

· 实验研究 ·

调心方对 β 淀粉样蛋白所致原代培养
海马神经元细胞毒模型的影响 *

姚明忠 赵伟康

内容提要 目的:建立 β 淀粉样蛋白($A\beta$)所致的神经细胞毒模型,探讨调心方的药效及作用机理。方法:原代培养大鼠海马神经元,用 $25\mu\text{mol/L}$ 聚集状态的 $A\beta_{1-42}$ 建立神经细胞毒模型。采用乳酸脱氢酶(LDH)释放量来检测神经元存活率,通过透射电镜、流式细胞仪检测判断神经元凋亡,应用免疫细胞化学法研究凋亡相关基因的表达蛋白(Bcl-2、Bax、c-Jun)。结果:神经元经 $A\beta_{1-42}$ 处理后,LDH 释放增加;电镜显示细胞体积缩小、染色质固缩、或浓聚成块状位于核周边、滑面内质网扩张;流式细胞仪检测可见亚二倍体峰,Bcl-2 减少,而 Bax 与 c-Jun 增加。调心方使 LDH 释放减少,电镜下具有凋亡形态特征的细胞减少,流式细胞仪检测显示凋亡率下降,Bcl-2 增加,Bax 减少,而 c-Jun 变化不明显。四氢氨基吡啶(THA)组神经元存活率增加,但其他指标的变化不明显。结论:调心方对 $A\beta_{1-42}$ 神经细胞毒有保护作用,可提高细胞存活率,抑制凋亡,其抑制凋亡作用的机制可能是通过提高 bcl-2、降低 bax 基因的蛋白表达而实现。THA 对神经元存活率有提高作用,但抑制神经元凋亡的作用似不明显。调心方对抑制 $A\beta$ 所致神经元凋亡明显优于 THA。

关键词 β 淀粉样蛋白 调心方 神经元凋亡 凋亡相关基因表达

Effect of Tiaoxin Recipe on β -Amyloid Induced Neurotoxic Model of the Primary Cultured Rat Hippocampal Neurons YAO Ming-zhong, ZHAO Wei-kang *Institute of Geriatrics, Shanghai University of TCM, Shanghai (200032)*

Objective: To study the effect of Tiaoxin Recipe (TXR) on β -amyloid induced neurotoxicity in the primary cultured hippocampal neurons and the therapeutical mechanism of it. **Methods:** In order to establish neurotoxic model, the primary cultured rat hippocampal neurons were treated with $25\mu\text{mol/L}$ aggregated β -amyloid fragment 1-42 ($A\beta_{1-42}$). Neuronal survival was assessed by lactate dehydrogenase (LDH) activity. Apoptosis of neurons was determined with transmission electron microscopy (TEM) examination and flowcytometric analysis. The protein expression of apoptosis-associated gene (Bcl-2, Bax, c-Jun) were examined by using immunocytochemical SABC method. **Results:** In the $A\beta_{1-42}$ treated neurons, the release of LDH was increased, TEM examination revealed that the cell body became shrunken, the chromatin was compacted or the patches of condensed chromatin lay against the nuclear membrane and the smooth surfaced endoplasmic reticulum was expanded. Flowcytometric analysis displayed the peak of hypodiploid DNA content. The expression of Bcl-2 was lowered, while Bax and c-Jun protein were increased. After treated with TXR, the above-mentioned changes were improved with the exception of c-Jun expression. In the Tacrine treated group, only the neuronal survival was increased, other observed criteria had insignificant change. **Conclusion:** TXR could attenuate the neurotoxic action of $A\beta_{1-42}$ and improve neuronal survival via suppressing apoptotic process. TXR could inhibit the apoptotic process via regulating the expression of bcl-2 and bax. Tacrine could improve neuronal survival, but its inhibition on neuronal apoptosis was not significant.

Key words β -amyloid protein, Tiaoxin Recipe, neuronal apoptosis, apoptosis-associated gene expression

调心方能显著改善 β 淀粉样蛋白($A\beta$)诱导的大鼠痴呆模型学习记忆障碍,提高 $A\beta$ 大鼠下降的胆碱乙酰转移酶(ChAT)活性和 M 受体 R_t 值⁽¹⁾,但其作用

* 本课题受国家自然科学基金重点项目(No. 39830450)及上海市教委科技发展基金(98CJ01)资助
上海中医药大学老年医学研究所(上海 200032)

机制还有待深入研究。由于目前早老性痴呆(AD)动物模型的建立仍存在一定的困难,难以对中药进行深入的药效和作用机理研究,本实验拟针对AD的病理特征,根据“ $A\beta$ 毒性说”,建立 $A\beta$ 所致的神经细胞毒模型,从神经细胞凋亡角度,探讨调心方的药效及作用机理。

材料与方法

1 材料 Wistar 孕鼠及雄性成年大鼠(体重300~350g,上海中医药大学实验动物中心提供)。调心方(由党参、桂枝、茯苓、远志、石菖蒲组成,每贴含生药149g,水煎后浓缩成每毫升相当于7.45g生药,由上海市中医药研究院老年医学研究所提供)。DMEM培养基、马血清、神经元基础培养基、B27添加剂(Gibco/BRL)、胎牛血清(杭州四季青公司)、 $A\beta$ 1-42(37℃孵育3天,使其变成聚集状态)、四氢氨基吡啶(THA, Sigma公司)、兔抗大鼠神经元特异性烯醇化酶(NSE)多克隆抗体(Zymed公司)、兔抗大鼠Bcl-2多克隆抗体、兔抗大鼠Bax多克隆抗体、小鼠抗大鼠c-Jun单克隆抗体(Santa Cruz公司)、SABC免疫组化染色试剂盒、DAB显色试剂盒(武汉博士德公司)。

2 方法

2.1 大鼠海马神经元原代培养与鉴定 孕18~19天Wistar大鼠,取出胎鼠分离出双侧海马,0.125%胰蛋白酶消化后在含10%胎牛血清和10%马血清的DMEM培养液中吹打分散,调节细胞浓度至 5×10^5 /ml,种植于涂有多聚赖氨酸的24孔培养板中,置于37℃、5% CO_2 的培养箱内培养,24h后更换为含2% B27添加剂的神经元基础培养基。培养12天的神经细胞经NSE免疫细胞化学(SABC法)鉴定后,可见培养细胞中染色阳性的神经元占95%以上。

2.2 调心方含药血清的制备及剂量-效应的关系 雄性Wistar成年大鼠20只,分为4组:生理盐水组、调心方低、中、高剂量组。低、中、高剂量组分别以成人等效剂量的2倍、3.5倍、5倍喂服大鼠。每天给药2次,连续3天,末次给药后1h采血,分离血清。用神经元存活率测定(FDA与PI双染法)研究剂量-效应关系,观察到调心方低剂量组为最佳作用剂量。

2.3 细胞分组及药物干预 神经元培养至12天,分为4组:正常组、模型组($A\beta$ 1-42)、THA组(0.15mmol/L THA加 $A\beta$ 1-42)、调心方组(调心方药物血清加 $A\beta$ 1-42)。 $A\beta$ 1-42的终浓度为25 μ mol/L,处理24h。

万方数据

2.4 调心方对 $A\beta$ 所致神经元存活率的影响 采用乳酸脱氢酶(LDH)释放量测定⁽²⁾。

2.5 调心方对 $A\beta$ 所致神经元凋亡的影响

2.5.1 透射电镜观察。

2.5.2 流式细胞仪检测 神经元分为3组:正常组、模型组、调心方组。检测 G_0/G_1 期之前的亚二倍体峰,根据亚二倍体峰含有的细胞量计算凋亡百分率。

2.6 调心方对 $A\beta$ 所致神经元凋亡相关基因表达蛋白(Bcl-2、Bax、c-Jun)的影响 采用SABC法⁽³⁾。

2.7 图像处理与结果分析 采用LEICA Q500IW图像分析系统分析积分光密度(IOD),所得数据用SPSS 9.0统计软件进行方差分析(one-way ANOVA)。

结 果

1 调心方对 $A\beta$ 所致神经元存活率的影响 正常组、模型组、THA组、调心方组的 A_{340} 变化值($\bar{x} \pm s, n=6$)分别为 0.0577 ± 0.0099 、 0.2240 ± 0.0257 、 0.1712 ± 0.0345 、 0.1048 ± 0.0158 。模型组神经元存活率较正常组显著降低(A_{340} 变化值增加, $P < 0.01$); THA组、调心方组较模型组存活率显著升高(A_{340} 变化值减小, $P < 0.01$);调心方组与THA组之间比较差异有显著性($P < 0.01$)。

2 调心方对 $A\beta$ 所致神经元凋亡的影响

2.1 透射电镜观察结果 神经元经 $A\beta$ 处理后出现凋亡细胞特征:细胞体积缩小,染色质固缩,或浓聚成块状位于核周边,滑面内质网扩张,其他细胞器结构基本完好。与模型组比较,电镜下调心方组具有凋亡特征的细胞有所减少,而THA组的变化不明显。

2.2 流式细胞仪检测结果 神经元经 $A\beta$ 处理后在 G_1 峰左侧出现亚二倍体峰。正常组、模型组、调心方组的神经元凋亡率(%)分别为1.50、35.99、18.23。调心方组的凋亡率较模型组降低了17.76%。

3 调心方对 $A\beta$ 所致神经元凋亡相关基因表达蛋白Bcl-2、Bax、c-Jun的影响 见表1。(1)Bcl-2:模型组较正常组显著降低($P < 0.01$);调心方组较模型组显著升高($P < 0.01$),THA组有升高趋势,但差异无显著性($P > 0.05$)。(2)Bax:与正常组比较,模型组显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,调心方组显著降低($P < 0.01$),THA组有降低趋势,但差异无显著性($P > 0.05$)。(3)c-Jun:与正常组比较,模型组显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,调心方组、THA组均有降低趋势,但差异无显著性($P > 0.05$)。

表 1 调心方对 Aβ 所致神经元凋亡相关基因表达蛋白 Bcl-2、Bax、c-Jun 影响的积分光密度(IOD)分析 ($\bar{x} \pm s$)

组别	IOD		
	Bcl-2	Bax	c-Jun
正常	5347.16 ± 809.10	1240.00 ± 523.42	1433.07 ± 492.86
模型	1474.97 ± 503.25 *	3939.15 ± 879.13 *	2908.78 ± 497.60 *
THA	1763.75 ± 658.60	3395.75 ± 573.39	2682.35 ± 547.94
调心方	3530.95 ± 552.92 [△]	2572.33 ± 487.32 [△]	2379.50 ± 526.58

注 :与正常组比较 , * $P < 0.01$;与模型组比较 , [△] $P < 0.01$,每组样本数为 6

讨 论

调心方由党参、桂枝、茯苓、远志、石菖蒲组成 ,具有益心气、振心阳、化痰浊、通心窍之功效⁽⁴⁾。

鉴定 Aβ 神经毒作用 ,首先要检测 Aβ 是否损伤了培养的神经元 ,可用细胞存活率来判断。研究经 LDH 释放量测定可看到 Aβ 具有神经毒作用 ,损伤了培养神经元 ,使细胞存活率降低。

Aβ 的神经毒性机制非常复杂 ,通过上述方法还不能区分神经元损伤的类型 ,即无法区分坏死与凋亡。本研究应用了透射电镜观察、流式细胞仪检测 ,显示 Aβ 处理神经元后 ,出现了凋亡的特征 ,因此可判断 25μmol/L 聚集状态的 Aβ 引起的神经元损伤类型主要是凋亡 ,即凋亡是神经元存活率降低的重要原因。

细胞凋亡作为许多生理、病理现象的最终结局 ,其调节也比较复杂。bcl-2 是一个公认的凋亡抑制基因 , bax 是 bcl-2 家族中与 bcl-2 功能相反的一个基因 ,可促进细胞凋亡。Bcl-2/Bax 组成一个平衡体系 ,Bax 过剩则细胞凋亡加重 ,而 Bcl-2 过多则细胞凋亡被抑制⁽⁵⁾。c-jun 是即刻早期反应基因(IEG) ,它们对细胞内外的各种刺激和 DNA 损伤做出反应 ,表达增加。c-Jun 和 c-Fos 编码蛋白组成异源二聚体 ,称为 AP-1 , AP-1 是一个重要的转录因子 ,结合于 DNA 上可诱导细胞凋亡⁽⁶⁾。本研究观察到 Aβ 可以使 Bcl-2 减少 ,而 Bax、c-Jun 增加 ,表明 Aβ 诱导的神经元凋亡是通过一些凋亡相关基因表达的改变来实现。

研究发现调心方使神经元 LDH 释放量减少 ,表明调心方对 Aβ 神经毒具有保护作用。通过凋亡指标的观察 ,发现调心方减轻了 Aβ 所致的神经元凋亡。提示调心方提高神经元存活率 ,可通过减轻 Aβ 引起的神经元凋亡来实现。

在凋亡相关基因的蛋白表达研究中发现 ,调心方

可提高 Bcl-2 ,降低 Bax ,通过对这些凋亡相关基因表达的调控 ,来抑制 Aβ 诱导的神经元凋亡。实验中调心方对 c-Jun 调控作用不明显 ,可能是对 c-Jun 无调控作用 ,也可能是由于 c-jun 属于即刻早期反应基因 ,处理 24h 后其表达变化的高峰已过。

THA 对部分 AD 患者有改善症状作用⁽⁷⁾。本研究观察到 THA 对 Aβ1-42 引起神经毒作用有保护作用 ,可提高神经元存活率。但对 Aβ1-42 诱导的海马神经元凋亡 ,THA 的抑制作用似不明显。

参 考 文 献

1. 周 晖 ,赵伟康. 调心方对 βA 大鼠痴呆模型空间学习记忆障碍和胆碱能系统的影响. 中药药理和临床 1998 ;14(3):29—31.
2. Koh JY , Choi DW. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. J Neurosci Methods 1987 ;20(1):83—90.
3. 陈允硕主编. 现代实用免疫细胞化学技术. 上海 :上海科学技术出版社 ,1997:67—90.
4. 林水森. 调理心肾治疗老年性痴呆. 中国中西医结合杂志 1992 ;12(7):393.
5. Oltvai ZN , Milliman CL , Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog , Bax , that accelerates programmed cell death. Cell 1993 ;74(4):609—619.
6. Anderson AJ , Su JH , Cotman CW. DNA damage and apoptosis in Alzheimer's disease : colocalization with c-Jun immunoreactivity , relationship to brain area , and effect of postmortem delay. J Neurosci 1996 ;16:1710—1719.
7. Farlow M , Gracon SI , Hershey LA , et al. A controlled trial of tacrine in Alzheimer's disease. The Tacrine Study Group. JAMA 1992 ;268(18):2523—2529.

(收稿 2000-08-28 修回 2001-04-25)