

原小檗碱类多靶点抗老年性痴呆症药理作用^{*}

陈 青, 奉文尚, 何 峰, 钟 翎

(中山大学药学院, 广东 广州 510006)

摘 要: 原小檗碱是一类异喹啉生物碱, 具有相同的药效基团。本研究检测了以小檗碱和四氢黄藤素为代表的原小檗碱多靶点抗 AD 效应及分子作用机制。以人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 为研究对象, 利用 Western blot 检测药物对细胞全长 APP 和 BACE1 蛋白水平的影响; ELISA 技术检测细胞外可溶性淀粉样前体蛋白 α (sAPP α) 的分泌; 酶活性检测试剂盒检测乙酰胆碱酯酶 (AChE) 的活性。结果显示, 药物处理细胞 24 h 后, 二者均能显著地抑制 BACE1 蛋白的表达, 并可使 sAPP α 的分泌显著增加, 但未见细胞 APP 蛋白含量明显变化, 同时对该细胞的 AChE 的活性具有显著的抑制作用。以上结果证明: 原小檗碱生物碱药理活性涉及预防和减少 A β 沉积和增强乙酰胆碱对胆碱受体的作用, 并通过细胞自身的代谢增加具有神经营养作用的 sAPP α 的分泌。提示此类化合物具有多靶点抗老年性痴呆的潜能, 通过结构优化改造, 将有望获得副作用小的新一代抗 AD 有效药物。

关键词: 阿尔茨海默病; 原小檗碱; 淀粉样前体蛋白; β -分泌酶 1; 可溶性淀粉样前体蛋白 α ; 乙酰胆碱酯酶
中图分类号: R96 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2009) 05-0086-05

Pharmacological Action of Multi-Target-Directed Proberberine on Anti-Alzheimer's Disease

CHEN Qing, FENG Wenshang, HE Feng, ZHONG Ling

(School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Proberberine is an isoquinoline alkaloid with the same pharmacophore. In this studies we explored the Multi-targeted effect of Berberine and tetrahydropalmatine (THP) which are representative of proberberine, and their molecular mechanisms of anti-Alzheimer's disease. SH-SY5Y cells were treated with Berberine or THP, the BACE1 protein level, the secretion of sAPP α and the AChE activity were respectively measured by western blot analysis, ELISA assay and AChE activity detection kit. The results showed that, after drug treatments for 24 hours, both Berberine and THP can significantly inhibit the expression of BACE1, increase the secretion of sAPP α , and decrease the AChE activity, but not change full length APP protein lever. These results demonstrated that the pharmacological effects of Proberberine were involved in prevention and reduction of A β level, enhancement of the effect of acetylcholine on acetylcholine receptor in the brain, and increase of the secretion of neurotrophic sAPP α . Our results suggest that Proberberine has multi-target-directed therapeutical potential on Alzheimer's disease, and through structural optimization, it is promising for the development of new anti-AD drugs with less side effects.

Key words: Alzheimer's Disease (AD); proberberine; Amyloid precursor protein (APP); β -site APP cleaving enzyme 1 (BACE1); α secretase form of soluble amyloid precursor protein (sAPP α); acetylcholinesterase (AChE)

^{*} 收稿日期: 2009-01-05

基金项目: 广东省科技计划资助项目 (2007B031406001, 2008A060202010); 国家自然科学基金资助项目 (30873457)

作者简介: 陈青 (1984 年生), 男, 硕士研究生; 通讯作者: 钟翎; E-mail: lsszhl@mail.sysu.edu.cn

阿尔茨海默症 (Alzheimer's Disease, AD) 是一种慢性原发、进行性脑变性疾病,表现为大脑皮层获得性高级功能的全面障碍和认知功能明显受损,脑功能退化衰亡,并伴有行为或人格方面的改变^[1-2]。AD 患者 3 个神经病理学特征为:以 β 淀粉蛋白 ($A\beta$) 为沉积核心的老年斑,细胞内高度磷酸化的微管蛋白组成的神经元纤维缠结和前脑基底部胆碱能神经元的退化和丢失^[3]。

由于 AD 的病因及发病机制未知,其治疗亦无特效药物。到目前为止,用于临床治疗 AD 的药物主要是基于胆碱能假说,乙酰胆碱酯酶抑制剂通过抑制 AChE 的活性使突触间隙乙酰胆碱的作用延长,增强脑内胆碱能神经的功能,从而有效改善患者的认知能力^[3]。但其副作用如对肝功能及转氨酶指数有较大影响,从而制约了它们的广泛应用。同时,人们也在寻找干扰 $A\beta$ 形成和沉积的有效药物。由于 AD 发病原因复杂,诱导的病理症状多样,因而开发研制多靶点、副作用小、效果好的抗 AD 药物具有重要的社会和经济意义。

原小檗碱类生物碱是一类异喹啉类生物碱,广泛存在于多种属植物体内,其药理作用广泛,其中抗菌、镇痛和降糖作用是临床常用的药理作用,在化学结构上,它们具有相同的药效基团,只是在 R1、R2、R3 和 R4 处不同 (图 1: A),其中小檗碱和四氢黄藤素 (tetrahydropalmatine, THP) 主要来自岩黄连的提取物 (图 1: B, C)。小檗碱和 THP 有降压、抗心率失常、抗血栓、钙拮抗、抑制胃酸分泌,抗肿瘤,抗糖尿病等药理作用^[4-7],近年报道小檗碱具有改变淀粉样前体蛋白加工途径的作用^[8]。本文系统分析了以小檗碱和 THP 为代表的原小檗碱类生物碱对淀粉样前体蛋白 (Amyloid precursor protein, APP) 水解途径的影响和对 β -分泌酶和 AChE 的抑制作用,提示原小檗碱类是具有多靶点的预防或治疗 AD 的前体化合物。

1 材料与方法

1.1 材料

小檗碱 (Berberine) 和四氢黄藤素 (tetrahydropalmatine, THP): 纯度为 99.9%, 用 DMSO 溶解配置成 100 $\mu\text{mol/L}$, 置 -20°C 冰箱备用。

人神经母细胞瘤 (Neuroblastoma cell) SH-SY5Y 由美国麻省州立大学医学院周建华实验室惠赠。

DMEM (高糖) 培养基、青链霉素、胰酶均购自 Gibco 公司; 胎牛血清、新生牛血清为 PAA 公司产品; 四甲基偶氮唑盐 (MTT)、二甲亚砜 (DMSO)、

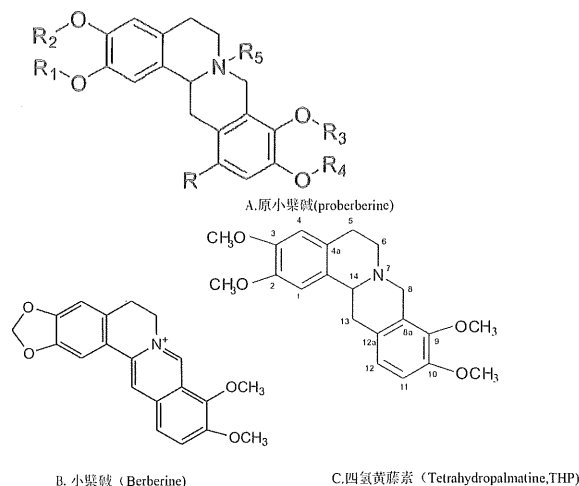


图 1 化学结构

Fig. 1 Chemical structure

N, N - (2 - 羟乙基) - 2 - 氨基乙磺酸 (BES) 和蛋白酶抑制剂为 Sigma 公司生产; BCA 蛋白定量试剂盒和 ECL 化学发光试剂盒购自 Pierce 公司; PVDF 膜 (0.2 μm) 购于美国 Millipore 公司; 其他常规试剂为国产分析纯。

小鼠抗人 APP 单克隆抗体 (MAB931) 和小鼠抗人 BACE1 单克隆抗体 (2211) 购自 R&D SYSTEMS 公司, 小鼠抗人 β -actin 单克隆抗体为 Chemicon 公司生产。Human APP ELISA Kits (用于检测胞外 sAPP α) 为 Biosource 公司产品。乙酰胆碱酯酶 (AChE) 测定试剂盒: 购自南京建成生物工程研究所第一分所。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 培养于含有 $w = 10\%$ FBS 和 $w = 1\%$ 青链霉素的 DMEM 培养液中, 在 37°C 、 $\varphi = 5\% \text{CO}_2$ 、100% 饱和和相对湿度的恒温细胞培养箱内培养。当细胞贴壁生长密度超过 80% 时, $w = 0.25\%$ 胰酶消化传代。

1.2.2 MTT 法测定细胞毒活性 药物对细胞生存能力的影响可用 MTT (Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide) 试验检测。取对数生长期的 SH-SY5Y 细胞, 以 1×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔板, 每孔含 200 μL 培养基, 12 h 后, 加入终浓度为 10 ~ 80 $\mu\text{mol/L}$ 的 THP 和小檗碱, 另设只加 DMSO 的对照组, 每一浓度组设 6 个复孔。24 h 后, 按照说明书操作步骤, 用酶标仪 (Bio-Teck) 检测各组细胞的吸光值 (A_{490})。各加药组与对照组相比得到的数值即代表相对活力。

1.2.3 细胞总蛋白抽提 细胞接种于 6 孔板, 每孔 3×10^5 个细胞, 在对数生长期分别加入不同浓

度的小檗碱和 THP 处理细胞, 继续培养 24 h, 收集细胞, 按我们以前的方法提取细胞总蛋白^[9], 以 BCA 法测定蛋白质浓度。

1.2.4 Western blot 检测小檗碱和 THP 对 BACE1 和 APP 蛋白表达的影响 取 50 μg 蛋白质在 $w = 10\%$ SDS - 聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳分离, 90 V、90 min 湿法电转移至 PVDF 膜上。Western blot 按前述方法^[9]检测 APP、BACE1 和 β -actin, ECL 化学发光试剂显色, X - 光片放射自显影。以目的片段与 β -actin 的光密度比值进行灰度分析。

1.2.5 ELISA 检测 sAPP α 取指数生长期的细胞, 消化后以 1×10^5 个/mL 的浓度接种于 12 孔板。24 h 后分别加入终浓度为 10、80 $\mu\text{mol/L}$ 的 THP 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 的小檗碱, 另设只加 DMSO 的对照组, 每组设 3 个复孔。24 h 后分别收集培养液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 5 min 后取上清, 按照 Human APP ELISA Kit (Biosource) 说明书上的步骤检测 sAPP α 。

1.2.5 乙酰胆碱酯酶 (AChE) 活性的测定 取 10 μg 蛋白质按照乙酰胆碱酯酶 (AChE) 测定试剂盒说明书上的步骤检测 AChE 的活性, 使用分光光度计 (Beckman Coulter™ DU 530) 检测样品在波长 412 nm (A_{412}) 处的吸光值。

2 结 果

2.1 原小檗碱类对 SH-SY5Y 细胞的生长活力没有影响

MTT 实验可评估药物对细胞的毒性, 用 10 ~

80 $\mu\text{mol/L}$ 的小檗碱和 THP 分别处理 SH-SY5Y 细胞 24 h 后, 发现对 SH-SY5Y 细胞的活力没有显著的变化 ($P > 0.05$), 结果见 (图 2)。表明在此浓度范围内药物对细胞的生长没有影响。

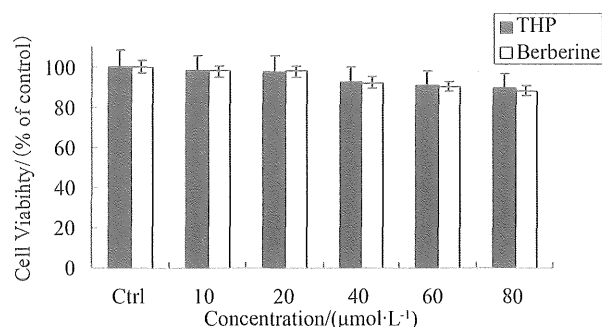


图 2 不同浓度的小檗碱和四氢黄藤素处理 24 h 的 SH-SY5Y 细胞活力 ($P > 0.05$)

Fig. 2 Cell viability of SH-SY5Y treated with Berberine and THP for 24 h ($P > 0.05$)

2.2 原小檗碱类对 APP 蛋白表达无明显影响

我们利用 Western blot 观察了小檗碱和 THP 对细胞内全长 APP 蛋白表达的影响, 结果发现: 药物处理 24 h 后, 各样品对细胞内的 APP 蛋白水平均无明显影响 ($P > 0.05$) (图 3)。

2.3 原小檗碱类明显地抑制了 BACE1 蛋白表达

BACE1 即 β 分泌酶 1 是 $\text{A}\beta$ 产生的限速酶, 抑制 β 分泌酶即可阻止或减少 $\text{A}\beta$ 的产生, 因而成为预防或治疗 AD 的靶点^[10]。我们通过 Western blot 检测了小檗碱和 THP 对 BACE1 的影响。药物作用

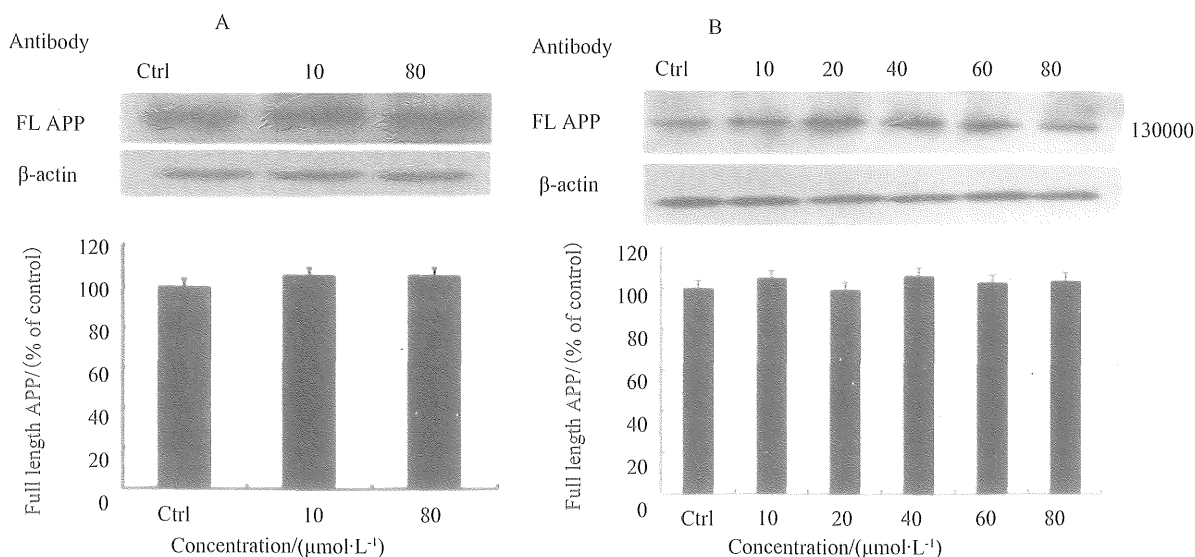


图 3 Western blot 检测小檗碱和 THP 作用 24 h 后 SH-SY5Y 细胞 APP 蛋白质水平 ($P > 0.05$)

Fig. 3 APP protein level of SH-SY5Y cells treated with Berberine and THP for 24 h by Western blot ($P > 0.05$)

(A: 小檗碱; B: THP)

细胞 24 h 后,结果显示:10 $\mu\text{mol/L}$ 的小檗碱(图 4: A)明显地降低了 BACE1 蛋白的表达水平,约达到 80% (*: $P < 0.01$);而 10 和 80 $\mu\text{mol/L}$ 的 THP(图 4: B)亦均能明显地抑制 BACE1 蛋白的表达,分别降低了约 40% 和 80% (*: $P < 0.05$)。

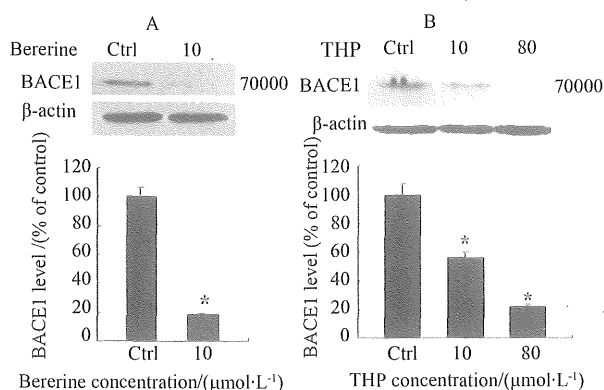


图 4 Western blot 检测小檗碱和 THP 作用

24 h 后 SH-SY5Y 细胞 BACE1 蛋白质水平

Fig. 4 BACE1 protein level of SH-SY5Y cells treated with Berberine and THP for 24 h by Western blot (A: 小檗碱, *: $P < 0.01$; B: THP, *: $P < 0.05$)

2.4 原小檗碱类能够显著的提高胞外 sAPP α 的分泌

胞外 sAPP α 含量的变化预示着胞内 APP 水解途径的改变,因此可作为抗 AD 的指标评价^[8,11]。为了考察它们对 APP 水解的影响,我们利用 ELISA 试剂盒检测了胞外 sAPP α 的含量变化。结果发现(图 5):10 $\mu\text{mol/L}$ 的小檗碱可增加胞外 sAPP α 的分泌($P < 0.05$),这一结果与已报到的结果一致^[8];80 $\mu\text{mol/L}$ 的 THP 则显著增高了 sAPP α 的分泌,与空白对照相比增加了 2.5 倍($P < 0.01$)。

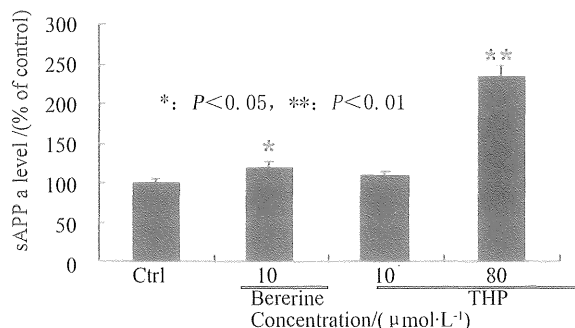


图 5 ELISA 检测小檗碱和 THP 作用 24 h 后 SH-SY5Y 细胞 sAPP α 分泌

Fig. 5 ELISA assay detected sAPP α secretion in SH-SY5Y cells treatment with berberine and THP for 24 h

2.5 原小檗碱类能够抑制 AChE 的活性

乙酰胆碱酯酶(AChE)抑制剂可提升神经递

质的水平,加强神经信号的滞留,从而扭转 AD 的症状^[3],我们检测了二者对 AChE 的抑制作用。药物处理 24 h 后,检测 AChE 的活性发现:10 $\mu\text{mol/L}$ 的小檗碱可显著抑制 AChE 的活性,达到了 50% ($P < 0.01$)。10、80 $\mu\text{mol/L}$ THP 对 AChE 的活性影响呈现了逐渐下降的趋势,并在 80 $\mu\text{mol/L}$ 时达到了最低,接近 50% ($P < 0.05$)(图 6)。

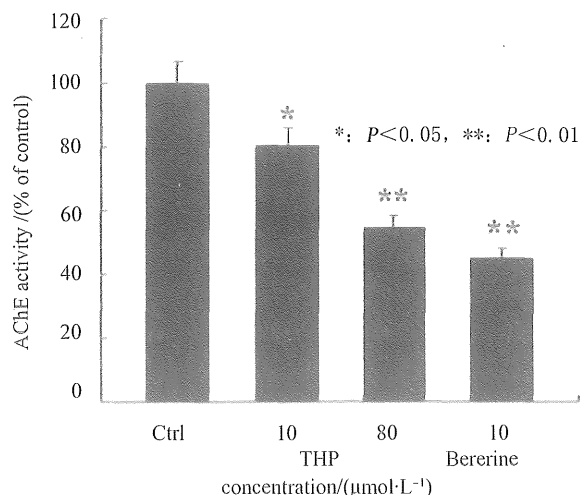


图 6 小檗碱和 THP 作用 24 h 后 SH-SY5Y 细胞中 AChE 酶活性

Fig. 6 AChE activities in SH-SY5Y cells treated with Berberine and THP for 24 h.

3 讨论

目前抗 AD 药物主要从抑制胆碱酯酶、改善症状、改善脑内微循环及脑代谢等角度治疗,但临床使用的胆碱酯酶抑制剂大多有严重的副作用。因而国际上这一领域的研究热点开始集中在减少引起 AD 的致病物质 A β (β -amyloid) 入手,通过抑制 A β 产生、聚集,甚至制造针对 A β 的抗体等手段来对抗其对大脑的损伤。本研究旨在从天然产物中研发一种副作用小,通过细胞本身的代谢作用,缓解大脑损伤,抑制 A β 产生并具有胆碱酯酶抑制作用的先导药物——原小檗碱类,正是这样一个具有多靶点、副作用小的先导化合物,经改造可望成为新一代抗 AD 药物。

(1) 它们对细胞的生长活力没有影响,表明它们的毒性作用低,副作用小。其次,小檗碱和 THP 可抑制 BACE1 的表达。BACE1 即 β 分泌酶是 A β 的限速酶,故以 BACE1 作为靶点进行药物的筛选从而开发治疗 AD 的药物,已成为当今治疗 AD 的一条重要途径^[10]。本研究发现:小檗碱和 THP 作用 SH-SY5Y 细胞 24 h 后,均显著的抑制了

BACE1 的蛋白表达。

(2) 小檗碱和 THP 可显著增加细胞外 sAPP α 的分泌。sAPP α 的神经保护作用已得到证实^[12]。增加 sAPP α 可促进 AD 患者脑内残余神经元的存活, 增加乙酰胆碱的释放, 从而改善患者的记忆功能。通过调节 APP 的代谢, 增加 sAPP α 的分泌, 从而加强了对神经元的保护作用, 改善 AD 患者的记忆。因而如何调节 APP 的代谢或者增加 sAPP α 的分泌已成为 AD 治疗的研究焦点^[13]。本实验研究表明, 小檗碱和 THP 均可促进细胞 sAPP α 的分泌, 但对 APP 蛋白无显著影响。这表明, 该药物促进 sAPP α 分泌的机制并不是增加胞内 APP 水平造成的, 而是在不影响胞内 APP 蛋白水平的情况下, 调节 APP 代谢, 促进 APP 更多地经 α 、 γ -分泌酶所介导的途径进行水解, 从而使 sAPP α 分泌增多。此外, 在胞内 APP 蛋白不增多的情况下, 有更多地 APP 经 α 分泌酶水解也就使经 β 分泌酶水解的 APP 的比例相对降低, A β 的产生也势必会降低。这对 AD 的预防或治疗是有重要意义的。

(3) 小檗碱和 THP 可抑制 AChE 的活性。AD 患者胆碱能系统受损, 导致突触部位乙酰胆碱(ACh)含量下降。因此阻止乙酰胆碱的降解, 增强乙酰胆碱对脑胆碱受体的作用, 有望提高 AD 患者的胆碱神经功能^[3]。本研究结果显示: 小檗碱和 THP 都明显地抑制了 AChE 的活性。已有研究发现, 黄藤素和小檗碱都能够显著的抑制 AChE 的活性^[14], 而四氢黄藤素同时又是小檗碱的前体化合物, 说明这一类结构相似的生物碱具有抑制 AChE 活性的作用。

综上所述, 我们通过对小檗碱和四氢黄藤素为代表的原小檗碱类生物碱抗老年痴呆症若干药理作用的检测, 表明其药理活性涉及两个方面: 第一, 干扰和减少 A β 沉积, 通过控制 BACE1 的蛋白质水平, 阻止 A β 的产生途径。同时, 通过细胞自身的代谢增加具有神经营养作用的 sAPP α 的分泌, 并可进一步降低 A β 的毒性作用; 第二, 通过降低 AChE 的活性, 增强乙酰胆碱对脑胆碱受体的作用, 从而减缓前脑基底部胆碱能神经元的退化和丢失, 使突触间隙乙酰胆碱的作用延长, 增强脑内胆碱能神经的功能, 从而有效改善 AD 患者的认知能力。这些结果显示此类化合物具有多靶点抗老年痴呆的潜能, 通过结构优化改造, 将有望获得副作用小的新一代抗 AD 有效药物。

参考文献:

- [1] ZILKA N, NOVAK M. The tangled story of Alois Alzheimer[J]. Bratisl Lek Listy, 2006, 107(9-10): 343-345.
- [2] MITCHELL T W, MUFSON E J, SCHNEIDER J A, et al. Parahippocampal tau pathology in healthy cognitive impairment, and early Alzheimer's disease[J]. Ann Neurol, 2002, 51: 182-189.
- [3] RICARDO B, JUAN P M, LUIS B. The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders[J]. Archives of Medical Research, 2001, 32, 32: 367-81.
- [4] IMANSHAHIDI M, HOSSEINZADEH H. Pharmacological and Therapeutic Effects of Berberis vulgaris and its Active Constituent Berberine[J]. Phytother Res, 2008, 22: 999-1012.
- [5] KIM D W, AHAN S H, KIM T Y. Enhancement of arsenic trioxide (As₂O₃)-mediated apoptosis using berberine in human neuroblastoma SH-SY5Y cells [J]. Korean Neurosurg Soc, 2007, 42: 392-399.
- [6] YIN Jun, XING Huili, YE Jianong. Efficacy of berberine in patients with type 2 diabetes mellitus. Metabolism [J]. Clinical and Experimental, 2008, 57: 712-717.
- [7] KONG Weijia, ZHANG Hao, SONG Danqing, et al. Berberine reduces insulin resistance through protein kinase C-dependent up-regulation of insulin receptor expression[J]. Metabolism Clinical and Experimental, 2009, 58: 109-119.
- [8] ASAI M, IWATA N, YOSHIKAWA A, et al. Berberine alters the processing of Alzheimer's amyloid precursor protein to decrease Ab secretion[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007, 12, 352(2): 498-502.
- [9] CHEN Xiang, FENG Wenshang, CHEN Qing, et al. Effects of acetylcholinesterase inhibitor on the processing of amyloid precursor protein[J]. Int J Physio Pathophys Pharmacol, 2009(1): 76-82.
- [10] VASSAR R. The beta-secretase, BACE: a prime drug target for Alzheimer's disease [J]. J Mol Neurosci, 2001, 17(2): 157-70.
- [11] MATTSON M P, CHENG B, CULWELL A R, et al. Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein[J]. Neuron, 1993, 10(2): 243-54.
- [12] STEIN T D, ANDERS N J, DECARLI C, et al. Neutralization of transthyretin reverses the neuroprotective effects of secreted amyloid precursor protein (APP) in APPsw mice resulting in tau phosphorylation and loss of hippocampal neurons: support for the amyloid hypothesis[J]. Neurosci, 2004, 24: 7707-17.
- [13] NEVE R L. A new wrestler in the battle between alpha- and beta-secretases for cleavage of APP [J]. Trends Neurosci, 2003, 26(9): 461-463.
- [14] 严镭, 王树声, 刘国林. 小檗碱对老年痴呆早期防治的研究[J]. 实用老年医学, 2001, 15(1): 30-33.
- YAN Lei, WANG Shusheng, LIU Guolin. A study of berberine in preventing and treating preclinical dementia in the aged[J]. Practical Geriatrics, 2001, 15(1): 30-33.