

## · 博士之窗 ·

# 补肾益智方对由 A $\beta$ 片段神经毒性诱导 NG108-15 细胞老年性痴呆模型神经递质释放影响的研究\*

钟振国<sup>1△</sup> 刘茂才<sup>2△△</sup> 赖世隆<sup>2△△</sup> 高洁<sup>2</sup> 程淑意<sup>2</sup>

**内容提要** 目的:观察补肾益智方对由 A $\beta$  片段神经毒性诱导的 NG108-15 细胞老年性痴呆(AD)模型神经递质释放的影响。方法:利用免疫印迹检查、免疫放射活性测定及电生理学测定方法,观察补肾益智方含药血清处理 A $\beta$  片段神经毒性诱导的 NG108-15 细胞后的胆碱乙酰基转移酶(ChAT)活性、突触素蛋白(synapsin)水平及功能性突触形成率。结果:补肾益智方含药血清组 ChAT 活性和突触素蛋白水平高于正常对照血清组;含药血清能调节递质释放能力和提高功能性突触形成。结论:补肾益智方具有减轻细胞对 A $\beta$  的神经毒性反应,表明该方能拮抗 AD 的病理发展,并通过提高神经递质释放能力发挥对 AD 的治疗作用。

**关键词** 补肾益智方 A $\beta$  NG108-15 细胞 神经递质 老年性痴呆模型

**Effect of Bushen Yizhi Recipe on Neurotransmitter Release in A $\beta$  Segment Neurotoxin Induced NG108-15 Cellular Model of Alzheimer Disease** ZHONG Zhen-guo, LIU Mao-cai, LAI Shi-long, et al *Institute of Neuroscience, The 2nd Affiliated Hospital of Guangxi College of TCM, Nanning (530001)*

**Objective:** To observe the effect of Bushen Yizhi Recipe (BSYZR) on neurotransmitter release in A $\beta$  segment neurotoxin induced NG108-15 cellular model of Alzheimer disease (AD). **Methods:** The levels of choline acetyltransferase (ChAT) activity, synapsin and functional synapse formation rate in the cellular model treated with BSYZR containing serum were determined by Western blot analysis, immunoradiometric assay and electrophysiologic technique. **Results:** BSYZR containing serum treatment could cause increase of ChAT activity and synapsin level in model cells, as compared with those in normal control model cells treated with non-drug containing serum, it also could regulate the release capacity of transmitter and raise the functional synapse formation. **Conclusion:** BSYZR could reduce the reaction of cell to A $\beta$  neurotoxin, indicating that it could be antagonistic to the pathological development of AD by means of raising the neurotransmitter release capacity.

**Key words** Bushen Yizhi Recipe, amyloid-protein  $\beta$ , NG108-15 cells, neurotransmitter, model of Alzheimer disease

Alzheimer 病(AD)又称老年性痴呆,是一种原发性大脑神经退行性病变,为特有的中枢胆碱能神经元的大量死亡及丢失,伴有神经炎斑、神经纤维缠结的形成,并有含  $\beta$  折片结构的淀粉样蛋白(Amyloid-protein, A $\beta$ )沉积<sup>(1)</sup>。A $\beta$  沉积导致胆碱能神经细胞的损害,胆碱乙酰基转移酶(Choline Acetyltransferase, ChAT)水平下降和乙酰胆碱(Acetylcholine, Ach)递质合成的降低,突触素蛋白(Synapsins)水平下降<sup>(2)</sup>, Ach

释放减少<sup>(3)</sup>。文献报道将 A $\beta$  产物注射入大白鼠大脑中隔内能减少海马神经 Ach 的释放<sup>(4)</sup>, A $\beta$ 1-42 抑制大白鼠大脑中隔原代细胞及小鼠胆碱能神经 SN56 细胞 ChAT 活性水平及 Ach 的合成和释放下降<sup>(5)</sup>。本实验,根据 AD 的发病机理及 A $\beta$  产物诱导神经细胞显示 AD 样病理改变原理,用 A $\beta$  产物诱导培养的 NG108-15 神经细胞显示 AD 样病理改变建立 AD 细胞模型,在体外通过观察补肾益智方含药血清能否改善由 A $\beta$  产物诱导神经细胞显示 AD 样病理损害来评价补肾益智方治疗 AD 的作用。同时,通过对细胞模型建立的探讨,为进一步研究 AD 发病机制,研究和开发防治 AD 药物提供理论依据和手段。

\* 国家“九五”攻关课题部分内容(No. 96-906-09-02)

1. 广西中医学院第二附属医院神经科学研究所(南宁 530011);

2. 广州中医药大学老年病研究所

△博士后,△△合作导师

## 材料和方法

### 1 材料

1.1 动物 健康 3 月龄 Wista 大鼠 60 只, 体重 200~250g, 购自第一军医大学动物实验室。

1.2 药物 补肾益智方主要由枸杞子、蛇床子、人参、何首乌、丹皮、冰片等组成, 由广东省中医院制剂科加工制备成浓缩颗粒剂, 每克含生药 6.44g, 临用前配成 0.176g 成药/ml (1.13g 生药/ml) 液体。

1.3 NG108-15 神经细胞株由日本国金泽大学医学部神经物性部门提供。

1.4 主要试剂 DMEM 培养基和胎牛血清 (FBS)、抗 Synapsin I 抗体 (GIBCO), A $\beta$  25-35、A $\beta$  1-42、cAMP、乙酰辅酶 A 锂盐、胆碱、溴化新斯的明 (Sigma),  $^{14}$ C-乙酰辅酶 A (Amersham)。

1.5 主要仪器 CO $_2$  培养箱 (德国产)、电生理测定用 Axoclamp 2A 放大器 (美国产)、蛋白条带密度测定用 DIANA ZERO-Dscan ONE-Dscan System 测定仪 (美国产)。

### 2 实验方法

2.1 实验血清的制备及血清浓度的选择 体外培养观察中药复方的药理作用用血清药理学方法<sup>(6)</sup>。将 Wista 大鼠随机分为对照组、补肾益智方组, 每组 30 只, 雄雌各半。补肾益智方含药血清 (简称含药血清) 的制备: 灌胃药量: 参照文献<sup>(7)</sup>剂量估换计算方法, 根据补肾益智方生药的成人治疗药量 1.17g·kg $^{-1}$ ·d $^{-1}$  换算成大鼠用量 5.6g·kg $^{-1}$ ·d $^{-1}$ , 每只大鼠每天灌药量相当于上述配成的成药液 1~1.5ml。灌药时间: 连续灌胃 1 个月后采血, 采血时间在末次给药后 4h 内, 离心分离血清, 无菌过滤, 56℃ 灭活补体, 即为含药血清。对照血清的制取: 在灌胃相同体积的水及相同的时间后, 用同样方法从正常大鼠提取分离。然后用 DMEM 培养液将含药血清和对照血清分别配成含 5%、10%、15%、20% 的含药血清或对照血清 DMEM 培养液, 培养 NG108-15 细胞, 以细胞生存率为指标, 根据观察结果选择生长状态最好的 5% 血清作为实验血清浓度。

2.2 A $\beta$  片段液配制法及 A $\beta$  浓度的选择 将 A $\beta$  25-35 或 A $\beta$  1-42 溶于高压灭菌后的生理盐水, 各配成 250 $\mu$ mol/L 和 10 $\mu$ mol/L 母液备用。参考文献报道<sup>(5,8)</sup>和结合我们的预试验发现, 在 NG108-15 细胞, 当 A $\beta$  25-35 片段在培养液的浓度为 5 $\mu$ mol/L 和 A $\beta$  1-42 的浓度为 200nmol/L 时较为合适。

2.3 AD 细胞模型建立及药物处理 NG108-

15 细胞以含 5% FBS DMEM 培养液在 37℃, 10% CO $_2$  培养箱中培养 1 天, 然后加入浓度为 5 $\mu$ mol/L A $\beta$  25-35 或 200nmol/L A $\beta$  1-42 片段, 继续培养 1 天后, 即建成 AD 细胞模型。以含 5% 含药血清 DMEM 培养液或含 5% 对照血清 DMEM 培养液更换原培养液, 仍加入上述浓度的 A $\beta$  片段以维持 AD 细胞模型, 同时加入细胞分化剂 cAMP (最终浓度为 0.25mmol/L) 分化培养 5 天后进行各项指标观察、分析。并设立无 A $\beta$  片段对照组。

2.4 ChAT 放射活性测定 破碎细胞后配制成蛋白浓度 5% (W/V) 匀浆。取 50 $\mu$ l 样品, 加 50 $\mu$ l 依地酸三硝基甲苯液混匀, 取 20 $\mu$ l 上述样品蛋白依地酸三硝基甲苯液, 加试样液或空白对照液 20 $\mu$ l, 1.14g/L 乙酰辅酶 A 10 $\mu$ l, 70mmol/L 胆碱 8 $\mu$ l, 175mmol/L EDTA 8 $\mu$ l, 1mmol/L 溴化新斯的明 7 $\mu$ l, 3mmol/L NaCl 7 $\mu$ l, 3.7 $\times 10^4$ Bq/ml  $^{14}$ C-乙酰辅酶 A 10 $\mu$ l, 每管加 10 $\mu$ l 14% 三氯乙酸终止反应。放射活性测定: 加入 2ml (5g/L) 四苯基硼, 再加入 5ml 甲苯闪烁液, 总体对照管加入 Formula-989。在液体闪烁分光仪上测定每分钟衰变数 (Disintegration per minute, DPM)。ChAT 活性的表示法: ChAT 的活性用每毫克蛋白质的组织在 1h 反应中形成的乙酰胆碱 nmol 数表示, 用下面公式计算各样品 ChAT 活性:

$$\begin{aligned} \text{ChAT 活性 (nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}) \\ = \frac{\text{试样 DPM} - \text{空白对照 DPM}}{\text{总体对照 DPM}} \times \frac{14}{0.06} \times 2 \end{aligned}$$

2.5 突触素蛋白的免疫印迹 (Western blot) 分析 每孔 200 $\mu$ g/15 $\mu$ l 样品蛋白分别注入 8% SDS-PAGE 凝胶电泳分离后, 将蛋白条带转移到 PVDF 膜上, 加抗 Synapsin I 抗体 (1:1000), 在室温孵育 2h, 加第二抗体 (抗 mouse 抗体 1:1000) 后, 在室温下孵育 1h。将用 PBS 洗涤后的转印膜用 Western blot 试剂盒 ECL 1 号、ECL 2 号液作用 1min, X 光胶片曝光 1~5min, 显影后作光密度扫描分析结果, 用 4 次不同样品蛋白重复同样实验 4 次。

2.6 电生理学测定突触后电位方法 分离新生的大白鼠后肢大腿部肌细胞, 在 10% CO $_2$  浓度及 37℃ 条件下培养 7 天。然后加入 NG108-15 细胞进行复合培养。1 天后去掉原培养液, 加入 5% 正常大鼠血清及 5% 含药血清, A $\beta$  1-42 的浓度为 200nmol/L, 在 0.25nmol/L cAMP 浓度下分化培养 4~5 天后形成神经-肌突触。用 2ml 电生理记录液 (10mmol/L Hepes-缓冲液 DMEM + 2mmol/L CaCl $_2$  + 0.1mmol/L 氯化胆碱) 代替原培养液, 记录突触后肌细胞电位,



即反映神经细胞释放递质能力的微小终板电位,以平均每分钟记录到 2 个电位以上为阳性结果。

2.7 统计学方法 以 SAS 6.12 统计软件分析,两组间均数比较采用组间  $t$  检验。

## 结 果

1 含药血清对 ChAT 活性的影响 在无  $A\beta$  或  $A\beta 1-42$  最终浓度  $200\text{nmol/L}$  时,对照血清组 ChAT 活性( $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )为  $1336.1\pm 268.2$  ( $n=10$ )和  $1290.7\pm 381.5$  ( $n=10$ );含药血清组为  $1651.2\pm 134.5$  ( $n=10$ )和  $1586.1\pm 223.4$  ( $n=10$ )。经组间  $t$  检验,在无  $A\beta$  时,含药血清组 ChAT 活性水平高于对照血清组 ( $P<0.05$ ), $A\beta 1-42$   $200\text{nmol/L}$  浓度时,含药血清组 ChAT 活性水平同样高于对照血清组 ( $P<0.05$ )。结果显示,含药血清在无  $A\beta$  或  $A\beta$  存在情况下均能提高 ChAT 活性水平。

2 含药血清对突触素蛋白水平的影响 免疫印迹结果,见图 1。在所有 6 个样本中均可显示分子重量约为  $86\text{KDa}$  和  $80\text{KDa}$  的突触素 Ia 和 Ib 条带影, $A\beta$  可不同程度地降低两组中突触素蛋白水平,而在含药血清组则相对较弱。经光密度扫描分析,含药血清组突触素 Ia 和 Ib 积分光密度总值在无  $A\beta$ 、 $A\beta 25-35$ 、 $A\beta 1-42$  时分别是 5.02、1.36 和 2.46,对照血清组为 3.18、0.57 和 0.71,含药血清组分别是对照血清组的 1.6、2.4、3.5 倍。结果显示,补肾益智方除了在能保护由  $A\beta$  引起细胞降低突触素水平外,在无  $A\beta$  组则能提高突触素蛋白的表达水平。

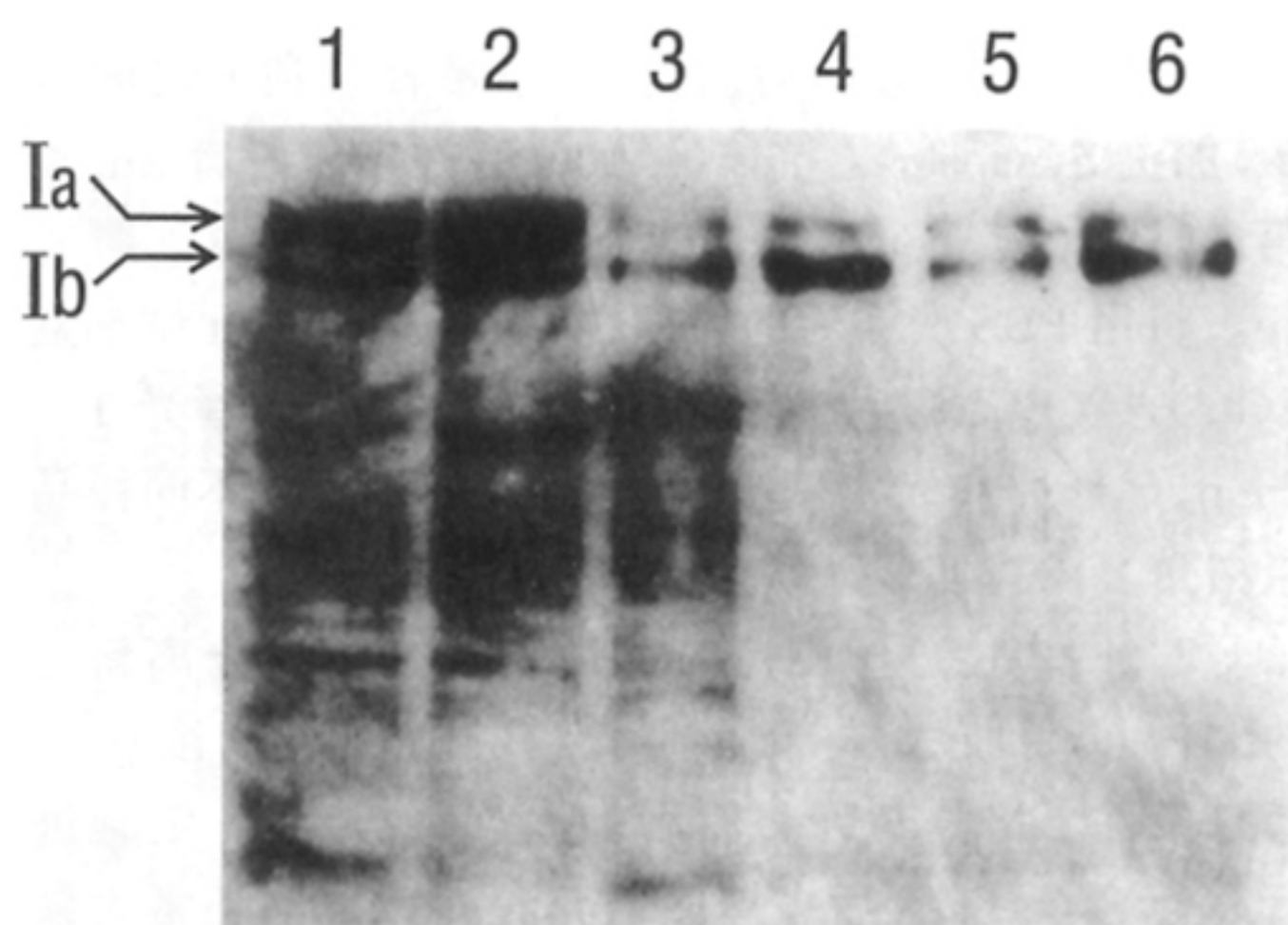


图 1 Western blot 分析补肾益智方对突触素蛋白 Ia 和 Ib 水平的影响

注:1 为无  $A\beta$  对照血清组,2 为无  $A\beta$  含药血清组,3 为  $A\beta 25-35$  对照血清组,4 为  $A\beta 25-35$  含药血清组,5 为  $A\beta 1-42$  对照血清组,6 为  $A\beta 1-42$  含药血清组

## 3 含药血清对神经递质释放的影响

3.1 含药血清对 NG108-15 细胞功能性突触形成的影响 见表 1。当无  $A\beta$  时,含药血清组功能性突触形成水平高于对照血清组。在  $A\beta 1-42$   $200\text{nmol/L}$  时,含药血清组功能性突触形成水平同样高于对照血清组。

表 1 含药血清对 NG108-15 细胞功能性突触形成的影响 ( $\%, \bar{x} \pm s$ )

| 组别   | $A\beta 1-42$ 浓度( $\text{nmol/L}$ ) |                   |
|------|-------------------------------------|-------------------|
|      | 0                                   | 200               |
| 对照血清 | $63.2 \pm 17.0$                     | $34.2 \pm 13.0$   |
| 含药血清 | $90.6 \pm 6.0^*$                    | $58.0 \pm 13.1^*$ |

注:与对照血清组比较, \*  $P<0.05$ ; 各组样本数为 10

3.2 含药血清对 NG108-15 细胞微小终板电位频率的影响 见表 2。微小终板电位频率分析也显示,无  $A\beta$  时,含药血清组微小终板电位频率高于对照血清组。 $A\beta 1-42$   $200\text{nmol/L}$  时,含药血清组微小终板电位频率同样高于对照血清组。结果显示,与对照血清组比较,含药血清组在无  $A\beta$  时能提高功能性突触的形成率和递质含量的释放,在  $A\beta$  存在时,对由  $A\beta$  引起的功能性突触的形成率和递质释放的损害起到保护作用。

表 2 补肾益智方血清对 NG108-15 细胞微小终板电位的影响 ( $\text{events}/\text{min}, \bar{x} \pm s$ )

| 组别   | $A\beta 1-42$ 浓度( $\text{nmol/L}$ ) |                   |
|------|-------------------------------------|-------------------|
|      | 0                                   | 200               |
| 对照血清 | $5.48 \pm 5.14$                     | $3.05 \pm 4.46$   |
| 含药血清 | $9.28 \pm 4.10^{**}$                | $5.55 \pm 5.85^*$ |

注:与对照血清组比较, \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ ; 各组样本数为 10

## 讨 论

本实验在 NG108-15 细胞培养液中加入 AD 代谢产物  $A\beta 25-35$  和  $A\beta 1-42$  片段可诱致 NG108-15 细胞产生相似 AD 的病理损害改变。主要表现在:一定浓度的  $A\beta 1-42$  可减少功能性突触的形成和神经递质的释放,这些结果与文献报道相一致<sup>[6]</sup>;  $A\beta 25-35$  和  $A\beta 1-42$  片段均可导致神经递质囊泡膜蛋白 synapsin I 水平的下降,尽管有报道 AD 患者大脑的免疫组织学检查有 synapsin I 水平的下降,但目前尚未有在体外培养由 AD 代谢产物  $A\beta$  片段引起 synapsin I 水平下降的报道。这些结果表明,用 AD 代谢产物  $A\beta 25-35$  及  $A\beta 1-42$  片段建立的 NG108-15 细胞 AD 模型是成功的。可用于 AD 药物筛选和药效评价。

目前防治老年性痴呆的药物研究主要是依据该药

能否对其病理发展有对抗和阻止作用,或对其病理发展有改善及逆转作用。中药补肾益智方具有补肾、益气、生髓、养脑作用。本研究显示补肾益智方含药血清能有效地降低具有神经毒性作用的 AD 代谢产物 A $\beta$ 25-35、A $\beta$ 1-42 片段对 NG108-15 神经细胞的病理损害。ChAT 活性水平的降低和神经递质囊泡膜蛋白的减少是 AD 的主要生化指标,补肾益智方含药血清能有效地保护由 A $\beta$  引起的这些改变,提高 ChAT 活性及 synapsin I 水平;AD 的主要表现是意识和行为的改变,它反映神经细胞功能的完整性和神经递质质量的改变,其中任一条件不足均可引起意识和行为的异常。电生理学检测的数据表明,补肾益智方含药血清能有效地保护由 A $\beta$  引起的功能性突触的形成和神经递质释放的影响,而对正常神经细胞则具有促进功能性突触的形成和神经递质释放的作用,为补肾益智方防治 AD 的有效性提供了有力证据。

有人对补肾益智方中的单味人参、何首乌研究表明<sup>[9]</sup>,两药均可调整血浆 cAMP 水平。cAMP 是第二信使物质,在信号转导、神经细胞分化和神经递质合成和释放、增强记忆作用方面发挥重要作用。细胞内 cAMP 水平增加可提高 ChAT 活性和神经末梢蛋白磷酸化,蛋白磷酸化可增加 synapsin I 蛋白水平<sup>[10]</sup>。研究报告也表明补肾益智方中的人参、何首乌、枸杞子等可抑制自由基的生成减少或清除能力增强,具有抗衰老作用,维持细胞良好功能状态。补肾益智方含药血清能维持神经细胞活力,增加突触形成的可塑性,即增加神经-肌突触的形成率,而 ChAT 酶的活性增强又增加了乙酰胆碱递质的合成量, synapsin I 神经递质囊泡膜蛋白的过量表达有效地调节神经递质释放。因此,补肾益智方能提高正常神经细胞功能,对 A $\beta$  引起

的损害又能起到保护作用。

## 参 考 文 献

1. Mark P, Guo Q, Furukawa K, et al. Presenilins, the endoplasmic reticulum, and neuronal apoptosis in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 1998;70:1-14.
2. Quirion R. Cholinergic markers in Alzheimer's disease and the autoregulation of acetylcholine release. *J Psychiatry Neurosci* 1993;18(5):226-234.
3. Masliah E, Terry R. The role of synaptic proteins in the pathogenesis of disorders of the central nervous system. *Brain Pathology* 1993;3:77-85.
4. Abe E, Casamenti F, Giovannelli L, et al. Administration of amyloid  $\beta$ -peptides into the medial septum of rats decreases acetylcholine release from hippocampus in vivo. *Brain Res* 1994;636:162-164.
5. Pedersen WA, Kloczewiak MA, Blusztajn JK. Amyloid  $\beta$ -protein reduces acetylcholine synthesis in a cell line derived from cholinergic neurons of the basal forebrain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:8068-8071.
6. 崔晓兰, 贺玉琢, 高英杰, 等. 中药药理研究的新思路——中药血清药理学. *中国中医药科技* 1997;4(4):239, 250.
7. 陈 奇主编. 中药药理研究方法学. 北京:人民卫生出版社, 1996:33-34.
8. Kruman I, Bruce-Keller AJ, Bredesen D, et al. Evidence that 4-hydroxynonenal mediates oxidative stress-induced neuronal apoptosis. *J Neurosci* 1997;17(13):5089-5100.
9. 郑虎占, 董泽宏, 余 靖, 主编. 中药现代研究与应用(第一、第三卷). 北京:学苑出版社, 1997:19-172, 2310-2339.
10. Sudhof TC, Czernik AJ, Kao HT, et al. Synapsins mosaics of shared and individual domains in a family of synaptic vesicle phosphoproteins. *Science* 1989;245:1474-1480.

(收稿:2001-07-11 修回:2001-09-20)

## 第四次全国中西医结合中青年学术研讨会征文通知

培养和造就中西医结合科技人才队伍,促进优秀青年科技人员成长是关系到我国中西医结合事业长远发展的重大战略任务。中国中西医结合学会决定于 2002 年 5 月在昆明举办第四次全国中西医结合中青年学术研讨会,会议将安排特邀报告、大会报告和专题讨论,并进行优秀论文评奖。现将会议征文有关事宜通知如下:

**征文内容** (1)中西医结合医学各学科临床研究、基础理论及实验研究;(2)中药新药研究与开发;(3)中西医结合医学研究思路与方法;(4)中西医结合医学的管理、教育等。

**征文要求** (1)来稿请寄全文(3 000 字以内)和摘要(800~1 000 字)各 1 份。摘要应包括“目的、方法、结果、结论”4 部分,如属于综述、总结报告、理论探讨等方面的文章,其摘要应将主要内容表达清楚;(2)来稿请打印,并附软盘。如手抄,须字迹工整。稿件须单位同意并盖公章。请自留底稿,恕不退稿;(3)来稿请注明作者姓名、单位、邮编;如属国家或省、部级课题者请注明;(4)来稿请寄:100700 北京市东直门内北新仓 18 号中国中西医结合学会学术部 周素云收,信封注明:“中青年学术会议征文”;亦可发送电子邮件, E-mail: suyunzhou@china.com。

**截稿日期** 2002 年 3 月 15 日(以邮戳为准);会议具体时间及地点另行通知,本次会议可授予国家级继续教育学分。