



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108653306 B

(45) 授权公告日 2021.07.02

(21) 申请号 201810424610.2

A61P 25/28 (2006.01)

(22) 申请日 2018.05.07

A61P 25/00 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108653306 A

(56) 对比文件

W0 2015154192 A1, 2015.10.15

(43) 申请公布日 2018.10.16

高颖.《骨碎补抗骨质疏松活性部位的化学成分研究》.《中国优秀硕士学位论文数据库 医药卫生科技辑》.2008,

(73) 专利权人 黑龙江中医药大学
地址 150040 黑龙江省哈尔滨市香坊区和平24号

高颖.《骨碎补抗骨质疏松活性部位的化学成分研究》.《中国优秀硕士学位论文数据库 医药卫生科技辑》.2008,

(72) 发明人 张宁 徐红丹 王发善 李庆伟
刘国良

曹秦等.《黄酮类化合物在防治神经退行性疾病中作用的研究进展》.《中国药理学与毒理学杂志》.2015,第29卷(第3期),

(74) 专利代理机构 北京预立生科知识产权代理有限公司 11736

彭双等.《骨碎补中的化学成分及药理作用研究进展》.《天津中医药大学学报》.2012,第31卷(第2期),

代理人 朱萍

审查员 吴铁生

(51) Int. Cl.

A61K 31/7048 (2006.01)

A61K 31/352 (2006.01)

权利要求书1页 说明书16页

(54) 发明名称

金鱼草素-6-新橙皮糖苷在老年痴呆治疗中的应用

(57) 摘要

本发明公开了金鱼草素-6-新橙皮糖苷在老年痴呆治疗中的应用,本发明首次公开了金鱼草素-6-新橙皮糖苷可以促进AD细胞的增殖和抑制AD细胞的凋亡,促进神经细胞中的SOD、p-Akt/t-Akt、ER β 或p-GSK-3 β /t-GSK-3 β 的活性或蛋白的表达,降低ROS、MDA、p-Tau/t-Tau或caspase-3的含量或表达水平。本发明同时公开了金鱼草素-6-新橙皮糖苷与部分植物雌激素联合应用具有较强的协同效应,提示金鱼草素-6-新橙皮糖苷可以与其他植物雌激素联合制备治疗阿尔茨海默的产品。

1. 一种药物组合物,其特征在于,所述药物组合物选自有效量的金鱼草素-6-新橙皮糖苷;和山奈酚、新北美圣草苷、柚皮素、木犀草素、圣草酚的一种或几种。
2. 根据权利要求1所述的药物组合物,其特征在于,所述药物组合物包括山奈酚、新北美圣草苷、柚皮素中的一种或几种。
3. 根据权利要求1或2所述的药物组合物,其特征在于,所述药物组合物还包括医学上可接受的载体或辅料。
4. 权利要求1-3任一项所述的药物组合物在制备治疗阿尔茨海默的产品中的应用。

金鱼草素-6-新橙皮糖苷在老年痴呆治疗中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医学领域,涉及金鱼草素-6-新橙皮糖苷在老年痴呆治疗中的应用。

背景技术

[0002] 阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,简称AD),又称原发性老年痴呆症,是一种神经系统退行性疾病。流行病学研究显示,AD是一种随着年龄的增长,发病率也会同时增加的增龄性疾病,65岁以上的人群约为5%,而在85岁以上的人群约为20%。

[0003] AD的病理学特性主要有两个,第一个是老年斑(senile plaques,SP),第二个是神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles,NFTs);其病因至今并未完全明确,学术界公认的发病机制为淀粉样蛋白学说、Tau蛋白学说、氧化应激学说、凋亡学说等, β 淀粉样蛋白($A\beta$)是老年斑的核心成分,可以通过诱导炎症、氧化损伤和细胞凋亡来发挥其毒性作用,从而导致AD的发生与发展。Tau蛋白以成对螺旋丝样结构主要存在于中枢神经系统神经元的轴突中,过磷酸化的Tau聚集形成NFTs,在AD的发病机制中占据重要地位。

[0004] 较多的研究发现,细胞凋亡在AD的发生和发展中占据重要地位。细胞凋亡又称为细胞程序性死亡,可分为凋亡激活信号、启动、承诺、执行和清除五个步骤。正常的细胞凋亡是一个主动发起以便更好维持内环境稳定状态的过程,当神经元受到各种有害物质刺激后会发生神经细胞的凋亡,而一旦正常凋亡过度活化,就很可能导致神经退变性疾病。研究表明, $A\beta$ 可能引发神经细胞凋亡。

[0005] 研究表明,雌激素可以多途径、多环节的方式防治AD,但长时间服用雌激素易产生子宫出血、乳腺癌及子宫内膜癌等副作用。因此,人们希望寻找可以替代雌激素的药物。植物雌激素(Phytoestrogen)是一类能结合并激活哺乳动物及人的雌激素受体,从而发挥雌激素样或者抗雌激素活性的成分。植物雌激素具有双酚结构,其化学结构与内源性雌激素非常接近,既有雌激素特性,又能根据内源性雌激素的含量和雌激素受体结合,发挥抗雌激素效应。寻找对AD有治疗效果的植物雌激素对于AD的临床治疗具有重要的意义。

发明内容

[0006] 为了解决现有技术中存在的问题,本发明的目的在于提供金鱼草素-6-新橙皮糖苷在阿尔茨海默治疗中的应用,金鱼草素-6-新橙皮糖苷作为植物雌激素,应用于阿尔茨海默的治疗,副作用低。

[0007] 具体地,本发明采用了如下技术方案:

[0008] 本发明的第一方面提供了一种药物组合物,所述药物组合物包括有效量的金鱼草素-6-新橙皮糖苷。

[0009] 进一步,所述药物组合物还包括木犀草素-7-0- β -D新橙皮苷、山奈酚、新北美圣草苷、北美圣草素、柚皮苷、柚皮素、柚皮素-7-0- β -D-葡萄糖苷、木犀草素、木犀草素-7-0- β -D-葡萄糖苷和圣草酚的一种或几种。

- [0010] 进一步,所述药物组合物包括山奈酚、新北美圣草苷、柚皮素中的一种或几种。
- [0011] 进一步,所述药物组合物还包括药学上可接受的载体或辅料。
- [0012] 本发明的第二方面提供了一种非诊疗目的的保护神经细胞的方法,所述方法为施用有效量的金鱼草素-6-新橙皮糖苷。
- [0013] 进一步,所述方法可以促进神经细胞的增殖或抑制神经细胞的凋亡。
- [0014] 进一步,所述抑制神经细胞的凋亡为促进神经细胞中的SOD、p-Akt/t-Akt、ER β 或p-GSK-3 β /t-GSK-3 β 的活性或蛋白的表达。
- [0015] 进一步,所述抑制神经细胞的凋亡为降低ROS、MDA、p-Tau/t-Tau或caspase-3的含量或表达水平。
- [0016] 本发明的第三方面提供了一种阻断金鱼草素-6-新橙皮糖苷作用的方法,所述方法为施用ER拮抗剂或PI3K阻断剂。
- [0017] 本发明的第四方面提供了如下任一项所述的应用:
- [0018] a. 本发明第一方面所述的药物组合物在制备治疗阿尔茨海默的产品中的应用;
- [0019] b. 金鱼草素-6-新橙皮糖苷在制备保护神经细胞的产品中的应用;
- [0020] c. 金鱼草素-6-新橙皮糖苷在制备治疗神经细胞致损引起的疾病的产品中的应用;
- [0021] d. 金鱼草素-6-新橙皮糖苷在制备提高SOD、p-Akt/t-Akt、ER β 或p-GSK-3 β /t-GSK-3 β 的活性或表达水平的产品中的应用;
- [0022] e. 金鱼草素-6-新橙皮糖苷在制备降低ROS、MDA、p-Tau/t-Tau或caspase-3的含量或表达水平的产品中的应用。
- [0023] 本发明的优点及有益效果:
- [0024] 本发明拓展金鱼草素-6-新橙皮糖苷新的医药用途,也为阿尔茨海默症的预防和治疗提供了一种安全、低毒、副作用小、药理作用强的雌激素替代物。

具体实施方式

- [0025] 本发明通过制备A β ₂₅₋₃₅致损PC12细胞的AD细胞模型,研究金鱼草素-6-新橙皮糖苷对AD细胞模型的保护作用及其作用机制,进而探讨金鱼草素-6-新橙皮糖苷预防和治疗AD的可能性。
- [0026] 本发明中的药物组合物包括有效量的金鱼草素-6-新橙皮糖苷以及药学上可接受的载体,作为优选的一种实施方式,本发明的药物组合物包括金鱼草素-6-新橙皮糖苷和其他植物提取物的组合,如木犀草素-7-0- β -D-新橙皮苷、山奈酚、新北美圣草苷、北美圣草素、柚皮苷、柚皮素、柚皮素-7-0- β -D-葡萄糖苷、木犀草素、木犀草素-7-0- β -D-葡萄糖苷、圣草酚等。
- [0027] 作为本发明的一种优选的实施方式,本发明的药物组合物包括金鱼草素-6-新橙皮糖苷与木犀草素-7-0- β -D-新橙皮苷或山奈酚或新北美圣草苷的组合,多种植物提取物的组合使用,有助于增强活性成分的作用效果。
- [0028] 在本发明中,医学上可接受的载体或辅料包括(但不限于)稀释剂、粘合剂、表面活性剂、致湿剂、吸附载体、润滑剂、填充剂、崩解剂。
- [0029] 其中,稀释剂如乳糖、氯化钠、葡萄糖、尿素、淀粉、水等;粘合剂如淀粉、预胶化淀

粉、糊精、麦芽糖糊精、蔗糖、阿拉伯胶、明胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素、乙基纤维素、聚乙烯醇、聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、海藻酸及海藻酸盐、黄原胶、羟丙基纤维素和羟丙基甲基纤维素等；表面活性剂如聚氧化乙烯山梨聚糖脂肪酸酯、十二烷基硫酸钠、硬脂酸单甘油酯、十六烷醇等；致湿剂如甘油、淀粉等；吸附载体如淀粉、乳糖、斑脱土、硅胶、高岭土和皂粘土等；润滑剂如硬脂酸锌、单硬脂酸甘油酯、聚乙二醇、滑石粉、硬脂酸钙和镁、聚乙二醇、硼酸粉末、氢化植物油、硬脂富马酸钠、聚氧乙烯单硬脂酸酯、单月桂蔗糖酸酯、月桂醇硫酸钠、月桂醇硫酸镁、十二烷基硫酸镁等；填充剂如甘露醇（粒状或粉状）、木糖醇、山梨醇、麦芽糖、赤藓糖、微晶纤维素、聚合糖、偶合糖、葡萄糖、乳糖、蔗糖、糊精、淀粉、海藻酸钠、海带多糖粉末、琼脂粉末、碳酸钙和碳酸氢钠等；崩解剂如交联乙烯吡咯烷酮、羧甲基淀粉钠、低取代羟丙基甲基、交联羧甲基纤维素钠、大豆多糖等。

[0030] 本发明中的药物组合物还可以包括稳定剂、杀菌剂、缓冲剂、等渗剂、螯合剂、pH控制剂及表面活性剂等添加剂。

[0031] 其中，稳定剂包括人类血清蛋白、L-氨基酸、糖及纤维素衍生物。L-氨基酸还可以包括甘氨酸、半胱氨酸及谷氨酸中的任意一个。糖类包括单糖，例如葡萄糖、甘露糖、半乳糖、果糖等；糖醇，例如甘露醇、纤维醇、木糖醇等；二糖，例如蔗糖、麦芽糖、乳糖等；多聚糖，例如葡聚糖、羟丙基淀粉、硫化软骨素、透明质酸等及它们的衍生物。纤维素衍生物包括甲基纤维素、乙基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素及羟甲基纤维素钠。表面活性剂包括离子或非离子表面活性剂，例如聚氧化乙烯烷基酯、山梨聚糖单酰基酯、脂肪酸甘油酯。添加剂缓冲剂可以包括硼酸、磷酸、乙酸、柠檬酸、谷氨酸及相应的盐（它们的碱金属或碱性稀土金属盐，例如钠盐、钾盐、钙盐及镁盐）。等渗剂包括氯化钾、氯化钠、糖及甘油。螯合剂包括乙二胺四乙酸钠及柠檬酸。

[0032] 本发明所述药物组合物可口服给药、非胃肠道给药、通过吸入喷雾给药、局部给药、直肠给药、鼻给药、颊给药、阴道给药或通过植入的贮药装置给药。优选口服给药或注射给药。本发明药物组合物可含有任何常用的无毒可药用载体、辅料或赋形剂。

[0033] 在治疗过程中，可以根据症状的严重程度、复发的频率和治疗方案的生理应答，调整本发明药物组合物的剂量。

[0034] 本发明可以采用本领域熟知的多种方法将所述药物组合物进行给药；包括但不限于：皮下注射、肌肉注射、经皮给予、局部给予、植入、缓释给予等；优选的，所述给药方式是非肠道给予的。

[0035] 本发明的药物可以制成液体制剂如水剂、油悬浮剂或其它液体制剂中的一种或多种，如糖浆或酏剂等中的一种或多种；用于肠胃外给药时，可将其制成注射用的溶液剂、水剂或油性悬浮剂等中的一种或多种。

[0036] 以上所述的使用形式中，优选的形式是片剂、包衣片剂、胶囊、栓剂或注射剂等中的一种或多种，进一步优选片剂、胶囊或注射剂等中的一种或多种，特别优选注射剂。

[0037] 作为一种可选择的方式，所述剂型可以是粉针剂，粉针剂一般采用常规的冷冻干燥法，以水作为溶媒，其步骤为：取金鱼草素-6-新橙皮糖苷（或其它植物提取物），加入赋形剂，加水溶解，加入活性炭，过滤除菌，灌装，半轧塞，冷冻干燥，压塞轧盖即可。所用的赋形剂选自甘露醇、水解明胶、葡萄糖、乳糖、右旋糖苷等中的一种或几种。

[0038] 作为一种可选择的方式，本发明制备粉针剂也可采用喷雾干燥法，以水作为溶媒，

其步骤为:取金鱼草素-6-新橙皮糖苷(或其它植物提取物),加或不加赋形剂,加水溶解,加入活性炭,过滤除菌,喷雾干燥,无菌分装,压塞轧盖即可。所用的赋形剂选自甘露醇、水解明胶、葡萄糖、乳糖、右旋糖苷等中的一种或几种。

[0039] 作为本发明的一种可选择的方式,所述剂型可以是小针剂,小针剂的制备以注射用水作为溶媒配制即可,也可加适量辅料,辅料选自乙醇、丙二醇、甘油、聚乙二醇、苯甲酸苄酯、二甲基乙酰胺中的一种或几种。

[0040] 作为本发明的一种可选择的方式,本发明可以制备葡萄糖输液或氯化钠输液,以注射用水作为溶媒,加入适量葡萄糖或氯化钠配制即可,也可加适量辅料,辅料选自乙醇、丙二醇、甘油、聚乙二醇、苯甲酸苄酯、二甲基乙酰胺中的一种或几种

[0041] 金鱼草素-6-新橙皮糖苷的药物组合物一般必须无菌且在生产储存条件下稳定。可以将该组合物配制成溶液、微乳液、分散液、脂质体或其它适合于高药物浓度的有序结构。通过将所需量的该金鱼草素-6-新橙皮糖苷与所需上述成分的一种或组合一起加入适当的溶剂中并接着进行除菌过滤制备无菌注射液。一般而言,通过将该金鱼草素-6-新橙皮糖苷加入含有基本分散介质和所需的上述其它成分的无菌溶媒中制备分散液。在用于制备无菌注射液的无菌粉剂的情况下,推荐的制备方法是真空干燥和冷冻干燥剂。例如,通过诸如卵磷脂的包衣、在分散液的情况下通过保持所需颗粒大小和通过使用表面活性剂,可以保持溶液的适当流动性。通过在该组合物中包括延迟吸收的药剂(例如单硬脂酸盐或明胶)可以达到注射组合物的延长吸收。

[0042] 作为本发明保护神经细胞的一种选择方式,金鱼草素-6-新橙皮糖苷抑制AD细胞的凋亡,调节SOD、p-Akt/t-Akt、ERβ、p-GSK-3β/t-GSK-3β、ROS、MDA、p-Tau/t-Tau或caspase-3活性或表达水平。AD患者由于体内氧化还原平衡受到破坏,机体内抗氧化酶活性降低,大量释放出氧自由基,产生氧化应激,导致脂质过氧化损害等,进而造成神经细胞的破坏,影响记忆功能。Aβ可以引起活性氧(ROS)蓄积,进而导致细胞凋亡。ROS包括超氧化物、羟自由基、H₂O₂等,可能与中枢神经系统的各种神经退行性疾病如AD中观察到的神经元变性相关。丙二醛(MDA)是细胞膜脂质被ROS类物质氧化之后产生的副产物,作为生物标志物被广泛用来评价细胞氧化损伤的严重水平,MDA的升高可以直接说明机体遭受了过度的氧化应激损伤。当细胞受到外界应激时,可以产生一类抗氧化酶类物质即超氧化物歧化酶(SOD),能够清除细胞内的ROS类物质,在维持细胞氧化与抗氧化平衡中起着重要的作用。细胞内SOD的高低可以间接说明细胞遭受的氧化应激程度。

[0043] 在本发明中,术语“有效量”是指可对人和/或动物产生功能或活性的且可被人或/或动物所接受的量。药物的有效量可随给药的模式和待治疗的疾病的严重程度等而变化。优选的有效量的选择可以由本领域普通技术人员根据各种因素来确定(例如通过临床试验)。所述的因素包括但不限于:所述药物的药代动力学参数例如生物利用率、代谢、半衰期等;患者所要治疗的疾病的严重程度、患者的体重、患者的免疫状况、给药的途径等。

[0044] 本发明的药物组合物还可以以单独的组合物或与主要的活性成分不同的剂量形式单独给予其它治疗性化合物。主要成分的部分剂量可以与其它治疗性化合物同时给药,而其它剂量可以单独给药。在治疗过程中,可以根据症状的严重程度、复发的频率和治疗方案的生理应答,调整本发明药物组合物的剂量。

[0045] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明,仅用于解释本发明,而不能理解为对本

发明的限制。本领域的普通技术人员可以理解：在不脱离本发明的原理和宗旨的情况下可以对这些实施例进行多种变化、修改、替换和变型，本发明的范围由权利要求及其等同物限定。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件或按照厂商所建议的条件实施检测。

[0046] 实施例1 MTT法检测雌二醇 (E_2) 对 AB_{25-35} 对PC-12细胞活力的影响

[0047] 1、细胞培养

[0048] 大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞PC-12细胞系 (BIOSYNTHESIS BIOTECHNOLOGY CO., LTD), 以含10%FBS和1%P/S的DMEM培养基, 在37℃, 5%CO₂的培养箱中培养, 2-3天换液1次, 使用0.25%含EDTA的胰蛋白酶常规消化传代, 取处于对数生长期的细胞用于实验。

[0049] 2、分组

[0050] 1) E_2 安全浓度筛选分组:

[0051] 空白组: DMEM培养液培养24h后更换一次DMEM培养液, 继续培养24h;

[0052] E_2 组: DMEM培养液培养24h后, 更换成终浓度分别为10 μ mol/L、1 μ mol/L、10⁻¹ μ mol/L、10⁻² μ mol/L、10⁻³ μ mol/L、10⁻⁴ μ mol/L、10⁻⁵ μ mol/L的 E_2 溶液继续培养24h;

[0053] 2) E_2 有效浓度筛选分组:

[0054] 空白组: DMEM培养液培养24h后更换一次DMEM培养液, 继续培养26h;

[0055] 模型组: DMEM培养液培养24h, 更换DMEM培养液培养2h后给予 AB_{25-35} 溶液, 使其终浓度为20 μ mol/L, 继续培养24h;

[0056] E_2+AB_{25-35} 组: DMEM培养液培养24h, 更换成终浓度分别为1 μ mol/L、10⁻¹ μ mol/L、10⁻² μ mol/L、10⁻³ μ mol/L、10⁻⁴ μ mol/L、10⁻⁵ μ mol/L的 E_2 溶液培养2h, 给予 AB_{25-35} 溶液, 使其终浓度为20 μ mol/L, 继续培养24h

[0057] 3、MTT检测

[0058] 细胞培养至对数期, 以2500/孔的量将细胞悬液种植至96孔板, 200 μ l/孔, 用PBS将周边36孔封闭, 每组设6个重复组, 依据不同分组情况处理后, 加入的MTT (5mg/ml) 20 μ l/孔, 孵育4h, 移除上清, 加入DMSO 150 μ l/孔摇晃10min, 570nm下用酶标仪检测吸光度 (OD)。

[0059] 细胞增殖率 (%) = $OD_{\text{给药组}} / OD_{\text{空白组}} \times 100\%$

[0060] 4、统计学处理

[0061] 结果用SPSS18.0软件处理, 以 $\bar{x} \pm SD$ 表示, 多组间比较使用单因素方差处理, 两样本比较采用LSD检验, $P < 0.05$ 为差异显著。

[0062] 5、实验结果

[0063] 1) E_2 安全浓度的筛选结果如表1所示, 与空白组相比, 10 μ mol/L的 E_2 组细胞增殖率明显降低 ($P < 0.01$), 1、10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴和10⁻⁵ μ mol/L的 E_2 组细胞的增殖率无明显变化。可知, E_2 的安全浓度范围为1、10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴和10⁻⁵ μ mol/L, 可用于后续 E_2 有效浓度的筛选。

[0064] 表1 E_2 对正常PC12细胞增殖率的影响 ($\bar{x} \pm SD$, n=6)

组别	浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	各组吸光度值 (OD)	细胞增殖率/%	
[0065]	空白组	-	0.685 \pm 0.016	100
		10	0.595 \pm 0.009**	87**
		1	0.672 \pm 0.012	98
		10^{-1}	0.674 \pm 0.019	98
	E ₂ 组	10^{-2}	0.674 \pm 0.014	98
		10^{-3}	0.676 \pm 0.011	99
		10^{-4}	0.678 \pm 0.007	99
	10^{-5}	0.680 \pm 0.010	99	

[0066] 注:与空白组相比,**为 $P < 0.01$

[0067] 2) E₂有效浓度的筛选的结果如表2所示,与空白组相比,模型组细胞增殖率明显降低($P < 0.01$);与模型组相比, 1 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 和 10^{-5} $\mu\text{mol/L}$ 的E₂组细胞增殖率明显升高($P < 0.01$, $P < 0.05$),其中, 10^{-3} $\mu\text{mol/L}$ 的E₂组细胞增殖率最高,因此选用E₂的 10^{-3} $\mu\text{mol/L}$ 浓度为最佳有效浓度,用于后续实验研究。

[0068] 表2 E₂对A β_{25-35} 损伤PC12细胞增殖率的影响($\bar{x} \pm \text{SD}$, $n=6$)

组别	浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	各组吸光度值 (OD)	细胞增殖率/%	
空白组	-	0.646 \pm 0.011	100	
模型组	0	0.536 \pm 0.019**	83**	
	1	0.548 \pm 0.020 [#]	85 [#]	
[0069]	10^{-1}	0.579 \pm 0.011 ^{##}	90 ^{##}	
	10^{-2}	0.598 \pm 0.011 ^{##}	93 ^{##}	
	E ₂ +A β_{25-35} 组	10^{-3}	0.642 \pm 0.012 ^{##}	99 ^{##}
		10^{-4}	0.636 \pm 0.011 ^{##}	98 ^{##}
		10^{-5}	0.632 \pm 0.015 ^{##}	98 ^{##}

[0070] 注:与空白组相比,**为 $P < 0.01$,与模型组相比,^{##}为 $P < 0.01$,[#]为 $P < 0.05$ 。

[0071] 实施例2 MTT法检测金鱼草素-6-新橙皮糖苷对A β_{25-35} 对PC-12细胞活力的影响

[0072] 1、细胞培养 步骤同实施例1

[0073] 2、分组

[0074] 1) 金鱼草素-6-新橙皮糖苷安全浓度筛选分组:

[0075] 空白组:同实施例1;

[0076] 金鱼草素-6-新橙皮糖苷组:DMEM培养液培养24h后,更换成终浓度分别为 $4 \times 10^2 \mu\text{mol/L}$ 、 $40 \mu\text{mol/L}$ 、 $4 \mu\text{mol/L}$ 、 $4 \times 10^{-1} \mu\text{mol/L}$ 、 $4 \times 10^{-2} \mu\text{mol/L}$ 、 $4 \times 10^{-3} \mu\text{mol/L}$ 、 $4 \times 10^{-4} \mu\text{mol/L}$ 、 $4 \times 10^{-5} \mu\text{mol/L}$ 的金鱼草素-6-新橙皮糖苷溶液继续培养24h;

[0077] 2) 金鱼草素-6-新橙皮糖苷有效浓度筛选分组:

[0078] 空白组、模型组 具体同实施例1

[0079] 金鱼草素-6-新橙皮糖苷+ $A\beta_{25-35}$ 组:DMEM培养液培养24h,更换成终浓度分别为 $4 \times 10^{-1} \mu\text{mol/L}$ 、 $4 \times 10^{-2} \mu\text{mol/L}$ 、 $4 \times 10^{-3} \mu\text{mol/L}$ 、 $4 \times 10^{-4} \mu\text{mol/L}$ 、 $4 \times 10^{-5} \mu\text{mol/L}$ 的金鱼草素-6-新橙皮糖苷溶液培养2h后给予 $A\beta_{25-35}$ 溶液,使其终浓度为 $20 \mu\text{mol/L}$,继续培养24h;

[0080] 3、MTT检测 步骤同实施例1

[0081] 4、统计学处理

[0082] 结果用SPSS18.0软件处理,以 $\bar{x} \pm \text{SD}$ 表示,多组间比较使用单因素方差处理,两样本比较采用LSD检验, $P < 0.05$ 为差异显著。

[0083] 5、结果

[0084] 1) 金鱼草素-6-新橙皮糖苷安全浓度的筛选结果如表3所示,与空白组相比, $4 \times 10^2 \mu\text{mol/L}$ 的金鱼草素-6-新橙皮糖苷组细胞增殖率明显降低($P < 0.01$), $40 \mu\text{mol/L}$ 和 $4 \mu\text{mol/L}$ 金鱼草素-6-新橙皮糖苷组细胞的增殖率明显升高($P < 0.01$), $4 \times 10^{-1} \mu\text{mol/L}$ 、 $4 \times 10^{-2} \mu\text{mol/L}$ 、 $4 \times 10^{-3} \mu\text{mol/L}$ 、 $4 \times 10^{-4} \mu\text{mol/L}$ 和 $4 \times 10^{-5} \mu\text{mol/L}$ 的金鱼草素-6-新橙皮糖苷组细胞增殖率无明显变化。可知 $4 \times 10^{-1} \mu\text{mol/L}$ 、 $4 \times 10^{-2} \mu\text{mol/L}$ 、 $4 \times 10^{-3} \mu\text{mol/L}$ 、 $4 \times 10^{-4} \mu\text{mol/L}$ 和 $4 \times 10^{-5} \mu\text{mol/L}$ 的金鱼草素-6-新橙皮糖苷对细胞增殖无明显影响。故金鱼草素-6-新橙皮糖苷的安全浓度范围为 $4 \times 10^{-1} \mu\text{mol/L}$ 、 $4 \times 10^{-2} \mu\text{mol/L}$ 、 $4 \times 10^{-3} \mu\text{mol/L}$ 、 $4 \times 10^{-4} \mu\text{mol/L}$ 和 $4 \times 10^{-5} \mu\text{mol/L}$,可用于后续金鱼草素-6-新橙皮糖苷有效浓度的筛选。

[0085] 表3 金鱼草素-6-新橙皮糖苷对正常PC12细胞增殖率的影响($\bar{x} \pm \text{SD}$, $n=6$)

组别	浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	各组吸光度值 (OD)	细胞增殖率/%
空白组	-	0.459 ± 0.015	100
	4×10^2	$0.312 \pm 0.023^{**}$	68^{**}
[0086] 金鱼草素-6-新橙皮糖苷组	40	$0.553 \pm 0.032^{**}$	120^{**}
	4	$0.562 \pm 0.024^{**}$	122^{**}
	4×10^{-1}	0.489 ± 0.029	107
	4×10^{-2}	0.491 ± 0.022	107
	4×10^{-3}	0.492 ± 0.031	107
	4×10^{-4}	0.488 ± 0.024	106
[0087]	4×10^{-5}	0.482 ± 0.034	105

[0088] 注:与空白组相比,**为 $P < 0.01$

[0089] 2) 金鱼草素-6-新橙皮糖苷有效浓度的筛选结果如表4所示,与空白组相比,模型组细胞增殖率明显降低($P < 0.01$);与模型组相比, $4 \times 10^{-1} \mu\text{mol/L}$ 的金鱼草素-6-新橙皮糖苷组细胞的增殖率明显升高($P < 0.01$), $4 \times 10^{-2} \mu\text{mol/L}$ 、 $4 \times 10^{-3} \mu\text{mol/L}$ 、 $4 \times 10^{-4} \mu\text{mol/L}$ 和 $4 \times 10^{-5} \mu\text{mol/L}$ 的金鱼草素-6-新橙皮糖苷组细胞增殖率无明显变化。可知金鱼草素-6-新橙皮糖苷的有效浓度为 $4 \times 10^{-1} \mu\text{mol/L}$,可用于后续实验研究。

[0090] 表4 金鱼草素-6-新橙皮糖苷对 $A\beta_{25-35}$ 损伤PC-12细胞活性的影响($\bar{x} \pm \text{SD}$, $n=6$)

组别	浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	各组吸光度值 (OD)	细胞增殖率/%
空白组	-	0.561 \pm 0.012	100
模型组	0	0.474 \pm 0.016**	84**
[0091] 金鱼草素-6-新橙皮糖苷+ $\text{A}\beta_{25-35}$ 组	4×10^{-1}	0.542 \pm 0.00 ^{##}	97 ^{##}
	4×10^{-2}	0.482 \pm 0.014	86
	4×10^{-3}	0.480 \pm 0.008	86
	4×10^{-4}	0.474 \pm 0.012	84
	4×10^{-5}	0.471 \pm 0.018	84

[0092] 注:与空白组相比,**为 $P<0.01$,与模型组相比,^{##}为 $P<0.01$ 。

[0093] 实施例3金鱼草素-6-新橙皮糖苷对 $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导的PC12细胞损伤保护作用的研究

[0094] 1、细胞培养 步骤同实施例1

[0095] 2、分组

[0096] 空白组、模型组 具体同实施例1

[0097] $\text{E}_2+\text{A}\beta_{25-35}$ 组:DMEM培养液培养24h,更换成终浓度 $10^{-3}\mu\text{mol/L}$ 的 E_2 溶液培养2h,给予 $\text{A}\beta_{25-35}$ 溶液,使其终浓度为 $20\mu\text{mol/L}$,继续培养24h;

[0098] 金鱼草素-6-新橙皮糖苷+ $\text{A}\beta_{25-35}$ 组:DMEM培养液培养24h,更换成终浓度为 $4\times 10^{-1}\mu\text{mol/L}$ 的金鱼草素-6-新橙皮糖苷溶液培养2h,给予 $\text{A}\beta_{25-35}$ 溶液,使其终浓度为 $20\mu\text{mol/L}$,继续培养24h。

[0099] 3、MTT检测 具体步骤同实施例1

[0100] 4、统计学处理

[0101] 结果用SPSS18.0软件处理,以 $\bar{x}\pm\text{SD}$ 表示,多组间比较使用单因素方差处理,两样本比较采用LSD检验, $P<0.05$ 为差异显著。

[0102] 5、结果

[0103] 结果如表5所示,与空白组相比,模型组细胞增殖率明显降低($P<0.01$);与模型组相比,金鱼草素-6-新橙皮糖苷+ $\text{A}\beta_{25-35}$ 组细胞增殖率明显升高($P<0.01$)。可知金鱼草素-6-新橙皮糖苷对 $\text{A}\beta_{25-35}$ 引发的PC12细胞活力损伤起保护功能,作用与 E_2 相似。

[0104] 表5 $\text{A}\beta_{25-35}$ 损伤PC-12细胞活性情况($\bar{x}\pm\text{SD}$, $n=6$)

组别	各组吸光度值 (OD)	细胞增殖率/%
空白组	0.644 \pm 0.007	100
模型组	0.553 \pm 0.006**	86**
[0105] $\text{E}_2+\text{A}\beta_{25-35}$ 组	0.638 \pm 0.008 ^{##}	99 ^{##}
金鱼草素-6-新橙皮糖苷+ $\text{A}\beta_{25-35}$ 组	0.634 \pm 0.004 ^{##}	98 ^{##}

[0106] 注:与空白组相比,**为 $P<0.01$,与模型组相比,^{##}为 $P<0.01$ 。

[0107] 实施例4金鱼草素-6-新橙皮糖苷对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的PC12细胞损凋亡的影响

[0108] 1、细胞培养 具体步骤同实施例1

[0109] 2、分组同实施例3

[0110] 3、流式细胞仪检测细胞的凋亡率

[0111] 细胞培养至对数期,以 4×10^5 /孔的量将细胞悬液种植至6孔板,2ml/孔,细胞按不同分组情况培养后,将上清液吸至一15ml离心管,PBS洗涤6孔板中的细胞一次,加入0.25%胰蛋白酶,然后用吸出的上清液停止消化,离心后对细胞进行收集,添加1ml PBS重悬细胞并计数,取含约 10^5 个细胞的重悬液,离心(1000rpm,5min)后移除上清,按照凋亡试剂盒操作,进行流式细胞仪检测。

[0112] 4、统计学处理

[0113] 结果用SPSS18.0软件处理,以 $\bar{x} \pm SD$ 表示,多组间比较使用单因素方差处理,两样本比较采用LSD检验, $P < 0.05$ 为差异显著。

[0114] 5、结果

[0115] 结果如表6所示,与空白组相比,模型组细胞凋亡率明显升高($P < 0.01$);与模型组相比,金鱼草素-6-新橙皮糖苷+ $A\beta_{25-35}$ 组细胞凋亡率明显降低($P < 0.01$)。这表明金鱼草素-6-新橙皮糖苷可以抑制 $A\beta_{25-35}$ 引发的细胞凋亡,作用与 E_2 相似。

[0116] 表6 $A\beta_{25-35}$ 损伤PC-12细胞的凋亡率($\bar{x} \pm SD, n=6$)

组别	细胞凋亡率/%
空白组	8.56±0.55
模型组	31.22±1.13**
E_2 + $A\beta_{25-35}$ 组	10.11±0.59 ^{###}
金鱼草素-6-新橙皮糖苷 + $A\beta_{25-35}$ 组	11.29±0.37 ^{###}

[0118] 注:与空白组相比,**为 $P < 0.01$,与模型组相比,^{###}为 $P < 0.01$ 。

[0119] 实施例5金鱼草素-6-新橙皮糖苷对 $A\beta_{25-35}$ 损伤PC12细胞中ROS、MDA及SOD含量变化的影响

[0120] 1、细胞培养 具体步骤同实施例1

[0121] 2、分组 同实施例3

[0122] 3、T-SOD的测定

[0123] 细胞培养至对数期,以 4×10^5 /孔的量将细胞悬液种植至6孔板,2ml/孔,细胞按不同分组情况培养后收集至15ml离心管中,将RIPA裂解液(含1%PMSF)添加到各离心管中,静置3min后将所有液体移至1.5ml离心管中,静置30min然后离心(4℃,12000rpm,5min),离心后取上清于一个1.5ml离心管中,应用BCA试剂盒进行蛋白定量。按照总超氧化物歧化酶测试盒说明书步骤,应用半自动生化分析仪,在波长550nm处,测定各组OD值。应用下列公式计算各组细胞中总SOD值:

$$[0124] \quad \text{总SOD活力} \quad (U/mgprot) = \frac{\text{对照OD值} - \text{测定OD值}}{\text{对照OD值}} \div 50\% \times \frac{\text{反应液总体积} (ml)}{\text{取样量} (ml)} \div \frac{\text{待测样本蛋白浓度} (mgprot/ml)}$$

[0125] 4、MDA的测定

[0126] 蛋白提取及定量同T-SOD的测定。按照丙二醛测试盒说明书步骤,应用半自动生化分析仪,在波长532nm处,测定各组OD值。应用下列公式计算各组细胞中MDA含量:

$$[0127] \quad \text{细胞中MDA含量} \quad (\text{nmol/mgprot}) = \frac{\text{测定OD值} - \text{对照OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \frac{\text{标准品浓度}}{10\text{nmol/ml}} \div \text{待测样本蛋白浓度}$$

[0128] 5、ROS测定

[0129] 细胞培养至对数期,以 4×10^5 /孔的量将细胞悬液种植至6孔板,2ml/孔,细胞按不同分组情况培养后,移除培养液,加入 $10 \mu\text{mol/L}$ 的DCFH-DA 1ml/孔,将6孔板放在培养箱内静置20min,每5min将孔板中的各孔混一次,使细胞充分接触探针。孵育结束,用无血清培养液洗涤细胞三次,收集细胞,加入1ml无血清培养液,上流式细胞仪检测。

[0130] 6、统计学处理

[0131] 结果用SPSS18.0软件处理,以 $\bar{x} \pm \text{SD}$ 表示,多组间比较使用单因素方差处理,两样本比较采用LSD检验, $P < 0.05$ 为差异显著。

[0132] 7、结果

[0133] 结果如表7所示,与空白组相比,模型组细胞中ROS及MDA的含量明显升高,SOD活性明显降低($P < 0.01$);与模型组相比,金鱼草素-6-新橙皮糖苷+ $\text{A}\beta_{25-35}$ 组细胞中ROS及MDA的含量明显降低,SOD活性明显升高($P < 0.01$)。说明金鱼草素-6-新橙皮糖苷能保护 $\text{A}\beta_{25-35}$ 引发的PC12细胞氧化损伤,其作用与 E_2 相似。

[0134] 表7 $\text{A}\beta_{25-35}$ 损伤PC12细胞中ROS、MDA及SOD含量的表达($\bar{x} \pm \text{SD}$, $n=6$)

组别	Relative ROS content (%of control)	MDA (nmol/mgprot)	SOD (U/mgprot)
空白组	100±2.134	1.234±0.011	67.123±3.124
模型组	154.948±6.188**	3.384±0.175**	45.098±3.203**
$\text{E}_2 + \text{A}\beta_{25-35}$ 组	106.409±5.668 ^{##}	2.177±0.182 ^{##}	71.293±3.103 ^{##}
金鱼草素-6-新橙皮糖 苷+ $\text{A}\beta_{25-35}$ 组	109.718±3.550 ^{##}	2.153±0.172 ^{##}	62.288±5.209 ^{##}

[0136] 注:与空白组组比,**为 $P < 0.01$;与模型组比,^{##}为 $P < 0.01$ 。

[0137] 实施例6 金鱼草素-6-新橙皮糖苷对 $\text{A}\beta_{25-35}$ 损伤PC12细胞中p-Tau蛋白表达的影响

[0138] 1、细胞培养 具体步骤同实施例1

[0139] 2、分组 具体分组同实施例3

[0140] 3、Western Blot检测蛋白的含量

[0141] 1) 细胞总蛋白的提取

[0142] 将各组细胞收集至15ml离心管中, 4°C 预冷的PBS洗涤两次,按每培养瓶 $300 \mu\text{l}$ 的量添加RIPA裂解液(含1%PMSF),静置3min后将液体移至1.5ml离心管中,静置30min然后离心(4°C , 12000rpm, 5min),将上清吸出至另一个新1.5ml离心管中;

[0143] 2) 蛋白变性

[0144] 将蛋白样品与 $5 \times \text{SDS}$ 上样缓冲液以4:1比例混合,沸水加热7min,使蛋白充分变

性;

[0145] 3) SDS-PAGE电泳

[0146] 配置10%分离胶和5%浓缩胶,加入变性后的蛋白样品60 μ g进行电泳,电泳条件:浓缩胶80V,分离胶100V;

[0147] 4) 转膜

[0148] 准备PVDF膜及两张一样的滤纸,膜依次放置在甲醇、去离子水、转膜缓冲液中浸泡,按照由下往上依次为滤纸、PVDF膜、凝胶、滤纸的顺序铺平,玻璃板赶走气泡,置于半干转印仪上,10V,30min;

[0149] 5) 封闭

[0150] 将PVDF膜取出后,放在配制好的封闭液中室温条件下孵育2h;

[0151] 6) 抗体孵育

[0152] 将PVDF膜取出之后放至于杂交袋,留出一个缺口添加约1ml一抗稀释液使膜正面充分与之接触,密封后4 $^{\circ}$ C过夜;倾去一抗稀释液,TBST洗涤三次,5min/次;取出PVDF膜,置于杂交袋,将大概1ml配制好的二抗稀释液添加到袋中,密封后室温放置1h;

[0153] 7) 洗膜

[0154] 倾去二抗稀释液,TBST洗涤三次,5min/次;

[0155] 8) 化学发光

[0156] ECL发光液A液和B液按照相同量混合均匀,滴至PVDF膜上,使其均匀覆盖,于暗室中曝光并显影,分析结果

[0157] 4、统计学处理

[0158] 结果用SPSS18.0软件处理,以 $\bar{x} \pm SD$ 表示,多组间比较使用单因素方差处理,两样本比较采用LSD检验, $P < 0.05$ 为差异显著。

[0159] 5、结果

[0160] 结果如表8所示,与空白组相比,模型组细胞内Tau蛋白磷酸化水平明显提高($P < 0.01$),与模型组相比,金鱼草素-6-新橙皮糖苷+ $A\beta_{25-35}$ 组Tau蛋白磷酸化水平明显下降($P < 0.01$),作用与 E_2 相似。提示金鱼草素-6-新橙皮糖苷可以通过抑制Tau蛋白磷酸化水平抑制 $A\beta$ 毒性,发挥细胞保护作用。

[0161] 表8 $A\beta_{25-35}$ 损伤PC12细胞中p-Tau蛋白的表达($\bar{x} \pm SD, n=6$)

	组别	浓度 (μ mol/L)	p-Tau/t-Tau
[0162]	空白组	-	0.412 \pm 0.098
	模型组	0	1.066 \pm 0.055**
	E_2 + $A\beta_{25-35}$ 组	10^{-3}	0.429 \pm 0.061 ^{##}
[0163]	金鱼草素-6-新橙皮糖苷 + $A\beta_{25-35}$ 组	4×10^{-1}	0.428 \pm 0.069 ^{##}

[0164] 注:空白组比较,**为 $P < 0.01$,模型组比较,^{##}为 $P < 0.01$ 。

[0165] 实施例7 ER信号通路在金鱼草素-6-新橙皮糖苷保护 $A\beta_{25-35}$ 诱导PC12细胞损伤中

的作用

[0166] 为了研究金鱼草素-6-新橙皮糖苷对PC12细胞及细胞中蛋白的影响,应用ER拮抗剂ICI182,780进行干预,观察金鱼草素-6-新橙皮糖苷处理后细胞及细胞中蛋白分子的变化。

[0167] 1、细胞培养 具体步骤同实施例1

[0168] 2、分组:

[0169] 空白组(1)、模型组(2)、E2+ AB_{25-35} 组(3)、金鱼草素-6-新橙皮糖苷+ AB_{25-35} 组(4)同实施例3;

[0170] E2+ AB_{25-35} +ICI182,780组(5):DMEM培养液培养24h,更换成终浓度 $1\mu\text{mol/L}$ 的ICI182,780培养1h,更换成终浓度 $10^{-3}\mu\text{mol/L}$ 的 E_2 溶液培养2h,给予 AB_{25-35} 溶液,使其终浓度为 $20\mu\text{mol/L}$,继续培养24h;

[0171] 金鱼草素-6-新橙皮糖苷+ AB_{25-35} +ICI182,780组(6):DMEM培养液培养24h,更换成终浓度 $1\mu\text{mol/L}$ 的ICI182,780培养1h,更换成终浓度 $4\times 10^{-1}\mu\text{mol/L}$ 的金鱼草素-6-新橙皮糖苷溶液培养2h,给予 AB_{25-35} 溶液,使其终浓度为 $20\mu\text{mol/L}$,继续培养24h

[0172] 3、流式细胞仪检测细胞的凋亡率 具体步骤同实施例4

[0173] 4、Western blot法检测ER β 、p-Akt、t-Akt、p-GSK-3 β 、t-GSK-3 β 、p-Tau、t-Tau及caspase-3蛋白的表达 具体步骤同实施例6

[0174] 5、统计学处理

[0175] 结果用SPSS18.0软件处理,以 $\bar{x}\pm\text{SD}$ 表示,多组间比较使用单因素方差处理,两样本比较采用LSD检验, $P<0.05$ 为差异显著。

[0176] 6、结果

[0177] 1)细胞凋亡率结果如表9所示,与空白组相比,模型组细胞凋亡率明显升高($P<0.01$);与模型组相比,金鱼草素-6-新橙皮糖苷+ AB_{25-35} 组细胞凋亡率明显升高($P<0.01$);与金鱼草素-6-新橙皮糖苷+ AB_{25-35} 组相比,金鱼草素-6-新橙皮糖苷+ AB_{25-35} +ICI182,780组细胞凋亡率明显升高($P<0.01$),金鱼草素-6-新橙皮糖苷抑制细胞凋亡的作用被阻断。金鱼草素-6-新橙皮糖苷的作用与 E_2 相似。这些数据表明ER信号通路参与了金鱼草素-6-新橙皮糖苷对 AB_{25-35} 诱导的PC12细胞凋亡的保护作用。

[0178] 表9 AB_{25-35} 损伤PC12细胞的凋亡率($\bar{x}\pm\text{SD}$, $n=3$)

	组别	细胞凋亡率/%
	1	4.228±0.54
	2	34.798±1.65**
[0179]	3	11.358±0.76 ^{##}
	4	15.278±1.22 ^{##}
	5	24.988±1.44 ⁺⁺
	6	23.618±0.79 ⁺⁺

[0180] 注:与空白组组比,**为 $P<0.01$;与模型组比^{##}为 $P<0.01$;与给药组比,⁺⁺为 $P<0.01$

[0181] 2) 细胞中蛋白的表达情况结果如表10所示,与空白组相比,模型组细胞内ERβ、p-Akt/t-Akt以及p-GSK-3β/t-GSK-3β的表达明显降低($P<0.01$),p-Tau/t-Tau及caspase-3的含量明显升高($P<0.01$);与模型组相比,金鱼草素-6-新橙皮糖苷+AB₂₅₋₃₅组细胞内ERβ、p-Akt/t-Akt以及p-GSK-3β/t-GSK-3β的表达明显升高($P<0.01$),p-Tau/t-Tau及caspase-3的表达明显降低($P<0.01$);与金鱼草素-6-新橙皮糖苷+AB₂₅₋₃₅组相比,金鱼草素-6-新橙皮糖苷+AB₂₅₋₃₅+ICI182,780组细胞内ERβ、p-Akt/t-Akt以及p-GSK-3β/t-GSK-3β的表达明显降低($P<0.01$),p-Tau/t-Tau及caspase-3的含量明显升高($P<0.01$)。金鱼草素-6-新橙皮糖苷的作用效果与E₂相似。ER拮抗剂的存在,减弱了金鱼草素-6-新橙皮糖苷对AB₂₅₋₃₅的抑制作用。表明金鱼草素-6-新橙皮糖苷可以通过激活ER途径活化Akt,激活GSK-3β从而降低Tau蛋白的过磷酸化水平、抑制细胞凋亡,对AB₂₅₋₃₅诱导的PC12细胞损伤发挥保护作用。

[0182] 表10 PC-12细胞中ERβ、p-Akt/t-Akt、p-GSK-3β/t-GSK-3β、p-Tau/t-Tau及caspase-3蛋白($\bar{x} \pm SD, n=3$)

组别	ERβ/β-actin	p-Akt/t-Akt	p-GSK-3β/ t-GSK-3β	p-Tau/t-Tau	caspase-3/β-actin
1	1.240±0.065	1.953±0.058	1.224±0.072	0.551±0.039	0.580±0.044
[0183] 2	0.873±0.081**	1.501±0.067**	0.694±0.065**	0.889±0.039**	0.824±0.046**
3	1.116±0.071 [#]	1.905±0.072 [#]	1.195±0.081 [#]	0.714±0.034 [#]	0.603±0.060 [#]
4	1.139±0.096 [#]	1.859±0.065 [#]	1.267±0.072 [#]	0.569±0.046 [#]	0.587±0.057 [#]
5	0.931±0.043 ⁺⁺	1.422±0.086 ⁺⁺	0.703±0.075 ⁺⁺	0.839±0.045 ⁺⁺	0.773±0.056 ⁺⁺
6	0.933±0.099 ⁺⁺	1.394±0.076 ⁺	0.722±0.082 ⁺⁺	0.797±0.024 ⁺⁺	0.904±0.029 ⁺⁺

[0184] 注:与空白组组比,**为 $P<0.01$;与模型组比,[#]为 $P<0.01$;与给药组比,⁺⁺为 $P<0.01$

[0185] 实施例8 PI3K/AKT途径在金鱼草素-6-新橙皮糖苷保护AB₂₅₋₃₅诱导PC12细胞损伤中的作用

[0186] 为了研究金鱼草素-6-新橙皮糖苷对PC12细胞及细胞中蛋白的影响,应用PI3K阻断剂LY294002进行干预,观察金鱼草素-6-新橙皮糖苷处理后细胞及细胞中蛋白分子的变化。

[0187] 1、细胞培养 具体步骤同实施例1

[0188] 2、分组:

[0189] 空白组(1)、模型组(2)、E₂+AB₂₅₋₃₅组(3)、金鱼草素-6-新橙皮糖苷+AB₂₅₋₃₅组(4)同实施例3;

[0190] E₂+AB₂₅₋₃₅+LY294002组(5):DMEM培养液培养24h,更换成终浓度50μmol/L的LY294002培养1h,更换成终浓度10⁻³μmol/L的E₂溶液培养2h,给予AB₂₅₋₃₅溶液,使其终浓度为20μmol/L,继续培养24h;

[0191] 金鱼草素-6-新橙皮糖苷+AB₂₅₋₃₅+LY294002组(6):DMEM培养液培养24h,更换成终浓度50μmol/L的LY294002培养1h,更换成终浓度4×10⁻¹μmol/L的柚皮素溶液培养2h,给予AB₂₅₋₃₅溶液,使其终浓度为20μmol/L,继续培养24h;

[0192] 3、流式细胞仪检测细胞的凋亡率 具体步骤同实施例4

[0193] 4、Western blot法检测ERβ、p-Akt、t-Akt、p-GSK-3β、t-GSK-3β、p-Tau、t-Tau及

caspase-3蛋白的表达 具体步骤同实施例6

[0194] 5、统计学处理

[0195] 结果用SPSS18.0软件处理,以 $\bar{x} \pm SD$ 表示,多组间比较使用单因素方差处理,两样本比较采用LSD检验, $P < 0.05$ 为差异显著。

[0196] 6、结果

[0197] 1) 细胞凋亡率结果如表11所示,与空白组相比,模型组细胞凋亡率明显升高($P < 0.01$);与模型组相比,金鱼草素-6-新橙皮糖苷+ $A\beta_{25-35}$ 组细胞凋亡率明显升高($P < 0.01$);与金鱼草素-6-新橙皮糖苷+ $A\beta_{25-35}$ 组相比,金鱼草素-6-新橙皮糖苷+ $A\beta_{25-35}$ +LY294002组细胞凋亡率明显升高($P < 0.01$),金鱼草素-6-新橙皮糖苷抑制细胞凋亡的作用被阻断。金鱼草素-6-新橙皮糖苷的作用与 E_2 相似。这些数据表明PI3K/Akt通路参与了金鱼草素-6-新橙皮糖苷对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的PC12细胞凋亡的保护作用。

[0198] 表11 $A\beta_{25-35}$ 损伤PC12细胞的凋亡率($\bar{x} \pm SD, n=3$)

组别	细胞凋亡率/%
1	5.448±1.03
2	36.658±1.74**
[0199] 3	8.828±1.52 ^{##}
4	11.688±0.81 ^{##}
5	26.278±1.64 ⁺⁺
6	29.308±1.10 ⁺⁺

[0200] 注:与空白组组比,**为 $P < 0.01$;与模型组比,^{##}为 $P < 0.01$;与给药组比,⁺⁺为 $P < 0.01$ 。

[0201] 2) 细胞中蛋白的表达情况结果如表12所示,与空白组相比,模型组细胞内p-Akt/t-Akt以及p-GSK-3 β /t-GSK-3 β 的表达明显降低($P < 0.01$),p-Tau/t-Tau及caspase-3的含量明显升高($P < 0.01$);与模型组相比,金鱼草素-6-新橙皮糖苷+ $A\beta_{25-35}$ 组细胞内p-Akt/t-Akt以及p-GSK-3 β /t-GSK-3 β 的表达明显升高($P < 0.01$),p-Tau/t-Tau及caspase-3的表达明显降低($P < 0.01$);与金鱼草素-6-新橙皮糖苷+ $A\beta_{25-35}$ 组相比,金鱼草素-6-新橙皮糖苷+ $A\beta_{25-35}$ +LY294002组细胞内p-Akt/t-Akt以及p-GSK-3 β /t-GSK-3 β 的表达明显降低($P < 0.01$),p-Tau/t-Tau及caspase-3的含量明显升高($P < 0.01$)。金鱼草素-6-新橙皮糖苷的作用效果与 E_2 相似。PI3K阻断剂的存在,减弱了金鱼草素-6-新橙皮糖苷对 $A\beta_{25-35}$ 的抑制作用,提示PI3K/Akt途径参与了金鱼草素-6-新橙皮糖苷的神经保护功能。

[0202] 表12 PC-12细胞中p-Akt/t-Akt、p-GSK-3 β /t-GSK-3 β 、p-Tau/t-Tau及caspase-3蛋白($\bar{x} \pm SD, n=3$)

组别	p-Akt/t-Akt	p-GSK-3 β /t-GSK-3 β	p-Tau/t-Tau	caspase-3/ β -actin
1	1.202 \pm 0.022	1.269 \pm 0.077	0.5 \pm 0.072	0.512 \pm 0.059
2	0.649 \pm 0.084**	0.788 \pm 0.098**	0.854 \pm 0.110**	0.781 \pm 0.049**
[0203] 3	1.093 \pm 0.039 ^{##}	1.369 \pm 0.088 ^{##}	0.536 \pm 0.077 ^{##}	0.624 \pm 0.048 ^{##}
4	1.022 \pm 0.064 ^{##}	1.260 \pm 0.093 ^{##}	0.524 \pm 0.106 ^{##}	0.568 \pm 0.056 ^{##}
5	0.667 \pm 0.097 ⁺⁺	0.853 \pm 0.109 ⁺⁺	0.83 \pm 0.084 ⁺⁺	0.764 \pm 0.035 ⁺⁺
6	0.652 \pm 0.094 ⁺⁺	0.874 \pm 0.094 ⁺⁺	0.794 \pm 0.069 ⁺⁺	0.705 \pm 0.023 ⁺⁺

[0204] 注:与空白组组比,**为P<0.01;与模型组比,^{##}为P<0.01;与给药组比,⁺⁺为P<0.01

[0205] 实施例9联合用药对A β_{25-35} 诱导的PC12细胞损伤保护作用的研究

[0206] 为评估不同的植物雌激素联合对A β_{25-35} 诱导的PC12细胞损伤保护的作用,发明人采用棋盘法进行实验。

[0207] 1、细胞分组及培养

[0208] 细胞分组及培养同实施例1,联合用药组加入两种不同倍比稀释的被测药物培养2h后,给予A β_{25-35} 溶液,使其终浓度为20 μ mol/L,继续培养24h。

[0209] 2、MTT检测具体步骤同实施例1

[0210] 3、数据统计

[0211] 实验结果用MacSynergyII软件分析。

[0212] 4、结果

[0213] 金鱼草素-6-新橙皮糖苷、木犀草素-7-0- β -D新橙皮苷、山奈酚、新北美圣草苷、北美圣草素、柚皮苷、柚皮素、柚皮素-7-0- β -D-葡萄糖苷、木犀草素、木犀草素-7-0- β -D-葡萄糖苷和圣草酚进行不同组合,在保护A β_{25-35} 诱导的PC12细胞损伤中产生协同、叠加等不同的效果,结果如表13所示,金鱼草素-6-新橙皮糖苷和木犀草素-7-0- β -D新橙皮苷以及圣草酚产生强协同效应。

[0214] 表13 联合用药对A β_{25-35} 诱导的PC12细胞损伤保护作用

药物组合		MacSynergy II 分析 协同/拮抗 ($\mu\text{M}^2\%$)	作用效果
[0215]	金鱼草素-6-新橙皮糖苷 木犀草素-7-O- β -D 新橙皮苷	23.17/0	叠加
	金鱼草素-6-新橙皮糖苷 山奈酚	275.43/0	强协同
	金鱼草素-6-新橙皮糖苷 柚皮苷	22.67/0	叠加
	金鱼草素-6-新橙皮糖苷 木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖苷	20.21/0	叠加
	金鱼草素-6-新橙皮糖苷 柚皮素	169.31/0	强协同
	金鱼草素-6-新橙皮糖苷 柚皮素-7-O- β -D-葡萄糖苷	11.17/0	叠加
	金鱼草素-6-新橙皮糖苷 新北美圣草苷	331.67/0	强协同
	金鱼草素-6-新橙皮糖苷 木犀草素	88.33/0	中度协同
	金鱼草素-6-新橙皮糖苷 圣草酚	67.41/-3.45	中度协同
	金鱼草素-6-新橙皮糖苷 北美圣草素	34.45/0	弱协同

[0216] 上述实施例的说明只是用于理解本发明的方法及其核心思想。应当指出,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以对本发明进行若干改进和修饰,这些改进和修饰也将落入本发明权利要求的保护范围内。