a、p-FoxO3a蛋白表达的影响

观察MSLDP对细胞活力和形态及关键蛋白表达的影响,来探讨六味地黄丸对AD影响的分子机制。

3.1 六味地黄丸和Aβ₂₅₋₃₅对神经细胞的影响

实验结果显示,不同浓度Aβ₂₅₋₃₅处理后细胞的存活率呈剂量依赖的形式降低。这表明Aβ₂₅₋₃₅对PC12细胞毒性损伤在一定浓度范围内与剂量呈正相关。同时观察处理后的细胞形态发现,随着Aβ₂₅₋₃₅浓度增高,各孔内的细胞形态改变也随着Aβ₂₅₋₃₅浓度增加而逐渐增多。这一结果与AD患者脑内Aβ的不断积累,毒性不断增加一致,同时,也与之前的研究结果相互验证:使用Aβ₂₅₋₃₅诱导PC12细胞后,会造成细胞活力下降,细胞内游离Ca²⁺浓度升高,形态上出现典型的凋亡特征,在一定范围内具有时间和剂量依赖性^[21]。

3.2 FoxO3a与Aβ的相互关系

FoxO3a是细胞稳态、应激反应和增殖/凋亡的核心调控因子,控制着复杂的基因表达网络。因此,它可以调节多种细胞过程,整合来自能量、生长因子和应激信号级联的输入,成为在神经系统疾病和抗衰老机制以及肿瘤等研究中较为新颖的研究热点。六味地黄丸的抗衰老作用主要与抗氧化和抗凋亡有关,Aβ积累所表现出来的毒性会造成神经细胞的氧化应激和凋亡,而体内FoxO3a的改变能够起下游基因产生抗

氧化和抗凋亡的作用,本课题组结合三者的相关性,研究其发挥相互作用的具体方式。细胞内的FoxO3a蛋白经Aβ₂₅₋₃₅的诱导后表达量升高,而p-FoxO3a的蛋白表达量降低,这提示Aβ₂₅₋₃₅可能通过对FoxO3a的调节来激活细胞凋亡的级联反应。

3.3 MSLDP对细胞内FoxO3a的影响

因为磷酸化是Forkhead转录因子家族成员重要的上游修饰途径,FoxO3a是PI3K/AKT信号通路下游重要的转录因子^[22,23],激活AKT能够导致FoxO3a磷酸化,磷酸化的FoxO3a被降解而失去其转录活性。MSLDP能够促进细胞增殖,同时还能影响细胞内FoxO3a与p-FoxO3a的表达量,因此,其发挥作用的方式可能与AKT激活所导致FoxO3a磷酸化密切相关。实验结果显示,MSLDP有明显的促进PC12细胞增殖的作用,高浓度的MSLDP还能使细胞长出小突触,形成分化趋势。同时,MSLDP预处理还能够明显降低Aβ₂₅₋₃₅对细胞的毒性,减少细胞损伤。有研究发现过氧化物酶体增殖物激活受体γ辅激活子1α(PGC-1α)能够通过下调FoxO3a降低APP代谢,减少Aβ的积累,FoxO3a对神经细胞自身APP代谢为Aβ有直接干预作用^[24],这与本课题组的实验结果一致:MSLDP干预后的PC12细胞内p-FoxO3a蛋白表达量升高,而FoxO3a的蛋白表达量则降低。

综上所述,六味地黄丸对Aβ₂₅₋₃₅所造成的神经细胞损伤具有保护作用,其作用机制可能是通过调节细胞内FoxO3a与p-FoxO3a的表达量,影响其下游基因的表达,进而调控细胞内的抗氧化、抗凋亡因子,促进细胞增殖,从而实现其对AD的预防及治疗。本实验为AD的预防和治疗找出一个新思路,同时也为在临床上应用六味地黄丸改善AD患者的病情和减缓AD病程发展提供了依据。

参考文献

- 1 Brookmeyer R, Abdalla N, Kawas C H, *et al.* Forecasting the prevalence of preclinical and clinical Alzheimer's disease in the United States. *Alzheimers Dement*, 2018, 14(2):121-129.
- 2 Association Alzheimer's. 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*, 2016, 12(4):459-509.
- 3 宋博雅. 阿尔兹海默症发病机制的研究进展. 西安文理学院学报(自然科学版), 2020, 23(4):77-79, 92.
- 4 杜娟, 黄昶荃, 何馥倩. β 淀粉样蛋白清除的研究进展. 中国老年学杂志, 2021, 41(2):411-415.
- 5 宋军营, 袁永, 王丛笑, 等. 六味地黄丸含药血清对 β -淀粉样蛋白损伤大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞的保护作用研究. 中国全科医学, 2017, 20(30):3763-3769.
- 6 邹前, 侯凯, 刁峻峰, 等. 阿尔茨海默病发病机制假说和药物治疗研究进展. 吉林医药学院学报, 2020, 41(5):372-374.
- 7 Naka K, Hoshii T, Muraguchi T, *et al.* TGF- β -FOXO signalling maintains leukaemia-initiating cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature*, 2010, 463(7281):676-680.
- 8 Morris B J, Willcox D C, Donlon T A, *et al.* FOXO3: a major gene for human longevity—a mini-review. *Gerontology*, 2015, 61(6):515-525.
- 9 Pradhan R, Yadav S K, Prem N N, *et al.* Serum FOXO3A: A ray of hope for early diagnosis of Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev*, 2020, 190:111290.
- 10 Zhao Y, Zhao R, Wu J, *et al.* Melatonin protects against A β -induced neurotoxicity in primary neurons via miR-132/PTEN/AKT/FOXO3a pathway. *Biofactors*, 2018, 44(6):609-618.
- 11 Ruankham W, Suwanjang W, Wongchitrat P, *et al.* Sesamin and sesamol attenuate H2O2-induced oxidative stress on human neuronal cells via the SIRT1-SIRT3-FOXO3a signaling pathway. *Nutr Neurosci*, 2021, 24(2):90-101.
- 12 Gay N H, Phopin K, Suwanjang W, *et al.* Neuroprotective effects of phenolic and carboxylic acids on oxidative stress-induced toxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurochem Res*, 2018, 43(1): 619-636.
- 13 Emerling B M, Weinberg F, Liu J L, *et al.* PTEN regulates p300-dependent hypoxia-inducible factor 1 transcriptional activity through Forkhead transcription factor 3a (FOXO3a). *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(7):2622-2627.
- 14 Duan N, Zhang W, Li Z, *et al.* Overexpression of HIPK2 removes the transrepression of proapoptotic genes mediated by the CtBP1-p300-FOXO3a complex and increases the chemosensitivity in osteosarcoma cells. *J Cancer*, 2021, 12(6):1826-1837.
- 15 周茜, 傅勤慧, 裴建. 阿尔茨海默病中医证候诊断标准研究进展. 上海中医药杂志, 2020, 54(12):91-96.
- 16 王智贤, 胡国恒. 阿尔兹海默病中医辨证研究概况. 湖南中医杂志, 2020, 36(5):155-157.
- 17 张春梅. 六味地黄丸配合治疗老年痴呆症的临床研究. 中医临床研究, 2012, 4(19):88-90.
- 18 王钊, 贾亚泉, 宋军营, 等. 基于网络药理学的六味地黄汤治疗痴呆机制研究. 河南大学学报(医学版), 2021, 40(2):84-92.
- 19 周玲, 王长江, 黄敏, 等. 六味地黄丸加三七水提液对秀丽线虫抗氧化、缓解A β 毒性及健康寿命的影响. 中华中医药杂志, 2017, 32(5): 1903-1909.
- 20 高海宁. 六味地黄丸对H2O2诱导PC12细胞凋亡影响的研究. 沈阳: 辽宁中医药大学博士研究生学位论文, 2016.
- 21 刘慧瑛, 夏兆云, 施扬, 等. 阿尔茨海默病发病机制概述. 老年医学与保健, 2020, 26(6):1098-1100.
- 22 Yang L, Xie S Z, Jamaluddin M S, *et al.* Induction of androgen receptor expression by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt downstream substrate, FOXO3a, and their roles in apoptosis of LNCaP prostate cancer cells. *J Biol Chem*, 2005, 280(39):33558-33565.
- 23 Liu L Y, Hu R, You H Y, *et al.* Formononetin ameliorates muscle atrophy by regulating myostatin-mediated PI3K/Akt/FoxO3a pathway and satellite cell function in chronic kidney disease. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(3):1493-1506.
- 24 Qin W P, Haroutunian V, Katsel P, *et al.* PGC-1 α expression decreases in the Alzheimer disease brain as a function of dementia. *Arch Neurol*, 2009, 66(3):352-361.

Effects of Medicated Serum of Liuwei Dihuang Pills on FoxO3a/p-FoxO3a Expression in PC12 Cells Injured by β -amyloid Protein

Yuan Yong, Song Junying, Wang Congxiao, Jia Yaquan, Xie Zhishen, Cai Ju, Fang Hongkai, Zhang Zhenqiang**

(Academy of Chinese Medical Sciences, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

Abstract: Objective To observe the effects of different concentrations of A β_{25-35} and medicated serum of Liuwei

Dihuang Pills (MSLDP) on rat adrenal pheochromocytoma cells (PC12) and the expression of FoxO3a and p-FoxO3a proteins, and to study the protective effect of MSLDP pretreatment on $A\beta_{25-35}$ injury AD cell model. **Methods** We prepared $A\beta_{25-35}$ mother liquor and prepare medicated serum of Liuwei Dihuang Pills, cultured PC12 cells with different concentrations of $A\beta_{25-35}$ ($10\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $20\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $40\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and MSLDP (2.5%, 5%, 10%, 20%, 30%) medium, MTT method was used to detect cell viability and observe changes in cell morphology. Western Blot was used to detect changes in the expression of FoxO3a and p-FoxO3a proteins in the cells. We took the appropriate concentration of MSLDP to pretreat the AD cell model induced by $A\beta_{25-35}$, and observed the changes in cell morphology, viability and FoxO3a and p-FoxO3a expression. **Results** ① $A\beta_{25-35}$ reduced the survival rate of PC12 significantly ($P<0.01$), and caused changes in cell morphology. The expression of p-FoxO3a in PC12 cells decreased, but the expression of FoxO3a increased. ② MSLDP improved the survival rate of PC12 cells significantly ($P<0.01$), and promoted the cells to increase their differentiation tendency, the expression of FoxO3a in the cells decreased, and the expression of p-FoxO3a increased with the increase of concentration. ③ MSLDP pretreatment can significantly reduce the damage of $A\beta_{25-35}$ to PC12 cells. Compared with the model group, the protein expression of FoxO3a in the MSLDP intervention group decreased ($P<0.01$), and the protein expression of p-FoxO3a increased significantly ($P<0.05$). **Conclusion** MSLDP can increase the activity of $A\beta_{25-35}$ -induced AD cell models and have a protective effect on PC12 cells. The mechanism may be related to the increase of phosphorylated FoxO3a protein expression.

Keywords: Liuwei Dihuang Pills, Alzheimer's Disease, $A\beta_{25-35}$, Foxo3a/p-FoxO3a, Protective effect

(责任编辑: 周阿剑、刘玥辰, 责任译审: 周阿剑, 审稿人: 王瑀、张志华)