

肝豆汤改良方对 Wilson's 病模型 TX 乳鼠神经元内 Cyt C/ Caspase 信号通路的分子调控机制

徐陈陈^{1,2}, 董健健², 程楠², 韩咏竹², 王训^{2*}

(1. 安徽中医药大学 研究生院, 合肥 230038;

2. 安徽中医药大学 神经病学研究所 附属医院, 合肥 230061)

[摘要] **目的:**探讨肝豆汤改良方调控 TX 乳鼠神经元内细胞色素 C(Cyt C)/半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(Caspase)信号通路的分子靶点并观察其相应的调控机制。**方法:**本实验乳鼠神经元通过原代方法分离培养所得,分为正常组、模型组、肝豆汤改良方组、丁苯酞组,正常组为正常 DL 乳鼠神经元,用完全培养基培养,模型组为 TX 乳鼠神经元,用 10% 空白兔血清培养,肝豆汤改良方组为 TX 乳鼠神经元,加入含体积浓度(5%, 10%, 15%, 20%)肝豆汤改良方兔血清的培养基继续培养,丁苯酞组为 TX 乳鼠神经元,用 10% 含丁苯酞兔血清培养。采用原子吸收分光光度法检测不同浓度含肝豆汤改良方兔血清作用 24 h 后,对 TX 乳鼠神经元内微量元素的影响;流式细胞仪检测经肝豆汤改良方兔血清作用后活性氧(ROS)释放量的变化;蛋白质免疫印迹(Western blot)法检测含肝豆汤改良方兔血清作用后 Cyt C, Caspase-9, Caspase-3 蛋白的表达。**结果:**与模型组比较,含肝豆汤改良方兔血清可显著降低 TX 乳鼠神经元内铜、铁含量,增加锌含量($P < 0.01$)。流式细胞仪检测发现,含肝豆汤改良方兔血清较模型组可显著降低 TX 乳鼠神经元内 ROS 的释放量($P < 0.01$)。Western blot 检测结果显示与模型组比较,含肝豆汤改良方兔血清可显著降低 TX 乳鼠神经元内 Cyt C, Caspase-9, Caspase-3 蛋白表达($P < 0.01$)。**结论:**肝豆汤改良方可能是通过促进过量铜排出而抑制神经元内 Cyt C, Caspase-9, Caspase-3 表达,从而减轻高铜对神经元的损伤作用。肝豆汤改良方可通过减少脑内铜含量,进而调控 Cyt C/Caspase 信号通路达到减轻高铜诱导的神经元损伤的治疗效果。

[关键词] Wilson 病; 肝豆汤改良方; Cyt C/Caspase 信号通路; 神经元

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)06-0143-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017060143

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161228.1132.030.html>

[网络出版时间] 2016-12-28 11:32

Molecular Regulatory Mechanism of Modified Gandou Decoction on Cyt C/ Caspase Signaling Pathway in Neurons of Wilson's Disease Model-TX Mice

XU Chen-chen^{1,2}, DONG Jian-jian², CHENG Nan², HAN Yong-zhu², WANG Xun^{2*}

(1. Graduate School, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China;

2. Department of Neurology, Neurological Research Institute, Affiliated Hospital,

Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230061, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the molecular targets of Modified GanDou decoction (MGDD) treatment in Cyt C/Caspase signaling pathway in neurons of TX neonatal mice, and explore its corresponding mechanism on regulating Cyt C/Caspase signaling pathway. **Method:** neurons of TX neonatal mice were obtained by using primary culture method, and were divided into normal group (normal DL neonatal mice neurons, cultured by complete medium), model group (TX neonatal mice neurons, cultured by 10% blank rabbit serum), MGDD group (TX neonatal mice neurons, continuously cultured by rabbit serum containing 5%, 10%, 15% and 20%

[收稿日期] 20160809(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173212,81573954);安徽省自然科学基金项目(1508085MH153)

[第一作者] 徐陈陈, 硕士, 医师, 从事神经系统遗传性疾病研究, Tel:15209827776, E-mail:1271658599@qq.com

[通讯作者] *王训, 教授, 从事神经系统遗传性疾病研究, Tel:13605519595, E-mail:neurodoc@163.com

MGDD), and Butylphthalide group (TX neonatal mice neurons, cultured by rabbit serum containing 10% Butylphthalide). Atomic absorption method was used to detect the effect of different concentrations of MGDD rabbit serum on microelement in the neurons of TX neonatal mice after 24 h treatment flow cytometry was used to analyze the expression of reactive oxygen (ROS) in the neurons of TX neonatal mice after treatment with rabbit serum containing MGDD; Western blot was used to detect the protein expression levels of Cyt C, Caspase-9 and Caspase-3 in the neurons of TX neonatal mice after treatment with rabbit serum containing MGDD. **Result:** As compared with the model group, MGDD could reduce the contents of copper and iron in the neurons of TX neonatal mice, and increase the content of zinc in a dose-dependent manner ($P < 0.01$). Flow cytometry results showed that MGDD can significantly reduce the release of ROS as compared with model group ($P < 0.01$). Western blot results indicated that MGDD significantly decreased the protein expression levels of Cyt C, Caspase-9, and Caspase-3 in the neurons of TX neonatal mice as compared with the model group ($P < 0.01$). **Conclusion:** MGDD could relieve the high copper-induced neurons damage, probably by promoting the copper excretion and inhibiting the expression levels of Cyt C, Caspase-9 and Caspase-3 in TX neonatal mice neurons. MGDD achieves the treatment effect by reducing copper content in brain and regulating Cyt C/Caspase signaling pathway.

[Key words] Wilson's disease; modified Gandou decoction; Cyt C/Caspase signaling pathway; neuron

Wilson 病 (Wilson's disease, WD) 是铜代谢障碍疾病的典型代表性疾病^[1], 由于铜沉积的部位不同临床表现也复杂多样, 以肝、脑、肾、角膜等多脏器损害为特征, 首发症状以神经系统表现者约占 50%^[2]。根据其临床症状可分为肝型、脑型、其他类型和混合型^[3]。WD 是少数可以治疗的神经遗传病之一, 笔者总结多年来对 WD 的临床和基础研究发现脑型 WD 患者经过系统的综合驱铜治疗, 病情仍难以逆转, 甚至症状呈进行性恶化, 严重影响患者的预后^[4]。本项目根据中医整体观念并结合现代医学对铜代谢障碍研究以及中医药神经保护机制研究, 依“通腑养髓”治法重组具中药神经保护剂之肝豆汤改良方。前期研究对肝豆汤改良方治疗 WD 的疗效机制进行了初步研究, 研究发现 TX 乳鼠神经行为学评分较正常 DL 乳鼠高, 经肝豆汤改良方治疗后显著降低, 表明肝豆汤改良方可改善 TX 乳鼠神经系统症状, 但其作用机制还不明确^[5-6]。本研究采用原子吸收分光光度法、流式细胞仪及蛋白质免疫印迹 (Western blot) 等技术旨在观测肝豆汤改良方对 TX 乳鼠神经元内相关微量元素及细胞色素 C (Cyt C)/半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (Caspase) 信号通路相关蛋白表达水平的影响, 以期揭示肝豆汤改良方通过调控 Cyt C/Caspase 信号通路从而发挥神经保护作用的作用环节及作用靶点, 将可能为临床中医药治疗脑型 WD 患者的早期干预和损伤后神经保护、再生修复提供新的治法思路。

1 材料

1.1 动物及细胞培养 7 对 TX 乳鼠种鼠及 DL 乳

鼠从美国 Jackson 实验动物中心引进, 共同饲养于安徽医科大学 SPF 级实验动物中心并进行传代繁殖, 繁殖以达到本项目研究所需的种群数量以取标本, 模型动物在入组前随机选择 5 只进行铜生化指标 (铜蓝蛋白、铜氧化酶、血清铜等) 和基因检测以确定种鼠及其子代的遗传均一性 (即均具有 WD 模型应具有的特性), 乳鼠神经元通过原代方法分离培养所得。30 只家兔购自南京立默科技有限公司, 合格证号 SCXK (苏) 2010-0002。本动物实验经安徽中医药大学伦理委员批准进行 (批准号 20141009015)。实验过程中对动物的处置遵循中华人民共和国科学技术部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》。

1.2 药物及试剂 肝豆汤改良方均购自北京同仁堂药店安徽合肥分店, 并经安徽中医药大学药学院金传山教授鉴定, 均符合 2015 年版《中国药典》标准, 按原方比例 (大黄 20 g, 黄连 20 g, 莪术 20 g, 姜黄 20 g, 鱼腥草 30 g, 泽泻 24 g, 三七 3 g, 芍药 20 g, 山茱萸 30 g) 称取药材, 由安徽中医药大学神经病学研究所附属医院基础实验室按大黄后下标准, 采用水煎法制备药液, 将中药置于煎药锅内, 并加入蒸馏水 200 mL, 煮沸后加入大黄, 再以文火煎 30 min, 经纱布滤过后置玻璃烧杯中, 药渣再加入蒸馏水 200 mL, 重复煎煮过滤。最后把 2 次滤液合并, 文火浓缩至 150 mL, 冷却后倒入棕色瓶内, 并于 4 °C 冰箱保存备用; 丁苯酞由石药集团恩必普药业有限公司提供, 批号 061102, 每 0.1 g 溶于 12.5 mL 食用麻油中, 配成混悬液, 放入棕色瓶内置 4 °C 冷藏箱中备

用。基础培养基, DMEM/F12(美国 Gibco 公司, 批号分别为 2015-0504, NAG1429); 胎牛血清(美国 Hyclone 公司, 批号 GZE124); 兔抗 Cyt C, 兔抗 Caspase-9, 兔抗 Caspase-3 多克隆抗体及辣根过氧化物酶标记山羊抗兔免疫球蛋白 IgG(英国 Abcam 公司, 批号分别为 GR45115-12, GR54565-14, GR46235-14, GR231489-1)。

1.3 仪器 GOLD-SIM 型 CO₂ 培养箱(美国 SIM 公司), CK2 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司), LD4-8 型水平低速离心机(北京医用离心机厂), SW-CJ-1F 型洁净工作台(苏净集团安泰公司), GZY-P20-B 型超纯水系统(湖南科尔顿水务有限公司), LDZX-50KBS 型立体压力蒸气灭菌锅(上海申安医疗器械厂), QT-2A 型涡旋混合器(上海琪特分析仪器有限公司)。

2 方法

2.1 含药血清制备及保存 30 只家兔适应性喂养 3 d 后, 随机分为 3 组, 空白组、肝豆汤改良方组和丁苯酞组, 每组各 10 只。空白组给以生理盐水 4.5 g·kg⁻¹·d⁻¹ 灌胃(*ig*), 肝豆汤改良方组给予中药浓煎液 4.5 g·kg⁻¹·d⁻¹ *ig* (含生药量 2.2 g·mL⁻¹), 丁苯酞组给以丁苯酞混悬液 4.5 g·kg⁻¹·d⁻¹ *ig*, 每日 2 次, 连续 10 d。末次 *ig* 禁食 12 h 后, 25% 乌拉坦(5 mL·kg⁻¹) 麻醉, 无菌条件下腹主动脉采血, 室温静置 2 h, 让血清充分析出, 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 吸取上层血清以 4 °C, 5 000 ×*g* 离心 30 min 后再取上清液, 然后 0.22 μm 滤器过滤除菌后置 -20 °C 下保存备用。

2.2 细胞培养 原代分离提取 DL, TX 乳鼠神经元, 培养基为含 2% B27 培养液的 Neurobasal 培养液(含 10% 进口胎牛血清和 1% 青链霉素), 置于 37 °C 5% CO₂ 培养箱, 相对饱和湿度的条件下培养, 细胞呈单贴壁生长, 24 h 后给细胞半量换培养基。

2.3 含药血清处理浓度、时间筛选 取对数生长期的 DL 乳鼠及 TX 乳鼠神经元, 弃原培养基, 磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 遍, 加含不同体积浓度(5%, 10%, 15%, 20%) 肝豆汤改良方兔血清的 2% B27 的 Neurobasal 作用乳鼠神经元 6, 12, 24, 48 h。弃培养基, PBS 洗 2 遍, 0.25% 胰酶 37 °C 消化 50 s, 加含 10% FBS 的 DMEM/F12 终止消化, 1 800 r·min⁻¹ 离心 5 min。加 PBS 重悬, 置冰浴内, 超声细胞粉碎仪粉碎细胞, 得到细胞混悬液, 原子吸收分光光度法检测细胞内铜含量, 实验重复 3 次。按照下列公式计算。

相对铜含量 = 实验组铜含量 / 正常组铜含量

2.4 实验分组及药物处理 实验分别设正常组、模

型组、肝豆汤改良方组、丁苯酞组; 正常组为正常 DL 乳鼠神经元, 用完全培养基培养, 模型组为 TX 乳鼠神经元, 用 10% 空白兔血清培养, 肝豆汤改良方组为 TX 乳鼠神经元, 加含不同体积浓度(5%, 10%, 15%, 20%) 肝豆汤改良方兔血清的培养基继续培养, 丁苯酞组为 TX 乳鼠神经元, 用 10% 含丁苯酞兔血清培养。

2.5 神经元内微量元素含量测定 取对数生长期的 DL 乳鼠及 TX 乳鼠神经元, 弃原培养基, PBS 洗 2 遍。正常组加含空白兔血清的培养基继续培养, 模型组加完全培养基继续培养, 肝豆汤改良方组加含不同体积浓度(5%, 10%, 15%, 20%) 肝豆汤改良方兔血清的培养基继续培养, 丁苯酞组用 10% 含丁苯酞兔血清培养, 24 h 后按 2.3 项方法采用原子吸收分光光度法检测肝细胞内铜、锌、铁含量。

2.6 流式细胞仪检测细胞中 ROS 释放量的变化 取对数生长期的 DL 乳鼠及 TX 乳鼠神经元, 按 2.4 项实验分组分别加含不同药物血清的培养基于 37 °C 培养箱中继续培养 24 h, 弃去原培养液, PBS 洗 2 遍, 消化收集细胞, 无血清培养液轻柔洗 2 遍, 按照 1:1 000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA, 使其终浓度为 10 μmol·L⁻¹, 加入 1 mL 稀释好的 DCFH-DA 工作液, 置于 37 °C 培养箱内避光孵育 30 min, 每 5 min 摇晃 1 次, 无血清培养液轻柔洗 2 遍, 以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA, 流式细胞仪检测细胞中 ROS 释放量的变化。

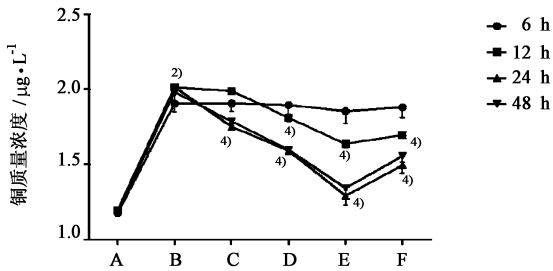
2.7 蛋白质免疫印迹(Western blot)法检测细胞中 Cyt C, Caspase-9, Caspase-3 蛋白表达的变化 取对数生长期的 DL 乳鼠及 TX 乳鼠神经元, 按 2.4 项实验分组分别加含不同体积浓度药物血清的培养基于 37 °C 培养箱中继续培养 24 h, 弃去原培养液, PBS 洗 2 遍, 消化收集细胞后裂解, 提取总蛋白, Bradford 法测定蛋白含量。取蛋白 20 μg 作电泳, 将蛋白样本转移至 NC 膜上。膜用 5% 脱脂奶粉封闭 4 h, TBST 洗 3 次, 每次 10 min, 分别加入 Cyt C, Caspase-9, Caspase-3 多克隆抗体, 4 °C 过夜。分别加入辣根过氧化物酶标记山羊抗兔免疫球蛋白 IgG, 脱色摇床摇 1.5 h, 洗涤缓冲液(TBST)洗 3 次, 每次 10 min。以 β-肌动蛋白(β-actin)作为内参。凝胶成像系统拍照, 并扫描分析各条带的光密度, 以 β-actin 的表达量为正常计算各组 Cyt C, Caspase-9, Caspase-3 的相对表达量。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间采用 *t* 检验, 以

$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 含药血清处理浓度、时间筛选 (原子吸收分光光度法) 采用原子吸收分光光度法检测不同浓度含肝豆汤改良方兔血清作用于 TX 乳鼠神经元不同时间点对神经元内铜含量的影响。结果显示,含肝豆汤改良方兔血清对 TX 乳鼠神经元内铜含量的影响呈现一定的量效和时效关系。在 5% ~ 15%, 随着含肝豆汤改良方兔血清作用浓度及作用时间的增加, TX 乳鼠神经元内铜含量呈现显著下降的趋势, 在 15% ~ 20% 浓度内, 随着含肝豆汤改良方兔血清作用浓度的增加, TX 乳鼠神经元内铜含量呈现一定的上升的趋势, 但仍显著低于模型组。15% 含肝豆汤兔血清作用 24 h 后 TX 乳鼠神经元内铜含量下降至接近 DL 乳鼠神经元内铜含量。因此, 选择 24 h 作为含肝豆汤兔血清作用时间, 并选取 10%、15%、20% 的含肝豆汤兔血清作为实验药物浓度。见图 1。



与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与 TX 组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$
图 1 含肝豆汤改良方兔血清作用于 TX 乳鼠神经元不同时间铜含量 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Copper in cortical neurons of TX suckling mouse, which were treated by different concentrations of rabbit serum with MGDD for different times ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表 2 含肝豆汤改良方兔血清作用于 TX 乳鼠神经元 24 h 后铜、锌、铁含量 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Cu, Zn, Fe in cortical neurons of TX suckling mouse, which were treated by different concentrations of rabbit serum with MGDD for 24 h ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	体积浓度/%	Cu	Zn	Fe
正常	-	1.20 ± 0.20	6.95 ± 0.29	6.67 ± 0.40
模型	-	2.01 ± 0.02 ²⁾	2.85 ± 0.26 ²⁾	8.20 ± 0.31 ²⁾
肝豆汤改良方	10	1.75 ± 0.01 ⁴⁾	3.16 ± 0.53	5.34 ± 0.45 ⁴⁾
	15	1.59 ± 0.02 ⁴⁾	4.70 ± 0.42 ⁴⁾	5.74 ± 0.46 ⁴⁾
	20	1.29 ± 0.06 ⁴⁾	5.88 ± 0.54 ⁴⁾	4.31 ± 0.47 ⁴⁾
丁苯酞	10	1.49 ± 0.05 ⁴⁾	2.91 ± 0.52	5.77 ± 0.26 ⁴⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与 TX 组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

3.4 流式细胞仪检测细胞中 ROS 释放量的变化 与正常组比较, 模型组荧光强度显著增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 含肝豆汤改良方兔血清作用 24 h 后, 可显著降低 ROS 的荧光强度 ($P < 0.01$), 并呈

3.2 含肝豆汤改良方兔血清对 TX 乳鼠神经元活力的影响 用 MTT 法检测不同浓度含肝豆汤改良方兔血清作用于 TX 乳鼠神经元 24 h 对神经元活力的影响。研究表明, 不同浓度的含肝豆汤改良方兔血清对 TX 乳鼠神经元活力没有相关影响。因此, 选择 24 h 作为含肝豆汤兔血清作用时间, 并选取 10%、15%、20% 的含肝豆汤兔血清作为实验药物浓度。见表 1。

表 1 含肝豆汤改良方兔血清作用于 TX 乳鼠神经元 24 h 存活率 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Cell viability in cortical neurons of TX suckling mouse, which were treated by different concentrations of rabbit serum with MGDD for 24 h ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	体积浓度/%	细胞存活率/%
模型	-	99.99 ± 0.20
干豆汤改良方	5	99.50 ± 0.48
	10	99.65 ± 0.35
	15	99.91 ± 0.11
	20	99.54 ± 0.44

3.3 含肝豆汤改良方兔血清对 DL, TX 乳鼠神经元内微量元素含量的影响 与正常组比较, 模型组细胞内铜、铁含量显著增加 ($P < 0.01$), 锌含量显著降低 ($P < 0.01$), 与模型组比较, 在 10% ~ 20% 浓度内, 含肝豆汤改良方兔血清作用于 TX 乳鼠神经元 24 h 后, 细胞内铜、铁含量显著降低 ($P < 0.01$), 锌含量显著增加 ($P < 0.01$), 并呈浓度依赖性, 表明该剂量范围内, 含肝豆汤改良方兔血清可显著降低 TX 乳鼠神经元内铜、铁含量, 显著增加细胞内锌含量。见表 2。

一定浓度依赖性。结果表明, 含肝豆汤改良方兔血清可显著降低 TX 乳鼠神经元 ROS 的释放量。见表 3。

3.5 Western blot 法检测神经元内相关蛋白的表达 与正常组比较, 模型组乳鼠神经元内 Cyt C,

表 3 含肝豆汤改良方兔血清作用于 TX 乳鼠神经元 24 h 后 ROS 荧光强度变化 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Fluorescence intensity of Ctr1 in cortical neurons of TX suckling mouse, which were treated by different concentrations of rabbit serum with MGDD for 24 h ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	体积浓度 / %	ROS
正常	-	20.50 ± 0.92
模型	-	72.44 ± 1.46
干豆汤改良方	10	49.29 ± 0.99
	15	48.48 ± 0.58
	20	40.67 ± 0.67
丁苯酞	10	39.94 ± 0.84

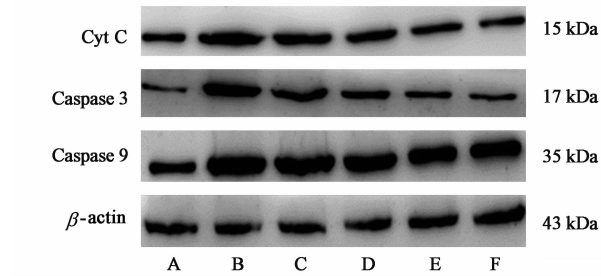
Caspase-9, Caspase-3 蛋白表达增加 ($P < 0.01$)。采用 Image J 软件对各目的条带与内参条带进行灰度比较,并作柱状图,各组间差异具有统计学意义,与模型组比较,含肝豆汤改良方兔血清组乳鼠神经元内 Cyt C, Caspase-9, Caspase-3 蛋白表达降低 ($P < 0.01$),并且 Cyt C, Caspase-9, Caspase-3 蛋白表达随含肝豆汤改良方兔血清浓度增加而降低,呈一定的浓度依赖性。见图 2,表 4。

4 讨论

WD 是铜代谢异常的遗传性疾病,临床特点以肝病、神经系统、角膜色素环 (K-F 环) 和肾脏损害为主。过量铜在中枢神经系统的沉积是引起神经、精神症状的主要原因,但铜沉积导致神经系统损伤的机制目前还不清楚,故对于其的研究显得尤为重要。因医学实验的特殊性,直接的人体实验是不被社会伦理学所接受的。因此,合适的动物模型是深入研究 WD 病的必备条件。1974 年,同系繁殖到 F68 的 DL 小鼠发生了自然突变品系, TX 小鼠由此产生。Theophilos 等^[6]发现 TX 小鼠 ATP7B 基因与人的同源性高达 82%,由于 ATP7B 基因的 A4066G 一个错义突变,使得 ATP7B 蛋白表达错位,从而影响了 Cu 离子的转运,导致高 Cu 环境时因 ATP7B 蛋白位置转移造成排铜障碍。陈曦等^[7]对 1~6 月龄 TX 小鼠铜代谢和肝损害情况研究发现, TX 小鼠出生后血清 Cu 逐渐下降,为正常组的 1/2~1/3。脑内 Cu 含量在第 3 月起较 DL 小鼠显著增高,约为 DL 小鼠的 1.5~2 倍;产生类似于 WD 的生化改变。虽然没有任何一种动物模型能完全复制 Wilson 病的全部临床特征,但是 TX 小鼠的致病基因与 Wilson 病的致病基因同源,且成年 TX 小鼠体内 Cu 大量沉积,血清 Cu 和铜蓝蛋白水平降低符合 WD 表现,而成为 WD 研究的理想动物模型之一。而 Przybylkowski 等^[8]的研究也为 TX 小鼠作为 WD 关于神经元损伤的动物模型提供了一定的依据。因此本实验选用 TX 乳鼠模型为实验对象,用于 WD 神经元内铜沉积导致脑损伤发病机制的研究。

ROS 是外源性氧化剂或细胞内有氧代谢过程中产生的具有很高生物活性的含氧化合物的总称。ROS 生成的主要部位及其作用的主要靶点位于线粒体^[9]。过量的 ROS 可引起线粒体膜脂质过氧化,线粒体通透性转换孔的开放,激发 Caspase 活化,通过内源性途径引起细胞凋亡^[10]。实验中笔者发现,含肝豆汤改良方兔血清作用于 TX 乳鼠神经元 24 h 后, TX 乳鼠神经元中 ROS 的释放量显著低于模型组,由此表明,肝豆汤改良方可降低 TX 乳鼠神经元中 ROS 的释放量,从而减少高铜产生的氧化损伤对神经元的损害。

Cyt C 是一类位于细胞线粒体内嵴上,相对分子质量为 $1.2 \times 10^4 \sim 1.5 \times 10^4$ Da 的水溶性小分子蛋白,不能通过其外膜,同时是第一种被发现的与线粒体有关的促凋亡因子。Cyt C 的释放可导致大量 ROS 的产生,反过来 ROS 的积累又导致线粒体膨



A. 正常组; B. 模型组; C. 10% 肝豆汤改良方组; D. 15% 肝豆汤改良方组; E. 20% 肝豆汤改良方组; F. 丁苯酞组

图 2 TX 乳鼠神经元内 Cyt C/Caspase 信号通路相关蛋白相对表达水平

Fig. 2 Expression of Cyt C/Caspase signaling pathway related proteins expression levels in cortical neurons of TX suckling mouse

表 4 含肝豆汤改良方兔血清对 TX 乳鼠神经元内 Cyt C/Caspase 信号通路相关蛋白相对表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of rabbit serum with MGDD on expression of Cyt C/Caspase signaling pathway related proteins expression levels in cortical neurons of TX suckling mouse ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	体积浓度 / %	Cyt C / β -actin	Caspase-3 / β -actin	Caspase-9 / β -actin
正常	-	0.84 ± 0.04	0.55 ± 0.01	0.96 ± 0.03
模型	-	2.31 ± 0.11 ²⁾	2.13 ± 0.09 ²⁾	2.34 ± 0.024 ²⁾
干豆汤改良方	10	1.81 ± 0.01 ⁴⁾	1.69 ± 0.13 ⁴⁾	2.01 ± 0.05 ⁴⁾
	15	1.18 ± 0.02 ⁴⁾	1.19 ± 0.03 ⁴⁾	1.67 ± 0.06 ⁴⁾
	20	0.91 ± 0.07 ⁴⁾	0.89 ± 0.11 ⁴⁾	1.37 ± 0.07 ⁴⁾
丁苯酞	10	0.62 ± 0.04 ⁴⁾	0.61 ± 0.04 ⁴⁾	1.12 ± 0.01 ⁴⁾

胀,线粒体内膜非特异性孔道产生,Cyt C 从内膜脱落并释放到胞质中。这一循环加剧了 ROS 的产生,ROS 可以引起氧化应激损伤细胞,促进细胞凋亡的发生^[11-14]。通过实验笔者发现模型组 TX 乳鼠神经元内 Cyt C 蛋白表达较正常组显著增加,含肝豆汤改良方免血清作用 TX 乳鼠神经元 24 h 后,细胞内 Cyt C 蛋白表达显著降低,并呈一定的浓度依赖性。说明肝豆汤改良方可抑制神经元内 Cyt C 蛋白表达,以减少 ROS 的产生以及二者所引起的氧化损伤。

Caspase 是细胞凋亡特异性的一类蛋白酶^[15-16]。LIU 等^[17]分离出 Cyt C, Apaf 1, Caspase-9 这 3 种可诱导 Caspase-3 活化的蛋白质。此项研究成果的提出确定了细胞凋亡与线粒体在分子水平上的联系。研究发现细胞内的线粒体可释放 Cyt C, 诱导细胞凋亡,推动了凋亡机制的进一步研究^[18]。一般情况下,Caspase 合成时是以没有活性的酶原状态存在于细胞,只有在活化后才能执行功能。由实验结果可知,模型组 TX 乳鼠神经元内 Caspase-9 和 Caspase-3 蛋白表达显著高于正常组,含肝豆汤改良方免血清作用 TX 乳鼠神经元 24 h 后,细胞内 Caspase-9 和 Caspase-3 蛋白表达显著降低,并呈浓度依赖性。表明肝豆汤改良方可通过促进过量的铜排除细胞外而抑制神经元内 Caspase-9 和 Caspase-3 蛋白表达。

研究结果证实,肝豆汤改良方可显著降低 TX 乳鼠神经元内铜及铁的含量,并增加神经元锌含量。其可能机制为肝豆汤改良方可通过促进过量的铜排出细胞外从而抑制 TX 乳鼠神经元内 ROS, Cyt C, Caspase-9, Caspase-3 的表达,减轻铜负荷导致的氧化应激损伤。可见肝豆汤改良方可通过降低神经元内铜含量,进而调控 Cyt C/Caspase 信号通路达到降低高铜诱导神经元损伤的治疗效果。肝豆汤改良方可以作为治疗性药物应用于肝豆状核变性脑型患者的治疗。

[参考文献]

[1] Ala A, Walker A P, Ashkan K, et al. Wilson's disease [J]. Lancet, 2007,369(9559): 397-408.
[2] Dusek P, Roos P M, Litwin T, et al. The neurotoxicity of iron, copper and manganese in Parkinson's and Wilson's diseases [J]. J Trace Elem Med Biol,2014,5: 2-7.
[3] 杨任民,韩咏竹,胡纪源,等.肝豆状核变性[M].北京:人民卫生出版社,2015:200-205.
[4] Schilsky M L. A century for progress in the diagnosis of Wilson disease [J]. J Trace Elem Med Biol,2014, 28

(4):492-494.

[5] 丁超,王训.肝豆汤改良方调节高铜诱导神经元损伤的信号调控机制的研究[D].合肥:安徽中医药大学,2014.
[6] Theophilos M B, Cox D W, Mercer J F, et al. The toxic milk mouse is a murine model of Wilson disease [J]. Hum Mol Genet,1996,5(10):1619-24.
[7] 陈曦,王楚怀,丰岩清,等. TX 小鼠铜代谢和肝损害实验研究[J].中华肝脏病杂志,2009,17(9): 688-690.
[8] Przybykowski A, Gromadzka G, Wawer A, et al. Neurochemical and behavioral characteristics of toxic milk mice: an animal model of Wilson's disease [J]. Neurochem Res,2013,38(10):2037-2045.
[9] 易健,舒徐.活性氧对细胞凋亡和增殖的调控作用[J].基础医学与临床,2013,33(10):1341-1344.
[10] 向军军,赖菁菁,胡跃强.近3年线粒体介导细胞凋亡的研究进展[J].中西医结合心脑血管病杂志,2016,14(13):1497-1499.
[11] 李美娇,郭虹,胡利民,等.丹红注射液对脑缺血缺氧损伤的保护作用[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(17):221-224.
[12] Jazvinšćak Jembrek M, Vlaimić J, Radovanović V, et al. Effects of copper overload in P19 neurons: impairment of glutathione redox homeostasis and crosstalk between caspase and calpain protease systems in ROS-induced apoptosis[J]. Biometals, 2014,27(6): 1303-1322.
[13] DU X, ZHENG Y, WANG Z, et al. Inhibitory act of selenoprotein P on Cu⁺/Cu²⁺-induced Tau aggregation and neurotoxicity [J]. Inorg Chem, 2014, 53(20): 11221-11230.
[14] Huttemann M, Pecina P, Rainbolt M, et al. The multiple functions of cytochrome c and their regulation in life and death decisions of the mammalian cell: from respiration to apoptosis [J]. Mitochondrion, 2011,11(3): 369-381.
[15] 陈晓宇,黄仁彬.玉郎伞多糖对快速老化小鼠额叶和海马神经元 Caspase 3 表达及活性的影响[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(17):208-211.
[16] 景晶,赵金英,华冰,等.甘草总黄酮抑制硫代乙酰胺诱导肝纤维化大鼠肝组织中 TGF-β₁ 及 Caspase-3 的表达[J].中国中药杂志,2015,40(15):3034-3040.
[17] LIU X, Kim C N, YANG J, et al. Induction of apoptosis program in cell-free extracts; requirement for dATP and cytochrome c [J]. Cell,1996,90(86): 147-157.
[18] 仇万山,陈亦江.线粒体结构、功能和常用研究方法[J].国际麻醉学与复苏杂志,2007,28(3):282-285.

[责任编辑 周冰冰]