

神经生长因子受体活性中草药及其成分的筛选

广东医学院生化研究室(湛江524023) 江黎明* 李志明** 韩宝铭***

摘要 一些神经元退行性病变Alzheimer's病,是导致早衰的重要原因之一,其发生和发展与缺乏神经生长因子的营养作用有关。而神经生长因子对神经元的营养支持作用主要是由受体介导的,本文采用神经生长因子受体竞争结合实验模型对14种传统抗衰老中草药的神经生长因子受体活性进行了筛选,并从牛膝中筛选出一种特异性抑制神经生长因子与其受体结合的活性物质,其 IC_{50} 为 $6.18 \pm 3.43 \mu g/ml$ 。

关键词 抗衰老 中草药 神经生长因子 受体

一些神经元退行性疾病,如Alzheimer's病,是导致早衰的重要原因之一,其发生和发展与缺乏神经生长因子(NGF)的营养支持有关^[1]。实验表明,多次给予NGF可以部分逆转一些神经元的退行性变化^[2]。大量研究表明,NGF的上述作用是由神经元细胞膜上的特异受体介导的;NGF通过与受体结合从而起到对神经元的营养及生长促进作用^[3]。显然,NGF受体活性物质的发掘具有广泛的应用价值。为此,本文采用NGF受体竞争结合实验为模型,对14种传统的抗衰老中草药进行了筛选评价,从中筛出了几种明显影响NGF受体结合的中草药,并进一步从牛膝中筛选出了一种能特异性抑制NGF受体结合的活性物质。

1 材料

1.1 材料: NGF和大鼠嗜铬神经瘤细胞PC12由美国Abbott药厂P. Distefano博士所赠; $Na^{125}I$ 购于Amersham; 乳过氧化物酶、过氧化氢、HEPES、BSA、硫酸鱼精蛋白购于Sigma; Sephadex G-75购于Pharmacia; DMEM培养液、小牛血清、热灭马血清以及青霉素和链霉素及其它细胞培养材料均购于Gibco。

2 方法

2.1 细胞培养: 将PC12细胞分散于各含10ml培养液(DMEM加7%小牛血清、7%热灭活马血清、 $50 \mu l/ml$ 青霉素和 $50 \mu g/ml$ 链霉素)的50ml培养瓶中,置 $37^{\circ}C$ 、5% CO_2 的饱和水蒸汽培养箱中进行培养。其它参照Greene方法^[4]操作。

2.2 NGF放射 ^{125}I 标记: 采用乳过氧化物酶法^[5]。即将装有 $10 \mu g$ 2.5S大鼠神经生长因子(mNGF)的带盖小离心管,加入 $0.1 mol/L$ 磷酸盐缓冲液($0.1 mol/L K_2HPO_4 - 0.1 mol/L KH_2PO_4$ (40.5:9.5), pH7.4)、 $1 mCi Na^{125}I$ ($10 \mu l$, $13 mCi^{125}I/\mu g$ 碘)、 $1 \pm 0.2 \mu g$ 乳过氧化物酶和 $0.045 mmol/L H_2O_2$,反应总体积为 $47 \mu l$ 。加入 H_2O_2 前后振摇均匀,在室温下($22^{\circ}C$)反应12min。加入 $150 \mu l$ CIP缓冲液($10 mmol/L$ 磷酸盐缓冲液,加 $1 mol/L NaCl$ 和 $0.1 mol/L NaI$, pH7.4)终止反应。然后加入 $200 \mu l$ P-100缓冲液(Hanks液加 $10 mmol/L$ HEPES、 $2 mg/ml$ BSA和 $0.5 mg/ml$ 硫酸鱼精蛋白, pH7.4)振摇均匀。 ^{125}I 标记的NGF(^{125}I -NGF)采用Sephadex G-75柱($2.5 \times 75 cm$)层析分离, ^{125}I 掺入率采用纸层析法测定为 $87 \pm 6.5\%$ 。

2.3 放射 ^{125}I -NGF受体结合实验: ^{125}I -NGF与PC12细胞膜上特异受体结合反应在总体

* Address: Jiang Liming, Department of Biochemistry, Guangdong Medical College, Zhanjiang

**香港中文大学生化系

***香港中文大学中药研究中心

积为0.25ml, 含0.25%BSA、0.2nmol/L ^{125}I -NGF (6000cpm/mol) 和 4×10^6 PC12细胞/ml的PBS (pH7.4) 中进行。竞争结合测定管加入一定浓度的中草药粗提物或纯化物, 非特异性结合管加入100nmol非标记NGF。室温 (22℃) 反应45min后, 结合到PC12细胞上的 ^{125}I -NGF采用经含0.3%Triton X-100和0.25%PEI的5mmol/L Tris-HCl缓冲液 (pH7.4, 4℃) 预先浸泡处理的Whatman GF/B玻璃纤维滤膜, 在细胞收集器 (24孔) 上抽滤分离。滤膜迅速先后用5ml含0.05%吐温20的PBS (4℃) 抽洗3次, 然后取出置一次性塑料 γ -射线测定管中, 采用Kontron Gama II Counting System进行 γ -射线测定。

3 结果

3.1 ^{125}I -NGF/PC12 NGF受体结合分析: 为了建立 ^{125}I -NGF/PC12 NGF受体结合实验模型用于NGF受体活性中草药及其有效成分的筛选, 本文首先对 ^{125}I -NGF受体结合的平衡速率和可饱和性进行了观察。 ^{125}I -NGF结合时间动力学实验结果表明, 在室温 (22℃) 下, ^{125}I -NGF受体结合反应45min后即可达到平衡 (图1)。饱和实验结果表明, 随着 ^{125}I -NGF浓度的增加, ^{125}I -NGF与PC12细胞上NGF受体的特异结合在 ^{125}I -NGF浓度为0~2nmol/L范围内呈可饱和性; 当 ^{125}I -NGF浓度大于2nmol/L时, 特异结合出现第二相升高的趋势 (图2)。这与文献报道PC12细胞具有高、低亲和力不同的2种NGF受体亚型相符。在 ^{125}I -NGF浓度为0~0.5nmol/L范围内, 特异结合随 ^{125}I -NGF浓度增加而呈近似于线性的增加, 并具有最大的斜率。故选择0.2nmol/L ^{125}I -NGF浓度进行受体竞争结合实验可获较高的灵敏度。

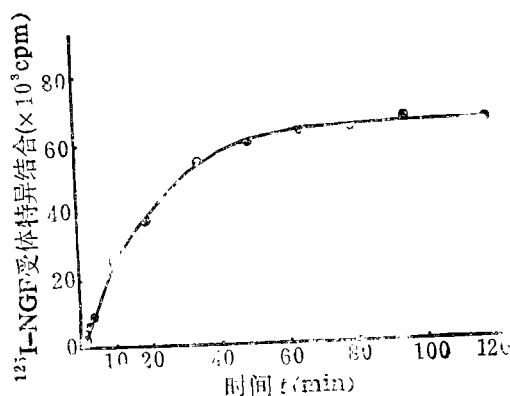


图1 ^{125}I -NGF与PC12细胞上受体结合时间动力学曲线

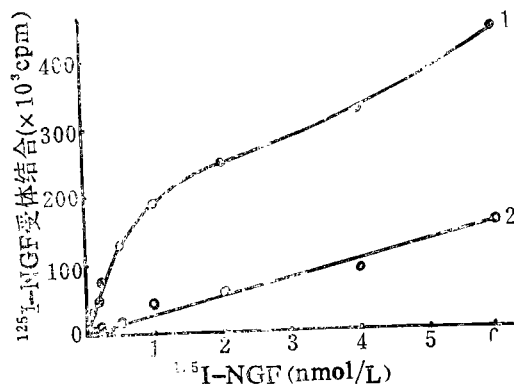


图2 ^{125}I -NGF与PC12细胞上NGF受体结合饱和曲线
1-结合 2-非特异性结合

3.2 14种传统抗衰老中草药对 ^{125}I -NGF受体结合的影响: 各种中草药经鉴定后切片, 分别水煮抽提20min, 抽提液过滤后经真空干燥成硬膏状, 4℃保存。实验前溶解稀释成所需浓度, 然后按上述方法进行 ^{125}I -NGF受体竞争结合实验。结果如表。

14种中药有5种的粗提物对 ^{125}I -NGF受体特异结合有不同程度的抑制作用 (图3-A), 其中牛膝的粗提物的抑制作用最显著, 其 IC_{50} 为 $0.301 \pm 0.26 \text{ mg/ml}$ ($n=3$); 另8种中草药的粗提物对 ^{125}I -NGF受体特异结合有不同程度的增强作用 (图3-B), 其中锁阳粗提物增

强结合的作用最强,其EC₅₀为0.054mg/ml,女贞子粗提物在低浓度时(<0.025mg/ml)对结合有极强的促进作用(EC₅₀<<0.01mg/ml),但随其浓度的增大,它对结合的促进作用反而逐渐减弱(图3-B)。

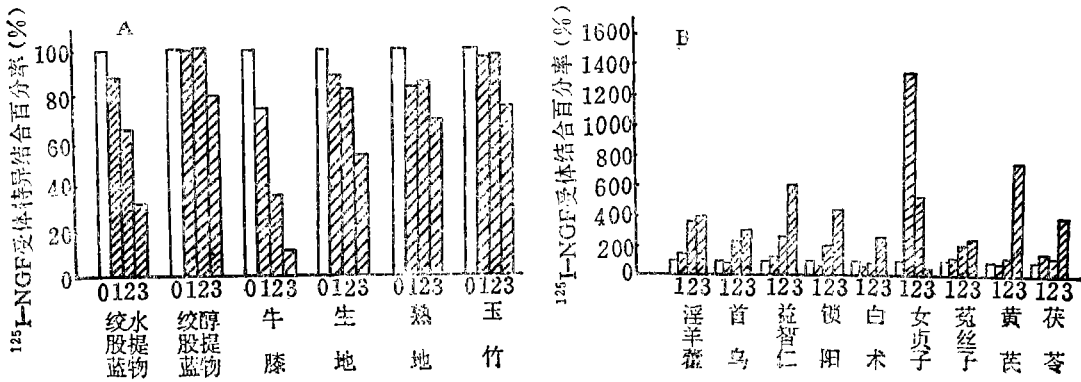


图3 14种中草药粗提物对¹²⁵I-NGF受体特异结合的影响

A-抑制结合的中草药

B-促进结合的中草药

□.空白对照管, ▨中草药粗提物测定管 1,2,3,中加粗提物的浓度分别为0.25、0.25和2.50mg/-ml

对牛膝的¹²⁵I-NGF受体特异结合抑制活性成分进行活性追踪分离纯化,结果分离出的活性单体成分N42-A对¹²⁵I-NGF受体特异结合抑制活性提高了49倍(IC₅₀=6.18±3.43μg/ml n=4,另文发表)。

3 讨论

神经元的退行性病变是导致早衰的重要原因之一。防止和逆转神经元的退行性病变可能是防治早衰的一条重要途径。实验表明一些神经元的退行性病变与缺乏NGF的营养支持有关;多次给予NGF可以逆转一些神经元的退行性变化。这显示了NGF在抗早衰研究和应用的重大价值。但因为NGF的抗原本性和来源及制备上的困难,使其作为药用的前景受到了很大的限制。因此,挖掘寻找小分子NGF受体活性物质替代NGF用于防治早衰具有重要意义。

神经生长因子(NGF)是神经细胞生长的重要调节因子,具有促进发育中的交感和感觉神经元的分化成熟,以及维持成熟交感神经元的正常功能等多种作用。大量的研究表明,NGF的神经营养支持作用是由神经元细胞膜上的特异受体介导的。这表明NGF受体结合实验是筛选NGF活性物质的理想模型。PC12细胞已被广泛用于神经元功能、分化以及NGF作用及其机制的研究。在PC12细胞膜上NGF受体密度较高,并且,NGF与PC12细胞上的特异受体结合可以诱导PC12细胞轴突生长,而分化为具有电兴奋性以及合成、释放儿茶酚胺类神经介质等交感神经元特性的终末分化细胞。为此,本文选择PC12细胞来建立用于

表1 14种中草药粗提物对NGF受体结合影响

粗提物	IC ₅₀ ^a (mg/ml)	EC ₅₀ ^b mg/ml
绞股蓝 I (水提物)	1.04±1.98 ^c	
绞股蓝 II (醇提物)	>2.50 ^c	
牛膝	0.301±0.20	
生地	1.02±1.23 ^c	
熟地	>2.50	
玉竹	>2.50	
淫羊藿		0.066
首乌		0.068
益智仁		0.088
锁阳		0.054
白术		0.216
女贞子		<0.010
菟丝子		<0.010
黄芪		0.066
茯苓		—

注: a-IC₅₀指抑制50%¹²⁵I-NGF受体特异结合所需加入中草药粗提物的浓度; b-EC₅₀指使¹²⁵I-NGF受体特异结合提高50%所需加入中草药的浓度; c-n=3

6 CA 1990, 112: 84160u	18 CA 1990, 112: 73902m
7 Sue C J, et al. Arch pharmacol Res, 1984, 7(2): 121	19 徐成俊, 等. 中草药, 1984, 15(1): 4
8 Sick W W, et al. Saengyak Hakhoechi, 1986, 16(4): 248	20 齐 治, 等. 天然产物研究与开发, 1989, 1(1), 82
9 徐成俊, 等. 药理学学报, 1985, 20(9): 652	21 康 白, 等. 中医药研究, 1989(5): 31
10 Shan X, et al. J Nat Prod, 1989, 52(4): 701	22 王荫棠, 等. 兰州医学院学报, 1989, 15(2), 59
11 北京医学院药学系黄花败酱研制组. 北京医学院学报, 1976(1): 17	23 高淑娟, 等. 天津中医, 1992(3): 42
12 CA 1980, 93: 3896c	24 王军仓, 等. 中医杂志, 1986, 27(5): 67
13 马越美, 等. 药学通报, 1987(2): 69	25 孙万里. 甘肃中医学院学报, 1990(3): 34
14 马越美, 等. 中药通报, 1987(6): 38	26 张元杏, 等. 中西医结合杂志, 1984(2): 109
15 何福江, 等. 药物分析杂志, 1991(2): 67	27 党胜兰, 等. 兰州医学院学报, 1990(4): 197
16 田 珍, 等. 中国药学杂志, 1989(21): 78	28 蔡忠琴, 等. 中药材, 1989(4): 38
17 Fursae N S, et al. Farm Zh(Kiev), 1984(3): 66	29 答自文, 等. 陕西中医, 1991(2): 88
	30 王荫棠, 等. 兰州医学院学报, 1988(1): 11
	(1993-06-07收稿)

(上接第81页)

NGF受体活性中草药及其有效成分筛选的¹²⁵I-NGF受体结合实验模型,并用此模型对14种传统抗衰老中草药进行了筛选。结果如(表)所示,锁阳等9种中草药对NGF受体结合不同程度的有促进作用(图3-B),提示其中可能含有NGF受体结合的激动剂;其余5种中草药对NGF受体结果有不同程度的抑制作用(图3-A),这种情况有2种可能性:一是其中含有NGF受体的专一性激动剂,二是含有NGF受体的专一性抑制剂。

进一步筛选分离出这些中草药中可能含有的NGF受体激动剂无疑具有广泛的应用前景;而分离出其中可能存在的NGF受体抑制剂,对NGF神经分子生物学研究及对一些已被证明与NGF或NGF受体过度表达相关的神经组织肿瘤的研究及防治同样具有十分重要的意义。

参 考 文 献

1 Levi-Montalcini R. Science, 1987(237) 1154	4 Greene L A, et al. Methods in Enzymol, 1987(147): 207
2 Springer J E. Experimental Neurology, 1988(102): 354	5 Thorell J I, et al. Biochem Biophys Acta, 1971(251): 363
3 Levi A. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1991(31): 205	(1993-01-11收稿)

《中国当代中医新思潮》征稿启事

四川云阳青年中医研究会组织专家学者主编的《中国当代中医新思潮》一书,并由国家级出版社出版发行。凡有志于振兴中医大业的同仁请积极撰写理论或临床文章(新见解、新设想、新经验),文稿一律用300格稿纸抄清,加盖单位公章,千字内文章尤受欢迎。附寄简历1份,一寸黑白免冠照片1张。届时将会同省级科委评选出优秀论文,颁发证书及奖金。专设特等奖5名,评奖结果在杂志上公布。

征稿时间: 1994-01-01至1994-04-01
稿件寄四川云阳人民路25号李华培收 邮政编码 634500 电话 22222

Hydride Generation-Second Derivative Spectrometry Determination of Germanium in Chinese Herbs

Yan Runan, Ma Changhua, and Xia Kaiyuan

Traces of Germanium in 31 different species of Chinese medicinal herbs were determined by hydride generation-second derivative spectrometry. The method proved to be simple, with high sensitivity and selectivity and can be used for the determination of Germanium in Chinese medicinal herbs and health care preparation containing Germanium.

(Original article on page 70)

Screening for NGF Active Chinese Medicinal Herbs and Their Active Components

Jiang Liming, Li Zhiming, and Han Baoge

It has been revealed that nerve growth factor (NGF) deficiency is the main cause of some kinds of neuron degenerative diseases such as Alzheimer's disease, and NGF administration can protect neuronal function decay and promote nerve regeneration. Moreover, NGF actions are mediated by its receptors. In the present study, ^{125}I -NGF receptor binding assay was used as a model for the screening of NGF receptor active components from 14 Chinese medicinal herbs. It was found that a component from the root of *Achyranthes bidentata* BI. possesses such inhibitory activity with $\text{IC}_{50} = 6.18 \pm 3.43 \mu\text{g/ml}$.

(Original article on page 79)

Studies on the Effect of Saikosaponins on Brain Electrical Activities of Sleep in Cat

Sun Bing, Hao Hongqian, Zheng Kaijun, et al

Effect of saikosaponins on sleep [slow wave-stage I (ISWS), slow wave-stage II (ISWS), rapid eye movement, REM] were studied in cats. Electrophysiological recording of EOG, EEG, EMG and PGO were monitored by polygraph for six consecutive hours. Preparation of saikosaponins was injected intraperitoneally. Results showed that saikosaponins could prolong total sleeping time, ISWS and REM time. The effect of saikosaponins is better than "zhushaanshen pill" by gastric gavage.

(Original article on page 82)

Effects of "Suxiaojiuxin pill" on Isolated Rabbit Aortic Stripes

Zhou Lianfa, Guo Jingsheng, et al

"Suxiaojiuxin pill" at a dose of 2mg/ml obviously inhibited the contraction of isolated rabbit aortic stripes induced by high K^+ , NA, Ach, His and 5-HT. In comparison with phenolamine, the "pill" did not shift the dose-response curve of NA, but depressed maximum response in a none competitive manner. However, similar to verapamil, it shifted high K^+ and Ca^{++} -free high K^+ dose response curve to the right at doses of 0.2~0.4mg/ml. PEG as a solvent did not show any effect in the all tests. These results indicated that "Suxiaojiuxin pill" has a Ca^{++} antagonistic effect in a none competitive manner, mainly by blocking Ca^{++}