

## 。药理实验与临床观察。

调心方对  $\beta$  淀粉样蛋白所致大鼠海马神经元凋亡的调控作用

姚明忠,赵伟康\*

(上海中医药大学老年医学研究所,上海 200032)

**摘要:**目的 探讨调心方的药效及作用机制 方法 原代培养大鼠海马神经元,  $A\beta$  1-42诱导神经细胞毒模型 采用 FDA与 PI双染检测神经元存活率, Hoechst 33258染色, TUNEL判断神经元凋亡,免疫细胞化学研究 Caspase-3表达, Northern Blot RT-PCR研究凋亡相关基因(bcl-2 bax c-jun c-fos)表达 结果 神经元经  $A\beta$  1-42处理后,活细胞数减少,染色质浓缩、核碎裂, TUNEL染色阳性神经元增多, Caspase-3表达增加, bcl-2 mRNA表达减少,而 bax与 c-jun表达增加, c-fos的表达变化不明显 调心方可显著改善上述变化 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 其机制可能通过提高 bcl-2 mRNA水平,降低 bax和 c-jun mRNA水平,减少 Caspase-3表达而实现

**关键词:**  $\beta$  淀粉样蛋白;调心方;神经元凋亡;半胱天冬酶-3;凋亡相关基因表达

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)06-0521-04

### Regulating effect of heart-beneficial recipe on $\beta$ -amyloid induced apoptosis of rat hippocampal neurons

YAO Ming-zhong, ZHAO Wei-kang

(Institute of Geriatrics, Shanghai University of TCM, Shanghai 200032, China)

**Abstract Object** To study the effect and mechanism of heart-beneficial recipe (HBR) on  $\beta$ -amyloid induced neuronal apoptosis. **Methods** In order to establish neurotoxic model, the primary cultured rat hippocampal neurons were treated with  $25\mu\text{mol/L}$  aggregated  $\beta$ -amyloid fragment 1-42 ( $A\beta$  1-42). Neuronal survival was assessed by viable counting after double-stained with fluorescein diacetate (FDA) and propidium iodide (PI). Apoptosis of neurons was determined by Hoechst 33258 staining and terminal transferase deoxyuridine nick-end labeling (TUNEL) staining. The protein expression of Caspase-3 was examined by immunocytochemical SABC method. The transcription of mRNAs related to bcl-2, bax, c-jun and c-fos gene were observed by Northern Blot or RT-PCR method. **Results** In the  $A\beta$  1-42 treated neurons, the number of viable cell was decreased. Hoechst 33258 staining showed condensation of nuclear chromatin and nuclear fragmentation. TUNEL staining revealed that the number of positive neuron was increased. The expression of Caspase-3 protein was elevated. The expression of bcl-2 mRNA was decreased, but bax and c-jun mRNA were increased. After HBR treatment, the above indexes were improved. **Conclusion** HBR could regulate the expression of apoptosis-associated gene and Caspase-3, attenuate the neurotoxic action of  $A\beta$  1-42 and improve neuronal viability via suppressing apoptotic process.

**Key words**  $\beta$ -amyloid protein; heart-beneficial recipe; neuronal apoptosis; Caspase-3; apoptosis-associated gene expression

Alzheimer病(AD)的主要病理特征为神经元丢失、大量老年斑(SP)、神经纤维缠结(NFT)其发病机制有: $\beta$ 淀粉样蛋白( $\beta$ -amyloid,  $A\beta$ )毒性说<sup>[1]</sup>、Tau蛋白异常修饰说、神经细胞凋亡说<sup>[2,3]</sup>等。中医认为AD属“神病”范畴,就五脏而言,心与“神”直接相关,治疗AD可从调心立法,调心方即以此为依

据,经临床疗效观察,能有效改善轻中度AD患者的记忆力、智力、认知功能、生活能力<sup>[4,5]</sup>。实验发现调心方可显著改善  $A\beta$  诱导的大鼠痴呆模型学习记忆障碍,提高  $A\beta$  大鼠下降的ChAT活性和M受体Rt值<sup>[6]</sup>,但其作用机制还有待深入研究。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

\* 收稿日期: 2000-10-26

基金项目: 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(No. 98CJ01)资助

作者简介: 姚明忠(1962-),男,江苏丹阳人,副教授、博士,现在中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所进行博士后研究,研究方向为延缓衰老、Alzheimer病研究及基因治疗。

神经细胞毒模型,从神经细胞凋亡角度,探讨调心方的药效与作用机制。

### 1 实验材料

Wistar孕鼠(上海中医学大学实验动物中心),调心方(党参、桂枝、茯苓、远志、菖蒲等组成,上海市中医药研究院老年所提供), $A\beta$  1-42(37℃孵育 3 d,使其变成聚集状态),Tacrine (Sigma),小鼠抗大鼠 CPP32单克隆抗体(Santa Cruz),SABC免疫组化染色试剂盒(博士德公司提供),In Situ Cell Apoptosis Detection Kit, POD(华美公司提供),随机引物标记盒、Access RT-PCR盒(Promega), $[\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP(北京亚辉公司),bcl-2 c-jun c-fos cDNA探针(北京市肿瘤研究所提供),bax PCR引物(北京赛百盛公司合成), $\beta$ -actin cDNA探针及 PCR引物(德国 Leipzig大学 Dr Chen赠送)。

### 2 实验方法

2.1 大鼠海马神经元原代培养与鉴定:从 18~ 19 d Wistar胎鼠取海马进行神经元原代培养。培养至 12 d的神经细胞经神经元特异性烯醇化酶(NSE)免疫细胞化学(SABC法)鉴定,神经元占 95%以上。

2.2 调心方含药血清的制备及剂量-效应关系:雄性 Wistar成年大鼠 20只,分为: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、3、5、5倍 ig大鼠,每天给药 2次,连续 3 d,末次给药后 1 h采血,分离血清。采用神经元存活率测定(MTT比色分析)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 d,分为 4组:正常组、模型组( $A\beta$  1-42)、Tacrine组(0.15 mmol/L Tacrine+  $A\beta$  1-42)、调心方组(调心方药物血清+  $A\beta$  1-42)。  $A\beta$  1-42的终浓度为 25  $\mu$ mol/L,处理 24 h。

2.4 调心方对  $A\beta$  所致的神经元存活率的影响: FDA与 PI双染法。

2.5 调心方对  $A\beta$  所致的神经元凋亡的影响: Hoechst 33258染色与 TUNEL(按试剂盒说明书操作)。

2.6 调心方对  $A\beta$  所致的蛋白酶 Caspase-3表达的影响: SABC法。

2.7 调心方对  $A\beta$  所致的神经元凋亡相关基因表达的影响。

2.7.1 Northern印迹杂交:细胞总 RNA提取采用异硫氰酸胍一步法,其它步骤按分子克隆实验指南方法<sup>[7]</sup>进行。

2.7.2 RT-PCR bax PCR引物: 5' TCAGCC-CATCTTCTTCCAGATGGT 3', 5' CCACCAGC-TCTGAACAGATCATGA 3';  $\beta$ -actin PCR引物: 5' CCAGCCATGTACGTTGCTATCCAG 3', 5' GGAACCGCTCATTGCCAATGGTGA 3'。按 Access RT-PCR盒说明书操作。

2.8 图像处理与结果分析:采用 LEICA Q500IW 图像分析系统分析积分吸光度(IA),所得数据用 SPSS

9.0统计软件进行方差分析(one-way ANOVA)。

### 3 结果

3.1 调心方对  $A\beta$  所致神经元存活率的影响(FDA与 PI双染法):荧光镜下观察到活细胞呈绿色,死细胞呈红色。正常组、模型组、Tacrine组、调心方组神经元存活率(%) ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )分别为 100.00 $\pm$ 12.69, 38.47 $\pm$ 7.29, 50.92 $\pm$ 8.28和 76.53 $\pm$ 12.49。模型组神经元存活率较正常组显著降低( $P < 0.01$ ); Tacrine组、调心方组神经元存活率较模型组均显著升高( $P < 0.05$ 或  $P < 0.01$ );调心方组与 Tacrine组之间比较有显著性差异( $P < 0.01$ )。

3.2 调心方对  $A\beta$  所致的神经元凋亡的影响。

3.2.1 Hoechst 33258染色:荧光镜下观察到正常组细胞核形态较大,染色质密度低而均匀。模型组染色质浓缩,甚至核碎裂。调心方组染色质浓缩或核碎裂的细胞有所减少,而 Tacrine组的变化不太明显。

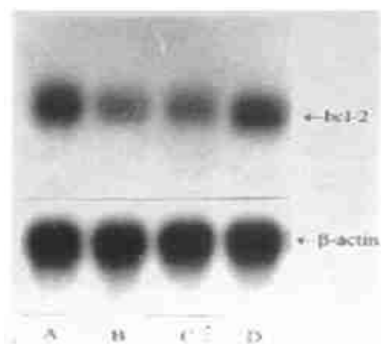
3.2.2 TUNEL:正常组、模型组、Tacrine组、调心方组 TUNEL染色阳性神经元数( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )分别为 3.50 $\pm$ 1.87, 78.67 $\pm$ 13.69, 72.50 $\pm$ 11.95和 46.83 $\pm$ 9.28。模型组 TUNEL染色阳性神经元数较正常组显著升高( $P < 0.01$ );调心方组较模型组显著下降( $P < 0.01$ ); Tacrine组有下降趋势,但无统计学意义,调心方组与 Tacrine组之间比较有显著性差异( $P < 0.01$ )。

3.3 调心方对  $A\beta$  所致的蛋白酶 Caspase-3表达的影响:正常组、模型组、Tacrine组、调心方组积分吸光度(IA) ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )分别为 460.59 $\pm$ 160.99, 2006.62 $\pm$ 661.15, 1792.58 $\pm$ 650.90和 1043.11 $\pm$ 296.00。模型组 Caspase-3表达较正常组明显升高( $P < 0.01$ );调心方组的表达较模型组明显降低( $P < 0.01$ ), Tacrine组有降低趋势,但无统计学意义。

3.4 调心方对  $A\beta$  所致神经元凋亡相关基因 bax、c-jun、c-fos 表达的影响: bcl-2、c-jun、c-fos、 $\beta$ -actin cDNA探针进行 Northern印迹杂交后放射自显影(图 1~ 3),图像分析系统进行积分吸光度

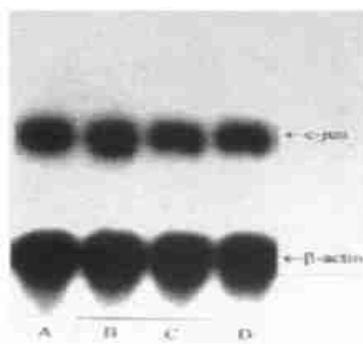
(IA)检测,结合内参照  $\beta$ -actin 的 IA 值进行上样量校正。Bax 及  $\beta$ -actin 引物同时进行 RT-PCR, PCR 产物琼脂糖凝胶电泳(图 4),可见扩增出了 540 bp

(bax)及 378 bp( $\beta$ -actin)条带,图像分析系统进行积分吸光度 (IA)检测,同样结合内参照  $\beta$ -actin 的 IA 值进行上样量校正(表 1)



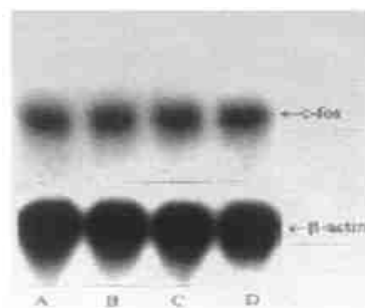
A 正常组 B 模型组  
C-Tacrine 组 D 调心方组

图 1 bcl-2 Northern 印迹杂交



图注同图 1

图 2 c-jun Northern 印迹杂交



图注同图 1

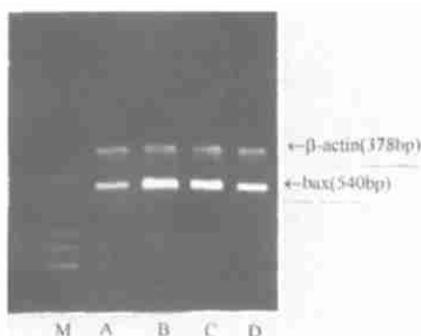
图 3 c-fos Northern 印迹杂交

## 4 讨论

鉴定  $A\beta$  神经毒作用,首先要检测  $A\beta$  是否损伤了培养的神经元,可用细胞存活率来判断,经 FDA 和 PI 双染后细胞计数看到了  $A\beta$  具有神经毒作用,损伤了培养神经元,使细胞存活率降低。 $A\beta$  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。研究应用了 Hoechst 33258 染色、TUNEL 进行观察,显示  $A\beta$  处理神经元后,出现了凋亡特征,因此可判断  $25 \mu\text{mol/L}$  聚集状态的  $A\beta$  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。

大量的事实证明凋亡发生是一个复杂的由 Caspase 家族成员介导的蛋白酶级联反应过程。该家族成员 Caspase-3 (CPP32) 是哺乳动物细胞凋亡中的关键蛋白酶。研究观察到  $A\beta$  引起 Caspase-3 的表达升高,说明可经过 Caspase-3 蛋白酶途径引起神经元凋亡。

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。c-jun 和 c-fos 是即早反应基因 (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/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。本研究观察到  $A\beta$  可以使 bcl-2 基因转录减少,而 bax/c-jun 的转录增加,



B-PCR Marker 为 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300 bp(自下而上),其余图注同图 1

图 4 bax RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

表 1 调心方对  $A\beta$  所致神经元凋亡相关基因 bcl-2

bax c-jun c-fos 表达的影响(校正后的 IA 值)

| 组别      | bcl-2    | bax    | c-jun   | c-fos   |
|---------|----------|--------|---------|---------|
| 正常      | 1 655.32 | 96.46  | 1920.74 | 1054.40 |
| 模型      | 621.32   | 149.61 | 2343.20 | 1175.23 |
| Tacrine | 729.55   | 131.99 | 2035.22 | 1138.59 |
| 调心方     | 1 466.45 | 107.02 | 1979.36 | 1094.38 |

结果显示: (1) bcl-2 模型组的 bcl-2 表达较正常组降低了 62.46%, 而 Tacrine 组、调心方组的表达较模型组分别升高了 0.17、1.36 倍。(2) bax 模型组的 bax 表达较正常组升高了 55.10%, 而 Tacrine 组、调心方组的表达较模型组分别降低了 11.78%、28.47%。(3) c-jun 模型组的 c-jun 表达较正常组升高了 21.99%, 而 Tacrine 组、调心方组的表达较模型组分别降低了 13.14%、15.53%。(4) c-fos 模型组的 c-fos 表达较正常组升高了 11.46%, 而 Tacrine 组、调心方组的表达较模型组分别降低了 3.21%、6.88%, 变化不甚明显。

表明  $A\beta$  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

调心方由党参、桂枝、茯苓、远志、菖蒲等组成,党参补益元气、安神益智,为君;桂枝温通经脉、振奋心阳为臣;茯苓益气凝神、化痰强记,远志安神、益智、开窍,二药为佐;菖蒲豁痰通窍增智为使,全方共奏益心气、振心阳、化痰浊、通心窍之功效。研究发现调心方能减轻  $A\beta$  诱导的神经元凋亡,使细胞存活率增加,这可能是调心方临床发挥疗效的机制之一。

研究还发现调心方可降低 Caspase-3 的表达,对凋亡相关的 Caspase-3 途径进行调控。在凋亡相关基因的 mRNA 表达研究中心发现,调心方可提高 bcl-2 表达,降低 bax 和 c-jun 的表达,通过对这些凋亡相关基因表达的调控,来抑制  $A\beta$  诱导的神经元凋亡。实验中调心方对 c-fos 表达的调控作用不明

显,可能是由于 c-fos 属于即刻早期反应基因,处理 24 h 后其表达变化的高峰已过

参考文献:

- [1] Selkoe D J. Alzheimer's disease: a central role for amyloid [J]. J Neuropathol Exp Neurol, 1994, 53: 438-447.
- [2] Smale G, Nicoll N R, Brady D R, *et al*. Evidence for apoptotic cell death in Alzheimer's disease [J]. Exp Neurol, 1995, 133: 225-230.
- [3] Baring A M. Is apoptosis key in Alzheimer's disease? [J]. Science, 1998, 281: 1303-1304.
- [4] 林水森. 调心肾治疗老年性痴呆 [J]. 中国中西医结合杂志, 1992, 12(7): 393.
- [5] 林水森, 杨柏灿. 养心健脑液治疗 Alzheimer 痴呆的临床观察 [J]. 上海中医药大学上海市中医药研究院学报, 1996, 10(2): 44-47.
- [6] 周晖, 赵伟康. 调心方对  $A\beta$  大鼠痴呆模型空间学习记忆障碍和胆碱能系统的影响 [J]. 中药药理和临床, 1998, 14(3): 29-31.
- [7] J 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南 [M]. 第二版. 北京: 科学出版社, 1992.

## 海噻啉抗肿瘤作用的实验研究

季宇彬, 高世勇, 孔琪, 张秀娟, 杨宝峰\*

(哈尔滨商业大学 制药工程系, 黑龙江 哈尔滨 150076)

**摘要:** 目的 研究海噻啉的抗肿瘤作用。方法 采用 MTT 实验和集落形成实验观察海噻啉的体外抗肿瘤作用; 通过海噻啉对 FC 小鼠和  $S_{180}$   $H_2$  荷瘤小鼠瘤重和生存时间的研究, 观察了海噻啉的体内抗肿瘤作用。结果 海噻啉对 8 种人癌细胞具有一定的杀伤作用, 以对 BGC-823 Eca-109 HCT-8 细胞的抑制作用最强; 对 BGC-823 Eca-109 HCT-8 细胞的集落形成有明显的抑制作用, 以对 Eca-109 细胞集落形成抑制作用最强; 可明显抑制 FC 小鼠和  $S_{180}$  小鼠瘤体的生长, 明显延长  $H_2$  荷瘤小鼠的生存时间。结论 海噻啉由中药复方和 5-Fu 两部分复合而成, 其抗肿瘤作用与二者相比具有明显的协同作用, 使抑瘤率大幅度提高。

**关键词:** 海噻啉; 荷瘤小鼠; 抗肿瘤作用

中图分类号: R979.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)06-0524-04

## Experimental studies on antitumor activities of Haimiding

Ji Yu-bin, Gao Shi-yong, Kong Qi, Zhang Xiu-juan, Yang Bao-feng

(Department of Pharmaceutical Engineering, Harbin Commercial University, Harbin Heilongjiang 150076, China)

**Abstract** **Object** To study the antitumor activities of Haimiding. **Methods** The *in vitro* antitumor action was observed by MTT and colony formation, its *in vivo* effects were studied by observing tumor weight and survival time of FC,  $S_{180}$  and  $H_2$  mice. **Results** Haimiding is a powerful antitumor agent in 8 kinds of human cancer cell line, especially on BGC-823, Eca-109 and HCT-8, with Eca-109 being the most susceptible. Haimiding also inhibits the growth of cancer cells of FC and  $S_{180}$  mice and prolongs the survival time of  $H_2$  mice. **Conclusion** Haimiding is a compounded preparation consisted of 5-Fu and Chinese medicine, they showed obvious synergistic effect to inhibit the growth rate of tumors.

**Key words** Haimiding; tumor bearing mice; antitumor activity

\* 收稿日期: 2001-01-11

基金项目: 国家科委生命中心博士基金资助 (项目号: 96-901-06-10); 中国优秀博士后基金资助 (中博号 [1999]17号); 黑龙江省杰出青年基金资助 (19906); 黑龙江省自然科学基金项目资助 (项目号: D9801)

作者简介: 季宇彬, 男, 博士, 教授, 硕士, 博士研究生导师, 44岁。多年来一直致力于中药药理、肿瘤药理、分子药理学研究, 1999年进入哈尔滨医科大学博士后工作站工作。

\* 哈尔滨医科大学博士后导师