



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102641351 A

(43) 申请公布日 2012.08.22

(21) 申请号 201110367516.6

(22) 申请日 2011.11.18

(71) 申请人 张艳波

地址 香港筲扶林沙宣道 10 号

(72) 发明人 张艳波 刘静怡 童瑶 施祖荣

(74) 专利代理机构 北京鼎佳达知识产权代理事

务所(普通合伙) 11348

代理人 蒋常雪

(51) Int. Cl.

A61K 36/73(2006.01)

A61P 25/28(2006.01)

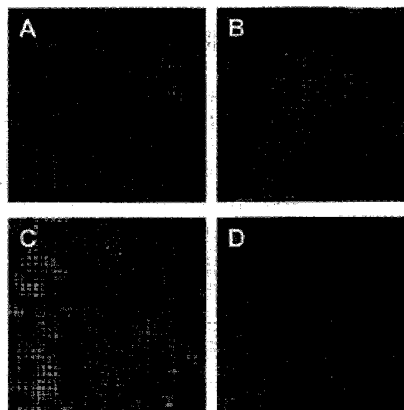
权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 1 页

(54) 发明名称

蓝莓提取物用于预防阿尔茨海默病

(57) 摘要

本发明蓝莓提取物用于预防阿尔茨海默病,首次通过体外实验证明,含 25% 总花青素的蓝莓提取物可有效抑制 β -淀粉样蛋白及同型半胱氨酸引起的 PC12 细胞凋亡。蓝莓提取物可进一步开发用于预防阿尔茨海默病。



0. 本发明蓝莓提取物用于预防阿尔茨海默病,其特征在于:
 1. 蓝莓提取物对 β -淀粉样蛋白致 PC12 细胞损伤的保护作用。
 2. 蓝莓提取物对同型半胱氨酸致 PC12 细胞损伤的保护作用。
 3. 蓝莓提取物对 β -淀粉样蛋白致 PC12 细胞核凋亡的抑制作用。
 4. 蓝莓提取物对 β -淀粉样蛋白致 caspase-3 表达增强的抑制作用。
 5. 蓝莓提取物对阿尔茨海默病的预防作用。
 6. 如权利要求 1-4 任一项中的应用,其中所述的蓝莓提取物有效成分含 25%的总花青素。

蓝莓提取物用于预防阿尔茨海默病

技术领域

[0001] 本发明属于药学领域。具体涉及蓝莓提取物对 β -淀粉样蛋白及同型半胱氨酸诱导的 PC12 细胞损伤的保护作用。

背景技术

[0002] 阿尔茨海默病 (Alzheimer's Disease, AD) 是一种神经退行性疾病。主要的临床表现为认知和记忆功能不断恶化,并伴随各种神经精神症状和行为障碍。在我国 65 岁以上的老年人中患病率约为 5%。AD 的主要病理特征之一是在大脑皮层和海马出现由 β -淀粉样蛋白 (A β) 聚积形成的老年斑 (SP)。大量研究已经表明,A β 在 AD 的病中起着相当重要的作用。A β 的神经毒性能引起氧化应激,线粒体损伤,激活凋亡因子,启动细胞的凋亡。同时,临床研究证明血浆中同型半胱氨酸水平增高可增加 AD 的发病率。因此,减少 A β 的生成,抑制 A β 或同型半胱氨酸引起的神经损伤是研究 AD 治疗的热点之一。

[0003] 目前治疗 AD 的药物主要是神经营养药、拟胆碱药或胆碱酯酶抑制剂,均属对证治疗药物,不能减缓 AD 病情的发展。蓝莓 (*Vaccinium myrtillus* L.) 制剂现已广泛用于各种保健品,可预防眼科及心血管方面的疾病。然而蓝莓提取物对 AD 的预防作用还未见报道。

发明内容

[0004] 本发明的目的是为蓝莓物用于预防海默病提供细胞水平的依据。发明人经过多次药理学实验,发现含 25% 总花青素的蓝莓提取物可有效对抗 A β_{25-35} 及同型半胱氨酸引起的细胞毒性,抵制细胞凋亡及凋亡蛋白 caspase-3 的表过。该药理作用在本发明以前尚无文献报道。

附图说明

[0005] 图 1,和对照组比较,经 A β_{25-35} 处理后细胞核出现凋亡特征:表现为细胞核变小或破碎,荧光增强。蓝莓提取物预处理可有效抑制 A β_{25-35} 诱导的细胞凋亡。蓝莓提取物对 A β_{25-35} 诱导的 PC12 细胞凋亡的影响 (A:对照组, B:A β_{25-35} 处理组, C:25 μ M 蓝莓提取物预处理组, D:50 μ M 蓝莓提取物预处理组)

[0006] 图 2,和对照组比较 A β_{25-35} 处理后 PC12 细胞 caspase-3 的表达显著增高。蓝莓提取物预处理可有效降低 caspase-3 的表达。

[0007] 蓝莓提取物抑制 A β_{25-35} 诱导的 caspase-3 表达增高。

具体实施方式

[0008] 细胞培养:PC12 细胞于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养。培养基为含 8% 胎牛血清,8% 马血清的 DMEM 培养液。取对数生长期的细胞以 $1 \times 10^4/100 \mu$ l 接种于 96 孔板,37 $^{\circ}$ C 培养 24h。

[0009] 药物处理:蓝莓提取物由香港东方保健品公司提供。细胞加入终浓度为 0-50 μ M

的蓝莓提取物,培养 24h 以观察蓝莓提取物的细胞毒性。细胞先不同浓度的蓝莓提取物预处理 1h,再加入 0.5 μM $\text{A}\beta_{25-35}$ 或 5mM 同型半胱氨酸继续培养 24h 以观察蓝莓提取物对 $\text{A}\beta_{25-35}$ 及同型半胱氨酸毒性的对抗作用。

[0010] MTT 细胞活力测定:药物处理后,去除培养液,每孔加入 50 μL MTT 溶液(终浓度 0.5mg/ml),37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 4h 后,每孔加入 50 μL MTT 裂解液(20% SDS,50% DMF pH4.7),37 $^{\circ}\text{C}$ 反应过夜。酶标仪检测各组细胞 570nm 的 OD 值。将 OD 值转换为百分比(%)。未经药物处理的细胞 OD 值设为 100%。每组 6 空对照,结果用 $\bar{X}\pm\text{SD}$ 表示。

[0011] 荧光显微镜检测细胞凋亡:将生产良好的 PC12 细胞接种于 6 孔板,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24h。分组及药物处理同上。弃除培养液,用 4% 多聚甲醛于 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 30min。用磷酸缓冲液(0.1M PBS, pH7.4) 漂洗后,加入终浓度为 5 $\mu\text{g/ml}$ 的 Hoechst33258 避光染色 10min, PBS 漂洗后封片,荧光显微镜观察细胞核凋亡。

[0012] Western blot 检测 caspase-3 的表达

[0013] 方法:将生长良好的 PC12 细胞接种于 6 孔板,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24h。分组及药物处理同上。用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白质浓度。用 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白。电泳后蛋白转移至 PVDF 膜,用含 5% 脱脂牛奶的 TBST 缓冲液(含 0.05% Tween20 的 TBS 缓冲液) 室温封闭 1h。将膜与溶解于 TBST 缓冲液的 caspase-3 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。TBST 洗涤 5min \times 3 次后,将膜与溶解于 TBST 缓冲液的辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1h。TBST 洗涤 5min \times 3 次,用 ECL 化学发光法检测蛋白表达。

[0014] 附图 1 说明:

[0015] 和对照组比较,经 $\text{A}\beta_{25-35}$ 处理后细胞核出现凋亡特征:表现为细胞核变小或破碎,荧光增强。蓝莓提取物预处理可有效抑制 $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导的细胞凋亡。

[0016] 蓝莓提取物对 $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞凋亡的影响(A:对照组,B: $\text{A}\beta_{25-35}$ 处理组,C:25 μM 蓝莓提取物预处理组,D:50 μM 蓝莓提取物预处理组)

[0017] 附图 2 说明:

[0018] 和对照组比较 $\text{A}\beta_{25-35}$ 处理后 PC12 细胞 caspase-3 的表达显著提高。蓝莓提取物预处理可有效降低 caspase-3 的表达。

[0019]

	蓝莓提取物浓度(μM)					
	0	1	5	10	25	50
细胞活力 (%)	100.0 \pm 10.2	102.6 \pm 7.2	104.7 \pm 5.7	102.9 \pm 9.5	109.1 \pm 5.1	114.4 \pm 4.6

[0020] 表 1

[0021]

蓝莓提取物浓度(μM)	0	0	10	25	50
$\text{A}\beta_{25-35}$ 浓度(μM)	0		0.5		
细胞活力(%)	100.0 \pm 1.7	68.6 \pm 1.2*	73.0 \pm 1.2	76.1 \pm 2.4*	90.0 \pm 1.4*

[0022] 表 2

[0023]

蓝莓提取物浓度(μM)	0	0	10	25	50
同型半胱氨酸浓度(mM)	0			5.0	
细胞活力(%)	100.0 \pm 2.9	79.6 \pm 1.5 [#]	82.7 \pm 6.3	90.7 \pm 3.0 [*]	90.6 \pm 2.8 [*]

[0024] 表 3

[0025] 表 1 说明：

[0026] 蓝莓提取物在 0-50 μM 浓度范围对 PC12 细胞无明显毒性。50 μM 蓝莓提取物可一定程度促进细胞增殖 (114.4 \pm 4.6%)。

[0027] 蓝莓提取物对 PC12 细胞活力的影响。

[0028] 表 2 说明：

[0029] 蓝莓提取物有效对抗 $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞活力下降。细胞用 0.5 μM $\text{A}\beta_{25-35}$ 处理 24h 后,活力显著下降 (68.6 \pm 1.2%)。蓝莓提取物预处理可明显对抗 $\text{A}\beta_{25-35}$ 的细胞毒性。50 μM 蓝莓提取物可恢复细胞活力至 90% 左右。

[0030] 蓝莓提取物对 $\text{A}\beta_{25-35}$ 致细胞损伤的保护作用。

[0031] 结果 :[#] $P < 0.05$ ^{*} $P < 0.05$

[0032] 表 3 说明：

[0033] 蓝莓提取物有效对抗同型半胱氨酸诱导的 PC12 细胞活力下降。细胞用 5mM 同型半胱氨酸处理 24h 后,活力显著下降 (79.6 \pm 1.4%)。蓝莓提取物预处理可明显降低同型半胱氨酸诱导的细胞损伤。蓝莓提取物 (25、50 μM) 可恢复细胞活力至 90% 左右。

[0034] 蓝莓提取物对同型半胱氨酸致细胞损伤的保护作用。

[0035] 结果 :[#] $P < 0.05$ ^{*} $P < 0.05$

[0036] 综上所述,本发明首次通过体外实验证明,含 25% 总花青素的蓝莓提取物可有效抑制 β -淀粉样蛋白及同型半胱氨酸引起的 PC12 细胞凋亡。蓝莓提取物可进一步开发用于预防海默病。

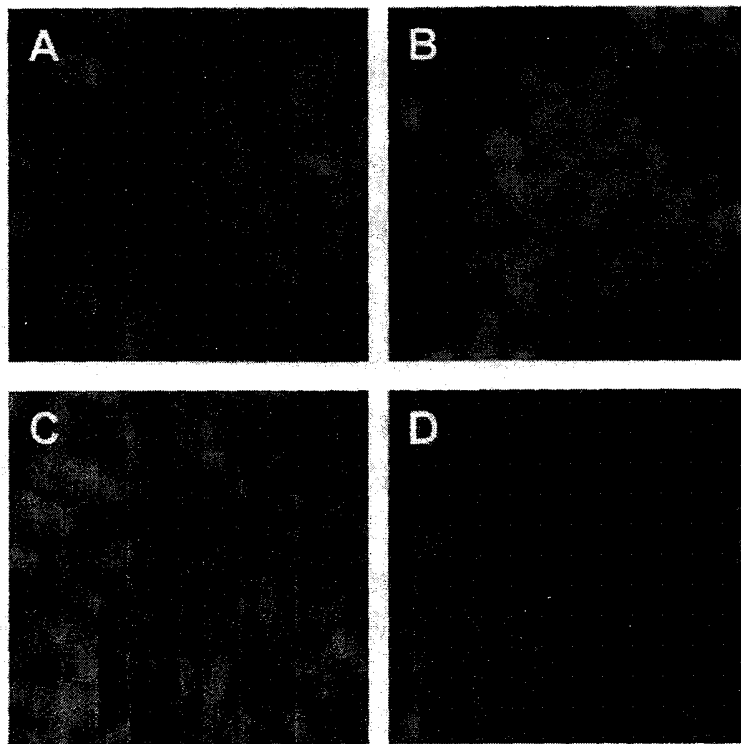


图 1

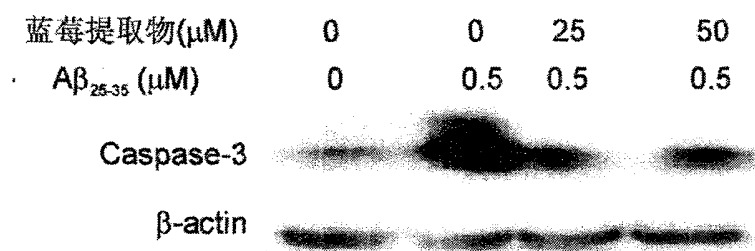


图 2