

六味地黄丸含药血清对A β 诱导SH-SY5Y细胞的自噬影响及机制研究*

朱仲康, 刘羽茜, 王 冰, 张 林, 王艳杰, 王 哲,
柳 春**, 赵丹玉**

(辽宁中医药大学中西医结合学院 沈阳 110847)

摘 要:目的 研究六味地黄丸含药血清对A β 诱导SH-SY5Y细胞的自噬影响及其机制,探讨阿尔茨海默病的病理机制及补肾填精法的作用机制。方法 30只大鼠随机分成对照组和六味地黄丸组两组,分别予以等量的双蒸水和含六味地黄丸粉末水溶液进行灌胃,末次灌胃结束后取血并分离血清备用。将SH-SY5Y细胞分为对照组、模型组和药物组,对照组和模型组给予空白血清的完全培养液,药物组给予含药血清的完全培养液,模型组和药物组加入A β 1-42寡聚体,培养48 h。应用CCK-8法对各组进行细胞增殖率分析;免疫荧光法分析各组细胞内A β 沉积情况;Western Blot法检测各组细胞BACE1、p62、LC3- I、LC3- II、Beclin1蛋白表达情况。结果 CCK-8结果显示,与对照组相比,模型组细胞增殖率显著降低($P<0.01$);与模型组相比,药物组细胞增殖率显著增高($P<0.01$)。与对照组相比,模型组细胞内A β 的沉积显著增加($P<0.01$);与模型组相比,药物组细胞内的A β 沉积显著减少($P<0.01$)。Western Blot结果显示,与对照组相比,模型组细胞的BACE1、Beclin1的蛋白表达量和LC3- II/LC3- I的比值显著升高($P<0.01$),p62的蛋白表达量显著降低($P<0.01$);与模型组相比,药物组细胞的Beclin1的蛋白表达量和LC3- II/LC3- I的比值显著升高($P<0.01$),BACE1和p62的蛋白表达量显著降低($P<0.01$)。结论 六味地黄丸含药血清可以增加A β 诱导的SH-SY5Y细胞自噬相关基因的表达,上调自噬水平,减轻细胞损伤,对细胞具有明显的保护作用。

关键词:阿尔茨海默病 自噬 A β 六味地黄丸 SH-SY5Y

doi: 10.11842/wst.20210427001 中图分类号: R285.5 文献标识码: A

阿尔茨海默病(AD)是一种呈进行性发展的神经退行性疾病,临床上以记忆功能障碍、认知能力下降甚至行为和人格改变等表现为特点。主要病理特征包括在患者的脑皮质和海马体中产生由 β 淀粉样蛋白(A β)沉积形成的老年斑、由Tau蛋白过度磷酸化形成的神经纤维缠结(NFTs)、脑神经元丢失以及大量胶质细胞增生等^[1]。目前研究表明,A β 和Tau蛋白的代谢与自噬功能密切相关^[2],神经细胞的自噬作用在AD发

生发展的过程中极为重要^[3]。自噬过程可以清除A β 和过度磷酸化的Tau等异常蛋白,减少神经突触丢失,对于AD的发生及发展有着重要的调控作用^[4]。

中医认为肾可藏精,精能生髓,而脑为髓海,当肾精出现不足,可导致髓海空虚,神思障碍,遂生痴呆,由此可知肾与脑的关系十分密切。现代中医学研究说明,肾虚与细胞自噬功能失调密切相关^[5]。肾主气化是肾脏生理功能的高度概括,一方面肾之精气上达

收稿日期:2021-04-27

修回日期:2022-01-14

* 国家自然科学基金委员会青年科学基金项目(81803854):基于中枢胰岛素抵抗探讨自噬失调对肾虚阿尔茨海默的影响及机制研究,负责人:赵丹玉;辽宁省自然科学基金委员会指导计划(20180551041):基于中枢胰岛素抵抗探讨自噬失调对肾虚阿尔茨海默的影响及机制研究,负责人:赵丹玉。

** 通讯作者:赵丹玉,博士,教授,主要研究方向:中医药防治代谢性疾病分子机制的研究;柳春,博士,教授,研究方向:中医药防治代谢性疾病分子机制的研究。

可化髓充脑,灌髓海,另一方面肾之浊气下降排出体外,以维持代谢平衡;细胞的自噬亦是如此,一方面可以通过自噬降解细胞中的“废物”,另一方面可以利用降解所产生的新的能量为细胞供能,有学者提出细胞自噬正是气化功能的微观体现^[6]。当肾虚发生时,自噬不足,大量异常的蛋白无法被降解,在脑内形成病理产物导致AD的发生。目前,临床上以补肾填精益髓为治则治法对AD疗效显著^[7-9]。六味地黄丸出自于钱乙的《小儿药证直诀》,由熟地黄、山药、酒萸肉、牡丹皮、茯苓和泽泻六味药组成,方中重用熟地黄,主入肾经,能滋阴补肾,填精益髓。体内研究表明六味地黄丸对改善小鼠的学习记忆能力作用明确^[10]。课题组前期动物实验研究表明六味地黄丸可以显著提高AD小鼠的脑内自噬水平^[11]。基于此,本文以人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)为研究对象,以A β 诱导建立AD细胞模型,旨在探讨六味地黄丸对AD细胞模型自噬水平的干预作用及其机制,为阿尔茨海默病的治疗提供新的思路及实验依据。

1 材料

1.1 动物

健康雄性SD大鼠30只,SPF级,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物许可证号:SYXK(辽)2015-0001。将大鼠按照随机数字表法分为对照组和六味地黄丸组,每组15只。六味地黄丸组给予含六味地黄丸生药量 $1.18\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的六味地黄丸粉末水溶液进行灌胃,对照组予以等体积的双蒸水,每日灌胃2次,连续灌胃5天。

1.2 细胞

人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)购自江苏凯基生物技术股份有限公司。将SH-SY5Y细胞培养于胎牛血清浓度10%、青霉素浓度 $100\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、链霉素浓度 $0.1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的DMEM高糖完全培养液中, 37°C ,5% CO_2 的培养环境下。

1.3 试剂

全蛋白提取试剂盒(WLA019)购于Wanleibio公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒(WLA004)购于Wanleibio公司;p62 antibody(WL02385)、LC3 I/II antibody(WL01506)、Beclin1 antibody(WL02508)、BACE1 antibody(WL02795)及内参抗体 β -actin(WL01845)购于中国Wanleibio公司;Beta-Amyloid 1-

42(AS-20276)购于美国ANASPEC公司;六味地黄丸(Z11021283)购于北京同仁堂科技发展股份有限公司;Cell Counting Kit-8(GK3607-500T)购于北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;胎牛血清(F41704)购于赛尔乐生物科技有限公司;DMEM不完全高糖培养液(KGM12800-500)购于江苏凯基生物技术股份有限公司;Cy3标记山羊抗荧光淬灭剂(S2100)购于中国Solarbio公司。

1.4 仪器

电泳仪(DYY-7C,北京六一制造厂),转移槽(DYCZ-40D,北京六一制造厂),双垂直蛋白电泳仪(DYCZ-24DN,北京六一制造厂),凝胶成像系统(WD-9413B,北京六一制造厂),超速冷冻离心机(H-2050R,湖南湘仪离心机仪器有限公司),酶标仪(ELX-800,美国BIOTEK公司),电热恒温培养箱(DH36001B,天津泰斯特仪器有限公司),超低温冰箱(WiseCryo(R)WUF-D,韩国大韩)高压蒸汽灭菌器(MLS-3780,日本三洋公司),透射电镜(H-7650,日本Hitachi公司), CO_2 培养箱(HERAcell 150i,美国Thermo公司),倒置显微镜(BX53,日本OLUMPUS公司)。

2 方法

2.1 含药血清制备

将30只SD大鼠按照随机数字表法分为2组:对照组和六味地黄丸组,每组15只。六味地黄丸组给予含六味地黄丸生药量 $1.18\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的六味地黄丸粉末水溶液进行灌胃,对照组予以等体积的双蒸水,每日灌胃2次,连续灌胃5天,根据前期研究基础^[10],末次灌胃结束2 h后腹主动脉取血,分离血清,并灭活过滤,分装保存。

2.2 A β_{1-42} 寡聚体配制

将1 mg的A β_{1-42} 置冰上,加入预冷的六氟异丙醇 $220\text{ }\mu\text{L}$,室温下放置1 h使其充分溶解后,放回冰上,于通风橱中使六氟异丙醇挥发。A β_{1-42} 风干成白色肽膜。将肽膜用 $44\text{ }\mu\text{L}$ 的无水二甲基亚砜溶解后,加入 $506\text{ }\mu\text{L}$ 的含10%胎牛血清的完全培养液进行稀释至浓度 $400\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。 4°C 孵育24 h后, 4°C ,14000转离心10 min,取上清液作为母液,分装后储存于 -80°C 。

2.3 细胞分组

将处于对数生长期的SH-SY5Y细胞分为3组:对

照组、模型组和药物组。待细胞贴壁后,对照组给予含 10% 空白血清的完全培养液;模型组给予含 10% 空白血清的完全培养液和终浓度为 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $\text{A}\beta_{1-42}$ 寡聚体(根据前期预实验的结果,确定 $\text{A}\beta_{1-42}$ 寡聚体的给药浓度);药物组给予含 10% 含药血清的完全培养液(根据前期的研究基础^[12]及预实验的结果,确定六味地黄丸含药血清的浓度)和终浓度为 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $\text{A}\beta_{1-42}$ 寡聚体。各组加药完成后培养 48 h。

2.4 六味地黄丸含药血清对 $\text{A}\beta_{1-42}$ 损伤的 SH-SY5Y 细胞增殖率的影响

取处于对数生长期的 SH-SY5Y 细胞,以 $2\times 10^4/\text{mL}$ 的密度接种于 96 孔板上,每组 6 个复孔,并设置空白。细胞贴壁后,各组细胞加药处理,在培养箱内继续培养 48 h 后取出。在避光条件下,按照 1:10 的比例将 CCK-8 试剂与含 10% 胎牛血清的完全培养液混合,弃上清,每孔加入 110 μL 的 CCK-8 混合液,放回培养箱内继续培养 3 h 后取出,用酶标仪在 450 nm 波长处测定各孔吸光值。计算细胞增殖率(细胞增殖率=[(各孔吸光值-空白孔平均吸光值)/(对照组平均吸光值-空白孔平均吸光值)] $\times 100\%$)。重复上述实验 3 次。

2.5 透射电镜观察细胞形态及自噬体的数量

将处于对数生长期的 SH-SY5Y 细胞按照 $5\times 10^4/\text{mL}$ 的密度接种于 25 cm^2 培养瓶中,细胞贴壁后,各组细胞加药处理,在培养箱内继续培养 48 h 后取出。吸掉培养液,将细胞刮下转移至离心管中,加入 PBS,2000 转离心 2 min 洗涤细胞。加入电镜固定液固定(2.5% 戊二醛)2 h 以上,0.1 M 磷酸漂洗,1% 锇酸固定,再用 0.1 M 磷酸漂洗,梯度乙醇脱水三次。纯丙酮与包埋液 1:2 的比例室温条件下包埋,纯丙酮与包埋液 2:1 的比例室温条件下过夜,37℃ 环境下使用纯包埋液包埋 2 h。烘箱内 37℃ 过夜、45℃ 下 12 h、60℃ 下 24 h。使用 LKB-1 型超薄切片机切片 50-60 nm,3% 醋酸铀-枸橼酸铅双染色,透射电镜观察,拍片。

2.6 免疫荧光法分析各组细胞内 $\text{A}\beta$ 沉积情况

向 24 孔板每个孔中滴入少量完全培养液浸润,孔中放入爬片,压紧排出气泡,将处于对数生长期的 SH-SY5Y 细胞,以 $2\times 10^4/\text{mL}$ 的密度接种于 24 孔板上,细胞贴壁后,各组细胞加药处理,在培养箱内继续培养 48 h 取出。吸去各孔中的培养液,用 PBS 洗涤细胞,加入 4% 多聚甲醛进行固定,15 min 后吸去多聚甲醛,用 PBS 洗涤细胞三次,加入 tritonX-100 室温孵育

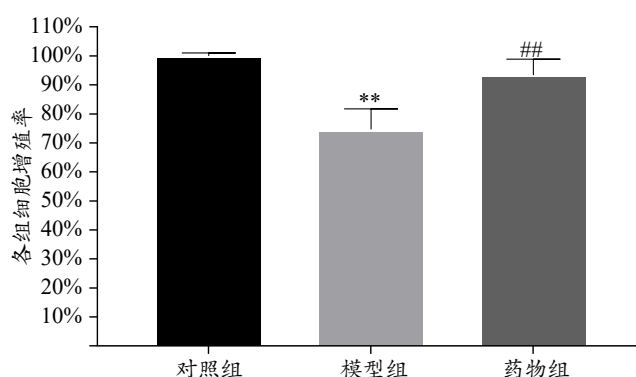


图1 六味地黄丸含药血清对 $\text{A}\beta$ 诱导 SH-SY5Y 细胞的增殖率的影响

注:与对照组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,## $P<0.01$ 。

30 min,清除 tritonX-100 后,用 PBS 浸泡 3 次。加入山羊血清室温 15 min,加入一抗 4℃ 过夜,PBS 清洗,加入荧光二抗孵育 60 min;PBS 清洗三次,加入 DAPI 以复染核,PBS 浸泡三次,用抗荧光淬灭剂封片,荧光显微镜下观察染色效果,拍照,并分析各组 $\text{A}\beta$ 平均荧光强度。

2.7 六味地黄丸含药血清对 $\text{A}\beta_{1-42}$ 损伤的 SH-SY5Y 细胞自噬相关蛋白的影响

取出各组细胞处理 48 h 后,吸掉培养液,用预冷的 PBS 洗涤后,裂解液裂解细胞。将裂解好的细胞转移至提前预冷的离心管柱套管中,15000 转离心 30 s 后立刻置于冰上,去掉离心管柱。冰上静置 30 min 后,4℃ 12000 rpm 离心 20 min,取上清,应用 BCA 试剂盒测定样品蛋白浓度。Western blot 法检测各组细胞 BACE1、p62、LC3- I、LC3 II、Beclin1 蛋白表达情况。应用上样缓冲液变性后,以 20 μg 蛋白/泳道上样,经 SDS-PAGE 电泳后,电转移至 PVDF 膜,加入一抗(1:500 稀释),4℃ 封闭过夜,TBST 洗涤 3 次,每次 5 min,加入 HRP 标记的二抗(1:5000 稀释)。按化学发光试剂盒说明书混合发光液 A 和 B,与膜作用后进行 X 光片曝光。X 光片显影和定影后利用凝胶自动分析成像软件扫描分析结果,以 β -actin 为内参照,对蛋白条带进行分析。

2.8 统计学方法

所有结果采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计处理,各指标采用单因素方差分析,结果用均值 $\pm$ 标准差表示,通过 LSD 方法进行组间多重比较, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

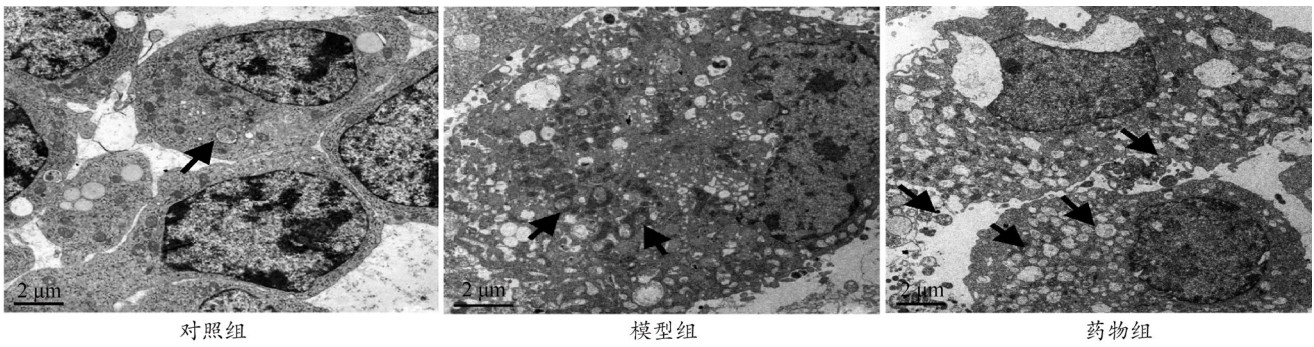


图2 六味地黄丸含药血清对Aβ诱导SH-SY5Y细胞的形态影响(×5000)

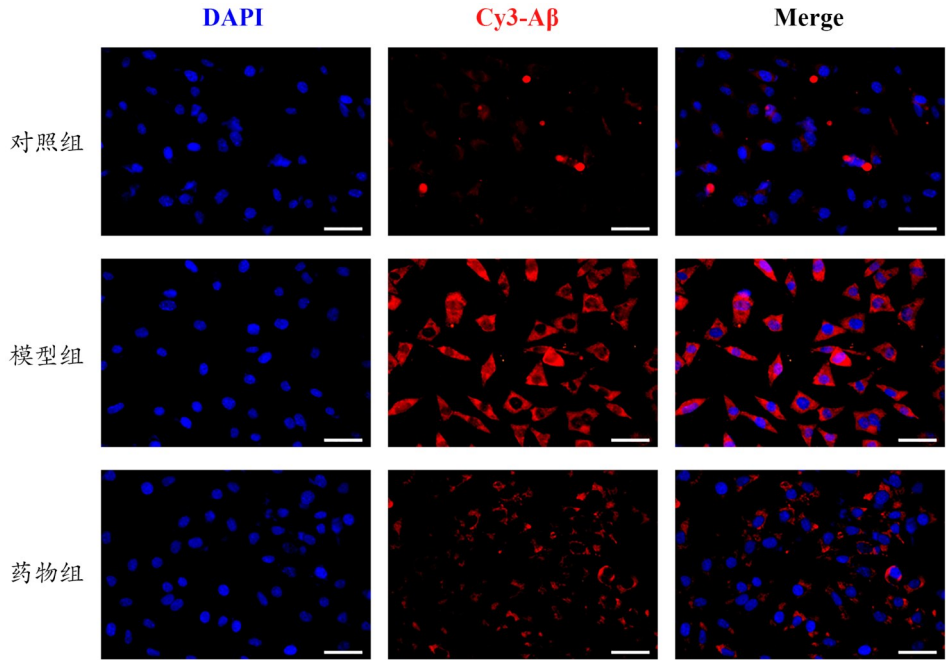


图3 六味地黄丸含药血清对Aβ诱导SH-SY5Y细胞的Aβ沉积的影响(×400)

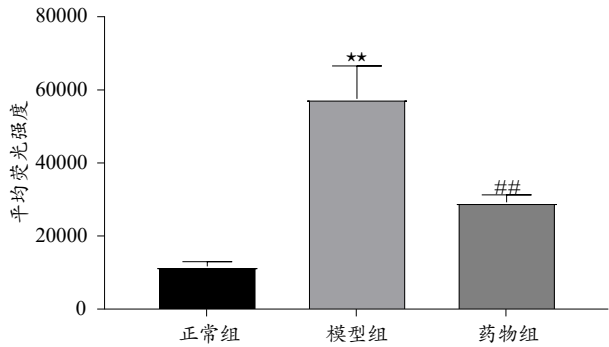


图4 六味地黄丸含药血清对Aβ诱导SH-SY5Y细胞的Aβ沉积的影响

注:与对照组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,## $P<0.01$ 。

3 结果

3.1 六味地黄丸含药血清对Aβ诱导SH-SY5Y细胞的增殖率的影响

与对照组相比,模型组细胞增殖率显著降低($P<0.01$);与模型组相比,药物组细胞增殖显著升高($P<0.01$)(图1)。

3.2 六味地黄丸含药血清对Aβ诱导SH-SY5Y细胞的形态影响

电镜结果如图所示,图中黑色箭头标记为自噬体,对照组电镜下可见细胞形态完整,结构清晰,线粒体结构完整,呈杆状、椭圆状,排列规则,线粒体嵴数量正常,排列规整。部分细胞浆内可见少量自噬体。

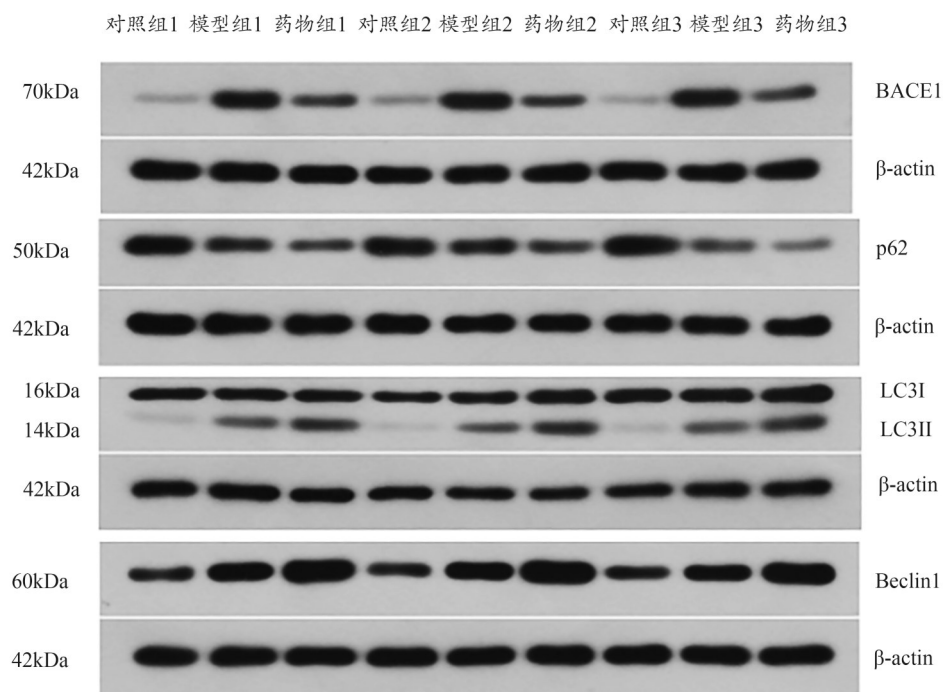


图5 各组细胞BACE1、p62、LC3-I、LC3-II、Beclin1的蛋白表达量

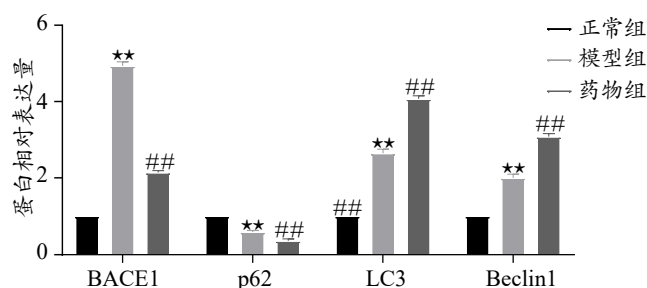


图6 各组细胞BACE1、p62、LC3-I、LC3-II、Beclin1的蛋白表达量

注:与对照组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,## $P<0.01$ 。

与对照组相比,模型组细胞的细胞核膜皱缩,线粒体排列紊乱,呈空泡状,高度水肿变性,基质染色变浅,线粒体嵴数量明显减少,结构排列紊乱。部分细胞浆内可见较多的自噬体。与模型组相比,药物组细胞形态接近正常,部分线粒体发生肿胀,程度减轻,未见明显空泡化,基质染色稍浅,部分线粒体嵴数量减少,排列紊乱,部分线粒体形态接近于对照组细胞内的线粒体结构,部分细胞浆内自噬体较模型组增多(图2)。

3.3 六味地黄丸含药血清对A β 诱导SH-SY5Y细胞的A β 沉积的影响

免疫荧光结果如图所示,可见对照组细胞内A β 的沉积很少,模型组细胞内有大量A β 沉积,药物组组

胞内A β 的沉积明显减少。通过平均荧光强度分析,与对照组相比,模型组荧光强度显著增高($P<0.01$),与模型组相比,药物组荧光强度显著降低($P<0.01$)(图3-图4)。

3.4 六味地黄丸含药血清对A β 诱导SH-SY5Y细胞的BACE1、p62、LC3-I、LC3-II、Beclin1蛋白表达的影响

统计结果表明,与对照组相比,模型组细胞的BACE1、Beclin1的蛋白表达量和LC3-II/LC3-I的比值显著升高($P<0.01$),p62的蛋白表达量显著降低($P<0.01$);与模型组相比,药物丸组细胞的Beclin1的蛋白表达量和LC3-II/LC3-I的比值显著明显升高($P<$

0.01), BACE1 和 p62 的蛋白表达量显著降低 ($P < 0.01$) (图5-图6)。

4 讨论

AD 又称老年痴呆, 属于中医的“痴呆”“呆病”等范畴, 是由髓减脑消, 神机失用所导致的一种神志异常的疾病, 以呆傻愚笨, 智能低下, 善忘等为主要临床表现。本病多由年迈体虚, 久病耗损等原因导致气血不足, 肾精亏耗, 脑髓失养。中医认为脑为髓海, 元神之府。《医林改错》有说: “年高无记性者, 脑髓渐空”。人步入老年, 脏腑的功能减退, 又因年高而阴气自半, 故肝肾阴虚, 或肾中精气不足, 不能生髓, 导致髓海空虚, 髓减脑消, 形成痴呆, 由此可见肾与脑的关系密切。目前 AD 的患者逐年增多, 临床上也以肾虚所致痴呆多见, 肾为先天之本, 中医对于先天的养护极为重视, 六味地黄丸为补肾的经典方剂, 全方六味药材, 三补三泻, 平补三阴。肾主骨生髓, 六味地黄丸不仅可以填补肾精, 还能在补先天的同时注重培补后天脾胃, 使脑髓得充, 充髓养脑达到防治的效果。本研究使用六味地黄丸含药血清对 $A\beta_{1-42}$ 诱导的细胞进行干预, 结果显示含药血清可以显著提高细胞的增殖率, 形态学上减轻 $A\beta$ 对细胞的损伤,

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, 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。本实验选择的 $A\beta_{1-42}$ 在人体内是较为常见的 $A\beta$ 亚型之一, 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^[13]。故本实验采用 $A\beta_{1-42}$ 诱导建立细胞模型。细胞外聚集的 $A\beta$ 作用于细胞表面的受体及相关蛋白, 进而引起细胞内的一系列酶活性的改变, 加重细胞内 $A\beta$ 的形成。因此, 细胞内 $A\beta$ 产生过多及清除障碍导致了细胞外老年斑的形成, 老年斑又作用于神经细胞引起细胞的进一步损伤产生更多的 $A\beta$ 。本研究通过免疫荧光实验证明同对照组相比模型组细胞内有大量 $A\beta$ 沉积, 药物组细胞内 $A\beta$ 的沉积明显减少, 表明六味地黄丸药物血清具有明显减轻细胞损伤, 减少细胞内 $A\beta$ 沉积的作用。

1962 年, 科学家观察到在细胞内存在着一种“自己吃自己”的现象, 因此将其命名为自噬。自噬体又称自噬小体, 是一种具有双层膜结构的特殊囊泡, 自

噬体内包裹着需要降解的细胞器或蛋白, 与溶酶体进行融合后, 可以形成自噬溶酶体, 从而将自身包裹的内容物进行降解, 达到细胞自我代谢的作用。神经细胞具有相对活跃的自噬水平, 对于维持细胞的生长和正常功能具有重要的意义。本研究通过透射电镜观察发现, 同对照组相比, 模型组细胞自噬体增多, 这可能是 $A\beta$ 刺激的结果。六味地黄丸含药血清进一步增强了 $A\beta$ 诱导的细胞自噬水平, 结合免疫荧光实验结果, 说明六味地黄丸含药血清提高神经细胞自噬水平有效清除了细胞内过多产生的 $A\beta$ 。

目前研究细胞自噬过程有多种蛋白的参与。 β 位点 APP 裂解酶 1 (BACE1) 即 β -分泌酶, 是一种跨膜蛋白, 参与 APP 的切割过程。有研究表明, BACE1 上调会导致 $A\beta$ 的生成增多, 在 AD 患者脑内也检测到 BACE1 的表达量升高^[16-17]。近期有学者通过细胞实验研究表示, $A\beta$ 的生成障碍还可能与 BACE1 的缺失有关^[18]。本研究结果显示, 模型组细胞 BACE1 表达显著上升, 六味地黄丸含药血清干预后可明显降低其表达, 与免疫荧光结果 $A\beta$ 的变化趋势一致。

自噬效应蛋白 Beclin1 磷酸化后, 可以与不同的调节蛋白结合形成复合物参与自噬的各个阶段。研究表明, 通过 2-羟基-DHA (HDHA) 来干预人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞的 AD 模型, 发现自噬水平与 Beclin1 的表达量同时升高^[19]; 通过姜黄素干预 AD 细胞模型后, 可以提高 Beclin1 的表达量, 起到提高自噬水平的作用^[20]; 还有研究在使用白藜芦醇作为自噬诱导剂后, 发现 AD 模型的神经元细胞自噬水平上升的同时 Beclin1 的表达量与溶酶体活性都随之增加^[21]。本研究也证实, 六味地黄丸含药血清可以明显提高 $A\beta$ 诱导的 SHSY-5Y 细胞 Beclin1 表达, 说明其具有增强细胞自噬水平的作用, 同透射电镜观察到的结果一致。

微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC3) 参与自噬体膜的形成过程, LC3 包括 LC3-I 和 LC3-II 两种形式, 在自噬的过程中 LC3-I 可以转换为 LC3-II。首先 pro-LC3 在 Atg4 的作用下, 一小段多肽在 C 端被水解, 此时暴露甘氨酸的 LC3 为胞浆型, 即 LC3-I, 在诱导自噬后, LC3-I 在类 E1 酶 Atg7、类 E2 酶 Atg3 以及类 E3 酶 Atg5-Atg12-Atg16L 复合物的共同作用下 (类泛素修饰过程), 在自噬体膜上与磷脂酰乙醇胺 (PE) 偶联, 形成膜结合形式的 LC3-II^[22]。LC3-II 作为自噬的重要

标志物,与自噬体的数量成正相关。本实验结果显示,六味地黄丸含药血清干预后,LC3-II/LC3-I的值明显升高,说明药物组细胞自噬水平显著增强。p62是自噬的接头蛋白,在自噬的中期和晚期进入自噬溶酶体内被降解^[23]。已有大量实验证明,当自噬被抑制时,p62的表达量会升高,而重新激活自噬后,p62的表达量会随之降低。因此p62表达量升高通常被认为是自噬活性受到抑制的标志。本实验药物组细胞p62表达明显下降,提示有更多的p62进入溶酶体降解,说明细胞具有更高的自噬水平。自噬流是评价细胞自噬水平的重要依据,包括自噬体形成、自噬体与溶酶体融合、底物降解等动态过程。LC3与P62蛋白是检测自噬流活化或受阻的关键,自噬流受阻时P62含量增多、LC3表达量减少^[24]。本实验结果显示同对照组相比,模型组细胞自噬流活化,药物组细胞自噬流活化程度更高,同以上其它结果一致。

综上所述,由于 $A\beta_{1-42}$ 的刺激,SH-SY5Y细胞受损

明显,细胞的自噬水平增强,这可能是由于细胞在 $A\beta_{1-42}$ 的刺激下,发生短时间的应激的结果。但由于 $A\beta_{1-42}$ 的毒性作用,细胞受损的同时自噬功能也受到损害,此时升高的自噬水平仍然不足以清除由 $A\beta_{1-42}$ 毒性造成的大量增多的异常蛋白质,因此在自噬水平升高的情况下仍可见到大量 $A\beta$ 沉积在细胞内;而六味地黄丸药物血清显示出了明显的细胞保护作用,且进一步增强了细胞的自噬水平,利于细胞及时清除异常蛋白质,达到部分恢复细胞形态和功能的效果。因此,补肾填精法可以通过提高神经细胞的自噬水平,清除异常蛋白质实现对细胞的保护,在一定程度上对阿尔茨海默病起到防治作用。

阿尔茨海默病作为一种呈进行性加重的神经退行性疾病,在临床上尚未发现有效的治疗手段。本课题在中医理论的指导下,以神经细胞的自噬异常为切入点,探讨AD的部分发病机制,以及补肾填精法的部分作用机制,有助于为中医“从肾论治”阿尔茨海默病及相关神经退行性疾病提供实验依据。

参考文献

- 1 Thal D R, FNDrich M. Protein aggregation in Alzheimer's disease: $A\beta$ and τ and their potential roles in the pathogenesis of AD. *Acta Neuropathol*, 2015, 129(2):163-165.
- 2 Frake R A, Ricketts T, Menzies F M, et al. Autophagy and neurodegeneration. *J Clin Invest*, 2015, 125:65-74.
- 3 Tsakiri E N, Gumeni S, Manola M S, et al. Amyloid toxicity in a Drosophila Alzheimer's model is ameliorated by autophagy activation. *Neurobiol Aging*, 2021, 105:137-147.
- 4 Chen W P, Zhang G, Cheng Z J, et al. Corrigendum to "Inhibitor kappa B kinase β , modulated by DJ-1/p-VHL, reduces Phosphorylated Tau (p-Tau) accumulation via autophagy in Alzheimer's disease model" [*Neuroscience* 452C (2021) 1-12]. *Neuroscience*, 2021, 465:235-240.
- 5 靖林林, 龚先玲, 孙学刚. 自噬的中医属性及其在人体衰老和肿瘤发病中的意义. *中医杂志*, 2014, 55(22):1891-1893.
- 6 黄贵华, 纪云西, 吴大力, 等. 细胞自噬与中医气虚痰瘀关系探讨. *中医杂志*, 2011, 52(20):1717-1719.
- 7 蒋鹭莲, 刘珂, 赵丽萍, 朱翔宇. “益肾调督”法针刺治疗阿尔茨海默病的作用机制研究. *世界科学技术-中医药现代化*, 2020, 22(8):2679-2685.
- 8 杨佳一, 赵俊, 田会玲, 等. “脾肾互赞”理论在阿尔茨海默病治疗中的应用. *世界科学技术-中医药现代化*, 2020, 22(8):2607-2614.
- 9 王祺, 单思, 吴欣宇, 等. 滋阴药延缓衰老机制的研究进展. *世界科学技术-中医药现代化*, 2020, 22(10):3726-3732.
- 10 崔勇, 王艳杰, 赵丹玉, 等. 六味地黄丸对 APP/PS1 小鼠学习记忆能力及胆碱能系统的影响. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(3):148-151.
- 11 朱仲康, 张林, 柳春, 等. 补肾填精法对肾虚阿尔茨海默小鼠海马自噬的干预作用. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(20):43-48.
- 12 崔勇. 六味地黄丸对 APP/PS1 双转基因小鼠 *TLR4/NF- κ B* 信号通路影响的实验研究. 沈阳: 辽宁中医药大学博士研究生学位论文, 2016.
- 13 王芳, 周爱民. β 淀粉样蛋白的研究进展. *医学综述*, 2012, 20:3377-3379.
- 14 Yu W H, Cuervo A M, Kumar A, et al. Macroautophagy—a novel Beta-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *Cell Biol*, 2005, 171(1):87-98.
- 15 黄福德. β 淀粉样肽在阿尔茨海默病中作用的逐渐认识. *生命科学*, 2014, 26(1):9-14.
- 16 Coimbra J R M, Marques D F F, Baptista S J, et al. Highlights in BACE1 inhibitors for Alzheimer's disease treatment. *Front Chem*, 2018, 6:178.
- 17 王永平, 王剑锋, WangYongping, et al. BACE1 作为阿尔茨海默病一种潜在的生物标志物. *国际老年医学杂志*, 2013, 34(1):39-41.
- 18 Ohno M, Evgeny A S, Linda H Y, et al. BACE1 deficiency rescues memory deficits and cholinergic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuron*, 2004, 41(1):27-33.
- 19 Manuel T, Amaia M E, A F deRoqueMaria, et al. Escrivá, Xavier Busquets. *The unfolded protein response in the therapeutic effect of*

- hydroxy-DHA against Alzheimer's disease. Apoptosis*, 2015, 20(5): 712-724.
- 20 康清梅. *Curcumin* 通过增强 *Rab7* 表达促进自噬体的轴突运输. 重庆: 重庆医科大学硕士研究生学位论文, 2017.
- 21 Wani A, Gupta M, Ahmad M, *et al.* Alboxin clears amyloid- β by inducing autophagy through PTEN-mediated inhibition of the AKT pathway. *Autophagy*, 2019, 15(10):1810-1828.
- 22 Ward C, Martinez L N, Otten E G, *et al.* Autophagy, lipophagy and lysosomal lipid storage disorders. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1861(4):269-284.
- 23 肖瑶. 运动对 *APP/PS1* 转基因 *AD* 小鼠海马自噬水平的影响. 上海: 华东师范大学硕士研究生学位论文, 2016.
- 24 Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 2008, 132(1):27-42.

Study on Effect and Mechanism of Liuwei Dihuang Pill on Autophagy Induced by A β in SH-SY5Y Cells

Zhu Zhongkang, Liu Yuxi, Wang Bing, Zhang Lin, Wang Yanjie, Wang Zhe, Liu Chun, Zhao Danyu
(College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Liaoning University of Traditional Chinese
Medicine, Shenyang 110847, China)

Abstract: Objective To study the effect of Liuwei Dihuang pill containing serum on autophagy of SH-SY5Y cells induced by A β and its mechanism, and to explore the pathological mechanism of Alzheimer's disease and the action mechanism of tonifying kidney and filling essence method. Methods 30 rats were randomly divided into control group and Liuwei Dihuang Pill group. They were given the same amount of double distilled water and Liuwei Dihuang Pill powder solution by gavage respectively. After the last gavage, the blood was taken and the serum was separated for standby. SH-SY5Y cells were divided into control group, model group and drug group. The control group and model group were given complete culture medium containing blank serum. The drug group was given complete culture medium containing drug serum. The model group and drug group were added A β 1-42 oligomer and cultured for 48 hours. CCK-8 method was used to analyze the cell proliferation rate; immunofluorescence method was used to analyze the deposition of A β ; Western blot was used to detect the protein expression of BACE1, p62, LC3- I, LC3- II and Beclin1. Results CCK-8 results showed that compared with the control group, the cell proliferation rate of the model group was significantly decreased ($P<0.01$); compared with the model group, the cell proliferation rate of the drug group was significantly increased ($P<0.01$). Compared with the control group, the deposition of A β in the model group increased significantly ($P<0.01$); compared with the model group, the deposition of A β in the drug group decreased significantly ($P<0.01$). Compared with the control group, the protein expression of BACE1, Beclin1 and the ratio of LC3- II/LC3- I in the model group were significantly increased ($P<0.01$), and the protein expression of p62 was significantly decreased ($P<0.01$); compared with the model group, the protein expression of Beclin1 and the ratio of LC3- II/LC3- I in the drug group were significantly increased ($P<0.01$), and the protein expression of BACE1 and p62 were significantly decreased ($P<0.01$). Conclusion Liuwei Dihuang pill containing serum can increase the expression of autophagy related genes induced by A β , up regulate autophagy level, reduce cell damage, and has obvious protective effect on SH-SY5Y cells.

Keywords: Alzheimer's disease, Autophagy, A β , Liuwei Dihuang Pill, SH-SY5Y

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