

· 药理实验与临床观察 ·

黑海参多糖对 β -淀粉样蛋白诱导的皮质神经元凋亡的保护作用[△]

中山医科大学药理教研室 (广州 510089) 邱鹏新* 黎明涛 唐孝礼 苏兴文 林穗珍 颜光美**

摘要 体外培养大鼠皮质神经元,用 β -淀粉样蛋白(β -AP)诱导皮质神经元凋亡。黑海参多糖使皮质神经元存活率增加,使神经元的DNA电泳图谱不出现“梯子状”,使神经元的流式细胞仪分析图上不出现凋亡峰,表明黑海参多糖对 β -AP诱导的皮质神经元凋亡具有保护作用。

关键词 黑海参多糖 β -淀粉样蛋白 皮质神经元 凋亡

Protective Effects of Polysaccharide from *Holothuria atra* on Apoptosis of Cortical Neurons Induced by Amyloid β -Protein

Department of Pharmacology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences (Guangzhou 510089) Qiu Pengxin, Li Mingtao, Tang Xiaoli, Su Xingwen, Lin Suizhen and Yan Guangmei

Abstract Cortical neurons were cultured *in vitro* and induced to apoptosis by amyloid β -protein (β -AP). Polysaccharides from several TCM were screened with the apoptotic model. It was found that the polysaccharide obtained from *Holothuria atra* Jaeger increased the survival rate of cortical neurons in a dose dependent manner, and prevented the neuronal nuclei from shrinkage, condensation and cleavage induced by β -AP. It also prevented neuronal nuclear DNA fragmentation and blocked the neuronal apoptotic peak induced by β -AP. These results indicated that polysaccharide from *H. atra* can block cortical neuronal apoptosis induced by β -AP.

Key words polysaccharide from *Holothuria atra* Jaeger amyloid β -protein (β -AP) cortical neurons apoptosis

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 目前已被列入危害人体健康的主要疾病之一。 β -淀粉样蛋白(β -AP)的神经元毒性是AD的分子病理学基础,最近用转基因动物模型过度表达 β -AP成功地再现了AD的中枢神经系统病理变化,进一步使 β -AP在AD的发病机制上的作用成为公论^[1,2]。神经元表面的多聚糖蛋白(proteoglycans)可能介导 β -AP与神经元的相互作用,这一相互作用是 β -AP神经毒性效应所必需的,而这些多聚糖蛋白以肝素或类肝素为结合 β -AP的分子基础^[3]。许多具有抗衰老作用的中药(如灵芝、银耳、黑海参、茯苓)富含具有生物活性的多糖类物质,其临床应用在国内已得到证实,因此推测某些天然生物多糖可能具有防止中枢神经元退行性病变的作用。我们利用 β -AP诱导皮质神经元凋亡模型,对一些中药多糖的药理活性进行了筛选,结果发现黑海参多糖对 β -AP诱导的皮质神经元损伤有明显的保护作用。

1 实验材料

1.1 样品与试剂:黑海参多糖由本课题组采用酶法和碱法消化醋酸钾和乙醇分级沉淀,从新鲜黑海参 *Holothuria atra* Jaeger 的体壁中分离得到,分子量为 10 253 Da,经琼脂糖电泳证实为单一成分,多糖组成中氨基半乳糖、葡萄糖醛酸、岩藻糖、硫酸基含量分别为 16.12%、17.88%、11.66% 和 23.52%^[4]。 β -AP 购自美国 RBI, Hoechst 33258 荧光染料、碘化丙啶(propidium iodide, PI)和脱氧核糖核酸酶(Dnase-I)购自美国 Sigma 公司,阿糖胞苷(Ara-C)购自 Upjohn 公司,琼脂糖购自 Promega 公司,多聚赖氨酸(分子量 15 000)、Neurobasal Medium 和 BME 培养基为 Gibco 公司产品,其它试剂均为市售分析纯。

1.2 仪器:荧光显微镜、电泳仪、流式细胞仪、超净工作台(北京半导体设备厂);二氧化碳培养箱(德国 Heraeus 公司);培养皿(美国 Costar 公司)。

* Address: Qiu Pengxin, Department of Pharmacology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou

邱鹏新 男,37岁,副主任医师,参加国家杰出青年基金和国家自然科学基金等科研项目,1998年获卫生部科技进步三等奖,研究方向为神经药理学。

** 联系人

[△]由国家杰出青年基金 (No. 396250022)、国家自然科学基金 (No. 39770851 No. 39870265)和广东省自然科学基金 (No. 960125)资助

1.3 动物: 清洁级 SD 孕鼠, 孕期 18 d, 由中山医科大学实验动物中心提供。

2 方法与结果

2.1 大鼠皮质神经元原代培养: 无菌条件下取出胎鼠, 分离脑皮质, 放入无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} Hank's 平衡液中洗净, 在含 0.05% 胰酶和 0.53 mmol/L EDTA 的溶液中剪碎, 37℃ 孵育 15 min, 加等体积含 0.05% 胰酶抑制剂和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Dnase-I 的 Hank's 平衡液, 200 g 离心 5 min, 沉淀用含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} Hank's 平衡液洗 1 次, 用含 10% 小牛血清的培养基稀释至细胞密度为 8×10^5 cells/mL, 接种于预先铺有多聚赖氨酸的 35 mm 培养皿中, 每皿 2 mL, 在含 5% CO_2 95% 空气的二氧化碳培养箱中培养 48 h, 换含 20% B₂₇ 和 0.5 mmol/L 谷氨酰胺的培养基。第 7 天加黑海参多糖或 β -AP 处理。

2.2 细胞存活率检测: 皮质神经元培养至第 7 天, 各皿加不同浓度的黑海参多糖和 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ β -AP, 继续培养 48 h, 去培养基, 用含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} PBS 洗 1 次, 加 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FDA (fluorescein diacetate) 染色 5 min, 用含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} PBS 洗 1 次, 在荧光显微镜下观察并拍照, 每皿拍 3 个不同视野, 在照片上对神经元的存活率进行统计学分析^[5]。结果显示, 随着黑海参多糖浓度的增加, β -AP 处理后的神经元的存活率升高, 当黑海参多糖的浓度达到 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 神经元的存活率可达 100%, 说明黑海参多糖对 β -AP 诱导的皮质神经元凋亡的保护作用是剂量依赖性的 (图 1)。

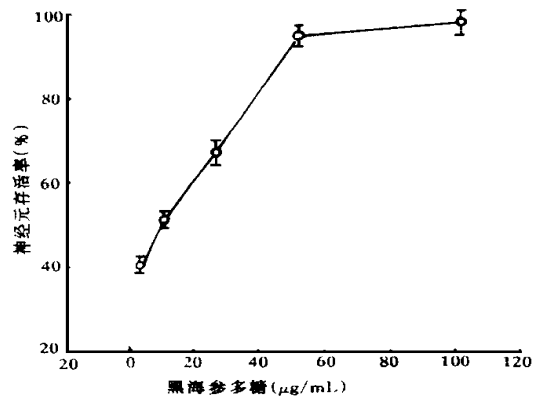
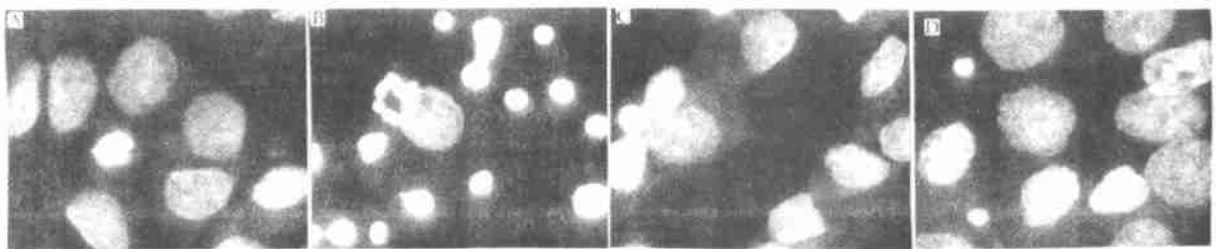


图 1 不同浓度的黑海参多糖对 β -AP (50 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 处理的皮质神经元存活率的影响

2.3 神经元凋亡的细胞核形态学检测: 实验分 4 组: 空白对照组, β -AP 组 (50 $\mu\text{mol}/\text{L}$), 黑海参多糖组 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 黑海参多糖), 黑海参多糖 + β -AP 组 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 黑海参多糖 + 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ β -AP)。加药后继续培养 48 h, 去培养基, 用含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} PBS 洗 1 次, 用 4% 的多聚甲醛固定 10 min, 用 PBS 洗 1 次, 自然晾干后加 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst 33258 染色 10 min, 双蒸水冲洗 2 次, 晾干, 荧光显微镜下观察并拍照^[6]。结果显示, 用 β -AP 处理的皮质神经元, 其细胞核明显固缩、凝聚和断裂 (图 2-B), 而 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 黑海参多糖 + 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ β -AP 组神经元的细胞核 (图 2-D) 和黑海参多糖组神经元的细胞核 (图 2-C) 与空白对照组神经元的细胞核 (图 2-A) 形态接近, 说明黑海参多糖对皮质神经元没有毒性, 对 β -AP 诱导的皮质神经元凋亡有明显的保护作用。



A 空白对照; B 经 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ β -AP 处理的神经元; C 加 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 黑海参多糖的神经元;

D 加 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 黑海参多糖后用 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ β -AP 处理的神经元

图 2 用 Hoechst 33258 染色分析神经元凋亡的形态变化

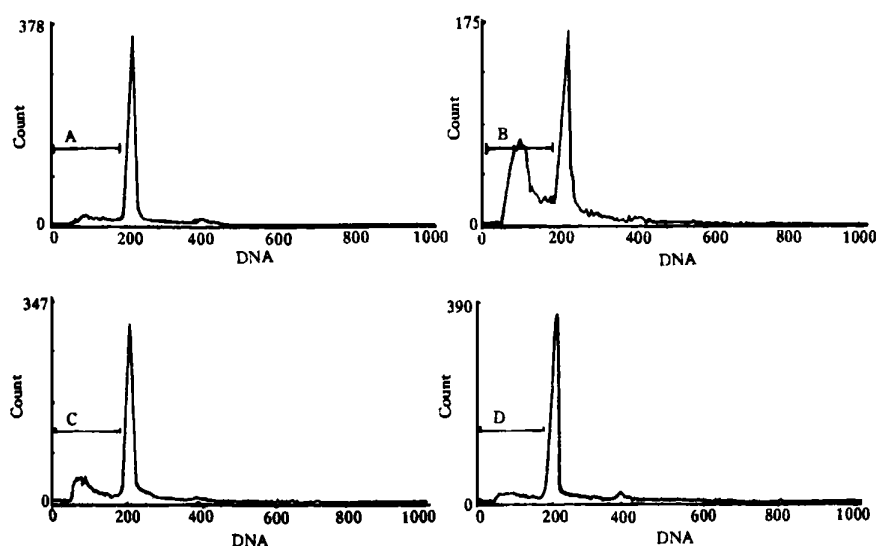
2.4 DNA 提取与电泳分析: 实验分组同 2.3。加药后继续培养 48 h, 去培养基, 用含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} PBS 洗 1 次, 0.125% 胰酶消化 10 min, 收集 5×10^6 细胞, 用裂解液 (含 0.2% Triton 50 mmol/L Tris 10 mmol/L EDTA) 裂解后, 酚/氯仿抽提, 样品在 1% 琼脂糖凝胶上电泳, 溴化乙锭染色, 紫外灯下观察拍照^[7]。以 Yan 等^[8,11] 建立的小脑颗粒神经元低钾凋

亡模型提取的 DNA 电泳作标准对照 (图 3-B)。结果显示, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 黑海参多糖 + 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ β -AP 组 (图 3-E) 细胞 DNA 与空白对照组 (图 3-C) 细胞 DNA 一样, 在琼脂糖凝胶上电泳显示分子量很大的一条带, 说明前两组细胞没有发生凋亡; 而 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ β -AP 组细胞 DNA 电泳显示清晰的“DNA 梯” (图 3-D), 说明 β -AP 诱导皮质神经元发生凋亡。



A-DNA标准分子量参照物; B标准凋亡模型对照(5 mmol/L K^+ 中培养的小脑颗粒神经元); C空白对照; D用 $50 \mu\text{mol/L}$ β -AP处理的神经元; E加 $50 \mu\text{g/mL}$ 黑海参多糖后用 $50 \mu\text{mol/L}$ β -AP处理的神经元

图 3 神经元凋亡的 DNA凝胶电泳分析



A空白对照; B经 $50 \mu\text{mol/L}$ β -AP处理的神经元; C加 $50 \mu\text{g/mL}$ 黑海参多糖的神经元;
D加 $50 \mu\text{g/mL}$ 黑海参多糖后用 $50 \mu\text{mol/L}$ β -AP处理的神经元

图 4 流式细胞仪对细胞凋亡峰的定量分析

3 讨论

程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD)是机体在发育过程中清除多余细胞的生理性自杀过程,也称凋亡(apoptosis)。估计在胚胎发育或出生后的早期阶段,中枢神经系统有多达 50% 以上的神经元发生程序性死亡。越来越多的证据表明,某些神经退行性疾病如阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)、帕金森氏症(Parkinson's disease)等是由于中枢神经发生了病理性的程序性死亡^[10]。国内外对于中枢神经系统细胞凋亡的研究,多采用原

2.5 流式细胞仪定量分析细胞凋亡峰:实验分组同
2.3 加药后继续培养 48 h,去培养基,用 PBS洗 2 次,0.125%胰酶消化 5 min,收集 $\times 10^6$ 细胞,将细胞悬浮于 pH7.4 PBS中,用 4#注射针头抽吸使成单个细胞悬液,用预先冷却至 -20°C 的 70%乙醇固定细胞, 4°C 过夜, $200 \times g$ 5 min离心收集细胞,弃乙醇,将细胞悬浮于含有 50 mg/L 碘化丙啶 50 mg/L Rnase-I 的染液中,避光于 37°C 温育 1 h 后进行流式细胞仪测定,采集荧光强度值并以仪器所配软件进行数据处理^[9]。结果显示, $50 \mu\text{g/mL}$ 黑海参多糖组(图 4-D)和正常对照组(图 4-A)一样均无亚 G1峰出现, $50 \mu\text{mol/L}$ β -AP组(图 4-B)出现明显的亚 G1峰, $50 \mu\text{g/mL}$ 黑海参多糖+ $50 \mu\text{mol/L}$ β -AP组(图 4-C)的亚 G1峰几乎消失,说明黑海参多糖不会诱导皮质神经元凋亡。而对 β -AP诱导的皮质神经元凋亡有明显的保护作用。

代培养的中枢神经元,用某些因素诱导神经元发生凋亡,以研究神经元凋亡的机制或抗凋亡药物的作用机制^[11]。细胞发生凋亡时,出现明显的核固缩、凝聚、断裂,形成凋亡小体,细胞 DNA电泳时出现明显的“梯子状”,在流式细胞仪 DNA定量分析图谱上出现显著的凋亡峰,通过这些凋亡特征的检测,可以定性定量分析细胞凋亡的情况。本文采用原代培养的大鼠皮质神经元,以 β -AP诱导神经元凋亡,然后从细胞存活率、细胞核形态观察、DNA断裂的凝胶电泳分析及流式细胞仪凋亡峰的定量分析等方面

均确证 β -AP诱导的皮质神经元死亡是典型的细胞凋亡,黑海参多糖对 β -AP诱导的皮质神经元凋亡有明显的保护作用。

黑海参多糖与肝素一样,都是酸性粘多糖,因此,我们从研究结果推测,神经元细胞上可能存在酸性粘多糖的特异性受体,酸性粘多糖对神经元的保护作用是通过受体介导的。目前,受体的分离纯化及黑海参多糖的分子作用机制研究正在进行之中。

参 考 文 献

1 Frank, M L, *et al.* Nature Genetics, 1995, 9: 21

- 2 Barger, S W, *et al.* Nature, 1997, 388: 878
- 3 Yan G M, *et al.* International Symposium of Alzheimer's disease. Osaka, Japan, 1996
- 4 唐孝礼,等. 中药材, 1999, 22(5): 223
- 5 Yan G M, *et al.* Mol Pharmacol, 1995, 47: 248
- 6 Yan G M, *et al.* J Neurochem, 1995, 65: 2425
- 7 Yan G M, *et al.* J Pharmacol Exp Ther, 1995, 274: 983
- 8 Yan G M, *et al.* Brain Res, 1994, 656: 43
- 9 黎明清,等. 生物化学与生物物理学报, 1997, 29(5): 495
- 10 Bains J S, *et al.* Brain Res Brain Res Rev, 1997, 25(3): 335
- 11 颜光美. 中山医科大学学报, 1998, 19(1): 1

(1999-06-29收稿)

阿魏酸钠和当归醇沉物对免疫性肝损伤的干预作用[△]

湖北医科大学药理教研室(武汉 430071) 李 颖* 彭仁

摘 要 阿魏酸钠(SF)及当归醇沉物(ESA)对卡介苗加脂多糖致小鼠免疫性肝损伤有保护作用,二者均降低肝损伤小鼠血清 ALT和谷胱甘肽 S转移酶活性,并增加肝细胞浆中谷胱甘肽还原酶活性,同时 ESA降低肝细胞浆中丙二醛含量,提示当归的护肝作用与抗脂质过氧化有关。ESA在护肝的同时尚能明显抑制小鼠脾脏指数的增加,提示 ESA更广泛的护肝机制。

关键词 阿魏酸钠 当归醇沉物 免疫性肝损伤 谷胱甘肽还原酶

Protective Effects of Sodium Ferulate and Ethanol Sediments from Danggui (*Angelica sinensis*) on Immunological Liver Injury

Department of Pharmacology, Hubei University of Medical Sciences (Wuhan 430071) Li Ying and Peng Renxiu

Abstract Sodium ferulate (SF) and ethanol sediments from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels (ESA) showed their protective effects on the immunological liver injury induced by lipopolysaccharide (LPS) in bacillus calmette-guerin (BCG) primed mice. They both suppressed serum ALT and glutathione S-transferase activity, and increased glutathione-reductase activity in hepatic cytosol in liver damaged mice. ESA also reduced the level of malondialdehyde (MDA), a product of lipid peroxidation, in hepatic cytosol. All these effects reminded that antioxidation was an important mechanism for *A. sinensis* to antagonize immunological liver injury. That ESA decreased the spleen index in liver damaged mice also reminded that there may be some other protective mechanisms of *A. sinensis*.

Key words sodium ferulate (SF) ethanol sediments from *Angelia sinensis* (Oliv.) Diels (ESA) immunological liver injury glutathione-reductase

当归单体成分阿魏酸钠(SF)对多种化学性肝损伤有保护作用^[1],但未见当归作用于免疫性肝损伤报道,已知当归醇沉物(ESA)有免疫活性^[2],但未见对肝损伤作用报道,本文用卡介苗加脂多糖的方法制造小鼠免疫性肝损伤模型,观察 SF及 ESA的影响,以期更全面认识当归对肝损伤的干预作用。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂:卡介苗(BCG)由卫生部兰州生物制品所提供,细菌脂多糖(LPS)购自 Sigma公司,血清型 Salmonella Typhimurium. 2,4-二硝基氯苯(CDNB),氧化型谷胱甘肽(GSSG),还原型谷胱甘肽(GSH)和还原型辅酶II(NADPH)为 Sigma公司产品,硫代巴比妥钠(TBA),5,5'-二巯-2,2'-二硝基苯甲酸(DTNB),阿魏酸钠(Sodium Ferulate, SF)片、

* Address: Li Ying, Department of Pharmacology, Hubei University of Medical Sciences, Wuhan

李 颖 男,29岁,湖北医科大学药理教研室讲师,药理学硕士学位。专业方向为生化药理,主要从事药物代谢、肝损伤及肝保护方面的工作。

[△]湖北省教委资助项目