

中药复方脑还丹对 A β 诱导的大脑皮质和海马神经元损害的保护作用研究

魏昌秀, 李庆明, 傅玉如

(广州中山大学附属第二医院, 广东 广州 510120)

摘要: 目的: 探讨中药复方脑还丹对 A β 诱导的大脑皮质和海马神经元损害的作用。方法: 采用 MTT 法及 NSE 免疫组化方法观察脑还丹药物血清对经 A β 25-35 处理的原代培养的新生大鼠大脑皮质和海马神经元的影响。结果: 体外培养的新生大鼠大脑皮质和海马神经元经 A β 25-35 处理后, 活细胞数减少, 而脑还丹含药血清能够促进神经元的存活率以及促进神经元的生长发育, 与对照组相比有显著性差异 ($P < 0.05$)。结论: 中药复方脑还丹能够减轻 A β 对大脑皮质和海马神经元的毒性作用。

关键词: 脑还丹; β -淀粉样蛋白; MTT; NSE

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2004)03-0018-03

Protective Effect of Naohuandan on the Impairment of Cortical and Hippocampal Neuron Induced by Beta-amyloid Protein

WEI Chang-xiu, LI Qing-ming, FU Yu-ru

(Second Affiliated Hospital of Sun Yat-san University, Guangzhou, 510120, China)

Abstract: Using thiazolyl blue colorimetry (MTT) and NSE immunohistochemistry staining to observe the effect of Naohuandan on the impairment induced by beta-amyloid protein (A β) of primary cultured cortical and hippocampal neurons, we found that when treated with A β , some neurons dead, As compared with those with non-drug containing serum, Naohuandan containing serum treatment could promote the survival, the growth and the development of neurons. The results indicated that Naohuandan could reduce the neurotoxin of A β to cortical and hippocampal neurons.

Key words: Naohuandan; A β ; MTT; NSE

老年性痴呆, 即阿尔采默病 (Alzheimer S Disease AD), 是引起痴呆最常见进行性退行性神经病。临床表现以认知功能减退为主, 病理学特征包括神经元丢失、神经元纤维缠结 (NFT)、老年斑 (SP) 和淀粉样血管病变等。 β -淀粉样蛋白 (A β) 是 AD 病人的老年斑中的主要成分, 已经有许多证据表明 A β 与 AD 发病有关。因此保护神经元免受 A β 的神经毒性可能是防治 AD 的有效手段之一。李庆明教授在古方“草还丹”的基础上组方“脑还丹”, 初步研究表明, “脑还丹”对老年性痴呆患者及痴呆动物具有一定的疗效^[1,2,3]。我们通过二甲基噻唑二苯基四唑溴盐 (MTT) 比色法、神经元特异性稀醇化酶 (NSE) 免疫组织化学方法研究脑还丹对 A β 诱导神经元损害的保护作用, 为脑还丹防治老年性痴呆进一步提供理论依据。

1 实验材料

收稿日期: 2003-09-11

基金项目: 广东省中医药管理局基金资助项目 (A002003002)

1.1 试剂 DMEM/F12 培养基 (Gibco 公司, 批号 1161236), A β 25~35 (Sigma 公司, 批号 042K49501), 小牛血清 (Gibco 公司), 多聚赖氨酸 (Sigma 公司, 批号 031K5106), MTT (Sigma 公司), NSE 免疫组化试剂盒 (博士德公司), NSE I 抗 (博士德公司), DMSO, D-hanks, 胰蛋白酶, PBS, 4% 多聚甲醛等。

1.2 仪器 倒置显微镜、超净工作台 (江苏苏净 BHC-1300 II A/B3 型); 二氧化碳培养箱 (德国 Heraeus P63450 Hanau 型); 培养板 (美国 Orange 公司), 酶联免疫分析仪 (Wellscan MK3 型), 全自动图像处理系统 (德国 KONTRON IBAS2.0 型)。

1.3 动物 新生 SD 大鼠 (24h 内), SD 大鼠, 由中山大学北校区实验动物中心提供。

1.4 脑还丹制剂 脑还丹由中药骨碎补 15g, 熟地 25g, 菖蒲 10g 等组成, 使用颗粒剂 (江苏江阴制药厂提供, 批号 0208136), 按所含生药量配制成不同浓度的药液。

2 方法

2.1 脑还丹大鼠含药血清的制备 取健康 SD 大鼠 30 只, 220~ 250g, 雄性, 随机分为 3 组, 分别按 1.0g 生药/ml/100g 体重、0.5g 生药/ml/100g 体重、1ml 生理盐水/100g 体重每天灌胃一次, 连续 7 天, 末次灌药后 1h 腹主动脉取血, 离心制备血清, 分别标记为高剂量组, 低剂量组及对照组, 经过滤除菌后 4℃ 贮存备用。

2.2 淀粉样蛋白的“老化”处理^[4] 将 A β 25~35 1mg 溶解在 1ml DMEM/F12 培养基内, 置于 37℃ 恒温箱内孵育 4~ 7d, 进行老化处理。然后 4℃ 贮存备用, 用时稀释。

2.3 神经细胞培养 取新生 SD 大鼠脑, 在解剖镜下分离出海马和大脑皮层, 用 D-Hanks 洗涤, 0.125% 胰蛋白酶消化 37℃ 15min, 过 200 目筛网, 用含 15% 小牛血清的 DMEM/F12 培养液终止消化并洗涤, 制成单细胞悬液, 计数。

2.4 MTT 比色法分析 将细胞悬液加入到预先经过多聚赖氨酸处理的 96 孔板培养孔中, 每孔加入 0.5×10^5 cells, 置 37℃ 5% CO₂ 培养箱内培养 24h, 吸出培养液, 随机分成高剂量、低剂量、对照组 3 组, 每组 9 孔, 分别加入含 10% 高剂量组, 低剂量组, 对照组血清的 DMEM/F12 培养基 150 μ l 和稀释的老化 A β 25~35(终浓度为 5 μ mol/L), 置 37℃ 5% CO₂ 培养箱内培养 72h。终止培养前 4h, 每孔加入 20 μ l MTT (5mg/ml) 继续培养 4h, 吸出培养基, 每孔加入 150 μ l DMSO, 摇晃使 MTT 反应的蓝色产物充分溶解。将培养板放在酶联免疫分析仪上, 采用实验波长 595nm 和参考波长 630nm 测每孔样品的光密度(OD)值。各组每次 8~12 孔, 重复 3 次。

2.5 NSE 免疫组织化学方法分析 将细胞悬液以 1×10^5 cells/cm² 的密度, 接种于 24 孔板内预先经多聚赖氨酸处理过的盖玻片上, 4h 后加入含有 15% 小牛血清(Gibco 产品)的 DMEM/F12 培养液, 置 37℃ 5% CO₂ 培养箱内培养 24h, 吸出培养液, 随机分成高剂量、低剂量、对照组 3 组, 每组 3 孔, 各组分别加入含 20% 高剂量组, 低剂量组, 对照组血清的 DMEM/F12

培养基 1ml 和稀释的老化 A β 25~35(终浓度为 5 μ mol/L), 置 37℃ 5% CO₂ 培养箱内培养 48h。弃去培养基, PBS 洗 3 次, 4% 多聚甲醛室温固定 15min。NSE 免疫组化按 SABC 免疫组化试剂盒说明书进行。各组每次 3~5 孔, 重复 3 次。

2.6 图像分析 将经过 NSE 免疫组化染色后的盖玻片输入全自动图像处理系统, 每张片随机选择 3 个视野, 计数阳性细胞数, 测定视野内全部神经细胞的胞体面积, 最大长径, 最大短径和平均突起长度。

2.7 统计学分析 结果采用 SPSS11.0 for windows 统计软件进行。

3 结果

倒置显微镜下, 刚分离接种的神经元呈圆形; 4h 后已经贴壁并开始形成短小突触; 24h 后神经元形态呈圆形, 椭圆型, 锥形或多角形, 1~3 个突起; 加入 A β 后部分神经元死亡。

3.1 MTT 比色法结果 不同剂量脑还丹含药血清组的吸光度值见表 1。结果显示: 高剂量组及低剂量组高于对照组, 有极显著差异 ($P < 0.01$), 高剂量组与低剂量组之间无显著差异 ($P < 0.01$)。

表 1 各组的 MTT 法吸光度值(OD) ($\bar{x} \pm s$; $n = 27$)

组别	剂量(g/ml/100g)	OD 值
高剂量组	1.0	0.1462 \pm 0.0297*
低剂量组	0.5	0.1369 \pm 0.0286*
对照组	0	0.0618 \pm 0.0181

注: * 与对照组相比 $P < 0.01$

3.2 NSE 免疫组化结果 不同剂量脑还丹含药血清培养大脑皮质和海马神经元 NSE 阳性细胞数及神经元胞体面积、最大长径、最大短径和平均突起长度见图 1 及表 2。结果显示: 高剂量组及低剂量组 NSE 阳性细胞数、胞体面积、最大长径、最大短径、平均突起长度均高于对照组, 差异均有显著性 ($P < 0.05$), 高剂量组与低剂量组之间无显著性差异。

4 讨论

AD 是导致痴呆的最常见的进行性神经变性疾病, 在老年人中随着年龄的增加其发病率升高。A β 是 AD 病人老年斑中的主要成分, 由 39~43 个氨基

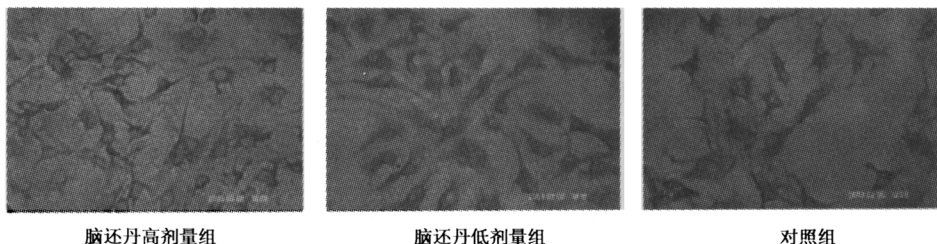


图 1 NSE 免疫组化染色显示培养 72h 新生大鼠皮质及海马神经元

表 2 各组的 NSE 阳性细胞数、胞体面积、最大长径、最大短径、和平均突起长度($\bar{x} \pm s; n = 9$)

组别	NSE 阳性细胞数	胞体面积(μm^2)	最大长径(μm)	最大短径(μm)	平均突起长度(μm)
高剂量组	47.1 ± 13.63*	76.64 ± 16.68*	11.65 ± 1.62*	7.96 ± 1.32*	38.84 ± 15.72*
低剂量组	39.3 ± 12.59*	72.35 ± 14.39*	11.02 ± 1.35*	7.68 ± 1.18*	36.28 ± 13.27*
对照组	28.0 ± 8.78	62.22 ± 12.36	10.10 ± 1.08	7.06 ± 1.02	30.25 ± 11.19

注: * 与对照组相比 $P < 0.01$

酸组成,可溶性无神经毒性,当转变为不溶型时可损害脑内与智力有关的特定结构。已经有许多证据表明 A β 与 AD 发病有关。APP 突变在早发家族性 AD 病人中已经被检测到^[5]。APP 转基因鼠的研究也是 A β 在 AD 病因中作用的一个有力的证据,过度表达 APP 基因突变的转基因鼠出现 AD 病人类似的神经病理改变及行为异常^[6,7]。转 APP 基因鼠用 A β 免疫治疗可以减轻 AD 样病理改变更加证实 A β 在 AD 中的作用^[8]。近年来培养的神经细胞已经用于 AD 中 A β 对神经变性作用的模型。许多研究表明 A β 对体外培养的神经元具有毒性作用,且已经有实验证实 A β 25~35 与 A β 1~40 所致的神经变性的机制相似^[9]。脑还丹是李庆明教授在抗老防衰的古方草还丹的基础上以骨碎补熟地等组成,该方具有补肾填精、活血通络、涤痰开窍、平衡阴阳的功效。初步研究表明脑还丹能够改善老年性痴呆患者的临床症状^[1];能够提高老龄大鼠血清雌二醇、睾酮水平,降低血粘度,能够提高去势老龄大鼠血清胰岛素样生长因子水平^[2];维持去势老龄大鼠海马 CA3 区神经元结构和突触密度^[3]。本研究在原代培养的大脑皮质及海马神经细胞培养液中加入具有神经毒性的老化处理的 A β 25~35 的同时,加入一定浓度的脑还丹含药血清,通过 MTT 比色法、NSE 免疫组织化学方法研究脑还丹的作用,结果表明在原代培养的神经细胞培养液中加入 A β 25~35 可导致细胞死亡,而脑还丹含药血清能够明显增加细胞的存活率,促进神经元的生长发育,表现为细胞面积的增大及突触长度的增加,证明脑还丹对 A β 所致的神经元的损害具有保护作用。由于 A β 与 AD 发病密切相关,故认为这是脑还丹治疗老年性痴呆的基础。但是 A β 的神经毒性的机理目前仍不清,有研究表明可能与 Ca²⁺ 稳态的破坏^[10]、Na⁺ - K⁺ - ATP 酶活性的降低^[11]、神经元凋亡^[12] 以及氧化还原障碍^[13]、tau 蛋白磷酸化^[14] 等有关。我们目前尚不能确定脑还丹通过哪一途径起作用,根据已有的研究结果我们推测脑还丹可能具有神经营养因子样作用以及抑制神经元凋亡的作用,目前对脑还丹在这方面作用的研究正在进行中。

参考文献:

- [1] 李庆明,黄启辉. 脑还丹制剂治疗老年痴呆的临床研究[J]. 老年医学杂志, 2002, 16(6): 169-171.
- [2] 程志安,李庆明. 脑还丹”对老龄去势大鼠“血清 IGF-I 和血脂水平的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2001 (1): 38-40.
- [3] 程志安,李庆明. 脑还丹”对老龄去势大鼠 cA3 区及皮质神经元超微结构的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2002(2): 31-33.
- [4] Pike C J, Walencewicz A J, Glabe L Get, et al. In Vitro aging of β amyloid protein causes peptides aggregation and neurotoxicity[J]. Brain Res, 1991, 563: 311-314.
- [5] Goate A, Chartier-Harlin M. C, Mullan M, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease [J]. Nature, 1991, 349, 704-706.
- [6] Moran P. M, Higgins L. S, Cordeu B, et al. Age-related learning deficits in transgenic mice expressing the 751-amino acid isoform of human β amyloid precursor protein [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 5341-5345.
- [7] Moechars D, Lorent K, De Strooper B, et al(1996) Expression in brain of amyloid precursor proteini mutated in the alpha secretase site causes disturbed behavior neuronal degeneration and premature death in transgenic mice [J]. EMBO J. 1996, 15, 1265-1274.
- [8] Schenk D, Barbour R, Dunn W, et al. Immunization with amyloidbeta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse [J]. Nature, 1999, 400, 173-177.
- [9] Pike C. J, Burdick D, Walencewicz A. J, et al. Neurodegeneration induced by β amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state [J]. J. Neurosci, 1993, 13, 1676-1687.
- [10] Mattson M. P, Cheng B, Davis D, et al. β Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity [J]. J. Neurosci, 1992, 12, 376-389.
- [11] Mark R. J, Hensley K, Butterfield D. A, et al. Amyloid β peptide impairs ion motive ATPase activities: evidence for a role in loss of neuronal Ca²⁺ homeostasis and cell death [J]. J. Neurosci, 1995, 15, 6239-6249.
- [12] LaFerla F. M, Tinkle B. T, Bieberich C. J, et al. The Alzheimer's A β peptide induces neurodegeneration and apoptotic cell death in transgenic mice [J]. Nat. Genet, 1995, 9, 21-30.
- [13] Behl C, Davis J. B, Lesley R, et al. Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity [J]. Cell, 1994, 77, 817-827.
- [14] Busciglio J, Lorenzo A, Yeh J, et al. β Amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding [J]. Neuron, 1995, 14, 879-888.