

# 阿立哌唑对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的神经 PC12 细胞损伤的影响及机制

杨淑珍\*, 赵晶媛#(新乡医学院第二附属医院精神七科, 河南新乡 453002)

中图分类号 R361<sup>†</sup>.3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)01-0053-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.01.14

**摘要** 目的:研究阿立哌唑对  $A\beta_{25-35}$  诱导的神经 PC12 细胞损伤的影响及其机制。方法:将 PC12 细胞随机分为正常对照组、模型组(20  $\mu\text{mol/L}$   $A\beta_{25-35}$ )和阿立哌唑低、中、高浓度组(5、10、20  $\mu\text{mol/L}$  阿立哌唑+20  $\mu\text{mol/L}$   $A\beta_{25-35}$ ),加入含相应药物的培养基培养 48 h,每组 6 个复孔。MTT 法检测细胞活力(光密度值),Hoechst 染色法检测细胞凋亡情况,分光光度法检测细胞中天冬氨酸特异性蛋白酶 3(Caspase-3)、Caspase-9 活性,Western blot 法检测细胞中 B 淋巴细胞瘤 2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)蛋白表达及蛋白激酶 B(Akt)磷酸化水平。结果:与正常对照组比较,模型组细胞光密度值降低,凋亡率增加,Caspase-3、Caspase-9 活性和 Bax 蛋白表达均增强,Bcl-2、PI3K 蛋白表达和 Akt 磷酸化水平均降低( $P < 0.01$ )。与模型组比较,阿立哌唑低、中、高浓度组细胞光密度值增加,凋亡率减少,Caspase-3、Caspase-9 活性减弱,Bcl-2、PI3K 蛋白表达和 Akt 磷酸化水平均增加;阿立哌唑中、高浓度组细胞 Bax 蛋白表达减弱( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。结论:阿立哌唑可明显抑制  $A\beta_{25-35}$  诱导的 PC12 细胞凋亡,其作用可能与激活 PI3K/Akt 信号通路有关。

**关键词** 阿立哌唑; $A\beta_{25-35}$  淀粉样蛋白;神经 PC12 细胞;凋亡;磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B 信号通路

额外的阳离子- $\pi$ 相互作用。这样的疏水作用同样也应对 EFV 的高 BSA 亲和力有贡献。本文所考察的 3 种抗 HIV 药物都结合在 BSA 的相同结构亚域(均以 Trp213 为中心)之中,虽然各自的结合方式并不相同,但其对血浆蛋白结合行为及潜在的药物-药物相互作用产生了影响。若患者同时服用 3 种药物,可导致药物在血浆中竞争结合相同位点,故三者间存在相互作用。

荧光光谱法与分子对接是研究抗病毒药物与 BSA 的相互作用的有效互补的 2 种研究方法。BSA 与药物结合的信息可使研究者更好地了解药物在体内的吸收、分布情况以及药物的毒性。

## 参考文献

- [1] Zhang Y, Lee P, Liang S, *et al.* Structural basis of non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac binding to human serum albumin[J]. *Chem Biol Drug*, 2015, 86(5): 1178-1184.
- [2] Zsila F, Bikadi Z, Simonyi M. Probing the binding of the flavonoid, quercetin to human serum albumin by circular dichroism, electronic absorption spectroscopy and molecular modelling methods[J]. *Biochem Pharmacol*, 2003, 65(3): 447-456.
- [3] Fanali G, Fasano M, Ascenzi P, *et al.*  $\alpha$ -Tocopherol binding to human serum albumin[J]. *Biofactors*, 2013, 56(3): 294-303.
- [4] Yue Y, Dong Q, Zhang Y, *et al.* Synthesis of imidazole

\* 主治医师,硕士。研究方向:神经病学。E-mail:jsprincess11@163.com

# 通信作者:副主任医师,硕士。研究方向:精神病学。电话:0373-3373606

derivatives and the spectral characterization of the binding properties towards human serum albumin[J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2016, 11(153): 688-703.

- [5] 兰蕊,龚小保,黄利桂,等. 荧光光谱法测定 3 种黄酮类化合物与人血清白蛋白相互作用的机制研究[J]. *中国药房*, 2016, 27(22): 3054-3057.
- [6] Chaudhuri S, Chakraborty S, Sengupta PK. Probing the interactions of hemoglobin with antioxidant flavonoids via fluorescence spectroscopy and molecular modeling studies[J]. *Biophys Chem*, 2011, 154(1): 26-34.
- [7] Sandhya B, Hegde AH, Seetharamappa J. Elucidation of binding mechanism and identification of binding site for an anti HIV drug, stavudine on human blood proteins[J]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(5): 3817-3827.
- [8] Bocedi A, Notaril S, Narciso P, *et al.* Binding of anti-HIV drugs to human serum albumin[J]. *IUBMB Life*, 2004, 56(10): 609-614.
- [9] Bujacz A. Structures of bovine, equine and leporine serum albumin[J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2012, 68(Pt10): 1278-1289.
- [10] Jahanban-Esfahlan A, Panahi-Azar V, Sajedi S. Spectroscopic and molecular docking studies on the interaction between N-acetyl cysteine and bovine serum albumin[J]. *Biopolymers*, 2015, 103(11): 638-645.
- [11] Ross PD, Subramanian S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability[J]. *Biochemistry*, 1981, 20(11): 3096-3102.

(收稿日期:2016-05-17 修回日期:2016-07-15)

(编辑:邹丽娟)

# Effects of Aripiprazole on PC12 Cell Injury Induced by A $\beta$ <sub>25-35</sub> and Its Mechanism

YANG Shuzhen, ZHAO Jingyuan (Dept. Seven of Psychiatry, the Second Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Henan Xinxiang 453002, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the effects of aripiprazole on PC12 cell injury induced by amyloid  $\beta$ -protein (A $\beta$ <sub>25-35</sub>) and its mechanism. METHODS: PC12 cells were randomized into normal control group, model group (20  $\mu$ mol/L A $\beta$ <sub>25-35</sub>), aripiprazole low-concentration, medium-concentration and high-concentration groups (5, 10, 20  $\mu$ mol/L aripiprazole+20  $\mu$ mol/L A $\beta$ <sub>25-35</sub>). These groups were cultured with culture medium containing relevant medicine for 48 h, with 6 wells in each group. The viability (optical density value) of PC12 cell was measured by MTT assay, and PC12 cell apoptosis was measured by Hoechst staining. The activities of Caspase-3 and Caspase-9 were determined by spectrophotometry. The protein expression of Bcl-2, Bax and PI3K and the phosphorylation of Akt were assayed by Western blot assay. RESULTS: Compared with normal control group, optical density value of model group was decreased while apoptotic rate was increased; the activities of Caspase-3 and Caspase-9, and the protein expression of Bax were increased; the protein expression of Bcl-2 and PI3K, the phosphorylation of Akt were decreased ( $P<0.01$ ). Compared with model group, optical density value of aripiprazole low-concentration, medium-concentration and high-concentration groups were increased, while apoptotic rate and the activities of Caspase-3 and Caspase-9 were decreased; the protein expression of Bcl-2 and PI3K and the phosphorylation of Akt were enhanced; while the protein expression of Bax were decreased in aripiprazole medium-concentration and high-concentration groups ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). CONCLUSIONS: Aripiprazole can suppress cell apoptosis of PC12 cell induced by A $\beta$ <sub>25-35</sub>, which is related to activating PI3K/Akt signal pathway.

**KEYWORDS** Aripiprazole; Amyloid  $\beta$ -protein; Nerve PC12 cell; Apoptosis; PI3K/Akt signal pathway

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)又称老年痴呆症,是一种中枢神经系统变性疾病,临床主要表现为认知功能障碍、行为及活动能力下降或异常。其中脑内及海马区A $\beta$ 淀粉样蛋白(Amyloid  $\beta$ -protein, A $\beta$ )沉积是AD主要病理变化之一,已成为AD治疗药物的主要靶点之一<sup>[1-2]</sup>。PC12细胞是来源于大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤的一种常用的神经细胞,其形态、结构及生化功能与神经元类似,常作为研究神经细胞生长、凋亡、发育及功能的细胞培养模型。A $\beta$ 诱导的PC12细胞损伤模型已被广泛用于AD等神经性疾病的探讨研究<sup>[3-4]</sup>。阿立哌唑是一种非典型抗精神病药物,能通过激活多巴胺受体改善精神分裂症状及抑郁症。同时临床研究证实,阿立哌唑单独用药或者联用其他非典型抗精神病药物对AD患者疗效显著<sup>[5-6]</sup>。基础研究也证实,阿立哌唑对PC12细胞活力或者1-甲基-4-苯基吡啶离子(MPP<sup>+</sup>)诱导的PC12细胞损伤具有显著影响<sup>[7-8]</sup>,但具体作用机制尚未见报道。所以,本研究拟以A $\beta$ <sub>25-35</sub>诱导PC12细胞损伤,探讨阿立哌唑的抗损伤作用及具体机制。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Tecan Infinite F200/M200型多功能酶标仪(瑞士Tecan公司);ChemiDoc™ XRS型凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司);AF6000型荧光显微镜(德国Leica公司)。

### 1.2 药品与试剂

阿立哌唑口腔崩解片(浙江大家制药有限公司,批号:140910A,规格:5 mg/片);A $\beta$ <sub>25-35</sub>(美国Sigma公司,批号:A4559,纯度:>95%);二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒(批号:P0010)、小鼠抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记山

羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)(H+L)、HRP标记山羊抗小鼠IgG(H+L)、Hoechst染色试剂盒(碧云天生物技术研究所);兔抗B淋巴细胞瘤2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)、蛋白激酶B(Akt)、磷酸化(p-)Akt单克隆抗体(美国Epitomics公司);天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶3(Caspase-3)、Caspase-9活性检测试剂盒(南京凯基生物科技有限公司);DMEM培养基(美国Gibco公司)。

### 1.3 细胞

大鼠神经PC12细胞购于中国科学院上海细胞库,培养于含10%胎牛血清的DMEM培养基中。

## 2 方法

### 2.1 分组与给药

按文献[9-11]方法将试验分为正常对照组、模型组(20  $\mu$ mol/L A $\beta$ <sub>25-35</sub>)和阿立哌唑低、中、高浓度组(5、10、20  $\mu$ mol/L阿立哌唑+20  $\mu$ mol/L A $\beta$ <sub>25-35</sub>),加入含相应药物的DMEM培养基培养48 h,每组6个复孔。

### 2.2 细胞活力的检测

将处于生长对数期的PC12细胞消化,调细胞密度为 $5\times 10^3$  mL<sup>-1</sup>,接种于96孔板,每孔200  $\mu$ L,于37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养48 h。按“2.1”项下分组给药,继续培养48 h,每孔加MTT(5 mg/mL)20  $\mu$ L,4 h后弃上清,并每孔加入二甲基亚砜(DMSO)150  $\mu$ L培养10 min。用酶标仪于570 nm波长处测定光密度(OD值),以此评价细胞活力。

### 2.3 细胞凋亡的检测

将融合度为80%的PC12细胞消化,调细胞密度为 $1\times 10^4$  mL<sup>-1</sup>,接种于6孔板,每孔1 mL,于37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养48 h,按“2.1”项下分组给药,继续培养48 h。然后按照Hoechst染色试剂盒说明书进行染色,固

定,显微镜下观察细胞核,发亮发白即是凋亡细胞。利用Image J软件计算各组细胞的细胞凋亡率(%)。

#### 2.4 细胞中Caspase-3、Caspase-9活性的检测

将融合度为80%的PC12细胞消化,调细胞密度为 $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ ,接种于6孔板,每孔1 mL,于 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 培养箱中培养48 h。按“2.1”项下分组给药,继续培养48 h,然后按照Caspase-3、Caspase-9活性检测试剂盒说明书操作,用酶标仪于405 nm波长处测定吸光度,计算活性。

#### 2.5 凋亡相关因子和PI3K/Akt信号通路相关因子的检测

将融合度为80%的PC12细胞消化,调细胞密度为 $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ ,接种于6孔板,每孔1 mL,于 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 培养箱中培养48 h。按“2.1”项下分组给药,继续培养48 h,收集细胞,加入RIPA裂解液,裂解30 min。以离心半径为15 cm、10 000 r/min离心10 min,收获蛋白。采用BCA蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度。蛋白样品煮沸变性10 min,上样,进行十二烷基硫酸钠凝胶电泳1~2 h,湿法转膜30~40 min,加入一抗(兔抗Bax、Bcl-2、PI3K、Akt、p-Akt单克隆抗体,小鼠抗GAPDH单克隆抗体,稀释比例均为1:100)孵育,4℃过夜。漂洗后,加入二抗[HRP标记山羊抗兔IgG(H+L)、HRP标记山羊抗小鼠IgG(H+L),稀释比例均为1:500],室温孵育1~2 h。漂洗并滴加增强化学发光(ECL)液后,在凝胶成像系统中曝光,用Quantity One软件统计各抗体条带灰度值。以Bcl-2、Bax、PI3K与GAPDH灰度值的比值表示对应蛋白的相对表达量,以p-Akt与Akt灰度值的比值表示Akt的磷酸化水平。

#### 2.6 统计学方法

所有数据至少重复测定3次并用 $\bar{x} \pm s$ 表示。数据采用SPSS 17.0软件进行统计分析,多组数据间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 细胞活力的测定结果

与正常对照组比较,模型组细胞的OD值降低( $P < 0.01$ )。与模型组比较,阿立哌唑各浓度组细胞的OD值均增加( $P < 0.01$ )。与阿立哌唑低浓度组比较,阿立哌唑中、高浓度组细胞的OD值均增加( $P < 0.01$ );与阿立哌唑中浓度组比较,阿立哌唑高浓度组细胞的OD值增加( $P < 0.01$ )。各组细胞活力的测定结果见表1。

#### 3.2 细胞凋亡率的测定结果

与正常对照组比较,模型组细胞凋亡率增加( $P < 0.01$ )。与模型组比较,阿立哌唑各浓度组细胞凋亡率减少( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。与阿立哌唑低浓度组比较,阿立哌唑中、高浓度组细胞凋亡率减少( $P < 0.01$ );与阿立哌唑中浓度组比较,阿立哌唑高浓度组细胞凋亡率减少( $P < 0.01$ )。各组细胞凋亡情况的Hoechst染色图见图1,凋亡率测定结果见表1。

表1 各组细胞活力和凋亡率的测定结果( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Tab 1 Results of cell viability and apoptotic rate in each group( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	OD值	细胞凋亡率, %
正常对照组	$0.67 \pm 0.06$	$5.38 \pm 0.54$
模型组	$0.34 \pm 0.03^{**}$	$38.46 \pm 2.54^{**}$
阿立哌唑低浓度组	$0.43 \pm 0.05^{##}$	$27.72 \pm 2.56^{\#}$
阿立哌唑中浓度组	$0.52 \pm 0.05^{##\Delta\Delta}$	$17.48 \pm 1.74^{##\Delta\Delta}$
阿立哌唑高浓度组	$0.63 \pm 0.06^{##\Delta\Delta\Delta\Delta}$	$9.59 \pm 0.98^{##\Delta\Delta\Delta\Delta}$

注:与正常对照组比较,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较, $^{\#}P < 0.05$ , $^{##}P < 0.01$ ;与阿立哌唑低浓度组比较, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ ;与阿立哌唑中浓度组比较, $^{\Delta\Delta\Delta}P < 0.01$

Note: vs. normal control group, \*\* $P < 0.01$ ; vs. model group,  $^{\#}P < 0.05$ ,  $^{##}P < 0.01$ ; vs. aripiprazole low-concentration group,  $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ ; vs. aripiprazole medium-concentration group,  $^{\Delta\Delta\Delta}P < 0.01$

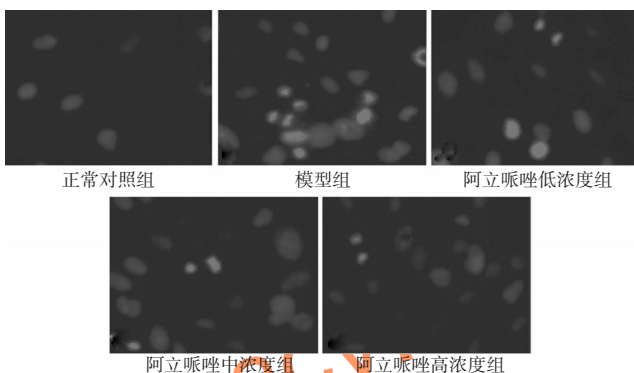


图1 各组细胞凋亡情况(Hoechst染色,  $\times 200$ )

Fig1 Cell apoptosis in each group (Hoechst staining,  $\times 200$ )

#### 3.3 细胞中Caspase-3、Caspase-9活性的测定结果

与正常对照组比较,模型组细胞中Caspase-3、Caspase-9活性增强( $P < 0.01$ )。与模型组比较,阿立哌唑各浓度组细胞中Caspase-3、Caspase-9活性减弱( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。与阿立哌唑低浓度组比较,阿立哌唑中、高浓度组细胞中Caspase-3、Caspase-9活性减弱( $P < 0.01$ );与阿立哌唑中浓度组比较,阿立哌唑高浓度组细胞中Caspase-3、Caspase-9活性减弱( $P < 0.01$ )。各组细胞中Caspase-3、Caspase-9活性的测定结果见表2。

#### 3.4 细胞中Bax、Bcl-2、PI3K蛋白表达和Akt磷酸化水平的测定结果

与正常对照组比较,模型组细胞中Bcl-2、PI3K蛋白表达减弱,Bax蛋白表达增强,p-Akt/Akt降低( $P < 0.01$ )。与模型组比较,阿立哌唑各浓度组细胞中Bcl-2、PI3K蛋白表达增强和p-Akt/Akt增加,阿立哌唑中、高浓度组细胞中Bax蛋白表达减弱( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。与阿立哌唑低浓度组比较,阿立哌唑中、高浓度组细胞中Bcl-2、PI3K蛋白表达增强和p-Akt/Akt增加,Bax蛋白表达减弱( $P < 0.01$ );与阿立哌唑中浓度组比较,阿立哌唑高浓度组细胞中Bcl-2、PI3K蛋白表达增强和p-Akt/Akt增加,Bax蛋白表达减弱( $P < 0.01$ )。各组细胞中Bax、Bcl-2、PI3K蛋白表达及Akt磷酸化水平的电泳图

见图2,测定结果见表3。

表2 各组细胞中 Caspase-3、Caspase-9 活性的测定结果( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Tab 2 Results of the activities of Caspase-3 and Caspase-9 in cell of each group( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	Caspase-3	Caspase-9
正常对照组	0.48 ± 0.04	0.29 ± 0.02
模型组	3.27 ± 0.30**	2.38 ± 0.24**
阿立哌唑低浓度组	2.72 ± 0.26 <sup>#</sup>	1.95 ± 0.20 <sup>#</sup>
阿立哌唑中浓度组	2.08 ± 0.20 <sup>#ΔΔ</sup>	1.23 ± 0.12 <sup>#ΔΔ</sup>
阿立哌唑高浓度组	1.23 ± 0.13 <sup>#ΔΔ▲▲</sup>	0.74 ± 0.07 <sup>#ΔΔ▲▲</sup>

注:与正常对照组比较,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ,<sup>#</sup> $P < 0.01$ ;与阿立哌唑低浓度组比较,<sup>ΔΔ</sup> $P < 0.01$ ;与阿立哌唑中浓度组比较,<sup>▲▲</sup> $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, \*\* $P < 0.01$ ; vs. model group, <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>#</sup> $P < 0.01$ ; vs. aripiprazole low-concentration group, <sup>ΔΔ</sup> $P < 0.01$ ; vs. aripiprazole medium-concentration group, <sup>▲▲</sup> $P < 0.01$

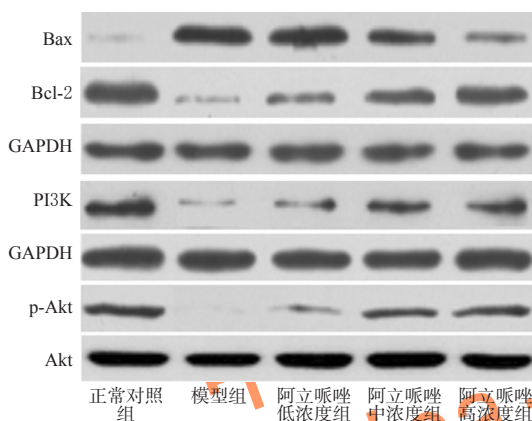


图2 各组细胞中 Bax、Bcl-2、PI3K 蛋白表达及 Akt 磷酸化水平的电泳图

Fig 2 Electrophoresis of protein expressions of Bax, Bcl-2 and PI3K and the phosphorylation of Akt in cell of each group

表3 各组细胞中 Bax、Bcl-2、PI3K 蛋白表达及 Akt 磷酸化水平的测定结果( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Tab 3 Determination results for protein expressions of Bax, Bcl-2 and PI3K and the phosphorylation of Akt in cell of each group( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	Bax/GADPH	Bcl-2/GADPH	PI3K/GADPH	p-Akt/Akt
正常对照组	0.15 ± 0.01	1.29 ± 0.12	0.62 ± 0.06	0.83 ± 0.08
模型组	1.34 ± 0.13**	0.21 ± 0.02**	0.18 ± 0.01**	0.08 ± 0.01**
阿立哌唑低浓度组	1.32 ± 0.05	0.37 ± 0.03 <sup>#</sup>	0.30 ± 0.03 <sup>#</sup>	0.19 ± 0.02 <sup>#</sup>
阿立哌唑中浓度组	0.88 ± 0.09 <sup>#ΔΔ</sup>	0.93 ± 0.10 <sup>#ΔΔ</sup>	0.41 ± 0.04 <sup>#ΔΔ</sup>	0.37 ± 0.03 <sup>#ΔΔ</sup>
阿立哌唑高浓度组	0.40 ± 0.04 <sup>#ΔΔ▲▲</sup>	1.14 ± 0.10 <sup>#ΔΔ▲▲</sup>	0.42 ± 0.37 <sup>#ΔΔ</sup>	0.38 ± 0.03 <sup>#ΔΔ</sup>

注:与正常对照组比较,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ,<sup>#</sup> $P < 0.01$ ;与阿立哌唑低浓度组比较,<sup>ΔΔ</sup> $P < 0.01$ ;与阿立哌唑中浓度组比较,<sup>▲▲</sup> $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, \*\* $P < 0.01$ ; vs. model group, <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>#</sup> $P < 0.01$ ; vs. aripiprazole low-concentration group, <sup>ΔΔ</sup> $P < 0.01$ ; vs. aripiprazole medium-concentration group, <sup>▲▲</sup> $P < 0.01$

## 4 讨论

本研究首先通过 MTT 法检测阿立哌唑对  $A\beta_{25-35}$  诱导的 PC12 细胞的影响,结果表明阿立哌唑能浓度依赖性地提高 PC12 细胞活力,进一步的 Hoechst 染色结果也证实阿立哌唑能抵抗  $A\beta_{25-35}$  诱导的 PC12 细胞凋亡,由此提示阿立哌唑能抑制  $A\beta_{25-35}$  诱导的 PC12 细胞凋亡,并促进细胞存活。

细胞凋亡由多种信号通路所调控,PI3K/Akt 信号通路就是其中之一,具有“抗凋亡通路”之称。当 PI3K 被激活后,可促使 3,4-二磷酸脂酰肌醇(PIP2)转化为 3,4,5-三磷酸脂酰肌醇(PIP3),后者招募并激活 Akt,活化的 Akt 通过磷酸化作用激活或抑制下游靶蛋白如 Bax、Bcl-2 及 Caspase 表达,进而调节细胞的增殖、分化及凋亡等过程。Bcl-2 是最常见的抑凋亡蛋白,能与促凋亡蛋白 Bax 形成异源二聚体,从而作用于线粒体膜上,促进细胞色素 C 及 Caspase-3 与 Caspase-9 的释放,最终诱导细胞凋亡。已有研究证实, $A\beta$  能促使神经元细胞 Bcl-2 表达减弱、Bax 表达增强,使 Bcl-2/Bax 比值降低<sup>[12]</sup>;同时  $A\beta_{25-35}$  可诱导 PC12 细胞中 Bcl-2 表达下调、Bax 表达上调, Caspase-3 活性增强<sup>[10,13]</sup>;另外  $A\beta$  可降低 AD 大鼠脑组织中 PI3K/Akt 信号通路活性,并伴随着 Caspase-3 活性的增强<sup>[14]</sup>。而 Xian YF 等<sup>[15]</sup>、刘玲等<sup>[10]</sup>报道 PI3K/Akt 信号通路的激活可以拮抗  $A\beta$  诱导的 PC12 细胞凋亡。因此本研究进一步探讨阿立哌唑对  $A\beta_{25-35}$  诱导的 PC12 细胞中 PI3K/Akt 信号通路激活情况, Bax、Bcl-2 表达量及 Caspase-3、Caspase-9 活性的影响,结果表明,阿立哌唑能显著上调 PI3K 及 Bcl-2 表达,提高 Akt 磷酸化水平,降低 Bax 表达及 Caspase-3、Caspase-9 活性。这提示阿立哌唑可通过激活 PI3K/Akt 信号通路,调节信号通路下游凋亡相关蛋白表达或活性,进而改善  $A\beta_{25-35}$  诱导的 PC12 细胞损伤。

## 参考文献

- [1] Alberici A, Benussi A, Premi E, et al. Clinical, genetic, and neuroimaging features of early onset alzheimer disease: the challenges of diagnosis and treatment[J]. *Curr Alzheimer Res*, 2014, 11(10):909-917.
- [2] 任红,廖红.以淀粉样蛋白  $A\beta$  为靶点治疗阿尔茨海默病的研究进展[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2012, 17(10):1172-1178.
- [3] 陈晓宇,荣延平,张士军,等.玉郎伞多糖对  $A\beta_{25-35}$  诱导 PC12 细胞损伤的保护作用研究[J]. *中国药房*, 2013, 24(19):1735-1738.
- [4] 李峥,高项羽,刘喆,等.丙泊酚通过 MAPK/ERK 信号通路对谷氨酸诱导的神经 PC12 细胞损伤的抑制作用[J]. *中国药房*, 2016, 27(1):61-63.
- [5] 雷四英.阿立哌唑/利培酮联合多奈哌齐治疗阿尔茨海默病的临床观察[J]. *中国药房*, 2016, 27(2):253-255.
- [6] de Deyn PP, Drenth AF, Kremer BP, et al. Aripiprazole in the treatment of Alzheimer's disease[J]. *Expert Opin*

# 黄花倒水莲口腔速崩片的制备及体外溶出行为考察<sup>Δ</sup>

吴卫\*,刘业滢,黄莹,刘莉平,廖丽圆,段小群<sup>#</sup>(桂林医学院药学院,广西桂林 541004)

中图分类号 R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)01-0057-04  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.01.15

**摘要** 目的:制备黄花倒水莲口腔速崩片并考察其体外溶出行为。方法:采用粉末直接压片制备速崩片。以崩解时限为评价指标,通过单因素及正交试验对方中填充剂甘露醇与崩解剂微晶纤维素用量比、药材浸膏加入量、润滑剂硬脂酸镁加入量等影响因素进行考察。通过体外溶出度试验(以水为溶出介质,桨法)对优化后处方所制速崩片的溶出效果(以远志皂苷元为对照品)进行评价。结果:最优处方为药材浸膏加入量15%、甘露醇与微晶纤维素用量比1.5:1、硬脂酸镁加入量1.0%;所制片剂崩解时限为(31±4) s,硬度为(3.4±0.2) kg、脆碎度为(0.23±0.07)% (RSD均小于0.11%, n=3);5 min内总皂苷累积溶出度达到90%以上,溶出参数 $T_{50}$ =0.84 min、 $T_{90}$ =1.77 min。结论:制备的黄花倒水莲口腔速崩片在水溶液中可快速崩解和溶出。

**关键词** 黄花倒水莲;口腔速崩片;制备;处方优化;正交试验;溶出度

## Preparation and *in vitro* Dissolution Investigation of *Polygala fallax* Rapidly Disintegrating Oral Tablets

WU Wei, LIU Yeying, HUANG Ying, LIU Liping, LIAO Liyuan, DUAN Xiaoqun (College of Pharmacy, Guilin Medical University, Guangxi Guilin 541004, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To prepare *Polygala fallax* rapidly disintegrating oral tablets and investigate its *in vitro* dissolution. METHODS: The rapidly disintegrating tablets was prepared by direct powder compression method. Using disintegration time as index, the ratio of stuffing bulking agent mannitol to disintegrating agent microcrystalline cellulose, the amount of drug extract, the amount of lubricant magnesium stearate and other influential factors were investigated by single factor test and orthogonal test. The drug dissolution effect of prepared tablet (using senegenin as substance control) was evaluated by *in vitro* dissolution test (using water as dissolution medium, paddle method). RESULTS: The optimal formulation was that the amount of drug extract was 15%; the ratio of mannitol to microcrystalline cellulose was 1.5:1; the amount of magnesium stearate was 1.0%. The disintegration time of prepared tablet was (31±4) s; tablet hardness was (3.4±0.2) kg; tablet friability was (0.23±0.07)% (RSD<0.11%, n=3). Ac-

*Pharmacother*, 2013, 14(4): 459-474.

[7] Ota A, Nakashima A, Kaneko YS, *et al*. Effects of aripiprazole and clozapine on the treatment of glycolytic carbon in PC12 cells[J]. *J Neural Transm: Vienna*, 2012, 119(11):1327-1342.

[8] Park SW, Lee CH, Lee JG, *et al*. Protective effects of atypical antipsychotic drugs against MPP(+)-induced oxidative stress in PC12 cells [J]. *Neurosci Res*, 2011, 69(4): 283-290.

[9] Park SW, Lee JG, Ha EK, *et al*. Differential effects of aripiprazole and haloperidol on BDNF-mediated signal changes in SH-SY5Y cells[J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2009, 19(5): 356-362.

[10] 刘玲,王淑英,王建刚. PI3K/Akt通路在芍药苷抗 $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导PC12细胞凋亡中的作用[J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(20):4045-4049.

[11] 刘玲,王淑英.芍药苷对 $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导PC12细胞氧化损伤的影响[J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(9):1318-1322.

[12] Wu Q, Tang ZH, Peng J, *et al*. The dual behavior of PC-SK9 in the regulation of apoptosis is crucial in Alzheimer's disease progression: review[J]. *Biomed Rep*, 2014, 2(2): 167-171.

[13] 袁芳,徐琦,盛磊,等.琐琐葡萄糖对 $\beta$ 淀粉样蛋白诱导PC12细胞凋亡的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(19):5372-5373.

[14] 温蒲圆,罗浩,周丽,等.丹参酮II A对阿尔茨海默病模型大鼠脑组织caspase-3、Akt与NF- $\kappa$ B表达的影响[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2014, 30(2):155-159.

[15] Xian YF, Lin ZX, Mao QQ, *et al*. Isorhynchophylline protects PC12 cells against beta-amyloid-induced apoptosis via pi3k/akt signaling pathway[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, doi: 10.1155/2013/163057.

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81560653);广西自然科学基金资助项目(No.2014GXNSFBA118190);广西高校大学生创新创业计划项目(No.201510601070)

\* 副教授。研究方向:药物制剂的开发与研究。E-mail:wuwei\_2007@126.com

# 通信作者:教授,博士。研究方向:药理药效及药物制剂研究。电话:0773-2303451。E-mail:robotduan@163.com

(收稿日期:2016-04-23 修回日期:2016-06-17)  
(编辑:邹丽娟)