

地黄饮子对海马神经元 AD 模型细胞凋亡的调控作用

谢 宁, 邹纯朴, 牛英才, 宋 琳
(黑龙江中医药大学, 黑龙江哈尔滨 150040)

摘要: 目的: 探讨古方地黄饮子含药脑脊液对 β -淀粉样蛋白(A β_{25-35}) 所致海马神经细胞 AD(Alzheimer's Disease) 模型凋亡基因 bcl-2, bax 和 caspase-3 表达的影响。方法: 运用中药脑脊液药理学的方法把体外培养成熟的大鼠海马神经细胞分为空白组、模型组、VitE 对照组、地黄饮子脑脊液低、中、高剂量组。6 组分别加入正常培养液、正常脑脊液、VitE 脑脊液、中药脑脊液低、中、高剂量, 继续孵育 2h。然后除空白组加入等量培养液外, 其它各组加入经老化处理的 A β_{25-35} (终浓度为 10 μ mol/L) 共同孵育 24h, 胰蛋白酶消化, 离心收集细胞, 提取总 RNA。应用 RT-PCR 和琼脂糖凝胶电泳方法测定 bcl-2, bax 和 caspase-3 基因的表达。结果: 地黄饮子脑脊液能剂量依赖性地增强受损海马神经元 bcl-2 基因的表达, 降低 bax 和 caspase-3 基因的表达。说明对 A β_{25-35} 所致离体海马神经细胞凋亡有抑制作用, 其作用机理可能与地黄饮子升高 bcl-2/bax 的比值, 抑制线粒体释放细胞色素 C, 控制 caspase-3 的激活有关。

关键词: 地黄饮子; 脑脊液; 老年性痴呆; 海马神经元; 细胞凋亡

中图分类号: R285.6 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2004)03-0029-04

Effect of Decoction of Rehmanniae on the Expression of Apoptosis of Hippocampal Neurons Model of Alzheimer Disease

XIE Ning, ZOU Chun-pu, NIU Ying-cai, SONG Lin

(Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

Abstract: Objective: To investigate effects on the expression of apoptosis gene bcl-2, bax and caspase-3 of Decoction of Rehmanniae on cultured hippocampal neurons injury induced by β -amyloid₂₅₋₃₅ protein (A β_{25-35}). Methods: Cultured hippocampal neurons were divided into 6 groups by using the cerebrospinal fluid with Traditional Chinese medicine normal group, model group, vitamin E group, low dose of TCM group, moderate dose of TCM group and high dose of TCM group. Six groups were respectively added to normal cultured fluid, normal cerebrospinal fluid, VitE cerebrospinal fluid, low dose of TCM cerebrospinal fluid, moderate and high dose of cerebrospinal fluid, hatched 2 hours. The normal group was added to the same dose of cultured fluid and other groups was added to A β_{25-35} dealt with aging (the final concentration is 10 μ mol/L). and then six groups were hatched 24 hours together. At last neurons were digested by trypsin, centrifuged, collected and then distilled the total RNA. The expression of bcl-2, bax and caspase-3 by using the methods of RT-PCR and agarose gelelectrophoresis were measured. Results: The group of Decoction of Rehmanniae cerebrospinal fluid can dose dependently enhance the expression of bcl-2 gene, reduce the expression of bax and caspase-3 gene injured hippocampal neurons. It showed that Decoction of Rehmanniae cerebrospinal fluid had the inhibitory effects on apoptosis of cultured Hippocampal neurons injury induced by A β_{25-35} . The mechanism may associate that Decoction of Rehmanniae enhanced the ratio of bcl-2/bax, restrained mitochondrial from releasing cytochrome c, controlled the activation of caspase-3.

Key words: Decoction of Rehmanniae; Cerebrospinal fluid; Alzheimer disease; Hippocampal neurons; Apoptosis

老年性痴呆(Alzheimer's disease)是一种神经退行性疾病,其病理特征是神经元纤维缠结、老年斑

产生和神经元丢失。其中细胞凋亡是神经元丢失的重要途径,并受 caspase 家族和 bcl-2 家族调控。本

文按照中药脑脊液药理学的方法^[1]用经老化处理的 A β_{25-35} 作用于体外培养的海马神经细胞, 造成体外 AD 模型, 观察地黄饮子脑脊液对 A β_{25-35} 所致 AD 模型细胞凋亡的调控作用, 并为阐明 A β_{25-35} 所致细胞凋亡的机制及 AD 的防治提供理论依据。

1 材料

1.1 动物 新生 wistar 大鼠, 出生 24h 以内, 由哈尔滨医科大学实验动物中心提供。大耳白兔, 由黑龙江中医药大学实验动物中心提供。

1.2 主要药品及试剂 A β_{25-35} 青霉素/链霉素、MTT、DMSO 购自 Sigma 公司; DMEM 培养基、Hepes、胰蛋白酶购自 Gibco 公司; 胎牛血清购自 Hyclone 公司; 阿糖胞苷购自上海华联制药厂; 多聚赖氨酸为武汉博士德公司产品; VitE 购自大连南美制药有限公司, 中药饮片由黑龙江中医药大学提供; 逆转录试剂盒购自 Superscrip 公司; 引物、DNA maker 由上海博亚公司提供。

1.3 主要实验仪器 PCR 扩增仪 (AMPLIFY GeneStar 9625), 水平电泳仪 (TJ-200 上海), 紫外凝胶成像仪 (Tanon GLS-2010 上海)。

2 方法

2.1 海马神经元的原代培养^[2] 出生后 24h 的 wistar 大鼠, 在无菌条件下, 取出大脑, 在 D-hanks 液中小心去除脑脊膜、小脑, 分离出海马并剪碎成小块, 加 0.2% 胰蛋白酶 37℃ 消化 5min, DMEM 终止消化后吹打成细胞悬液, 200 目尼龙网过滤, 1200r/min 离心 5min, 去上清, 沉淀用培养液吹打成细胞悬液, 胎盘蓝染色进行死活细胞记数, 调整细胞密度至 1.0×10^6 /ml, 接种于预先涂有 0.005% 多聚赖氨酸的培养瓶中, 每瓶加培养液 5ml, 5% CO₂/95% 空气, 37℃, 饱和湿度。24h 后全换液, 以后每 3d 半量换液, 3d 后培养液中加入 2.5ml/L 阿糖胞苷, 以抑制非神经细胞生长。培养第 10-12d 后, 观察神经细胞体呈菱形或梭形, 细胞伸出的突起互相连接成网状, 胞体饱满, 胞体四周生长晕明显, 可以开始实验。

2.2 脑脊液的收集 2kg 重大耳自家兔, 适应性喂养 3d, 分别灌胃给服中药水煎剂 (含生药比为 2:1) 和 VitE (用吐温-80 助溶于蒸馏水中, 浓度为 2%), 服药 1h 后巴比妥钠静脉麻醉, 迅速于无菌条件下在枕骨大孔处垂直进针, 抽取 200 μ l 脑脊液, 并补充同体积的生理盐水。以上步骤连续 3d, 把 3d 获得的同一家兔的脑脊液混合, -70℃ 冻存备用。

2.3 实验分组及 AD 模型的建立 把成熟的海马神

经元分别设立 6 个组: 空白组、模型组、VitE 对照组、地黄饮子脑脊液低剂量组、地黄饮子脑脊液中剂量组、地黄饮子脑脊液高剂量组, 每组 5 瓶。神经元接种 10d 后吸去培养液, 每组各瓶分别加入空白培养液 50 μ l、正常脑脊液 50 μ l、VitE 脑脊液 50 μ l 和中药脑脊液低剂量 25 μ l、中剂量 50 μ l、高剂量 100 μ l, 最后, 加培养液补至 5ml, 37℃ 孵育 2h。然后除空白组之外的各组加入经老化处理的 A β_{25-35} (终浓度为 10 μ mol/L), 空白组加入等量的培养液, 继续孵育 24h。

2.4 RT-PCR 检测 bcl-2、bax 和 caspase-3 基因的表达 按 Trizol 试剂盒说明书提取 RNA 引物设计由美国 NCBI 数据库提供 RNA 全序列, 用 primer3 引物设计软件设计。**Rat bcl-2:** left primer 5' cga ctt tgc aga gat gtc ca3', right primer 5' atg ccg gtt cag gta ctc ag3' (产物为 232bp); **Rat bax:** left primer 5' atg gag ctg cag agg atg at 3', right primer 5' gat cag ctc ggg cac ttt ag3' (产物为 209bp); **Rat caspase-3:** left primer 5' tgc atg cag cta acc tca ga3', right primer 5' ata (产物为 310bp) β -actin: left primer: 5' ccg gcc agc gtc cag acg 3', right primer: 5' cat cgt ggg ccg ctc tag gca 3' (产物为 480bp)。

逆转录体系参照 Superscrip II cDNA 合成试剂盒说明书。

逆转录反应: ①分别取总 RNA 5 μ l, Oligo (dT) 2 μ l, 10mM dNTP1 μ l, DEPC 处理水 10 μ l 混合, 65℃ 孵育 5min 后冰浴 1min; ②加入 10 \times RT buffer 2 μ l, 25mM MgCl₂ 4 μ l, 0.1M DDT 2 μ l, Rnase OUT Recombinant Rnase Inhibitor 1 μ l 将混合液瞬时离心; ③加 Super Script II RT 1 μ l 于反应管, 混合后 42℃ 孵育 50min, 70℃ 孵育 15min, 终止反应, 反应管置冰上; ④加入 RnaseH 1 μ l 于反应管中, 37℃ 孵育 20min。合成的 cDNA 于 -20℃ 保存备用。

聚合酶链式反应 (PCR): cDNA 4 μ l, dNTP 2 μ l, 10 \times RT buffer 4 μ l, 正反义引物 (25 μ mol/L) 各 1 μ l, β -actin (25 μ mol/L) 各 1 μ l, Tap 酶 0.4 μ l, 加去离子水至 40 μ l。反应参数: 95℃ 4min; 94℃ 40S, 55℃ 30S, 72℃ 40S, 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 5min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离检测。凝胶成相分析系统进行拍照和分析扩增产物电泳强度 (凝胶成相分析系统显示的吸光度扫描结果), 以上 PCR 反应重复 3 次, 取平均值。

3 结果

3.1 海马神经元 bcl-2 基因 mRNA 的表达 RT-PCR

结果显示,地黄饮子脑脊液能够上调 bcl-2 的表达,并呈一定的剂量依赖性。其表达水平优于 VitE(见图1)。电泳强度比较显示:模型组 < VitE 对照组 < 地黄饮子脑脊液低剂量组 < 地黄饮子脑脊液中剂量组 < 地黄饮子脑脊液高剂量组 < 空白组(见表 a)。

表 a 各组电泳强度平均值比较

组别(n)	Bcl-2		bax		caspase-3	
	参照值	强度	参照值	强度	参照值	强度
空白组 5	230	243	252	237	225	220
模型组 5	232	210	254	254	224	266
VitE 组 5	230	214	254	251	228	258
低剂量组 5	230	219	254	246	225	246
中剂量组 5	232	229	254	244	225	235
高剂量组 5	228	236	253	238	225	222

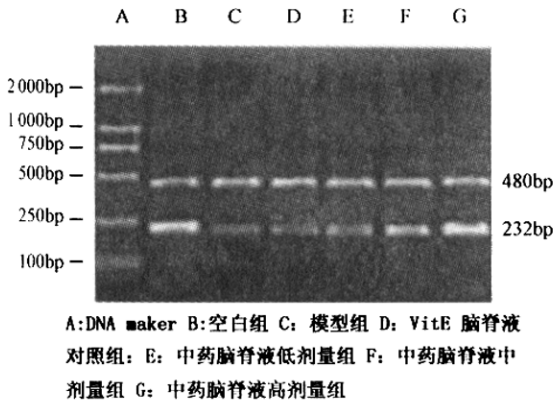


图1 海马神经元 bcl-2 基因 mRNA 表达凝胶电泳图谱

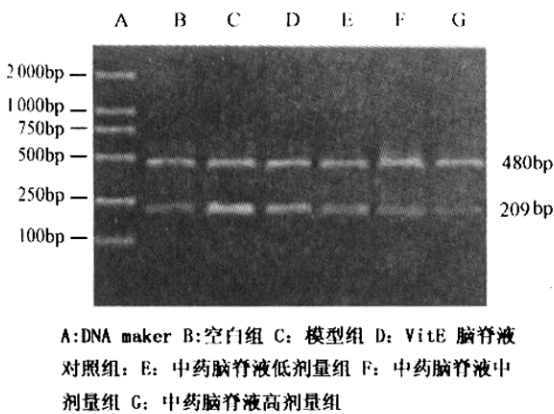


图2 海马神经元 bax 基因 mRNA 表达凝胶电泳图谱

3.2 海马神经元 bax 基因 mRNA 的表达 RT-PCR 结果显示,地黄饮子脑脊液能够下调 bax 的表达,并呈一定的剂量依赖性。其表达水平低于 VitE(见图2)。电泳强度比较显示:模型组 > VitE 对照组 > 地黄饮子脑脊液低剂量组 > 地黄饮子脑脊液中剂量组

> 地黄饮子脑脊液高剂量组 > 空白组(见表 a)。

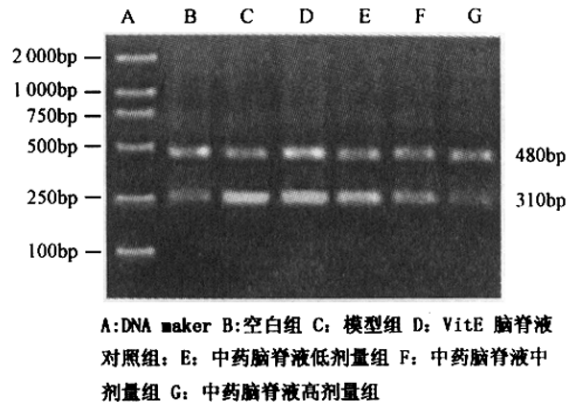


图3 海马神经元 caspase-3 基因 mRNA 表达凝胶电泳图谱

3.3 海马神经元 caspase-3 基因 mRNA 的表达 RT-PCR 结果显示,地黄饮子脑脊液能够下调 caspase-3 的表达,并呈一定的剂量依赖性。其表达水平低于 vitE(见图3)。电泳强度比较显示:模型组 > VitE 对照组 > 地黄饮子脑脊液低剂量组 > 地黄饮子脑脊液中剂量组 > 地黄饮子脑脊液高剂量组 > 空白组(见表 a)。

4 讨论

细胞凋亡是 AD 神经细胞死亡的一条重要途径,体外研究老年斑(SP)的核心成分 β -淀粉样蛋白对培养的神经元的毒性作用有以下特点:A β 作用初期,细胞膜是完整的,细胞的改变不同时进行,并出现了核固缩,细胞微缩,而后出现凋亡小体,这些都是细胞凋亡的基本形态学特征^[3]。

另外,从 A β 处理 24h 的神经元中提取 DNA 发现了寡聚核苷酸的梯状分布,这是 A β 诱导神经元凋亡的一种特征性生物化学变化。说明 A β 的毒性作用的基本特征是细胞凋亡^[4]。研究表明:bcl-2 家族决定着细胞是否进入凋亡通路。bcl-2 在变性神经元中,其表达明显减少。bcl-2 的基因产物能阻止凋亡,促进神经元存活,bax 的基因产物能加速细胞凋亡,bcl-1/bax 的比率决定细胞凋亡是否发生。实验表明:A β_{25-35} 可引起快速、持续 bcl-2 的下调和 bax 的上调,使神经元易于变性而启动凋亡。caspase-3 是所有细胞凋亡的最后执行者。bcl-1/bax 的比值的降低使线粒体外膜形成离子通道,促进细胞色素 C 释放,细胞色素 C 能活化 caspase-3 引起级联反应,后者对细胞内具有功能的蛋白质进行水解、切割,引起神经细胞凋亡^[5]。地黄饮子脑脊液能剂量依赖性的

上调 bcl-2 的表达, 下调 bax 的表达, 升高 bcl-2/bax 的比值, 并剂量依赖性的下调 caspase-3 的表达, 抑制细胞凋亡。

bcl-2 基因在 AD 脑中的高表达, 是通过抗氧化作用对细胞起保护作用^[6]。近十年来的研究^[7], 已把自由基引起神经退行性变和神经细胞死亡的作用置于中心位置。蛋白质和 DNA 被自由基攻击, 招致细胞内的许多稳态系统包括钙调节系统受损, 当细胞中的钙离子持续升高并同时存在自由基时会出现恶性前馈 (feed forward), 即 Ca^{2+} 加速自由基的生成, 或反过来, 自由基增加胞内钙离子的堆积。胞内钙离子的堆积和自由基生成过多, 导致膜脂质过氧化, 细胞通透性改变, 释放凋亡因子, 引起细胞凋亡^[8]。

我们以往的工作证明: $A\beta_{25-35}$ 能刺激神经细胞产生大量自由基, 丙二醛 (MDA) 含量明显升高, 降低超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (CAT) 和谷胱甘肽谷过氧化物酶 (GSH-Px) 活性, 并使钙离子大量内流。地黄饮子可以通过调节 SOD、CAT 和 GSH-Px 这些抗氧化酶的活性起到间接的抗氧化作用, 提高 CAT 和 GSH-Px 协同作用以使细胞内 H_2O_2 浓度保持在稳定水平, 缓解 H_2O_2 的毒性^[9]。因此我们推测, 地黄饮子脑脊液有效成分通过消除自由基的产生, 提高抗氧化酶活性, 调节细胞膜通透性, 保持钙稳态的作用, 来调节 bcl-2/bax 的比值, 抑制线粒体释放细胞色素 C, 控制 caspase-3 的激活, 达到抑制神经细胞凋亡的目的。

脑脊液药理学是一种新的药理实验方法学, 其应用尚处于探索阶段。与血清药理学的不同之处在于该方法主要是针对神经细胞的离体实验研究, 保证受试药物进入体内并透过血脑屏障作用于神经细胞, 比较接近药物在脑内环境中产生药效的真实过程。中药复方由于其成分复杂, 有效成分难以界定,

应用脑脊液药理学可以删除体外实验和血清中各种干扰因素的影响^[1], 直接观察大脑内部微观环境中中药的药效学效应, 说明这是一种行之有效, 科学合理的研究方法, 值得进一步发展和完善。

参考文献:

- [1] 梅建勋, 张伯礼, 陆融, 等. 中药脑脊液药理学研究方法的初建——对中药影响星形胶质细胞神经营养作用的观察[J]. 中草药, 2000, 31(7): 523-525.
- [2] Jear Christophe C, Yibing L, Liza R, et al. Trolox and 6, 7-dinitroquinoxaline 2, 3-dione prevent necrosis but not apoptosis in cultured neurons subjected to oxygen deprivation [J]. Brain Res, 1998, 784: 25.
- [3] Loo DT, Copani AG, Pike CJ, et al. Apoptosis is induced by β -amyloid in culture central nervous system nervous [J]. Proc Natl Acad Sci, 1993, 90: 7951-7955.
- [4] Gula G, Wu CK, Saroff D, et al. Aging reorders the brain vulnerable to amyloid β -protein neurotoxicity [J]. Nature, 1996, 382: 685-691.
- [5] 张海风, 刘勇军, 朱奇峰, 等. SNP 对体外培养的海马神经元 bcl-2 和 bax 基因表达的影响[J]. 中国现代医学杂志. 2002, 12(10): 16-20.
- [6] Gervais FG, Xu D, Robertson GS, et al. Involvement of caspase in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid beta precursor protein and amyloidogenic A beta peptide formation [J]. Cell, 1999, 97: 395-406.
- [7] 张均田. 神经药理学研究进展[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002. 16-29.
- [8] Marson MP. Calcium homeostasis and free radical metabolism as convergence point in the pathophysiology of dementia [M]. Molecular mechanisms of dementia. 1997. 103-104.
- [9] 谢宁, 邹纯朴, 周妍妍, 等. 地黄饮子脑脊液对离体神经元 AD 模型自由基损伤的保护作用及其相关酶的影响[J]. 中医药信息, 2003, 20(6): 59-61.