

• 基础研究 •

脑溢安对谷氨酸致神经元损伤的保护作用

聂亚雄 黎杏群 黄亮群 黄如训

[摘要] 目的 探讨中医平肝熄风、凉血泻火治法的抗神经损伤机理。方法 建立谷氨酸致体外培养的大鼠海马神经元兴奋毒性损伤模型,并用脑溢安含药血清、细胞外调节蛋白激酶(ERK)阻滞剂 PD 98059 进行干预,分别检测各组神经元活化的 ERK、c-jun 氨基末端激酶(JNK)水平及上清液 LDH 活性。结果 脑溢安含药血清能上调谷氨酸损伤后的大鼠海马神经元 ERK 水平,下调 JNK 水平,PD98059 能阻断脑溢安对受损神经元的保护作用。结论 以平肝熄风、凉血泻火为主要治法的脑溢安含药血清对谷氨酸致培养大鼠海马神经元损伤后的保护作用与 MAPK 信号转导途径有关,脑溢安上调 ERK 表达,下调 JNK 表达,促进细胞生存。

[关键词] 脑溢安;血清药理学;兴奋性氨基酸;乳酸脱氢酶;丝裂元活化的蛋白激酶;培养神经元;中医治法

Effect of serum obtained from rat treated orally with Traditional Chinese Medicine Nao Yi An on MAPK signal transduction in injured cultured neurons NIE Ya-xiong, LI Xing-qun, HUANG Liang-qun, et al. Institute of Combined Chinese and Western Medicine, Xiangya Hospital, Changsha 410008, Hunan, China

[Abstract] **Objective** To explore the effects of the serum of traditional Chinese medicine Nao Yi An on glutamate-induced cell death in cultured hippocampal neurons of rat and the underlying mechanisms. **Methods** Hippocampal neurons were cultured. The excitatory amino acid-induced toxicity on cultured neurons was investigated. The viability of injured neurons was determined with the measurement of Lactate dehydrogenase (LDH) activity. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) were determined by immunoprecipitation/kinase assays/western blot detection. **Results** The serum of Nao Yi An raised cell viability. The serum of Nao Yi An upregulated the expression of extracellular regulated protein kinases(ERK) and downregulated the expression of c-Jun N-terminal kinase/stress activated protein kinase(JNK) in cultured neurons. The serum of Nao Yi An-induced upregulation of ERK and its anti-death action were prevented with the specific ERKs inhibitor PD98059. **Conclusions** Activation of ERK signaling together with inhibition of JNK signaling by Chinese medicine Nao Yi An appears to be an important mechanism for its survival effects on cultured hippocampal neurons.

[Key words] Nao Yi An;serum pharmacology;excitatory amino acid;LDH;MAPK;cultured neurons;therapy of Traditional Chinese Medicine

中图分类号:R743.32 文献标识码:A 文章编号:1006-9771(2002)07-0421-02

丝裂原活化的蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinase, MAPK)级联途径与脑缺血、炎症等应激反应引起细胞凋亡密切相关^[1]。MAPK 主要包括细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERKs 或 P44/42 MAPK)、c-jun 氨基末端激酶(c-jun N-terminal kinase/stress activated protein kinase, JNK/SAPK)、P38 及 ERK5。大量研究表明,过量激活谷氨酸受体诱导的兴奋性损伤,是如中风、老年性痴呆、Huntington 病神经元死亡的主要机制^[2]。以平肝熄风、凉血泻火为主要治法的中药复方脑溢安颗

粒剂是治疗脑卒中的三类新药,目前正进行 III 期临床试验。为了进一步探讨脑溢安对脑卒中的治疗机理,我们采用谷氨酸致培养神经元损伤模型,观察脑溢安含药血清对谷氨酸致培养大鼠海马神经元损伤后 MAPK 信号转导通路的影响。

1 资料与方法

1.1 药品和试剂 脑溢安浸膏粉由湘雅医院药剂科监制。神经细胞无血清培养基(Neurobasal Medium™), DMEM 培养基, B27, L-谷氨酰胺、丙酮酸钠、HEPES、腐胺等,为美国 Gibco 公司产品。多聚赖氨酸、胰岛素等为 Sigma 公司产品。兔抗大鼠神经元特异性烯醇化酶(NSE)抗体,武汉博士德公司。P44/42 MAPK(ERK)和 JNK 检测试剂盒购于 NEB 公司。其他试剂均为市售分析纯级。

1.2 仪器 Olympus IXTO 倒置显微镜,日本;Queue System, Inc. QWJ300 TVBB 型 CO₂ 培养箱,美国;mini-gel 电泳装置, BIO-RAD LKB Bromma, 美国;超声匀浆器,美国 Branson Sonic Power;高速低温离心机, DU-640 紫外分光光度计,美国 Beckmen 公司。

基金项目:科技部 2000 年度国家新药研究基金资助(No. 96-901-05-225)

作者单位:1. 410008 湖南长沙市,中南大学附属湘雅医院中西医结合研究所(聂亚雄、黎杏群);2. 410008 湖南长沙市,中南大学中国医学遗传学国家重点实验室(黄亮群);3. 510080 广东广州市,中山大学附属一院神经内科(聂亚雄、黄如训)。作者简介:聂亚雄(1964),男,博士后,讲师,主要从事脑血管病研究。

1.3 实验方法

1.3.1 脑溢安含药血清的制备 250g 雄性 SD 大鼠, 脑溢安浸膏粉水溶液灌胃 2 次/d, 每次 2ml(脑溢安浸膏粉用量按体表面积计算为临床 70kg 成人用量的 3 倍, 相当于浸膏粉 4.92g/kg, 4ml 药液含浸膏粉 1.23g, 相当于生药 11.37g), 连续灌胃 3.5d, 于最后一次给药 1h 后, 股动脉取血, 分离血清, 0.2μm 滤膜过滤除菌, 56℃ 30min 灭活, 24 小时内使用。正常血清对照组大鼠, 每次灌服等量生理盐水, 获取血清同含药血清的制备。

1.3.2 大鼠海马神经元原代培养 参照文献^[3]方法, 用无血清培养基 Neurobal mediumTM(其中补加 0.5 mM 谷氨酰胺 2%B27 双抗) 分孔培养 9—11d, 神经元经鉴定后供试验用。

1.3.3 造模及分组 培养后的海马神经元, 用 BSS 液^[4](NaCl 135, KCl 5, CaCl 2l .8, NaHCO₃ 3.6, glucose 7.5, HEPES 100mmol/L, pH 7.4) 洗 2 遍, 分为 3 组: ①正常血清组: 加入含 5% 正常大鼠血清的 BSS 液; ②脑溢安含药血清: 加入 5% 脑溢安含药血清的 BSS 液; ③ PD98059 组: 海马神经细胞培养液加终浓度 50μM PD98059 孵育预处理 1h。BSS 液洗 2 遍, 然后加入 5% 脑溢安血清及终浓度 50μM PD98059 BSS 液。以上 3 组 37℃ 5%CO₂ 孵育预处理 40 分钟, 加入终浓度 500μM 谷氨酸液 10 分钟, 吸去含谷氨酸液。

1.3.4 培养液乳酸脱氢酶检测 每组取 8 孔, BSS 液洗 2 遍, 然后加入无血清 DMEM 液, 置孵箱继续培养 24h, 分别收集其培养液 0.3ml, 1000r/min 离心 5min, 取上清, 立即置全自动生化分析仪检测各培养孔乳酸脱氢酶活性。LDH 含量按每孔中蛋白量进行计算, 按 Bradford 法测定细胞蛋白量^[5]。

1.3.5 培养细胞活化的 P44/42 MAPK(ERKs) 或 JNK 激酶蛋白表达 每组各另取 3 孔, 用冰浴的 PBS 液漂洗 2 次, 加裂解 buffer, 冰上孵育 5 分钟, 用细胞刮刮起未脱壁裂解细胞, 与裂解液一并移入 1.5ml 离心管中, 超声匀浆细胞 4 次, 每次 5s。4℃ 离心 15000 转 × 20min, 取上清用分光光度计测定蛋白质浓度, 约取 200μg; 按试剂盒说明操作, Western blot 分析检测激酶活性, X 光片上的显色条带进行光密度扫描半定量分析。

1.4 统计方法 实验数据用($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较用 *t* 检验。

2 结果

2.1 一般情况 种植后约 4h, 分散良好的细胞已贴壁, 12h 左右细胞逐渐开始长出突起, 后突起逐渐增加,

并相互互联成网状。神经元经兔抗大鼠神经元特异性烯醇化酶(NSE) 染色, 所占比例一般均达 95% 以上。原代培养的海马神经元细胞体饱满, 表面光滑呈立体隆起, 神经突起形成致密网络。加谷氨酸产生兴奋毒性损伤后, 神经细胞逐渐退化, 胞体肿胀、神经突起断裂, 神经元崩解。

2.2 LDH 漏出情况及 MAPK 信号转导通路的影响和 PD98059 的干预作用 5% 脑溢安含药血清组能明显减少谷氨酸兴奋毒性损伤后神经元 LDH 的漏出, 与 5% 正常血清对照组比较有非常显著性差异(*P* < 0.01)。5% 脑溢安含药血清组神经元经 50μM PD98059 预处理后, 其神经元保护作用下降, 谷氨酸中毒后细胞 LDH 漏出增加, 与 5% 脑溢安含药血清组比较有显著性差异(*P* < 0.05), 说明 ERK 阻滞剂部分阻断脑溢安含药血清对谷氨酸致神经元损伤的保护作用。与 5% 正常血清组比较, 脑溢安组 ERK 活性上升、JNK 活性下降(*P* < 0.05)。经 ERK 阻滞剂 PD98059 处理过的细胞, 脑溢安组无活化的 ERK 表达, 50μM PD98059 可完全阻断脑溢安组谷氨酸激活后的 ERK 信号转导通路, 对活化的 JNK 表达起部分阻断作用。见附表。

附表 3 组海马神经元 LDH 漏出情况及活化的

MAPK 激酶蛋白表达($\bar{x} \pm s$)

组别	LDH(KU/g protein)	ERK	JNK
正常血清组	36 ± 7	54 ± 9	115 ± 22
脑溢安含药血清组	17 ± 6 ^{a, b}	81 ± 13 ^c	75 ± 13 ^c
脑溢安含药血清 + PD 组	24 ± 8	5 ± 1	88 ± 17

与正常血清组比较, a: *P* < 0.01, c: *P* < 0.05。与 5% 脑溢安含药血清 + PD 组比较, b: *P* < 0.05。

3 讨论

在真核细胞中, 已确定出 4 条 MAPK 信号转导通路, 即 ERK(P44/ P42 MAPK) 通路、SAPK/ JNK 通路、P38 MAPK 通路及 ERK5 通路。通常而言 JNK 和 P38 主要被应激刺激和病理性损伤信号所激活, 介导细胞死亡, 而 ERK 通常介导细胞的分化、增殖, 促细胞生存。

血清药理实验方法最大优点是体外和体内实验结果的一致性。本研究应用血清药理学方法研究脑溢安对大鼠海马神经元 MAPK 信号转导通路的影响, 含药血清的制备, 采用动物通用的给药方案, 经摸索以 5% 含药血清进行实验效果最佳, 同文献报导一致^[6]。

脑溢安根据传统中医理论, 针对中风病风、火、痰、瘀病机组方, 以羚羊角、钩藤、白芍平肝熄风, 以生地、丹皮、大黄凉血泻火, 以田七、天竹黄、地龙行血化痰。研究证明, 脑溢安抗细胞损伤的机理与其对 MAPK 信号转导途径的双向调节有关。脑溢安含药血清提高受损细胞 ERK 生存通路, 抑制 JNK 死亡(下转第 431 页)

(上接第 422 页) 通路,因而可起神经保护效应。这一发现为对中医平肝熄风,凉血泻火治法的抗神经损伤作用及中药治疗的多靶点效应机制提供了新的依据。

[参考文献]

- [1] 聂亚雄,黎杏群.丝裂原活化的蛋白激酶信号转导通路和 Caspase-3, Akt 与脑缺血损伤[J].国外医学生理、病理科学与临床分册, 2001, 21(3): 226 — 227 .
- [2] Lipton SA, Rosenberg PA. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders[J]. N Engl J Med, 1994, 330 : 613 — 622 .
- [3] Kenneth JB, Tara C, Gabriel GH. Bcl-2 prolongs neuronal survival during hypoxia-induced apoptosis[J]. Mol Brain Res, 1999, 72 :

214 — 225 .

- [4] Dong LP, Wang TY. Effects of Puerarin against glutamate excitotoxicity on cultured mouse cerebral cortical neurons[J]. Acta pharmacologia Sinica, 1998, 19(4): 339 — 342 .
- [5] Benveniste H, Drejer J, Schoushoe A, et al. Elevation of the extracellular concentrations of glutamates and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis[J]. J Neurochem, 1984, 43 : 1369 — 1374 .
- [6] 李仪奎, 吴健宇.血清药理实验中采血时间的通法方案[J]. 中国药理学通报, 1999, 15(6): 569 — 70 .

(收稿日期 : 2002-05-16)