

丹栀逍遥散含药血清对 D-半乳糖致原代培养神经元损伤的影响

蔡大勇* 赵 雁* 黄启福*

摘要 目的:探讨丹栀逍遥散(DZXYS)对 D-半乳糖致原代培养神经元损伤的保护作用机制。方法:在原代培养第 6d,以 50mM D-半乳糖(D-gal)作用神经元 72h 造成自由基损伤模型,用 10% DZXYS 药物血清防治损伤。倒置显微镜下观察神经元的生长发育形态,MTT 法在酶标仪上检测神经元代谢率,PI 染色在流式细胞仪上检测神经元凋亡构成比,HE 染色观察神经元形态,形态计量神经突起密度,RT-PCR 检测糖醛还原酶信使 RNA(AR mRNA)含量。用 *t* 检验比较正常对照神经元、受 D-gal 攻击神经元和受 D-gal 攻击同时得到 DZXYS 防治神经元之间的差别。结果:受 D-gal 攻击而受损伤的神经元代谢率显著降低($P < 0.01$),高、中、低剂量 DZXYS 防治均可使其明显回升($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);凋亡构成比增高($P < 0.01$),高、中低剂量 DZXYS 防治均可使其回降($P < 0.01$);攻击后出现变性坏死的形态变化,DZXYS 防治使其好转,但神经突起浆质中出现均匀、细小的颗粒;神经突起密度显著降低($P < 0.01$),高、中、低剂量 DZXYS 防治使其明显回升($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);消除胶质细胞的原代培养神经元无 AR-mRNA 表达。结论:DZXYS 可试用于老年性痴呆的防治。

主题词 阿尔茨海默病/预防和控制 @ 神经元损伤 丹栀逍遥散/治疗应用

老年性痴呆(AD)的发病率高,对老年人的生活质量影响大^[1]。我们根据代谢障碍和自由基损伤理论,建立了神经元损伤的模拟 AD 细胞模型^[2]。在该模型上观察丹栀逍遥散(DZXYS)对神经元的影响,为其临床防治 AD 提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂:(1)仪器:CO₂ 培养箱(Forma, USA)、万能显微镜(Olympus, Japan)、倒置相差显微镜(Olympus, Japan)、AE160 型精密天平(Mettler, Switzerland)、2550 型酶联免疫检测仪(BIO-RED, USA)、MRC1024LCSM 流式细胞仪(Bio-red, USA)、PTC-100 型 PCR 仪、DYY-Ⅲ 5 型稳压稳流电泳仪、VDS 型凝胶成像分析仪。(2)试剂:D-半乳糖(Galactose, C₆H₁₂O₆, 北京化学试剂公司)、马血清(中国医学科学院天津血液病研究所)、优质胎牛血清(Gibco)、高

糖 DMEM 培养基(Gibco);多聚赖氨酸(MW 1.5×10⁴~3.0×10⁴)、胰蛋白酶、谷氨酰胺、胰岛素、转铁蛋白、亚硒酸钠、皮质酮、黄体酮、腐氨、三碘甲状腺原氨酸、牛血清白蛋白(BSA)、阿糖胞苷、RNA 酶、碘化丙啶(PI)、噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砜、TRIZOL 均为 Sigma 公司产品。大鼠糖醛还原酶信使 RNA(AR-mRNA)的引物为:顺向 5'-CTGTAAACCA-GATCGAG-3',反向 5'-AACCGGATCAGCACCTG-3',扩增产物大小为 180bp(北京赛百盛公司,50D),一步法 RT-PCR 试剂盒(Promega),DGL20000 DNA-Marker(北京鼎国生物科技发展有限公司)。安理申片,5mg/片,国药准字(1999)J-19 号,英国 Boots 公司生产,卫材(苏州)制药有限公司分装;成人使用剂量 5mg/日。DZXYS 浸膏:按 1995 版药典 DZXYS 处方配制(柴胡 6g,当归 6g,白芍 6g,炒白术 6g,茯苓 6g,牡丹皮 3g,炒栀子 3g,炙甘草 3g),饮片来源于北京中医药大学国医堂,由北京中医药大学中药学院煎煮(首次至沸后 2h,再次至沸后 1.5h),80℃下真空负压浓缩制成流浸膏,生药浓度为 3.0g/ml。

1.2 神经元原代培养流程:(1)大鼠血清的制备:雄性 Wistar 大鼠 30 只,体重 280±20g,随机分 5 组,每组 6 只。正常对照组:喂养基本颗粒饲料观察 3d 后,每日生理盐水 5.0ml/kg 灌胃,连续 14d。安理申组:安理申悬浮于 1% 的缩甲基纤维素钠(CMC)中灌胃给药 1.65mg/kg,余同正常对照组。DZXYS 高、中、低剂量给药组:分别以 37.908、12.636、4.212g/kg 剂量灌胃给药 DZXYS,余同正常对照组。第 15d 末次给药后 2h,以乙醚麻醉大鼠,按无菌操作进行颈动脉插管放血,分离血清,每瓶 1ml 分装血清封口后,低温冰箱-70℃保存备用。(2)原代神经元培养:参考司徒镇强、吴军正的原代神经元培养方法^[3,4]。接种前用多聚赖氨酸铺板。在冰上按无菌操作,取 16~18d 胚鼠大脑 6~8 个,切成小块;6%CO₂、36℃、0.125%胰酶消化 25min;接种液终止消化 2 次,移入 20ml 接种液吹散细胞,静置后取上清用 150 目过滤;细胞计数后用接种液稀释至所需密度接种。以 1.0×10⁵/ml(HE 染色)、4.0×10⁵/ml(MTT、PI 染色)细胞密度,6、12、96 孔培养板每孔分别接种 2.0、1.0、0.15ml。在 36℃、6%CO₂ 及

* 北京中医药大学病理教研室,北京市朝阳区北三环东路 11 号(100029)

收稿日期:2002-05-08;修回日期:2002-05-28

附表 DZXYS 对原代培养神经元损伤的保护作用($\bar{x} \pm s$)

组别	代谢率	凋亡构成比	神经元突起密度
正常对照组	0.762 $\pm$ 0.030(33)	0.060 $\pm$ 0.029(19)	0.557 $\pm$ 0.0422(10)
D-gal 模型组	0.543 $\pm$ 0.064(11)*	0.356 $\pm$ 0.215(19)*	0.468 $\pm$ 0.0330(10)*
安理申组	0.652 $\pm$ 0.028(11)*▲▲	0.154 $\pm$ 0.130(19)▲▲	0.481 $\pm$ 0.0387(10)*
DZXYS 高剂量组	0.684 $\pm$ 0.072(11)*▲▲	0.173 $\pm$ 0.154(19)*▲▲	0.514 $\pm$ 0.0273(10)*▲▲△
DZXYS 中剂量组	0.623 $\pm$ 0.069(11)*▲	0.174 $\pm$ 0.158(19)*▲▲	0.509 $\pm$ 0.0251(10)*▲
DZXYS 低剂量组	0.747 $\pm$ 0.031(11)▲▲△△☆	0.171 $\pm$ 0.164(19)*▲▲	0.576 $\pm$ 0.0404(10)▲▲△△☆

与正常对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$; 与安理申组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$; 与 DZXYS 高剂量组比较, ○ $P < 0.05$, ○○ $P < 0.01$; 与 DZXYS 中剂量组比较, ☆ $P < 0.01$ 。括号内为动物数

饱和湿度下静置培养 24h 后全换接种液;第 3d 加入终浓度 10mM 阿糖胞苷作用 24h,其后每 3.5d 半量更换维持液 1 次。(3)D-gal 致原代神经元损伤模型处理:于原代培养的第 6d 分 6 组进行处理。正常对照组:加入含 50mM 葡萄糖和 10%正常对照组药物血清的维持液培养 72h。D-gal 模型组:加入含 50mM D-gal 和 10%正常对照组药物血清的维持液培养 72h。安理申组:加入含 50mM D-gal(终浓度)和 10%安理申治疗组药物血清的维持液培养 72h。DZXYS 高、中、低剂量给药组:加入含 50mM D-gal(终浓度)和 10%DZXYS 高、中、低剂量给药组药物血清的维持液培养 72h。

1.3 观察指标:(1)神经元生长发育:每天观察描述培养神经元生长发育的形态特征^[3]。(2)神经元代谢率:D-gal 攻击 72h 后,MTT 法,用酶联免疫检测仪检测神经元的代谢率^[3]。(3)神经元凋亡构成比:D-gal 攻击 72h 后,PI 染色流式细胞仪检测神经元凋亡构成比^[3,4]。(4)神经元形态结构:D-gal 攻击 72h 后,HE 染色,观察神经元的形态特点^[3,4]。(5)神经元突起密度:D-gal 攻击 72h 后,HE 染色,在 40 倍物镜下随机选择两个清楚的视野,用上海第三光学仪器厂的 C₅ 目镜测微尺,逐一观察测微尺标线与神经突起的交叉点数,总点数除以 10³ 作为突起长度的数据。(6)AR-mRNA 含量^[3,4]。

1.4 统计学方法:各组数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 t 检验比较组间差别,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 培养神经元生长发育的基本过程:倒置相差显微镜下观察到原代培养神经元三个生长发育阶段。(1)成活阶段:第 1~3d,所有细胞均存活。(2)成熟阶段:第 4~6d,消除非神经元后,神经元迅速分化,出现神经元的形态特征。(3)稳定阶段:第 7~9d,神经元已充分分化,并维持稳定的结构。

2.2 DZXYS 对培养神经元代谢率的影响:D-gal 攻击 72h 后,以 MTT 法用酶标仪检测神经元的代谢状态,

数据统计分析如附表。结果显示,DZXYS 高、中、低剂量给药组的代谢率比正常对照组低、比模型组高,其中低剂量组比其它各给药组高,统计学差异均有高度显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。表明 DZXYS 能提高代谢率而防止原代培养神经元损伤。

2.3 DZXYS 对培养神经元凋亡构成比的影响:D-gal 攻击 72h 后,以 PI 染色流式细胞仪分析原代培养神经元凋亡构成比,数据统计分析如附表。结果显示,DZXYS 高、中、低剂量给药组凋亡构成比较正常对照组高,较损伤模型组低,统计学差异均有高度显著性($P < 0.01$)。表明 DZXYS 通过抑制凋亡而防止原代培养神经元损伤。

2.4 DZXYS 对培养神经元细胞形态的影响:D-gal 攻击 72h 后,HE 染色,Olympus 光学显微镜下观察照相,显示神经元的病变特点。(1)正常对照组神经元形态:神经胶质细胞数量少,胞浆少,圆核浓染。边缘不齐。神经元数量较多,突起致密,锥体神经元胞浆嗜碱性染色,圆核深染,核浆比为 3:5。直行轴突粗大均匀;树突分岔多、弯曲行走;突起交织成网状。颗粒神经元胞浆淡染,圆核深染,核浆比为 6:7;突起弯曲、分支多。多极神经元数量少,胞浆淡染,核圆,核浆比为 4:5;突起多,分叉多,行走弯曲。细胞外散在大量的紫红色细小颗粒,大小不等,圆形,有生物膜外界,部分颗粒有蓝染的核心。(2)损伤模型组神经元病变:神经胶质细胞数量减少,胞浆少,核浓缩深染。神经元数量减少,突起稀疏。锥体神经元减少、变小,胞浆深染,核染色质密集,核浆比值增加;突起减少,直径增粗;轴突粗细不均,行径弯曲;树突深染、僵硬、膨大和扭曲,分支减少。其它类型的神经元具有类似的病变。细胞外颗粒增多。(3)安理申组神经元形态:神经胶质细胞数量减少、体积缩小比损伤模型组严重。神经元病变特点与损伤模型组类似,但程度减轻。神经元数量、体积回升,突起密度回升。轴突较均匀,无弯曲,树突无僵硬;但突起的浆质内出现颗粒状结构,使分支密度无明显回升,纤细网络仍然疏散。细胞外颗粒减少。(4)DZXYS 给药

组神经元形态:DZXYS 高、中、低剂量给药组的病变特征相似。神经胶质细胞与正常对照组类似。神经元病变性质与损伤模型组类似,但程度明显减轻。神经元总数量明显回升,突起形成的网络密集,类似于正常对照组。神经元的体积回升,数量回增。轴突均匀、直行,树突无僵硬,突起分支密度明显回升,纤细网络密集类似于正常对照组。细胞外颗粒明显减少,接近于正常。

2.5 丹桅逍遥散对神经元突起密度的影响:D-gal 攻击 72h 后,常规 HE 染色,40 倍物镜下形态计量神经元突起密度。数据统计如附表。结果显示,除 DZXYS 低剂量组外,其余各给药组的神经突起密度比正常对照组低,比损伤模型组高,且 DZXYS 低剂量给药组高于其它组,统计学差异均有高度显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。表明 DZXYS 的作用效果与神经元突起密度无关,其中低剂量组效果最好。

2.6 丹桅逍遥散对神经元 AR-mRNA 的影响:D-gal 攻击 72h 后,各组 RT-PCR 检测均无 AR-mRNA 的表达,表明阿糖胞苷消除了胶质细胞,无 AR-mRNA 表达。不加入阿糖胞苷时,正常对照组,损伤模型组,安理申组和 DZXYS 高、中、低剂量给药组的 AR-mRNA 灰度值依次为 1.00、0.868、0.671、1.304、0.650、0.226,表明半乳糖醇只在少突胶质细胞形成。

3 讨论

本实验证实了 D-gal 通过氧自由基引起原代培养神经元损伤^[2,3,5~7]。阳性对照药安理申通过提高代谢功能而起防治作用,表现为神经元的代谢率回升、凋亡率下降;不影响病变形态,但出现轴浆运输障碍。

DZXYS 是从肝论治 AD 的代表方。AD 证型脏腑传变的中心环节是肝郁气结^[1]。AD 虚证源于肾,终于脑、心,肝郁促进 AD 向难治状态发展是为证型脏腑传变的关键。《辨证录·呆病》论及 AD 患者肝气郁,脾气衰,痰阻清窍而成痴,症见健忘、失算、言误或迷失。阴不足则肝阳亢,症见目眩、耳鸣、易怒、苔黄舌红、脉弦数。应以疏肝清热,养血健脾治之。DZXYS 方中柴胡疏肝解郁为君药;牡丹皮、炒栀子清热解毒,当归养血理气,白芍养血柔肝,共为臣药;白术、茯苓、甘草健脾益气,共为佐药^[8~12]。以 10% 的 DZXYS 药物血清加入到培养基中能一定程度地逆转 D-gal 引起的原代培养神经元损伤。

D-gal 损伤的原代培养神经元代谢率降低、凋亡率升高,DZXYS 药物血清能使原代培养神经元的代谢率回升、凋亡率下降。其中,低剂量组效果最好,高剂量组次之,中剂量组效果较差。说明 DZXYS 提高了受损神经元的代谢功能。

D-gal 损伤的原代培养神经元出现胞体的变性坏死,出现突起密度的降低,DZXYS 药物血清能减轻原代培养神经元的胞体损伤,能增高突起密度。其中低剂量组效果最好,高剂量组次之,中剂量组效果最差。说明 DZXYS 能维持受损神经元的形态结构。

综上所述,通过影响原代培养神经元功能和结构,DZXYS 能降低凋亡率,增高代谢率,减轻损伤程度,提高神经突起密度,促进轴浆运输功能,从而起到治疗 AD 的作用。

感谢 感谢北京中医药大学东直门医院田金洲教授赠送安理申片,北京中医药大学国医堂赠送丹桅逍遥散处方的中药饮片。

参考文献

- 1 蔡大勇,黄启福.老年期痴呆中医证型的五脏传变规律.北京中医药大学学报,2001,24(3):11-13.
- 2 蔡大勇,赵雁,黄启福.D-半乳糖致原代培养神经元损伤模型的建立.中国病理生理学杂志,2002,18(6):18-21.
- 3 司徒镇强,吴军正主编.细胞培养.西安:世界图书出版公司,1996,221-227.
- 4 王伯云,李玉松,黄高昇,等主编.病理学技术.北京:人民卫生出版社,2000,855-869.
- 5 Peeyush K,Lifei W,Naseem H A. Semi-quantitation of mRNA by polymerase chain reaction; levels of oxidative defense enzymes and aldose reductase in rat lenses cultured in hyperglycemic or oxidative medium. Res Com Mol Patho Pharm,1996,92:3-18.
- 6 Novelli G,Reichardt JKV. Molecular basis of disorder of human galactose metabolism: past, present, and future. Molecular Genetics and Metabolism,2000,71:62-65.
- 7 Murata M,Ohta N,Sakurai S,et al. The role of aldose reductase in sugar cataract formation; aldose reductase plays a key role in lens epithelia cell death (apoptosis). Chemico-Biological Interactions, 2001, (130/132):617-625.
- 8 杨军,王静,丁中华,等.脑康泰胶囊对脑缺血及痴呆小鼠学习记忆的影响.中国现代应用药学,2000,17(2):87-90.
- 9 吴正治,唐春艳,卢汉平.清肝泻胆法对老年性痴呆模型小鼠学习记忆能力及海马 M 受体亚型的影响.中医杂志,1999,40(7):437-438.
- 10 皮明钧,文彬,陈力,等.加味温胆汤对亚急性衰老大鼠自由基及超微结构的影响.中国中医药科技,1999,6(1):34-36.
- 11 寇俊萍,禹志领,田景萱,等.益智丸对小鼠记忆、脑内 SOD、MDA 及免疫功能的影响.中国中药杂志,1997,22(8):493-496.
- 12 皮明钧,刘莺,陈力,等.加味温胆汤对亚急性大鼠 GSH-Px 及肝、脑 MAO、LTP 的影响.中国中医基础医学杂志,1999,5(2):14-16.

寻求合作

本人经过 20 余年的努力,研究成功治疗小儿瘙痒症(湿疹、丘疹性寻麻疹)及多种顽癣、皮炎的方药。具有很高的开发价值和经济效益,希望与有关单位、专家及治疗皮肤病感兴趣的朋友合作。本着共同开发,共同受益,不需对方任何投资的合作方式。

联系地址:湖南省桂东县沙田镇上周江康民诊所,联系人:郭承中,电话:(0735)78681133,13135052811,邮编:423501。