

• 药理 •

补肾醒脑解毒方对培养神经元单纯疱疹病毒感染后 NGF 和 BDNF 表达的影响*

贺双腾¹, 蒋士生², 蔡光先², 何飞舟², 李顺祥², 朱冰姣², 伍参荣³

(1 湖南医科大学附属湘雅医院中西医结合研究所, 长沙 410008;

2 湖南省中医药研究院, 长沙 410006; 3 湖南中医学院微生物教研室, 长沙 410007)

摘要: 观察补肾醒脑解毒中药复方对 HSV-1 感染后神经元内 NGF、BDNF 表达的调节作用。用 HSV-1 感染原代培养大鼠海马神经元造成急性感染与潜伏感染, 然后运用 Northern 杂交方法检测中药煎液对感染神经元 NGF 和 mRNA 表达水平的影响。结果显示: (1) 正常培养海马神经元内有微量 NGF 和 BDNF 表达, 加入中药煎液后 NGF 和 BDNF 表达明显提高; (2) 感染 0.1 MOI HSV-1 后 6-12h 出现 BDNF 与 NGF 表达增加, 24h 后下降, 48h 后显著低于正常水平, 4d 后表达消失。加中药煎液后 NGF 和 BDNF 表达时间延长; (3) 补肾醒脑解毒方能使潜伏感染神经元 NGF 和 BDNF 表达持续增加, 并维持潜伏感染神经元存活达 10 周以上。结果表明补肾醒脑解毒方对 HSV-1 感染神经元 NGF 和 BDNF 表达具有上增性调节作用。

关键词: 神经生长因子; 脑衍生神经营养因子; 基因表达; 海马神经元培养; 补肾醒脑解毒方

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2000)04-0022-06

The Effects of Bushen Xingnao Jiedu Fang on Regulating Expressions of NGF and BDNF in Cultured Hippocampal Neurons After Infection of Herpes Simplex Virus Type 1

HE Shuang-teng¹, JIANG Shi-sheng², CAI Guang-xian², HE Fei-zhou²,
LI Shun-xiang², ZHU Bing-jiao², WU Can-rong³

(1 The Institute of Combined Traditional Chinese and Western Medicine in Xiangya

Hospital Affiliated to Hunan Medical University, Changsha 410008;

2 Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410006;

3 The Department of Microbiology of Hunan College of
Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007)

Abstract: Observing the effects of Bushen Xingnao Jiedu Fang (BXJF) on regulating the expressions of nerve growth factor (NGF) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in cultured hippocampal neurons after infection of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) in vitro. Detecting the expression level of NGF mRNAs in normal cultured neurons, acute infection neurons, latent infection neurons, and BXJF-treated infected neurons with Northern blot. Results indicated: (1) Expressions of NGF and BDNF mRNAs were observed on hippocampal neurons and the expressions were increased after addition of the decoction of BXJF. (2) A transient increasing expression of NGF and BDNF mRNAs was also found from 6h to 12h af-

收稿日期: 2000-01-28

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39670870)

ter HSV-1 infection. But expression level of NGF mRNA and BDNF mRNA could not be detected at day 4 after HSV-1 infection. The time courses of NGF and BDNF expressing were extended for two days. (3) The increasing expressions of NGF mRNA and BDNF mRNA in neurons with HSV-1 latent infection were remained by addition of the decoction of BXJF, and these neurons survived for at least ten weeks after deprivation of acyclovir. The results indicated the decoction of BSXNJDF was found to have the effects on increasing expressions of NGF mRNA and BDNF mRNA in normal cultured neurons and HSV infected neurons.

Key words: Nerve growth factor; Brain-derived neurotrophic factor; Gene expression; Hippocampal neuronal culture; Bushen Xingnao Jiedu Fang

单纯疱疹病毒(Herpes simplex virus, HSV)是散发性病毒性脑炎的主要病原^[1,2]。近10年来随着抗病毒药无环鸟苷(Acyclovir, ACV)的应用,HSV脑炎的死亡率已大幅度下降,但重症病人存活后仍遗留有不同程度的神经功能缺陷症状^[3]。为探寻中医药对HSV脑炎后遗症的治疗,我们根据中医学传统理论与自己的临床经验,选用补肾醒脑解毒中药复方在体外对HSV感染神经元进行实验研究,发现该方对HSV-1感染神经元具有较好保护作用^[4],并对HSV-1感染神经元内神经生长因子(Nerve growth factor, NGF)和脑衍生神经营养因子(Brain-derived neurotrophic factor, BDNF)的表达具有上增性调节作用,现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 大鼠海马神经元培养 取怀孕18d的SD种大鼠,麻醉后活杀,无菌取胎,分离胎鼠大脑,取海马置于Hank's液中,吹打分散成单细胞悬液^[5],按1:1比例加入含20%小牛血清的DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium, Gibco产品)液,室温下静置5min,取中层细胞悬液,移入培养瓶37℃孵育3h,优先非神经细胞贴壁^[6],然后吸出未贴壁细胞(含神经元达90%以上),用含10%胎牛血清、5mM葡萄糖、5μg/ml胰岛素、5μg/ml转铁蛋白、5U/ml青霉素、50μg/ml链霉素、10mM HEPES的DMEM液(pH7.3)调整细胞密度为 0.25×10^5

细胞/ml,接种于25μg/ml多聚赖氨酸(Sigma产品)液包被的25ml培养瓶中,每瓶接种细胞悬液4ml,密闭瓶口,37℃培养。5d后第1次换液,换半液,以后每4~5d换液1次。培养20d供实验用,并以抗MAP-2(Microtubule-associated protein-2, 微管蛋白-2)抗体进行免疫染色鉴定^[7]。

1.2 病毒 HSV-1毒株和Vero细胞由中国预防医学科学院病毒研究所提供。病毒在Vero细胞上增殖,病毒滴度达 10^7 TCID₅₀/ml时供用。

1.3 中药煎液制备 补肾醒脑解毒方含熟地、山茱萸、人参、鹿茸、石菖蒲、远志、当归、麝香、金银花、板蓝根等15味中药。根据《中华人民共和国药典》(1995年版)规格选购各药,按细胞培养要求制剂,每ml相当含生药1g。使用时以DMEM培养液将药液稀释至所需浓度。

1.4 细胞分组与治疗 培养20d的神经元,分为6组:(1)正常对照组:换正常培养液;(2)正常+药物组:在培养液中加入含1:40、1:80、1:160、1:320、1:640的中药煎液;(3)急性感染对照组:以0.1 MOI(Multiplicity of infection)的HSV-1感染培养神经元,病毒吸附30min后加正常培养液;(4)急性感染+治疗组:以含1:160浓度中药煎液的培养液孵育24h,弃培养液,洗细胞3次后,加0.1 MOI的HSV-1吸附30min,换含1:160浓度中药煎液的培养液;(5)潜伏感染

对照组: 0.1MOI 的 HSV-1 吸附 30min 后加含 50 μ M ACV (湖北潜江制药厂产品, 批号 9611022) 的培养液以抑制病毒复制与细胞病变 (Cytopathic effect, CPE)^[8], 7d 后撤去 ACV, 换正常培养液; (6) 潜伏感染+ 治疗组: 0.1MOI 的 HSV-1 吸附 30min 后加含 50 μ M ACV 的培养液. 7d 后撤去 ACV. 撤药前 24h 换含 1:160 浓度中药煎液的培养液.

1.5 Northern 杂交 (1) 探针标记: 小鼠 NGF cDNA pGEM3zf(-) 质粒由日本长崎大学河野通明教授惠赠. 以 NcoI 线性化, 用 SP6 RNA 聚合酶 (Boehringer mannheim 产品) 转录为长 496bp 地高辛标记的 cRNA 探针^[9]. 大鼠 BDNF cDNA Bluescript SK(-) 质粒由美国 Regeneron Pharmaceuticals Inc. 惠赠, 以 NcoI 线性化, 用 T7 RNA 聚合酶转录为长 445bp 地高辛标记的 cRNA 探针. 大鼠 GAPDH cDNA 线性化模板 (Ambion 公司产品) 以 T7 RNA 聚合酶 (Boehringer Mannheim 产品) 转录为 383bp 地高辛标记为 cRNA 探针, 以用作参照标准^[10]. (2) 总 RNA 抽提与杂交: 培养神经元用 0.125% 胰蛋白酶、0.01% EDTA 液消化后收集细胞, 12000rpm 离心 1min, DEPC 水配制的 PBS 洗涤细胞 3 次. 用总 RNA 抽提试剂盒 (Promega 产品) 一步法提取培养神经元总 RNA, 测定 RNA 浓度, 在 2.2M 甲醛变性凝胶上每孔点总 RNA 30 μ g, 电泳后将 RNA 真空转移至尼龙膜 (Amersham 产品), 80 $^{\circ}$ C 真空干烤 60min, 将尼龙膜放入含地高辛标记的 cRNA 探针的杂交液中 42 $^{\circ}$ C 杂交过夜. 不同浓度 SSC 洗膜后, 加入碱性磷酸酶标记的抗地高辛抗体 (Boehringer Mannheim 产品) 进行抗原抗体反应. 再以 NBT/BCIP 液室温下避光显色 20~60min. 显色条带用 GS-525 型分子图像系统 (Bio-Rad 产品) 扫描后进行光密度分析.

1.6 统计分析 全部实验数据以均数+ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示. 计量资料两组间比较或同

组前后比较用 *t* 检验, 多组间比较用 *F* 检验.

2 结果

2.1 培养神经元生长情况 分散的海马神经元接种到多聚赖氨酸包被的培养瓶中密闭培养 60min 可全部贴壁, 24h 约 20% 细胞长出突起, 培养 7d 的神经元有 90% 以上长出突起. 突起的树突或轴突开始联成网状. 培养过程中约 3%~5% 的细胞未能成活, 表现为胞体缩小, 无突起长出. 培养 10d 以后神经元生长活跃, 不再死亡. 培养 20d 的正常大鼠海马神经元胞体饱满, 树突连成网状, 以 MAP₂ 免疫染色显示神经元在 95% 以上. 在含 2% 小牛血清的 DMEM 液中, 培养神经元至少存活 5 个月以上. 1:40、1:80、1:160、1:320、1:640 浓度的补肾醒脑解毒方中药煎液加入培养液中处理细胞 50d 对培养神经元的形态与存活无任何影响, 能为培养神经元很好耐受, 并可见神经元生长更好. 因此, 补肾醒脑解毒方对细胞的毒性低微.

2.2 感染 HSV-1 后培养神经元形态学变化

感染 0.1MOI HSV-1 后 48h, 细胞开始出现病变, 表现为病变神经元胞体肿胀、变圆、发亮, 如小水泡样, 突起断裂、减少. 尔后病变逐渐扩散, 至感染后 8d 约 90% 神经元溶解、消失. 1:40、1:80、1:160 浓度的中药煎液对 0.1MOI 的 HSV-1 感染神经元 CPE 抑制作用较弱, 但能延缓神经元 CPE 扩散、延长神经元存活时间至 15~20d.

在 ACV 处理组, 50 μ M ACV 能完全抑制感染神经元出现细胞病变. 7d 后撤去 ACV 换用中药煎液, 1:40、1:80、1:160、1:320 的药物浓度能继续维持神经元的正常形态而不出现细胞病变达 10 周以上^[4], 未加中药的对照组在撤去 ACV 后 24h 开始出现病变, 10d 后细胞全部溶解、死亡. 提示补肾醒脑解毒方能抑制潜伏状态 HSV 复活.

2.3 对正常培养神经元 NGF、BDNF mRNA 表达的影响 Northern 杂交显示, 培养 20d 的海马神经元有微量 NGF mRNA 和

BDNF mRNA 表达。加入 1: 160 浓度的补肾醒脑解毒方煎液后 6h, NGF 和 BDNF mRNA 表达水平升高, 在 24h 最高, 至 48h 下降, 但较正常组表达水平高。尔后维持在这一水平, 见图 1。提示补肾醒脑解毒方能促进培养海马神经元 NGF 与 BDNF mRNA 的表达。

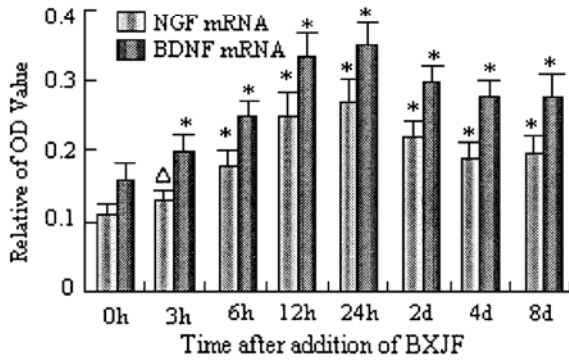


图 1 正常对照和补肾醒脑解毒方组神经元内 NGF 和 BDNF mRNA 在各时间点的表达水平。

Δ: $P > 0.05$, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ (与正常对照比较, $n = 3$ 下同)。

2.4 对 HSV-1 急性感染神经元 NGF 和 BDNF mRNA 表达的影响 培养海马神经元感染 HSV-1 后约 6h 即可见 BDNF mRNA 表达升高, 在 12h 达峰值, 24h 下降, 48h 低于正常组水平, 第 4d 表达消失。NGF mRNA 在 HSV-1 感染后 12h 表达上升, 24h 下降, 48h 则显著低于正常组水平。在中药处理组 (1: 160 浓度), NGF mRNA 与 BDNF mRNA 表达在各时间点均高于感染对照组, 至第 8d 仍可见表达。见图 2、图 3。

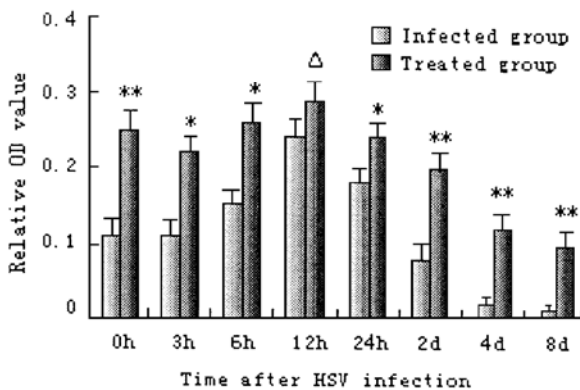


图 2 各时间点 NGF mRNA 在 HSV-1 感染组神经元内和补肾醒脑解毒方处理组神经元内的表达。

2.5 对隐性感染神经元 NGF 和 BDNF

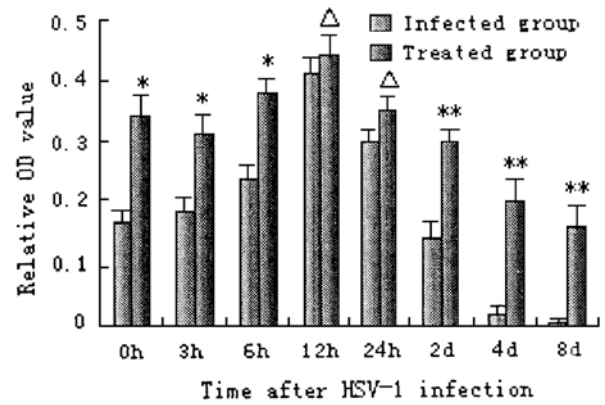


图 3 各时间点 BDNF mRNA 在 HSV-1 感染组神经元内和补肾醒脑解毒方处理组神经元内的表达。

mRNA 表达的影响 50μM ACV 处理的 HSV-1 感染神经元, NGF mRNA 在 HSV-1 吸附后 12h 表达稍微增高, 但在 24h, 48h, 3d, 6d 均未见增高。BDNF mRNA 表达在 HSV-1 感染后 6h, 12h 轻微增高, 尔后维持在正常水平或低于正常水平。第 7d 撤去 ACV 换用正常培养液, 撤药后 12h 可见 NGF 与 BDNF mRNA 表达增高, 至 48h 降低于正常组水平, 至 4d NGF、BDNF mRNA 表达信号消失。中药组 (1: 160 浓度) 在撤药后 6h 可见 NGF 与 BDNF mRNA 表达水平增高, 此后 NGF 和 BDNF mRNA 表达维持在高于正常组水平。见图 4, 图 5。

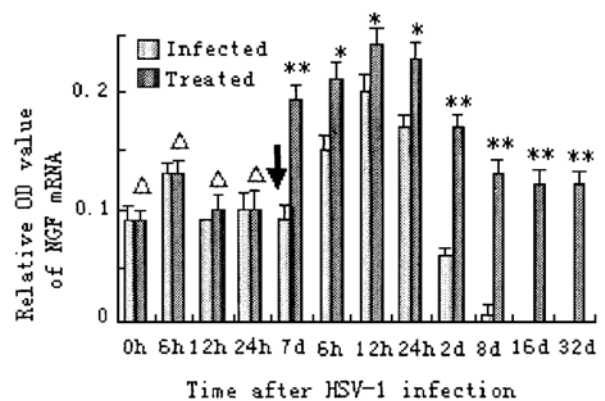


图 4 补肾醒脑解毒方对 HSV-1 隐性感染神经元 NGF mRNA 表达的影响。

3 讨论

近年来国内外应用 AVC 治疗 HSV 脑炎, 病死率已由过去的 70% 以上下降至 19%, 但存活病人约有半数遗留有偏瘫、失语、精神障碍、痴呆等后遗症^[11]。目前对 HSV

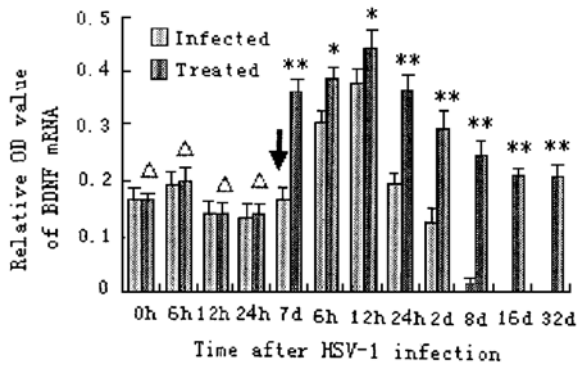


图5 补肾醒脑解毒方对 HSV-1 隐性感染神经元 BDNF mRNA 表达的影响。

脑炎后遗症的治疗尚缺乏理想的药物。体外实验显示,经 ACV 处理的 HSV-1 感染神经元,病毒仍呈潜伏状态(Latency)隐藏在神经元内,撤药后病毒又可复燃,引起细胞病变^[8]。大量实验发现,神经营养分子如 NGF、BDNF 对神经元具有保护作用,对损伤神经元的形态、功能具有恢复作用。NGF 能抑制 HSV-1 在神经元内的复制,维持感染神经元的正常形态,这与 NGF 对神经元提供营养支持有关。但由于 NGF、BDNF 为大分子多肽物质,不能透过血脑屏障,直接脑内给药有一定困难和损伤。尽管 NGF、BDNF 已可以人工生物合成,但尚难应用于临床治疗中枢神经系统疾病。本文实验结果显示,补肾醒脑解毒方煎液对体外正常培养神经元、HSV-1 感染神经元、HSV-1 潜伏感染神经元均能促进 NGF、BDNF mRNA 的表达,延长 HSV-1 急性感染神经元存活时间,维持 HSV 隐性感染神经元存活达 10 周以上。提示补肾醒脑解毒方对 HSV-1 感染神经元具有良好保护作用。

在脑内,海马是 NGF、BDNF 表达、合成的主要部位。如 NGF 在海马合成后,经神经轴索逆行运送至纹状体、基底前脑等部位,以营养这些部位的胆碱能神经元^[12]。有人认为,中枢神经系统损伤后之所以不能和外周神经损伤后那样得到较好的恢复,是因为中枢神经系统内缺乏雪旺氏细胞分泌 NGF、BDNF 以提供支持受损神经元恢复的微环

境^[13]。各种脑损伤、应激、剧烈运动、病毒感染等均可引起脑内 NGF、BDNF 上增性表达^[10],但时程很短暂,难以提供对受损神经元持久的营养分子支持,而损伤神经元的修复则需一个较长的过程。本文运用体外实验方法,初步观察到补肾醒脑解毒方对正常神经元与 HSV 感染神经元 NGF、BDNF 表达具有持续的上增性调节作用,这一结果对应用中医药治疗 HSV 脑炎后遗症将具有积极的实用意义。

补肾醒脑解毒方由地黄饮子、拱辰丹、四妙勇安汤三方加减组成。地黄饮子是中医治疗偏瘫、失语的传统方剂。补肾醒脑解毒方可能通过滋补成分增加了对培养神经元的营养作用,从而增强了神经元对病毒的抵抗力,使病毒进入潜伏状态,以维持感染神经元的正常形态与存活。

参考文献:

[1] Fields BN, Knipe DM, Howley PM, eds. *Virology* [M]. 3rd ed. Vol 2. New York: Lippincott-Raven, 1996, 2231~ 2342.

[2] 肖波, 侯熙德, 向传喜, 等. 疱疹病毒性脑炎的早期诊断方法研究[J]. 中华神经科杂志 1998, 31(6): 336~ 338.

[3] 侯熙德. 神经病学[M]. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 138~ 140.

[4] 蒋士生, 贺双腾, 蔡光先, 等. 补肾醒脑解毒方对单纯疱疹病毒感染神经元的保护作用[J]. 中国中医基础医学杂志 1999, 5(10): 24~ 29.

[5] Brewer GJ. Isolation and culture of adult rat hippocampal neurons [J]. *J Neurosci Meth*, 1997, 71(2): 143~ 155.

[6] Hoener MC, Henitt E, Conner JM, et al. NGF content in adult rat brain is several-fold higher than generally reported and is largely associated with sedimentable fractions [J]. *Brain Res*, 1996, 728(1): 47~ 56.

[7] Dottle CG, Banker GA, Binder RI. The expression and distribution of the microtubule-associated proteins tau and microtubule-asso-

- ciated protein 2 in hippocampal neurons in the rat in situ and cell culture[J]. *Neuroscience* 1989, 23(1): 121~ 130.
- [8] Wilcox CL, Smith RL, Freed CR, et al. Nerve growth factor-dependence of herpes simplex latency in peripheral sympathetic and sensory neurons in vitro[J]. *J Neurosci*, 1990, 10(4): 1268~ 1275.
- [9] Hattori A, Tanaka E, Murase K, et al. Tumor necrosis factor stimulates the synthesis and secretion of biologically active nerve growth factor in non-neuronal cells[J]. *J Biol Chem*, 1993, 268(4): 2577~ 2582.
- [10] Neeper SA, Gomez-pinilla F, Choi J, et al. Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain[J]. *Brain Res*, 1996, 726(1): 49~ 56.
- [11] 田苏娜, 濮孟久, 孟家眉. 单纯疱疹病毒脑炎[J]. *国外医学神经病学神经外科学分册*, 1992, 19(3): 132~ 135.
- [12] Winkler J, Ramirez GA, Kuhn HG, et al. Reversible Schwann cell hyperplasia and sprouting of sensory and sympathetic neurites after intraventricular administration of nerve growth factor[J]. *Ann Neurol*, 1997, 41(1): 82~ 93.
- [13] 严恒林, 沈馨亚. 雪旺氏细胞与中枢神经再生[J]. *细胞生物学杂志*, 1995, 17(2): 49~ 53.