

清脑益智方含药脑脊液对缺氧复氧皮层 神经元细胞重塑相关指标的影响

秦秀德¹, 刘玉¹, 张玉莲¹, 王硕², 朱金墙², 康立源^{2*}

(1. 天津中医药大学第二附属医院, 天津 300193; 2. 天津中医药大学, 天津 300193)

[摘要] 目的: 探究清脑益智方通过促神经元突触重塑治疗血管性痴呆的机制。方法: 原代培养皮层神经元, 将神经元细胞按照 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 的密度接种于 96 孔细胞培养板, 将细胞分为正常组、缺氧复氧组、正常脑脊液组 (正常 CSF 10% 的元血清培养液)、清脑益智方 $15.7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 给药, 连续 3 d 制备的含药脑脊液高剂量组 (清脑益智方-CSF 10% 的元血清培养液)、清脑益智方含药脑脊液低剂量组 (清脑益智方-CSF 5% 的元血清培养液)、恩必普组含 $75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ig 3 d 制备的脑脊液 5% 的元血清培养液。除正常细胞组外, 其余各组均在添加相应干预措施后进行缺氧 24 h 复氧 24 h 处理。采用 ELISA 法检测细胞上清液中突触素 (synapsin, SYN)、生长相关蛋白-43 (growth associated protein-43, GAP-43)、微管相关蛋白 2 (microtubule associated protein 2, MAP-2) 等突触重塑标志物的表达。结果: 清脑益智方含药脑脊液能够促进缺氧复氧皮层神经元突触重塑相关指标 SYN, GAP-43, MAP-2 的表达, 并且清脑益智方含药脑脊液高剂量组与低剂量组的上述 3 个指标表达水平均明显高于缺氧复氧组, 且具有显著的统计学差异 ($P < 0.01$)。结论: 清脑益智方可通过 SYN, MAP-2, GAP-43 等突触重塑标志物的表达而促进神经元重塑。

[关键词] 清脑益智方; 皮层神经元; 突触重塑

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)10-0174-04

[doi] 10.11653/syfy2013100174

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130308.1040.004.html>

[网络出版时间] 2013-03-08 10:40

Effect of Qingnao Yizhi Decoction on Synaptic Remodeling Related Indexes

QIN Xiu-de¹, LIU Yu¹, ZHANG Yu-lian¹, WANG Shuo², ZHU Jin-qiang², KANG Li-yuan^{2*}

(1. The Second Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Tianjin 300193, China; 2. Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the possible mechanism of Qingnao Yizhi (QNYZ) decoction on vascular dementia (VD) through testing the effect of cerebrospinal fluid which contained Qingnao Yizhi decoction on synaptic remodeling so as to provide more scientific evidence for the clinical medication on VD patients. **Method:** The primary cultured rat cortical neurons were vaccinated in 96-well cell culture plates and the vaccination concentration was $1 \times 10^6/\text{mL}$. And the cells were divided into control group, H/R group, cerebrospinal fluid (CSF) group, high dose CSF containing QNYZ group (QNYZ-H), low dose CSF containing QNYZ group (QNYZ-L) and CSF containing butylphthalide (NBP) group (except the control group, the other groups were firstly dealt with hypoxia for 24 hours and then received reoxygenation for 24 hours). The concentration of synaptic remodeling markers such as synapsin, microtubule associated protein 2 and growth associated protein-43

[收稿日期] 20121121(013)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81202653); 全国优秀博士学位论文作者专项资金项目(201082); 中国博士后科学基金一等资助项目(20110490080)

[第一作者] 秦秀德, 博士, 博士后, 主治医师, 从事中医药防治脑病的临床与基础研究, E-mail: qinxiude@foxmail.com

[通讯作者] * 康立源, 博士, 研究员, 从事中医药防治心脑血管疾病和中药新药研究, E-mail: klyzm@163.com

of the supernatant were assayed by the ELISA way. **Result:** The concentration of synaptic remodeling markers such as synapsin (SYN), microtubule associated protein 2 (MAP-2) and growth associated protein-43 (GAP-43) of the supernatant of the QN-H, QN-L groups increased, and the three indices'level are obviously higher than these in the H/R group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Qingnao Yizhi decoction could improve the synaptic remodeling of the H/R CNC through regulating the expression of SYN, MAP-2 and GAP-43.

[**Key words**] Qingnao Yizhi decoction; cortical neuronal cell; synaptic remodeling

血管性痴呆是目前唯一可预防的痴呆类型,中医药在血管性痴呆的防治中发挥着重要的作用。张伯礼院士根据前人关于血管性痴呆的相关理论及自己多年的临床实践经验,筛选出了黄连、丹参、人参、麦冬、石菖蒲等中药,组成具有开窍益智、清脑化毒、醒神降浊、祛痰通络作用的清脑益智方^[1]。突触可塑性是近年来关于神经系统疾病的研究热点,本研究通过脑脊液药理学的方法,采用 ELISA 法检测皮层神经元(cortical neuron cell, CNC)培养上清液中突触重塑相关标志物突触素(synapsin, SYN)、生长相关蛋白-43(growth associated protein-43, GAP-43)、微管相关蛋白 2(microtubule associated protein 2, MAP-2)的含量,探讨清脑益智方对缺氧复氧皮层神经元突触重塑的影响。

1 材料

1.1 动物 大耳白家兔,体重(2 ± 0.2) kg,购自天津中医药大学实验动物中心,许可证号 SCXK(津)2010-0004;Wistar 大鼠,体重(180 ± 20) g,(购自天津中医药大学实验动物中心,许可证号 SCXK(津)2009-0004)。

1.2 药物与试剂 清脑益智方组成药物(人参 5 g,麦冬 12 g,浙贝母 12 g,黄连 6 g,石菖蒲 12 g 等),由天津中医药大学附属保健医院提供;丁基苯酞软胶囊(批号 11060211,石药集团恩必普药业有限公司)。SYN ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司),MAP-2 ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司),GAP-2 ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司)。

1.3 仪器 LB-B50L 型立式压力蒸气灭菌锅(上海华线医用核子有限公司),Primo R 台式低温冷冻离心机(德国 Heraeus 公司),小型离心机(Minispin,德国 Eppendorf 公司),BS110S 型 1/万天平,GP1200-G 型天平,德国 Sartorius 公司),-80 °C 低温冰箱(MDF-382E,日本 Sanyo 公司),-20 °C 低温冰箱(BC-163D,海尔集团),Multiskan Ascent(酶标仪,美国 Thermo 公司),3131 型三气培养箱(美国 Thermo 公司),FORMA3111 型 CO₂ 恒温培养箱(美国 Thermo 公司),7020 型全自动生化分析仪(日本日

立公司),BCM-1300A(超净工作台,苏州安泰空气技术有限公司),Nikon TE300 倒置相差显微镜(Leica dmil 公司);细胞计数板(XB-K-25,上海安信光学仪器制造有限公司)。

2 方法

2.1 试验药物制备

2.1.1 清脑益智方浸膏的制备 药物由天津中医药大学制药厂经水煎醇沉加工为 200% 的清脑益智方浓缩液,-20 °C 保存。药物具体加工处理过程:①提取药物 3 次,采用溶媒:12,10,10 倍的水,对应的提取时间:2,2,2 h;②60% 的乙醇进行浓缩醇沉;③静置 24 h;④取上清液旋转蒸发浓缩至 2:1($2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$);⑤棕色玻璃瓶分装,4 °C 冰箱保存备用。

2.1.2 丁苯酞工作液的制备 采用花生油将丁苯酞软胶囊配制为 5% 的溶液。

2.2 含药脑脊液制备

2.2.1 大耳白家兔分组及给药 采用随机数字法将 20 只大耳白家兔随机分为空白对照组 5 只,清脑益智方组 10 只,丁基苯酞组 5 只。清脑益智方组和恩必普组 ig 剂量如下(ig 剂量均为人类服用量的 10 倍):清脑益智方组: $15.7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,bid;丁基苯酞: $75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,bid,连续给药 3 d。

2.2.2 脑脊液采集 末次给药后 1.5 h 取脑脊液,然后 $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,0.22 μm 滤膜进行过滤除菌后 -40 °C 冰箱储存备用。

2.3 神经元原代培养 取怀孕 16 d 的 Wistar 大鼠,颈椎脱臼处死,70% 乙醇浸泡 3~5 min,在无菌条件下,取出胚胎大脑皮层,剔除脑膜及大血管。将皮质剪碎约 1 mm^3 大小,加入体积分数 0.25% 胰蛋白酶消化,37 °C,5 min。立刻加入含 10% 新生小牛血清(FBS)的 DMEM/F12 培养液终止消化,并将组织完全吹散。经 75 μm 筛网过滤,收集滤液; $800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,离心 10 min,弃上清,收集沉淀,用含体积分数 10% FBS 的 DMEM/F12 培养液重新悬浮,调整细胞密度 $1 \times 10^6/\text{mL}$,接种于预先涂有体积分数 0.01% 多聚赖氨酸的培养板中。4 h 后,置换为无血清 DMEM/F12 培养液(含体积分数 0.02% B-27,

100 U·mL⁻¹青霉素,100 U·mL⁻¹链霉素)。以后,每 2 d 半量换液 1 次。细胞生长至 7 d 时,用于实验。

2.4 分组及给药 取接种于 96 孔板的 CNC,每组设平行 6 孔,另设正常培养组,各组处理方案如下:正常对照组(N-C):置换无血清培养液继续培养 48 h,不做 H/R 处理;缺氧复氧组(H/R):置换无血清培养液,将培养板放入体积分数分别为 94% N₂,5% CO₂,1% O₂ 的三气培养箱缺氧孵育 24 h,再于体积分数分别为 95% 空气,5% CO₂ 条件下复氧孵育 24 h;正常脑脊液组(N-CSF):置换含正常大耳白家兔脑脊液 10% 的无血清培养液,细胞培养板缺氧复氧处理同缺氧复氧组;清脑益智方含药脑脊液高剂量组(QN-H):置换含清脑益智方含药脑脊液 10% 的无血清培养液,细胞培养板缺氧复氧处理同缺氧复氧组;清脑益智方含药脑脊液低剂量组(QN-L):置换含清脑益智方含药脑脊液 5% 的无血清培养液,细胞培养板缺氧复氧处理同缺氧复氧组;丁基苯酞组(NBP):置换含丁基苯酞含药脑脊液 5% 的无血清培养液,细胞培养板缺氧复氧处理同缺氧复氧组。

2.5 SYN,MAP-2,GAP-43 蛋白表达 吸取各组上清液,1 000 r·min⁻¹离心 10 min。将 50 μL 对照品,

50 μL 样品加入相应反应孔,立即加入 50 μL 的生物素标记的抗体,混匀,封板,37 °C 温育 1 h,洗板 3 次,每孔加入 60 μL 的亲合链霉素-HRP,封板,37 °C 温育 30 min,洗板 3 次,每孔加入底物 A,B 各 50 μL,混匀 30 s,封板,37 °C 避光温育 10 min,每孔加入终止液 50 μL,立即于 450 nm 处检测。根据标准曲线方程计算浓度。

2.6 统计学处理与分析 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 软件包进行数据处理,组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

清脑益智方含药脑脊液对缺氧复氧损伤神经元 SYN,MAP-2,GAP-43 蛋白表达的影响 经测定 SYN,GAP-43,MAP-2 标准曲线,根据标准曲线算得的 SYN,GAP-43,MAP-2 浓度如表 1 所示。结果表明,H/R 组 SYN,GAP-43,MAP-2 蛋白表达均较正常组显著降低($P < 0.05$),GAP-43 较正常组显著增加($P < 0.05$);与缺氧复氧模型组比,清脑益智方高、低剂量组及丁基苯酞组含药脑脊液均可显著增加 SYN,GAP-43,MAP-2 蛋白表达($P < 0.05$)。

表 1 清脑益智方含药脑脊液对 H/R 神经元 SYN 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

ng·L⁻¹

组别	脑脊液/%	SYN	GAP-43	MAP-2
正常	-	358.69 ± 9.45	44.37 ± 3.63	224.32 ± 7.57
缺氧复氧	-	318.25 ± 11.06 ¹⁾	50.07 ± 2.57 ¹⁾	161.89 ± 6.04 ¹⁾
正常-CSF	10	332.75 ± 6.19	55.79 ± 2.66	168.23 ± 6.66
清脑益智-CSF	10	443.19 ± 10.04 ²⁾	74.26 ± 2.89 ²⁾	200.82 ± 10.86 ²⁾
	5	408.72 ± 9.85 ²⁾	64.06 ± 2.56 ²⁾	197.28 ± 8.84 ²⁾
丁基苯酞-CSF	5	387.22 ± 9.54 ²⁾	64.48 ± 1.33 ²⁾	197.30 ± 6.37 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与缺氧复氧组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

突触可塑性指突触连接在结构和功能上的修饰,是神经系统生长发育、损伤修复及学习记忆等活动的神经生物学基础^[2]。Syn,GAP,MAP-2 等是关于神经元重塑的常用的分子标志物。Syn-I 是突触囊泡膜蛋白的主要成分之一,参与突触的形成和递质的运输,也是突触发育的标志性蛋白^[3]。GAP-43 是 20 世纪 80 年代初,Skene 等人几乎同时由再生兔外周神经等组织中获得,是一种神经组织特异性磷酸蛋白质,为神经组织所固有,其对神经纤维生长、发育、再生以及突触功能维持和递质释放都起重要作用。它作为轴突再生的标志物,在神经元发育和轴突生长时高水平表达,它的表达增加意味着轴

突的发芽增加。GAP-43 与神经细胞迁移,损伤后再生,突触的可塑性等有密切的关系^[4]。MAP-2 为神经细胞骨架成分,主要存在于神经细胞的树突和胞体中,MAP-2 的表达对于树突的分化是必需的,其参与了神经元和非神经元细胞突起生长以及神经元极性的形成^[5],对神经元的发育、分化、重塑、细胞结构的维持、神经元突起的生长及线粒体的轴突转运具有重要意义。因此,MAP-2 被认为是神经生长和修复相关蛋白,是研究神经再塑的分子标志物^[6]。

研究团队前期的研究工作表明,清脑益智方具有改善血管性痴呆患者记忆力,提高认知功能,恢复异常的行为学等作用;有增强脑代谢,促进受损神

神经元的修复,提高红细胞的变形能力,逆转脑内单胺类神经递质的异常改变,保护脑神经元的超微结构等作用^[7-8]。脑脊液药理学在神经系统疾病研究中的应用备受瞩目,国内有学者对脑脊液的规范使用进行了探讨^[9]。以含药脑脊液代替含药血清观察作用于中枢神经系统药物特别是中药复方避免血清中复杂成分的干扰,更能体现有效成分的药理作用,增加有效成分研究的针对性^[10]。本实验的研究结果表明,清脑益智方含药脑脊液能够促进缺氧复氧皮层神经元突触重塑相关指标 SYN, GAP-43, MAP-2 的表达,并且清脑益智方含药脑脊液高剂量组与低剂量组的上述 3 个指标表达水平均明显高于缺氧复氧组,且具有显著的统计学差异($P < 0.01$)。清脑益智方含药脑脊液对上述 3 个指标的影响呈现一定的剂量量效依赖关系。由此表明,清脑益智方含药脑脊液能够提高缺氧复氧皮层神经元培养液中 SYN, GAP-43, MAP-2 等神经元突触重塑相关标志物的表达,促进神经元突触重塑。

[参考文献]

- [1] 王永炎. 老年性痴呆辨治[J]. 中国医药学报,1994,9(2):49.
- [2] Alkomiet Hasan, Michael A Nitsche, Bettina Rein, et al. Dysfunctional long-term potentiation-like plasticity in schizophrenia revealed by transcranial direct current stimulation[J]. Behavioural Brain Research,2011,224(1):15.
- [3] Bonanom I D, Menegon A, Miccio A, et al. Phosphorylation of synapsin-I by cAMP-dependent protein kinase controls synaptic vesicle dynamics in developing neurons [J]. J Neurosci, 2005, 25(32):7299.
- [4] Madura T, Yamashita T, Kubo T, et al. Changes in mRNA of SlitRobo GTPase-activating protein 2 following facial nerve transection[J]. Brain Res Mol Brain Res, 2004,123:76.
- [5] Zhao J, Ma Y, Qi J. Expression of cytoskeleton and apoptosis related genes after cerebral infarction [J]. Neurol Res,2006,28(1):71.
- [6] Dehmelt L, Halpain S. The MAP-2/Tau family of microtubule associated proteins[J]. Genome Biol,2005,6(1):204.
- [7] Zhang Jun-ping, Li Ling, Chen Xiao-yu, et al. Effects of a traditional Chinese medicine, Qing Nao Yi Zhi Fang, on glutamate excito-toxicity in rat fetal cerebral neuronal cells in primary culture[J]. Neurosci Lett,2000,18,290(1):21.
- [8] 张军平,张伯礼,王永炎,等. 清脑益智方药血清在缺氧培养条件下对人胚大脑神经细胞的影响[J]. 中国中医基础医学杂志,2002,8(8):17.
- [9] 张启春,寇俊萍,朱丹妮,等. 脑脊液药理实验条件规范化初探 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(8):10.
- [10] 张启春,王秋娟,寇俊萍,等. 当归芍药散防治老年期痴呆的物质基础与作用机制研究 VI [J]. 中国实验方剂学杂志,2005,11(5):55.

[责任编辑 聂淑琴]

欢迎订阅 2013 年《中国中医药信息杂志》

《中国中医药信息杂志》是由国家中医药管理局主管、中国中医科学院中医药信息研究所主办的中医药学术期刊。本刊立足于行业报道的前沿,关注相关的政策动态,跟踪报道中医药重大课题,及时分析报道中医药的新政策、新技术、新发明、新成果、新疗法,努力使信息的选择与表达方式能够充分体现中医药发展水平,为广大读者提供一流的信息服务。

《中国中医药信息杂志》1994 年创刊,2002 年,被中国科学技术信息研究所的“中国科技论文统计源期刊”收录,成为中国科技核心期刊。随着期刊影响力的不断提升,已被波兰《哥白尼索引》、美国《化学文摘》、美国《乌利希期刊指南》、《世界卫生组织西太平洋地区医学索引》及英国《农业与生物科学研究中心文摘》、英国《全球健康》等国际检索系统收录。

《中国中医药信息杂志》是中医药行业一本独具特色的学术期刊,其内容较全面地反映了我国中医药发展水平。主要栏目有:中医动态、中医药发展论坛、专题论坛、改革与管理、中医药信息学、研究与进展、论著、实验研究、流行病学调查、质量标准研究、制剂与工艺、中药研究与开发、临床报道、专家经验、临证心得、思路与方法、中医教育、医院药学等。

《中国中医药信息杂志》为月刊,大 16 开国际开本,112 页,国内外公开发行,每册定价 10 元,全年 120 元。国内邮发代号:82-670;国外代号:M4564。也可直接汇款至本刊编辑部订阅。地址:北京市东直门内南小街 16 号《中国中医药信息杂志》编辑部 邮编:100700 电话:010-64014411-3278 E-mail:Lxx@mail.cintcm.ac.cn