

加味温胆汤含药脑脊液抗 A β 细胞毒性作用 及其机制的实验研究

胡亚萍, 王 平*, 胡永年, 刘 玲, 孔明望, 石和元
(湖北中医学院老年医学研究所, 湖北 武汉 430061)

[摘要] 目的: 采用脑脊液药理学的方法探讨加味温胆汤治疗 AD 的作用机制。方法: 运用体外细胞培养的方法, 观察加味温胆汤含药脑脊液对 A β_{25-35} 诱导的 NG108-15 细胞损伤的影响。结果: 模型组 pJNK 和 p53 的表达均增高, 经治疗后均显著降低($P < 0.01$), 细胞被阻滞在 S 期。结论: 加味温胆汤含药脑脊液神经保护作用与下调 pJNK 和 p53 的水平有关。

[关键词] 加味温胆汤; 脑脊液; 阿尔茨海默病; 信号转导

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)07-0026-03

Cerebrospinal Fluid Containing Modified Wendan Decoction for Protection Against β -amyloid₂₅₋₃₅-induced Injury in NG108-15 Cells

HU Ya-ping, WANG Ping*, HU Yong-nian, LIU Ling, KONG Ming-wang, SHI He-yuan
(Gerontological Research Center of Hubei Traditional Chinese Medicine Institute, Wuhan 430061, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effective mechanism of Modified Wendan Decoction in treating AD with

[收稿日期] 2006-11-30

[基金项目] 国家中医药管理局项目(04-05JP41)

[通讯作者] * 王平, Tel: (027) 68890008; E-mail: pwang54@yahoo.com.cn

“Cerebrospinal Fluid Pharmacology”. **Methods:** NG108-15 cells were cultured in vitro detecting the action of Modified Wendan Decoction for protection against $A\beta_{25-35}$ -induced injury in NG108-15 cells. **Results:** Both of p-JNK and p53 are obviously up-regulated in the model group and both are dose-dependently down-regulated after treated ($P < 0.01$). The cells are arrested in S phase. **Conclusion:** The JNK signal pathway involved in the cell apoptosis process induced by the $A\beta_{25-35}$ fragment, Cerebrospinal fluid containing Modified Wendan Decoction can down-regulate the level of p-JNK and p53, promote cells transferring from S phase to G_2 phase. It can neutralize the cytotoxicity to some degree. Its possible mechanism maybe relevant to the activation of JNK signal pathway and down-regulation of p53.

[**Key words**] Modified Wendan Decoction; cerebrospinal fluid; alzheimer's disease; signal pathway

阿尔茨海默病的病理机制目前还不明确, 由 $A\beta$ 沉积所致的老年斑是 Alzheimer's Disease (AD) 大脑的一个重要病理特征, $A\beta$ 已被证实可以导致神经细胞的死亡, 这也就意味着防止神经细胞的损伤将会是延缓 AD 病程的一条较好的途径^[1]。加味温胆汤是多年来被临床证实有效的用于治疗 AD 的方剂。以往的研究表明, 加味温胆汤可以调节 SAM-P/10 大鼠脑内兴奋性氨基酸和抑制性氨基酸的平衡, 改善老化痴呆大鼠的记忆功能^[2]。此次实验是通过 $A\beta_{25-35}$ 体外诱导细胞凋亡, 采用脑脊液药理学的方法^[3], 从信号转导的角度探讨氨基末端激酶通路是否介导了 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 NG108-15 细胞的凋亡, 以及同为 JNK 底物和细胞周期重要调节因子的 p53, 它一旦被激活, 会给细胞周期带来怎样的影响。

1 材料

1.1 实验动物 清洁级大耳白家兔 12 只, 体重 (2.5~3) kg, 由华中科技大学同济医学院动物中心提供。

1.2 试剂 NG108-15 细胞购于中国典型培养物储藏中心, 胎牛血清购于武汉三利公司, $A\beta_{25-35}$ 、DMEM、多聚赖氨酸购于 Sigma 公司, 鼠抗 p-JNK 抗体购于美国 Santacruz 公司, JNK 抑制剂 SP600125 购于上海康成公司, 免疫组化试剂盒购于武汉博士德公司。

1.3 药物 加味温胆汤由何首乌、茯苓、枳实、半夏、竹茹、竹节参、石菖蒲等药组成。加水煎煮 30 min, 药渣同法加水再煎, 两煎混合过滤并加热浓缩至含生药 2.2 g/mL, 4℃保存。

2 方法

2.1 脑脊液的制备 动物被随机分为两组, 分别给予加味温胆汤和生理盐水灌胃 7 d, 10 mL/次, 2 次/d。末次给药后 1 h 内用水合氯醛将给药组白兔麻醉, 1.2 mL/kg, 在无菌条件下用 7 号注射针头从枕骨

大孔处垂直进针, 抽取清亮脑脊液, -70℃保存, 空白组同样处理所得为空白脑脊液。

2.2 NG108-15 细胞的培养 细胞以 1×10^6 的密度接种于含 10% 胎牛血清、100 u/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素的 DMEM 培养基中, 在 37℃、体积分数为 5% 的 CO_2 培养箱中培养, (3~4) d 传代 1 次。

2.3 AD 细胞模型的建立与分组 $A\beta_{25-35}$ 溶解于双蒸水中, 配置成 50 μmol/L 的母液, 置于 37℃温箱中老化 4 d。细胞被置于终浓度为 5 μmol/L 的 $A\beta_{25-35}$ 中作用 24 h 用以建立 AD 细胞模型。然后分别给予终浓度分别为 5%、10%、20% 的含药脑脊液继续处理 24 h。另外设立两个对照组, 一个是空白对照组, 仅给予 10% 空白脑脊液处理, 另一个 JNK 抑制剂 SP600125 组, SP600125 溶于 DMSO 中, 在加入 $A\beta_{25-35}$ 之前细胞先用 25 μmol/L 的 SP600125 处理 30 min 用以中断 JNK 信号转导通路。

2.4 检测指标

2.4.1 细胞免疫化学染色法(ABC 法) 检测 JNK 及 p53 根据武汉博士德公司提供的 SABC 免疫组化试剂盒说明书进行操作。首先盖玻片需用 1% 多聚赖氨酸进行处理, 细胞依次经 5 μmol/L 的 $A\beta_{25-35}$ 及药物处理 48 h 后, 用 4% 的多聚甲醛固定, 再依次经过 0.1% 的 Triton, 3% H_2O_2 , 5% 的血清封闭液处理后, 加入一抗为 p-JNK (1:40) 或 p53 (1:200) 抗体进行孵育, DAB 染色, 苏木素复染, 常规脱水封片。取 10 个视野计算阳性率, 细胞核呈棕褐色的为阳性细胞。

2.4.2 细胞周期 采用流式细胞仪进行分析, 细胞经过离心收集并用 PBS 冲洗, 加入 70% 的冰乙醇 4℃过夜, PBS 洗后, 加入 0.5 mL PI 染液避光染色 20 min, 300 目尼龙网过滤后上机检测, 每个样本检 10 000 个细胞。

2.5 统计学处理 所有的结果均以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 统计分析采用 t 检验, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

3 结果

3.1 加味温胆汤含药脑脊液对 p-JNK 和 p53 表达的影响

表 1 各组免疫组化细胞染色阳性率分析

分组	含药脑脊液 终浓度(%)	p-JNK 阳性 细胞率(%)	p53 阳性 细胞率(%)
空白组	—	9.50 ± 3.92 ¹⁾	7.70 ± 2.87 ¹⁾
模型组	—	57.30 ± 19.74	69.71 ± 30.13
加味温胆汤	5	33.20 ± 20.21 ^{1,2)}	39.90 ± 16.40 ^{1,2)}
加味温胆汤	10	29.60 ± 13.66 ^{1,2)}	37.50 ± 14.74 ^{1,2)}
加味温胆汤	20	17.40 ± 7.35 ^{1,3)}	17.90 ± 10.15 ^{1,3)}
SP600125 组	—	11.00 ± 4.90 ¹⁾	9.10 ± 1.45 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$;与 SP600125 组比较²⁾ $P < 0.01$ ³⁾ $P < 0.05$

如表所示,模型组 p-JNK 和 p53 的表达明显高于其它各组, ($P < 0.01$),低、中剂量组与 SP600125 组之间存在极显著差异,高剂量组与 SP600125 最接近但仍有显著差异,SP600125 组与空白组之间差异无统计学意义。

3.2 加味温胆汤含药脑脊液对细胞周期的影响

表 2 各组细胞周期分布(%)

分组	含药脑脊液 终浓度(%)	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
空白组	—	41.88	42.00	16.12
模型组	—	49.11	50.89	0.00
加味温胆汤	5	40.35	57.40	2.24
加味温胆汤	10	40.36	56.09	3.55
加味温胆汤	20	33.85	55.11	11.04
SP600125 组	—	32.37	52.98	14.65

数据表明细胞被阻滞在 S 期,在 G₂/M 期中,模型组细胞几乎为零,低剂量组和中剂量组可见少量,其他 3 组则有不同程度的升高。

4 讨论

加味温胆汤是在温胆汤的基础上根据 AD 患者共有的肾虚痰阻特点化裁而成的,它具有补肾化痰的功用,可以改善和稳定 AD 患者的某些临床症状。此次的研究是在体外再次证实了它对 A β_{25-35} 神经毒性的拮抗作用。

JNK 是丝裂原激活的蛋白激酶中的一员,可以被细胞因子及环境应激所激活,参与很多信号通路的转导,包括凋亡。活化的 JNK 可以使 p53 磷酸化。

根据细胞免疫组化染色的结果来看, p-JNK 的变化都伴随着 p53 的改变,模型组的阳性率最高,而 JNK 被 SP600125 阻断后,它们的表达均显著下降,说明 JNK 介导了细胞的凋亡并且伴随着 p53 的活化。SP600125 组与空白组之间差异无统计学意义,但还不能肯定地说在 A β_{25-35} 诱导的细胞凋亡过程中, JNK 就是唯一的通路,只能说在众多凋亡的机制中它起了很大的作用,因为免疫细胞化学在定量上有它的局限性。尽管给药的 3 组阳性率下降呈现出了剂量依赖性,但是高剂量组与 SP600125 组之间还存在显著差异,这说明神经细胞受损后很难完全恢复到从前,这其中还存在着不为我们所知的机制,同时也提示我们对 AD 的干预应在 A β 沉积以前。

细胞一旦受损,它立即引发细胞的应激反应,比如启动 p53 的监控功能,这个功能在受损的细胞中得到加强,它使得一些无法修复的细胞进入细胞凋亡。当细胞经药物处理后,细胞得到部分修复, p53 的这一功能便削弱了,从而使得部分停留在 S 期的细胞转向 G₂ 期。上述实验结果也验证了此点, p53, 它既是 JNK 下游的一个底物,同时又是细胞周期的重要影响因素。

此次实验揭示了加味温胆汤治疗 AD 的机制与它的神经元保护功能有部分关系,而这种保护作用很大程度上是和 JNK 信号转导途径的激活和 p53 表达的下降分不开的。

[参考文献]

- [1] Longo FM, Massa SM. Neuroprotective Strategies in Alzheimer's Disease. NeuroRx[J]. 2004, Jan, 1(1): 117-127.
- [2] 王平,刘玲,张六通,等.加味温胆汤对 SAM-P/10 老化痴呆鼠三个脑区递质氨基酸的影响[J].中国实验方剂学杂志,2001,7(4):24.
- [3] 梅建勋,张伯礼,陆融.中药脑脊液药理学方法的建立[J].天津中医药,1999,16(6):25.