

温胆汤改良方对 $A\beta_{25-35}$ 诱导 AD 细胞模型 bcl-2、bax 蛋白表达的影响*

□石和元 王平** 胡永年 邱幸凡(湖北中医学院老年医学研究所 武汉 430061)
田代志(湖北中医学院实验中心 武汉 430061)

摘要:目的:温胆汤改良方含药脑脊液及含药血清对 AD 细胞模型凋亡及凋亡相关蛋白 bcl-2、bax 表达的影响。方法:温胆汤改良方含药脑脊液和含药血清分别作用于 $A\beta_{25-35}$ 诱导 NG108-15 细胞建立的 AD 细胞模型,镜下观察细胞生长状况,流式细胞术检测细胞凋亡,免疫组化检测 bcl-2、bax 蛋白的表达。结果:与模型组比较,含药脑脊液组和含药血清组细胞凋亡率降低($p<0.05$), bcl-2 表达无显著性差异($p>0.05$), bax 蛋白表达减弱($p<0.01$), bcl-2/bax 比值升高($p<0.01$)。结论:温胆汤改良方能有效地抑制 AD 细胞模型凋亡,其作用机理可能与其干预凋亡相关基因 bax 的表达,升高 bcl-2/bax 比值有关。

关键词: Alzheimer 病 脑脊液 NG108-15 细胞 凋亡 温胆汤

细胞凋亡是 AD (Alzheimer's Disease) 发病过程中神经元丢失的主要方式,并受到 bcl-2 基因家族调控^[1]。实验拟建立 $A\beta$ 蛋白片断所致的 AD 细胞模型,参考中药脑脊液药理学^[2]的方法,观察温胆汤含药脑脊液及含药血清对 AD 细胞模型的影响,从而探讨温胆汤改良方的药效与作用机制。

一、材料

1. **动物** 大耳白家兔,体重 2.5~3kg,购自华中科技大学同济医学院实验动物中心。

2. **细胞** NG108-15 细胞株由武汉大学中国典型培养物保藏中心(CCTCC)提供。

3. **药物** 温胆汤改良方由竹节人参、石菖蒲、天麻、枳实、陈皮、白芥子等药物组成,由湖北中医学院老年医学研究所提供。含生药 2.2g/ml。

4. **主要试剂** $A\beta_{25-35}$ 、DMEM 培养基、碘化丙啶(PI)购自 Sigma 公司;胎牛血清(FBS)由武汉三利生物技术有限公司提供;兔抗大鼠 bcl-2 多克隆抗体、兔抗大鼠 bax 多克隆抗体、即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒购自武汉博士德公司。

5. **主要仪器** 恒温 CO_2 培养箱(美国)、倒置相差显微镜(CK2,日本 OLYMPUS)、流式细胞仪(FAC-

收稿日期:2005-09-13

修回日期:2005-10-12

* 国家中医药管理局基金项目(NO.04-05JP41):温胆汤改良方对 Alzheimer 病细胞模型神经细胞周期影响的实验研究,负责人:王平。

** 联系人:王平,医学博士,教授,博士生导师,主要研究方向:脑病及老年病的中医药证治规律及方药筛选,Tel: 027-68890008,Email: pwang54@yahoo.com.cn。

(World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica) 37

SCalibur 型,美国 BD 公司)

二、方 法

1. 血清的制备 家兔适应性喂养 3d 后, 随机分为空白组和中药组。中药组给予中药浓煎液 (4.5g/kg·d) 灌胃, 每日 2 次, 连续 3d, 空白组灌服相同体积的生理盐水。末次灌胃 1h 后, 水合氯醛麻醉, 无菌心脏采血 40ml/只, 收集血液 4℃ 过夜, 3000rpm 离心 15min, 收集血清, 56℃、30min 灭活, 过滤除菌, -20℃ 保存。

2. 脑脊液的收集 动物采血后, 迅速用一次性 1ml 注射器连接 7 号针头, 于无菌条件下从家兔枕骨大孔处垂直缓慢进针, 穿刺小脑延髓池缓慢抽取脑脊液, 每只家兔收集脑脊液 800~1000μL, -70℃ 冻存备用。

3. AD 细胞模型的建立^[3] NG108-15 细胞接种于 50ml 培养瓶, 加 5ml 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 在 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养。根据细胞生长情况, 每 1~2d 更换培养液, 2~3d 传代一次。Aβ 先于 37℃ 孵育 4d 促其老化, 选择传代后进入对数生长期的细胞, 加入终浓度为 5μmol/L 的 Aβ₂₅₋₃₅ 片断, 继续培养 1d 后, 即建成 AD 细胞模型。

4. 分组及处理 实验分 6 组: 空白组、模型组、空白脑脊液组、含药脑脊液组、空白血清组、含药血清组。脑脊液组分别加入空白脑脊液、含药脑脊液 100μL, 然后补加完全培养基至 5ml。血清组分别以含 10% 空白血清、10% 含药血清的培养基更换原培养液。除空白组外, 其余各组均预先建立 AD 细胞模型。各组进行相应处理 24h 后, 倒置相差显微镜下观察细胞生长状态并摄片, 检测相关指标。

5. 流式细胞术检测细胞凋亡 收集各组细胞 (2×10⁶), 70% 冰乙醇固定, PI 染色液染色 30min 后, 上流式细胞仪检测, 用 CELLQuest 软件分析, 计数在 G1 峰前出现亚二倍体峰的细胞数, 计算细胞凋亡率。

6. 用 SABC 免疫组化法检测 bcl-2、bax 蛋白的表达, 计算 bcl-2/bax 比值 在高倍镜 (×400) 下随机 5 个视野计数阳性神经元表达数, 取平均值用于比较。

7. 统计方法 使用 SPSS11.5 软件进行统计处理, 组间比较应用单因素方差分析。

三、结 果

1. 对细胞形态的影响 如图 1, 细胞在无 Aβ₂₅₋₃₅ 的空白组生长背景清晰, 胞体饱满折光性好, 胞浆均匀、透亮, 细胞表面无明显斑点及沉积物。在 Aβ 蛋白片断神经毒性作用下, 其余各组细胞生长背景不良, 可见若干死亡细胞和细胞碎片漂浮, NG108-15 细胞数目明显减少, 多积聚成簇状, 大部分神经元胞体缩小, 胞浆较暗淡, 有斑点, 有较多细胞脱壁漂浮现象。而其中含药脑脊液和含药血清组细胞生长态势较好, 死亡、碎裂细胞相对较少。

2. 对细胞凋亡的影响 如图 2, 在流式细胞分析直方图上, 除空白组外的其余各组均可见正常二倍体细胞 DNA 峰 (G1 峰) 前出现一个亚二倍体的凋亡峰 (Ap 峰)。结果表明 Aβ₂₅₋₃₅ 片断的神经性能诱导 NG108-15 细胞异常凋亡。各组细胞凋亡率见表 1。与模型组比较, 含药脑脊液和含药血清组细胞凋亡率均减少 (p<0.01), 且含药脑脊液组神经元凋亡率小于含药血清组 (p<0.05)。

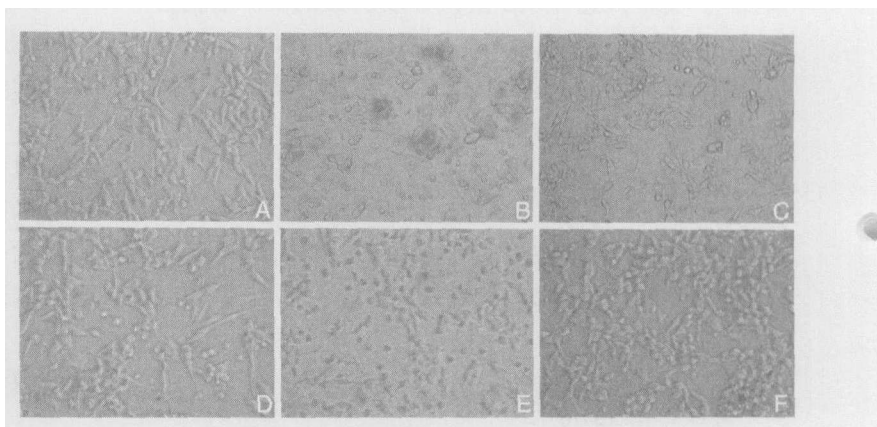


图 1 各组细胞生长情况 (20×10)

A 空白组; B 模型组; C 空白血清组;

D 含药血清组; E 空白脑脊液组; F 含药脑脊液组

3. 对凋亡相关基因 *bcl-2*、*bax* 蛋白表达的影响 细胞胞质呈棕黄色, 有棕黄色颗粒为 *bcl-2* 阳性细胞。Bax 免疫组化染色方式为胞浆, 以细胞浆呈不均匀棕黄色细颗粒状或棕褐色团块状为 *bax* 的阳性染色。各组 *bcl-2*、*bax* 染色阳性细胞数及 *bcl-2*/

bax 比值见表 2。

与空白组比较, 有 AB_{25-35} 作用的各组 *bcl-2* 表达下降, 而 *bax* 的表达升高 ($p < 0.05$)。与模型组比较, 各血清组和脑脊液组神经元 *bcl-2* 阳性表达数无显著性差异 ($p > 0.05$), 而含药脑脊液组和含药

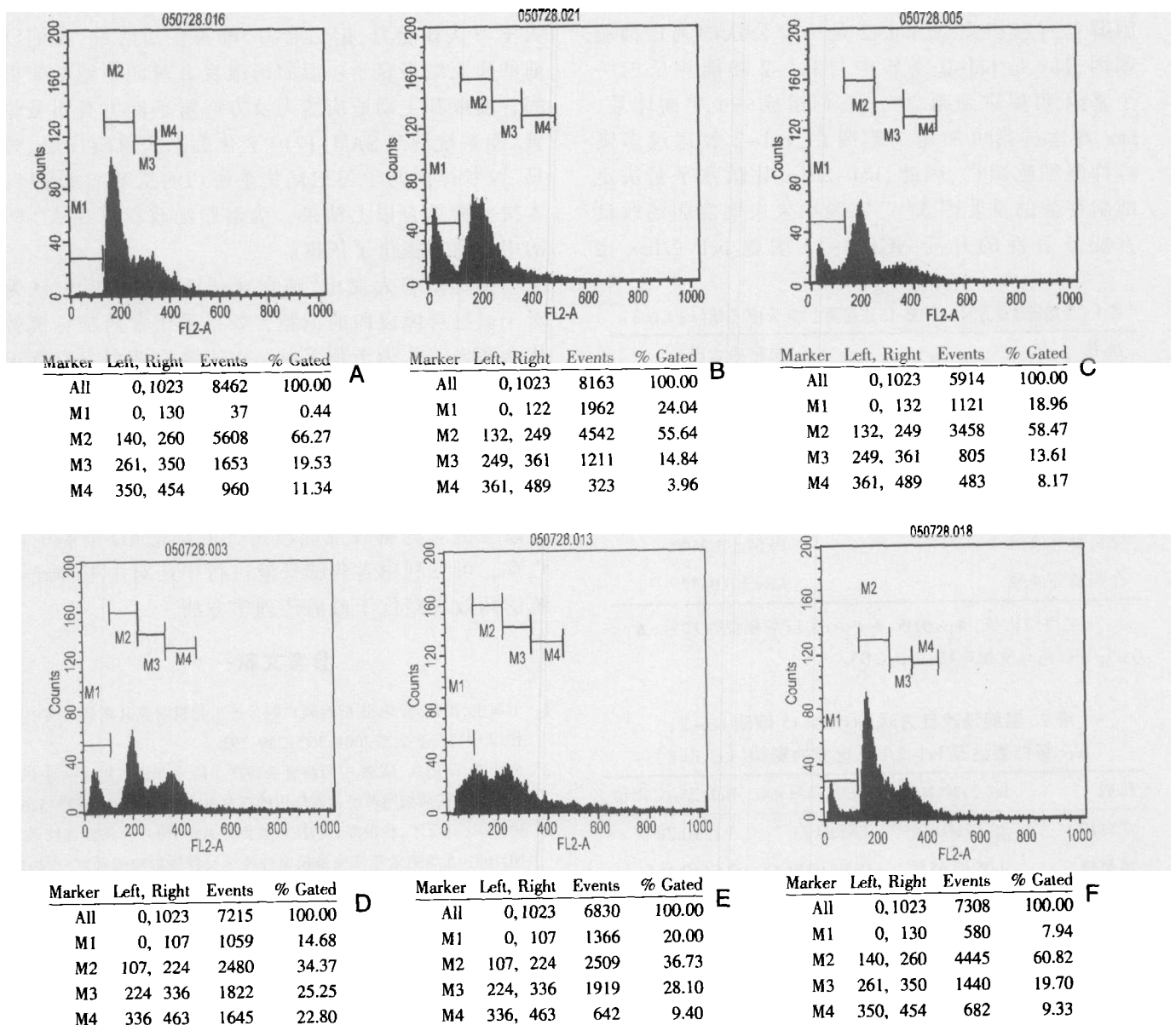


图 2 流式细胞直方分析图

A 空白组; B 模型组; C 空白血清组; D 含药血清组; E 空白脑脊液组; F 含药脑脊液组

血清组 bax 的表达有极其显著性降低 ($p<0.01$), bcl-2/bax 比值升高。两组间比较无显著性差异 ($p>0.05$)。

四、讨 论

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、bax 基因表达与细胞凋亡有密切关系,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。它们组成一个平衡体系,bax 表达过剩可加速细胞凋亡,bcl-2 表达过多则可抑制细胞凋亡,因此,bcl-2/bax 比值水平是决定细胞存活的重要因素^[4]。实验结果表明温胆汤改良方能显著性的升高 NG108-15 细胞 bcl-2/bax 比

值,降低细胞凋亡率。另外,与模型组比较,各血清组和脑脊液组细胞 bcl-2 阳性表达数无明显差异,含药脑脊液组和含药血清组 bax 的表达有显著性意义降低,提示温胆汤改良方保护由 A β 引起的 NG108-15 细胞凋亡的作用,可能与其下调 bax 基因的表达有关。

临床疗效观察温胆汤改良方能明显提高 AD 病人学习认知能力、记忆能力,改善生活质量,我们以前的研究结果显示:温胆汤改良方对动物记忆的巩固,提取和主动适应能力及方向辨别能力有明显改善,能系统调节 SAM-P/10 老化痴呆大鼠脑皮层、海马、纹状体内与学习记忆关系密切的氨基酸水平^[5]。本次实验结合以上结果,为温胆汤改良方在 AD 防治中的运用提供了依据。

梅建勋等人提出“脑脊液药理学概念”^[2],认为对于血脑屏障以内的细胞,如果采用含药脑脊液替代含药血清作为干预手段,由于脑脊液中含有真正通透血脑屏障的成分,比较接近药物在脑内环境中产生药效的真实过程,可以删除体外实验和血清中各种干扰因素的影响,增加了实验结果的可信度。本实验流式细胞术结果显示,与含药血清组比较,温胆汤改良方含药脑脊液能显著性的降低 AD 细胞的凋亡率,可见利用含药脑脊液进行中药对中枢神经系统的药效观察优于血清药理学方法。

参考文献:

1 王润生,冯征,张均田.细胞凋亡的分子生化机制及其在病发病中的作用.中国药理学杂志 2001,36(5):289-292.
2 梅建勋,张伯礼,陆融.中药脑脊液药理学研究方法的初建—对中药影响星形胶质细胞神经营养作用的观察.中草药 2000,1(7):523-526.
3 钟振国,刘茂才,赖世隆,等.补肾益智方对由 A β 片段神经毒性诱导 NG108-15 细胞老年性痴呆模型神经递质释放影响的研究.中国中西医结合杂志 2002;22(1):50-53.
4 卿晨,丁健.Bcl-2 基因家族在调节细胞凋亡中的作用.国外医学分子生物学分册 2000,22(1):17-21.
5 王平,刘玲,张六通,等.加味温胆汤对 SAM-P/10 老化痴呆鼠三个脑区递质氨基酸的影响.中国实验方剂学杂志 2001,7(4):24-27.

(责任编辑:许有玲)

表 1 温胆汤改良方对 NG108-15 细胞凋亡率(%)的影响($\bar{x}\pm s,n=8$)

组别	细胞凋亡率
空白组	1.36 $\pm$ 0.12
模型组	24.16 $\pm$ 2.14**
空白血清组	20.23 $\pm$ 3.10**
含药血清组	12.36 $\pm$ 1.09***
空白脑脊液组	19.07 $\pm$ 1.21**
含药脑脊液组	7.89 $\pm$ 0.96***

注:与空白组比较:★ $p<0.05$ 、★★ $p<0.01$;与模型组比较:▲ $p<0.05$;与含药血清组比较:△ $p<0.05$ 。

表 2 温胆汤改良方对 NG108-15 细胞 bcl-2、bax 蛋白表达及 bcl-2/bax 比值的影响($\bar{x}\pm s,n=8$)

组别	Bcl-2 阳性细胞数	Bax 阳性细胞数	Bcl-2/bax 比值
空白组	20.17 $\pm$ 0.10	7.55 $\pm$ 0.23	3.12 $\pm$ 0.28
模型组	9.05 $\pm$ 0.65*	18.96 $\pm$ 0.56*	0.54 $\pm$ 0.36*
空白血清组	9.12 $\pm$ 0.05*	17.29 $\pm$ 0.84*	0.76 $\pm$ 0.09*
含药血清组	9.57 $\pm$ 0.38*	9.32 $\pm$ 0.59**	1.18 $\pm$ 0.37**
空白脑脊液组	9.83 $\pm$ 0.63*	18.23 $\pm$ 0.21*	0.64 $\pm$ 0.22*
含药脑脊液组	10.15 $\pm$ 0.39*	9.26 $\pm$ 0.51**	1.25 $\pm$ 0.12**

注:与空白组比较:★ $p<0.05$;与模型组比较:▲ $p<0.05$;▲▲ $p<0.01$

Objective Taking for example TCM small compound prescriptions for the treatment of climacteric syndromes in perimenopause the comparative study on the optimal compatibility and dose rate of TCM small compound prescriptions in the second preclinic phase is conducted to set up a platform for the choice of TCM small compound prescriptions .
Method To select the best preparative technology from among three such ones by the method of disassembling prescriptions and setting an exceptional experiment on pharmacodynamics as the index of its assessment and carry out comparative study of the optimal compatibility and dose rate of TCM prescriptions by the method of uniform design.
Result Among the said three technologies the best one is the extraction method of modern pharmacy chosen in accordance of the physical and chemical properties of medicines involved, and the experimental and theoretical value of the optimal compatibility and dose rate of TCM prescriptions is achieved by the method of uniform design. **Conclusion** This study methodology is practically feasible in both theory and practice.

Key words TCM small compound prescription, Choosing method, climacteric syndromes in perimenopause

Study of Modelling and Optimization and their Application in Production Process of TCM Drops

Li Wen (Tasley Group Ltd., Tianjin ,300402)

Shao Xiuli(School of Information, Nankai University,TianJin,300071)

In this article the study chooses the optimization of the production process of TCM drops as its objective and the production process of drops of a large-scale TCM enterprise as its background and takes the modeling, optimization and control of the production process of TCM drops as its content to analyze, model and monitor the production process of TCM drops by modern science and technology so as to improve the quality control of drops and explore the possibility of the digitalization of the production process of TCM drops in both theory and application. The article establishes a few models of mechanisms for the production process of TCM drops and the models of data by the way of identification, analyzes the process of drop production and then proposes a scheme of optimization of the process; puts forward an algorithm for soft measurement of dropping tempo, the key parameter which is quite difficult to measure directly, and suggests that the algorithm of particle cluster could be used to optimize fuzzy controller so as to establish a feasible system of fuzzy control of dropping tempo; and designs and sets up a platform for the collection and analysis of data as well as a system of controlling the production process of TCM drops.

Key words modeling, platform, particle parameter

Effect of Improved Prescription of Wendan Decoction on Expression of Bcl-2 and Bax in A β_{25-35} Segment of Induced Cellular Model of Alzheimer's Disease

Shi Heyuan,Wang Ping,Hu Yongnian and Qiu Xingfan

(Institute of Geriatrics, Hubei Institute of Traditional Chinese Medicine,Wuhan 430061)

Objective To explore the effect of decoction-containing cerebrospinal fluid and serum of improved Wendan

prescription on the apoptosis and the expression of protein bcl-2 and bax associated with apoptosis in cellular model of Alzheimer's disease. **Methods** To respectively apply decoction-containing cerebrospinal fluid and decoction-containing serum to cellular model of Alzheimer's disease established by A β_{25-35} inducing NG₁₀₈₋₁₅ cells and then observe the growth of cells under microscope, testing the apoptosis of cells by flow cytometric analysis and the expression of the protein bcl-2 and bax by the method of immunohistochemistry. **Results** In comparison with the model group the rate of cell apoptosis is lower ($p < 0.05$), the expression of bcl-2 assumes no apparent difference ($p > 0.05$), the expression of bax protein becomes weaker ($p < 0.1$) and the ratio of bcl-2/bax goes up ($p < 0.1$) in the groups of decoction-containing cerebrospinal fluid and decoction-containing serum. **Conclusion** The improved prescription of Wenden decoction is able to effectively inhibit the apoptosis of cellular model of Alzheimer's disease and its functional mechanisms may be associated with its intervention in the expression of the gene bax related to apoptosis and the rise of bcl-2/bax ratio.

Key Words Alzheimer's disease, Cerebrospinal fluid, NG₁₀₈₋₁₅ cell, apoptosis, Wenden decoction.

Treatment of Cardio-vascular Diseases via Promoting Blood Circulation and Removing Blood Stasis As Well As Mobilization of Stem Cells of Bone Marrow for Them

Su Hai and Tu Rangzu

*(Department of Heart Diseases of the Second Hospital,
School of Medical Sciences of Nanchang University, Nanchang 330006)*

The research of stem cells has become a hotpoint in the area of medical sciences in recent years. Some research results have shown that stem cells of bone marrows can be transversely transformed into cardiocytes and vascular endothelial cells to recover injured myocardium and it is found in the last years, in particular, that some medicines are able to mobilize the stem cells of bone marrow to reach peripheral blood and then injured myocardium. Such new discoveries have provided the study of traditional Chinese medicine with a new train of thought. Now that clinical practice has confirmed that the treatment of promoting blood circulation and removing blood stasis has good curative effect for ischemic cardiovascular diseases, the subject of whether this kind of treatment can play such a role as to mobilize the stem cells of bone marrow is worth deep studies. In this article this subject is deeply discussed in the hope that the mechanisms of the treatment of promoting blood circulation and removing blood stasis for cardiovascular diseases can be further expounded on the basis of the latest research results of modern sciences.

Key Words Cardiovascular diseases, promoting blood circulation and removing blood stasis, bone marrow, stem cell, mobilization

Study and Application of A Device integrating Pressure and B-ultrasound for Acquisition of pulse Message in Traditional Chinese Medicine

Yang Jie, Niu Xin, Xu Yuanjing and Niu Shudong

(Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029)