

doi:10.3969/j.issn.2095-0411.2019.05.013

## 一种磷酸二酯酶抑制剂异去甲蟛蜞菊内酯对 HT-22 细胞的保护作用

毛明强, 邹 婧, 郑 静, 丁淑敏, 吴香莹, 周冬雷, 孙毅立

(常州大学 制药与生命科学学院, 江苏 常州 213164)

**摘要:**磷酸二酯酶(PDEs)是催化水解细胞内第二信使 cAMP 和 cGMP 的唯一途径,而磷酸二酯酶抑制剂可通过改变 cAMP 和 cGMP 的浓度从而调节学习与认知功能障碍等多种生理过程。异去甲蟛蜞菊内酯(Demethylwedelolactone, DWEL) 是墨旱莲的主要成分之一。实验采用 Alpha 试剂盒确认 DWEL 对 PDE2A 有一定的抑制作用,其  $IC_{50}$  为  $9.17 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;而对 PDE4D 和 PDE10A 无明显抑制作用,说明 DWEL 对磷酸二酯酶的抑制具有一定选择性。可的松诱导 HT-22 细胞模型发现,不同浓度的 DWEL 给药后细胞活力不断提高,浓度到达  $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,细胞活力为 76.98% ( $P < 0.05$ ),结果表明 DWEL 对神经细胞有一定保护作用。

**关键词:**磷酸二酯酶;异去甲蟛蜞菊内酯;抑制作用;神经细胞

中图分类号:R 285

文献标志码:A

文章编号:2095-0411(2019)05-0087-06

## Protective Effect of Phosphodiesterase Inhibitor DWEL on HT-22 Cells Damage

MAO Mingqiang, ZOU Jing, ZHENG Jing, DING Shumin, WU Xiangying, ZHOU Donglei, SUN Yili  
(School of Pharmaceutical Engineering & Life Science, Changzhou University, Changzhou 213164, China)

**Abstract:** Phosphodiesterase PDEs are the only pathways that catalyze the hydrolysis of second messenger cAMP and cGMP in cells. Phosphodiesterase (PDE) inhibitors can regulate learning and cognitive dysfunction (AD) by altering the concentrations of cAMP and cGMP. Demethylwedelolactone (DWEL) is one of the main components of Eclipta prostrata L. Alpha kit test confirmed the inhibition effect of Demethylwedelolactone on PDE2A with  $IC_{50}$  value  $9.17 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . However, no obvious inhibition effect was found on PDE4D and PDE10A which indicate Demethylwedelolactone can inhibit

收稿日期:2019-04-04。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81603336)。

作者简介:毛明强(1995—),男,江苏南京人,硕士生。通信联系人:丁淑敏(1978—),E-mail: dsm@cczu.edu.cn

引用本文:毛明强,邹婧,郑静,等. 一种磷酸二酯酶抑制剂异去甲蟛蜞菊内酯对 HT-22 细胞的保护作用[J]. 常州大学学报(自然科学版),2019,31(5):87-92.

PDE2A selectively. HT-22 cell model induced by cortisone showed that Demethylwedelolactone could increase the survival rate of HT-22 cell cells. When the concentration reached  $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , the cell viability was 76.98% ( $P < 0.05$ ). These results suggested that DWEL could protect HT-22 cell induced by cortisone.

**Key words:** PDEs; Demethylwedelolactone; inhibition; nerve cells

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)即老年痴呆症,是一种慢性中枢神经系统退行性疾病。其临床表现为进行性认知障碍和记忆损害,并且伴有多种神经精神症状和行为障碍,发病机制复杂,病因尚未明确<sup>[1]</sup>。目前常用的治疗药物主要有胆碱酯酶抑制剂(AChEIs)、非竞争性 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体黏抗剂、作用于 A $\beta$  和 Tau 蛋白的药物<sup>[2]</sup>,均以改善阿尔茨海默病临床症状,延缓疾病发展为主,无法逆转或阻止病情的进展<sup>[3-5]</sup>。

现代研究人员已将眼光聚集于第二信使,用于应对 AD。磷酸二酯酶(PDEs)是一类可水解细胞内第二信使环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)和环磷酸鸟苷(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)的酶类,可调节细胞内的多种信号传递和生理活动<sup>[6]</sup>。PDEs 由 11 种不同的家族组成,且各家族包含不同的亚型。PDEs 可以催化 3'-磷酸酯键的水解进而灭活 cAMP 和 cGMP,发挥生物活性和药理作用。PDEs 与神经认知功能密切相关,多数 PDEs 亚型与情绪或认知障碍有关,研究人员发现在脑内各区域有不同类型 PDEs 分布,且海马、皮层和纹状体占优势<sup>[7-8]</sup>。PDEs 亚型如 PDE2A, PDE4, PDE5 和 PDE10A 等已成为抗 AD 药物的潜在靶点。目前,一些 PDE 抑制剂在临床得到了广泛的应用。

有研究表明<sup>[9]</sup>墨旱莲提取物(EEEP)可改善东莨菪碱诱导的记忆障碍,部分 EEEP 的改善功能可能与海马 LTP 的增强有关<sup>[10-11]</sup>。课题组前期研究发现,异去甲蟛蜞菊内脂(DWEL)作为墨旱莲中代表成分之一,对磷酸二酯酶的活性有一定抑制作用,但其对神经细胞及 AD 的调节作用尚未见报道。因而实验采用可的松诱导 HT-22 细胞模型探究 DWEL 对神经细胞的保护作用,为深入开发 AD 治疗药物提供参考。

## 1 实验部分

### 1.1 材料与试剂

多标记微孔板检测仪(Envision)购于 PerkinElmer;涡旋仪(Vortex. Genie2T)购于上海迈旗环保科技有限公司;96 孔板(Millipore, USA)。DWEL 购于上海将来实业有限公司(纯度 $\geq 99.0\%$ ),Biotinylated-cAMP Tracer, Streptavidin coated Donor Beads, Anti-cAMP Acceptor Beads 购于 PerkinElmer;DMSO,上海沪峰生物科技有限公司;EHNA 购于 Sigma-Aldrich;DMEM,胎牛血清(FBS),磷酸盐缓冲液(PBS),PDE2A, PDE4D, PDE10A 均购于 Gibco 公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 PDEs 酶活检测实验样品溶液的配制

EHNA(erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine)为阳性对照药,加 DMSO 溶解并配成  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的溶液,备用;将 EHNA 溶液先用 Reaction Buffer(反应缓冲液)稀释成  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,然后依次稀释 10 个浓度梯度,编号 A1—A10,备用;吸取  $1 \text{ mL } 10 \times \text{Reaction Buffer}$  于  $10 \text{ mL}$  的离心管中,加入  $0.01 \text{ g BSA}$ ,加入约  $6 \text{ mL}$  超纯水缓慢震荡至 BSA 溶解,定容至  $10 \text{ mL}$ ,缓慢摇匀,置于冰中,备用;Bio-

tanylated-cAMP(生物素标记的 cAMP)用 Buffer 稀释 800 倍,备用;Donor Beads(链霉亲和素供体微珠)和 Anti-cAMP Acceptor(抗体标记受体微珠)用 Buffer 分别稀释 93.75 倍和 100 倍,备用;DWEL 标准品用 DMSO 溶解并配成  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的溶液,备用。

### 1.2.2 PDEs 酶活检测模型的建立及验证

培养得到了 PDE2A, PDE4D, PDE10A 3 种活性较好的酶,为了检测化合物的酶活抑制率,建立了以下模型<sup>[12]</sup>:首先加  $2 \mu\text{L}$  不同浓度抑制剂和 PDE2A  $4 \mu\text{L}$ ,离心,孵育 0.5 h;然后加入 Biotanylated-cAMP 溶液  $4 \mu\text{L}$ ,离心,反应 1 h;最后加  $5 \mu\text{L}$  Donor Beads 和  $10 \mu\text{L}$  Anti-cAMP Acceptor 离心,避光反应 1 h,检测 Alpha 信号。使用 EHNA 验证该模型是否可以检测化合物的生物活性。根据平均信号值计算每个浓度的抑制率,用 GraphPad Prism 5 作图拟合得到 EHNA 的  $\text{IC}_{50}$  值。

### 1.2.3 DWEL 对 PDE2A, PDE4D, PDE10A 抑制活性检测

取配好的 DWEL 稀释成终浓度为  $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  2 个浓度进行初筛。对 PDE2A, PDE4D, PDE10A 进行活性检测,具体步骤参见 1.2.2 的模型。根据平均信号值计算化合物在 2 个浓度下的抑制率。

### 1.2.4 可的松损伤 HT-22 细胞实验模型

小鼠海马神经元 HT-22 细胞加含 10% 胎牛血清,  $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  青霉素和  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 DMEM 完全培养基,置于  $37^\circ\text{C}$ , 5% 二氧化碳细胞培养箱中常规培养。实验前进行传代以备用。

将生长较好的 HT-22 细胞种于 96 孔板,培养 24 h 后,吸除 96 孔板中原有培养液,给药组加入进口可的松(cortisone)和国产可的松,使得进口可的松和国产可的松终浓度达到  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  两个浓度;空白组加入无血清培养基;放入  $37^\circ\text{C}$  培养箱培养 24 h 后对细胞进行观察,进行 MTT 检测。

### 1.2.5 DWEL 对 HT-22 细胞活性检测

取生长较好的 HT-22 细胞种于新的 96 孔板,培养 24 h 后,给药组加入 DWEL,使 DWEL 的终浓度分别为 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,培养 2 h,然后加入  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的进口可的松,继续培养 24 h;模型组直接加入  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的进口可的松继续培养 24 h;空白组加入无血清培养基,继续培养 24 h。弃去原培养基,每孔加入  $100 \mu\text{L}$  PBS 清洗后加入无血清培养基  $90 \mu\text{L}$  及  $10 \mu\text{L}$  5% MTT,共同孵育 4 h。弃去培养基,每孔加入  $100 \mu\text{L}$  的溶解液,置摇床上低速震荡 10 min,使结晶物充分溶解。最后于酶标仪波长 490 nm 处测量各孔的吸光值,根据每组吸光度计算细胞活力。

### 1.2.6 统计学分析

数据用  $\bar{X} \pm s$  表示,采用 SPSS16.0 统计软件进行方差分析,组间比较采用  $t$  检验, \*  $P < 0.05$  为有显著性差异, \*\*  $P < 0.01$  为有极显著性差异。

## 2 实验结果

### 2.1 化合物酶活检测模型验证

EHNA 验证酶活检测模型实验中,每个浓度的平均信号值和抑制率见表 1。用 GraphPad Prism 5 作图拟合出 EHNA 对 PDE2A 的  $\text{IC}_{50}$  为  $0.58 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,文献报道 EHNA 的  $\text{IC}_{50}$  为  $0.80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,两者基本一致,证明了该模型有效,可以用来检测化合物的酶活性。

### 2.2 DWEL 对 PDE2A, PDE4D 和 PDE10A 的活性检测结果

不同浓度 DWEL 对 PDE2A, PDE4D 和 PDE10A 的活性抑制结果见表 2。从表 2 中可以看出,

DWEL 对 PDE2A 有抑制作用,在高浓度时( $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )抑制作用较好,抑制率为 63.16%,低浓度( $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )时相对较弱,抑制率为 16.03%,用 GraphPad Prism 5 作图拟合得到其  $\text{IC}_{50}$  值为  $9.17 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。而 DWEL 对 PDE4D 和 PDE10A 均无抑制作用,说明 DWEL 对磷酸二酯酶的抑制具有一定选择性。

表 1 不同浓度 EHNA 对 PDE2A 的抑制率

编号	终浓度/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	平均信号值	抑制率/%	编号	终浓度/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	平均信号值	抑制率/%
A1	80	104 917	99.35	A6	2.50	106 254	101.23
A2	40	103 578	97.46	A7	1.25	100 912	93.70
A3	20	107 917	103.58	A8	0.63	70 648	50.99
A4	10	112 047	109.41	A9	0.31	47 904	18.90
A5	5.0	107 009	102.30	A10	0.16	42 422	11.17

表 2 DWEL 对 PDE2A, PDE4D, PDE10A 的抑制率

编号	种类	浓度/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	平均信号值	抑制率/%	编号	种类	浓度/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	平均信号值	抑制率/%
1	PDE2A	20	277 435.33	63.16	4	PDE4D	5	2 128.33	-0.83
2	PDE2A	5	82 239.00	16.03	5	PDE10A	20	30 000.67	-2.53
3	PDE4D	20	1 898.33	-0.90	6	PDE10A	5	28 818.00	-2.92

### 2.3 可的松对 HT-22 细胞活力的影响

不同来源,不同浓度可的松对 HT-22 细胞活力的影响见图 1(\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ )。空白组细胞活力为 100%,进口可的松浓度为  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  (A) 和  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  (B) 时,细胞活力分别为 73.56%,58.36%;而国产可的松浓度为  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  (C) 和  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  (D) 时,细胞活力分别为 76.67%,66.18%。可见,进口可的松浓度为  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,其细胞活力与空白组相比有显著差异,故选  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  进口可的松造模。

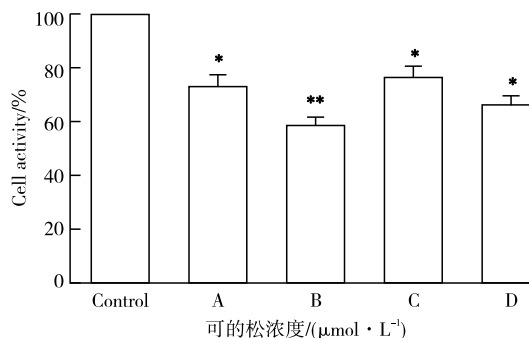


图 1 可的松损伤 24 h 后 HT-22 细胞活力

### 2.4 DWEL 对可的松损伤 HT-22 细胞的活力影响

可的松损伤 HT-22 细胞后,给药(DWEL)24 h,细胞活力见图 2(## $P < 0.01$ ,与空白组比;\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,与模型组相比)。与空白组相比,进口可的松(浓度为  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )对细胞损伤后,细胞活力为 69.24%,说明可的松对细胞有杀伤作用。不同浓度的 DWEL 给药后细胞活力在不断提高,当浓度到达  $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,细胞活力达到最高,为 76.98%,说明在此浓度下 DWEL 对细胞具有一定保护作用。继续增大给药浓度至  $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,细胞活力反而下降,说明高浓度 DWEL 又有一定的细胞毒作用。

## 3 讨论

在大脑的神经元细胞中,如果 PDE2A 的活性受到抑制,则能选择性地增加神经元和海马区的 cGMP 浓度水平,从而增强神经元的塑性,能够改善记忆功能<sup>[13-15]</sup>,以此来探究应对 AD 的猜想。文章通过两部分实验来评价墨旱莲主要成分之一的 DWEL 对 PDEs 的抑制作用及其对神经细胞的保护

作用。

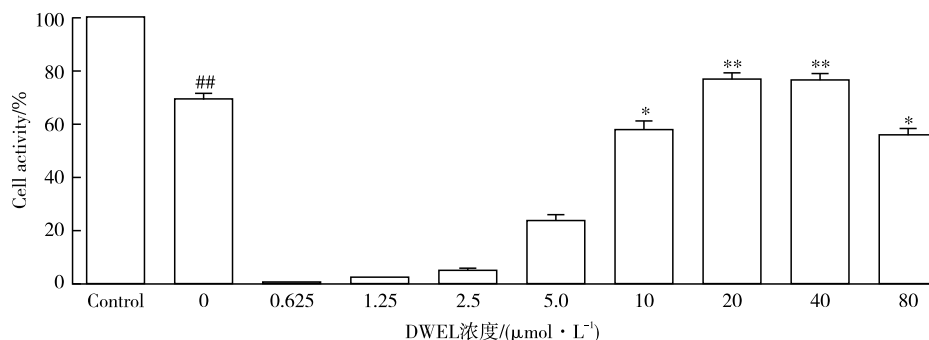


图 2 DWEL 浓度对 200  $\mu\text{mol/L}$  可的松损伤细胞活力的影响

Alpha 试剂盒法评价 DWEL 对磷酸二酯酶的抑制作用及其选择性,发现 DWEL 对 PDE2A 有抑制作用,在高浓度时(20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )抑制作用较好,抑制率为 63.16%;而 DWEL 对 PDE4D 和 PDE10A 均无抑制作用,说明 DWEL 对磷酸二酯酶的抑制具有一定选择性,可用于抑制 PDE2A。

海马神经元细胞是海马区的主要细胞组成,主要功能是参与近期记忆、情绪及内脏功能调节、是老年性痴呆、癫痫等疾病的主要病灶之一<sup>[16-20]</sup>。实验采用可的松诱导小鼠海马神经元 HT-22 细胞造模来评价 DWEL 对神经细胞的保护作用,发现进口可的松(浓度为 200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )对细胞损伤后,细胞活力为 69.24%,给药 DWEL(浓度为 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )后,细胞活力到达 76.98%,细胞活力有所提高,表明 DWEL 对神经细胞有一定的保护作用。本文的研究结果为今后抗老年痴呆药物的研发提供新思路 and 候选化合物。然而本结果仅限于体外实验,其在抗 AD 方面的作用及机制还需进一步的动物实验深入研究。

## 4 结 论

DWEL 对 PDE2A 有一定的抑制作用,其  $\text{IC}_{50}$  为 9.17  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,并具有一定选择性。可的松诱导 HT-22 细胞模型发现,DWEL 给药后细胞活力不断提高,表明 DWEL 对神经细胞有一定保护作用。

## 参考文献:

- [1]黄浩.以磷酸二酯酶为主要靶点的阿魏酸抗阿尔兹海默病作用机制研究[D].北京:北京工业大学,2016.
- [2]万素馨,方伟.阿尔茨海默病的治疗药物作用机制研究进展[J].现代药物与临床,2018,33(12):3406-3410.
- [3]ADLIMOUGHADDAM A, NEUENDORF M, ROY B, et al. A review of clinical treatment considerations of donepezil in severe Alzheimer's disease[J]. CNS Neurosci Ther, 2018, 24(10): 876-888.
- [4]LOVESTONE S, BOADA M, DUBOIS B, et al. A phase II trial of tideglusib in Alzheimer's disease[J]. Alzheimers Dis, 2015, 45(1): 75-88.
- [5]MATHURAM T L, REECE L M, CHERIAN K M. GSK-3 inhibitors: a double edged sword-an updam on tideglusib[J]. Drug Res(Stuttg), 2018, 68(8): 436-443.
- [6]张莉, 杜冠华. 磷酸二酯酶 7: 一个新的抗炎免疫药物靶点研究进展[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(1): 1-4.
- [7]XU Y, ZHANG H T, O'DONNELL J M. Phosphodiesterases in the central nervous system: implications in mood and cognitive disorders[J]. Handb Exp Pharmacol, 2011(204): 447-485.
- [8]HECKMAN P R, BLOKLAND A, RAMAEKERS J, et al. PDE and cognitive processing: beyond the memory domain[J]. Neurobiol Learn Mem, 2015(119): 108-122.

- [9]BENDER A T, BEAVO J A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use[J]. *Pharmacol Rev*, 2006, 58(3): 488-520.
- [10]JUNG W Y, KIM H, PARK H J, et al. The ethanolic extract of the *Eclipta prostrata* L. ameliorates the cognitive impairment in mice induced by scopolamine[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2016, 190: 165-173.
- [11]GINTER E, SIMKO V, WEINREBOVA D, et al. Novel potential for the management of Alzheimer disease[J]. *Bratisl Lek Listy*, 2015, 116(10): 580-581.
- [12]ROULEAU N, TUROTTE S, MONDOU M H, et al. Development of a versatile platform for nuclear receptor screening using AlphaScreen[J]. *J Biomol Screen*, 2003, 8: 191-197.
- [13]BERNABEU R, SCHMITZ P, FAILLACE M P, et al. Hippocampal cGMP and cAMP are differentially involved in memory processing of inhibitory avoidance learning[J]. *Neuroreport*, 1996, 7: 585-588.
- [14]MORITA H, MURATA T, SHIMIZU K, et al. Characterization of phosphodiesterase 2A in human malignant melanoma PMP cells[J]. *Oncol REP*, 2013, 29(4): 1275-1284.
- [15]RENEERKENS O A, RUTTEN K, BOLLEN E, et al. Inhibition of phosphodiesterase type 2 or type 10 reverses object memory deficits induced by scopolamine or MK-801[J]. *Behav Brain Res*, 2013, 236(1): 16-22.
- [16]LUGNIER C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) super family: a new target for the development of specific therapeutic agents[J]. *Pharmacol Ther*, 2006, 109(3): 366-398.
- [17]GOMEZ L, MASSARI M E, VICKERS T, et al. Design and synthesis of novel and selective phosphodiesterase 2 (PDE2a) inhibitors for the treatment of memory disorders[J]. *J Med Chem*, 2017, 60(5): 2037-2051.
- [18]MENNITI F S, FARACI W S, SCHMIDT C J. Phosphodiesterases in the CNS: targets for drug development[J]. *Nat Rev Drug Discovery*, 2006, 5(8): 660-670.
- [19]LUEPTOW L M, ZHAN C G, O'DONNELL J M. Cyclic GMP-mediated memory enhancement in the object recognition test by inhibitors of phosphodiesterase-2 in mice[J]. *Psychopharmacology*, 2016, 233(3): 447-456.
- [20]BOESS F G, HENDRIX M, VANDERSTAAY F J, et al. Inhibition of phosphodiesterase 2 increases neuronal cGMP, synaptic plasticity and memory performance[J]. *Neuropharmacology*, 2004, 47(7): 1081-1092.

(责任编辑:殷丽莉)