

# 补肾益精方含药血清对 $\beta$ -淀粉样蛋白干预血脑屏障体外模型渗透性的影响

王丹丹 史国娟 于顾然

(南京中医药大学附属医院神经内科, 江苏南京 210029)

**摘要** 目的:以  $A\beta_{1-42}$  干预血脑屏障大鼠脑微血管内皮细胞和星形胶质细胞共培养模型,评价补肾益精方含药血清对该模型的渗透性的影响。方法:体外分别培养胚胎鼠脑微血管内皮细胞和星形胶质细胞,鉴定并测定跨内皮细胞电阻,利用 Transwell 细胞培养池,建立内皮细胞和星形胶质细胞共培养的血脑屏障体外模型,将  $5\mu\text{mol/L}$   $A\beta_{1-42}$  加入大鼠脑微血管内皮细胞和星形胶质细胞非接触式共培养血脑屏障模型。分为  $A\beta_{1-42}$  模型组和  $A\beta_{1-42}$  加补肾益精方低、中、高剂量组,另设血脑屏障空白组,分别检测并比较各培养组荧光素钠的渗透性。结果:补肾益精方低、中剂量组荧光素钠的通透性明显低于  $A\beta_{1-42}$  模型组( $P<0.05$ )。结论:补肾益精方含药血清对  $A\beta_{1-42}$  诱导的血脑屏障渗透性增加有抑制作用。

**关键词** 补肾益精方含药血清 脑血管 内皮细胞 星形胶质细胞 血脑屏障 渗透性 体外实验 Wistar乳鼠  
**中图分类号** R241.1 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X(2015)10-0072-03

阿尔兹海默病(Alzheimer's disease, AD)是以进行性全面认知功能损害为特征的老年变性性疾病,细胞外老年斑及神经元纤维缠结是其病理学特征<sup>[1]</sup>。在该病发病学说中, $\beta$ -淀粉样蛋白( $A\beta$ )破坏血脑屏障功能是该病发病的重要机制<sup>[2-3]</sup>。针对该病中医发病机理,王永炎院士提出了“毒损脑络”理论<sup>[4]</sup>。基于AD中西医发病机制,我们建立了  $A\beta$  干预的血脑屏障体外模型,探讨我们临床治疗阿尔兹海默病常用的补肾益精方含药血清对该模型的影响<sup>[5-6]</sup>。

## 1 实验材料

**1.1 实验动物** Wistar 乳鼠购自上海西普尔必凯实验动物有限公司,合格证号:2008001652684,许可证号:SCXK(沪)2013-0016。

**1.2 主要试剂与耗材**  $A\beta_{1-42}$  (美国 sigma 公司),细胞培养瓶(美国 FALCON 353014),青霉素/链霉素溶液(Penicillin/streptomycin solution)、0.25%胰蛋白酶(Trypsin-EDTA)、磷酸盐缓冲液(PBS)均购自中国南京凯基生物科技发展有限公司,DMEM 高糖培养基(美国 GIBCO12800-082),F12 培养液(美国 GIBCO 883684),胎牛血清(FBS,美国 ExCell Biology FBS500),24 孔细胞培养板(24 wellcell culture plate,美国 Corning Incorporated 3413),96 孔细胞培养板(96 wellcell culture plate,美国 Corning Incorporated 3599),因子 VIII(Abcam ab11713),胶质纤维酸性蛋白(GFAP,博士德 PB0046),内皮细胞生长因子(ECGS,

Sciencell 1052),荧光素钠(Sigma F6377)。

**1.3 主要仪器与设备** 超净工作台(中国苏州净化 SW-CJ-1FD), $\text{CO}_2$  培养箱(日本 SANYO XD-101),生物倒置显微镜(日本 OLYMPUS IX51),台式低速离心机(中国上海医疗器械股份有限公司医疗设备厂,80-2),多功能酶标仪(美国 MD M3),电阻仪(美国 Millipore 公司)。

## 2 实验方法

**2.1 细胞培养** 脑微血管内皮细胞(brain capillary endothelial cells, BCECs)培养:无菌条件下取 Wistar 乳鼠大脑,留皮质,将皮质剪碎后匀浆,匀浆液依次经 100 目、200 目筛网过滤,收集 200 目滤网上物质,向其加入 0.1% II 型胶原酶,37℃作用 30min 后离心(2000r/min, 10min),用完全培养液[DMEM/F12 基础培养液+15%FBS+1% (v/v) ECGS+120U/mL 肝素]悬浮管底沉淀,吹打均匀后接种于预先涂有多聚赖氨酸的塑料培养瓶中,置培养箱中培养。星形胶质细胞(astrocytes, As)培养:无菌条件下取 Wistar 乳鼠大脑,分离大脑皮质,将皮质剪碎后在 0.125% 胰蛋白酶中 37℃消化 10min (期间每隔 3min 轻摇晃数次),200 目筛网过滤,滤过液以 1000r/min,离心 2min,管底沉淀用星形胶质细胞完全培养液(DMEM/F12 基础培养液+10%FBS)悬浮后,接种于多聚赖氨酸包被的塑料培养瓶中,置培养箱中培养。

基金项目:国家自然科学基金资助(81573771);江苏省自然科学基金资助(BK20151599);江苏省中医药局基金资助(LZ13027)

**2.2 细胞鉴定** 细胞培养板中取出长满脑微血管内皮细胞(或星形胶质细胞)的盖玻片,浸入4%的多聚甲醛固定液中30min或过夜,PBS浸洗3min×3次。将放有切片的耐高温塑料染色架放入盛有抗原修复缓冲液的烧杯中,高火档至煮沸,将烧杯取出置于电热器上保持微沸状态20min,而后将烧杯浸入流水中,自然冷却后用PBS浸洗3次。每张切片滴加2滴3% $H_2O_2$ -甲醇溶液,室温(15~25℃)封闭10min,PBS浸洗3次。滴加即用型山羊血清50~100 $\mu$ L,室温孵育20min;滴加一抗Ⅷ及GFAP(1:100稀释)50 $\mu$ L,37℃,湿盒孵育2h,PBS浸洗3次;滴加异硫氰酸荧光素(FITC,1:200稀释)二抗50 $\mu$ L,37℃,避光孵育1h,PBS浸洗3次。每张片子滴加配制二脒基苯基吡啶(DAPI)染液50~100 $\mu$ L复染,室温避光放置5min,用防萃灭封片胶封片。

**2.3 体外血脑屏障模型的建立** 采用Corning公司的Transwell 3413细胞培养池(PET膜材,孔径0.22 $\mu$ m)作为共培养的支持物,建立大鼠脑微血管内皮细胞与星形胶质细胞非接触式共培养模型。首先将分离的脑微血管内皮细胞接种于细胞培养池的上室,将细胞培养池置于底部含有星形胶质细胞的24孔板内,培养7d后BCEC即可形成致密单层,测定其电阻。

**2.4 跨内皮细胞(BCEC)电阻的测定** 通过测定模型中跨BCEC的电阻值评价体外血脑屏障模型中细胞旁转运程度。用Millicell-ERS测定共培养模型的跨内皮细胞电阻值(transendothelial electric resistance, TEER),以无细胞的培养池作为对照,测得其电阻值为滤过层的TEER<sup>[7]</sup>。通过测定BCEC两侧的电阻可以评价紧密连接形成的程度。大多数结果表明,跨细胞单层电阻值应该在300 $\Omega \cdot cm^2$ 以上,本实验共培养模型的电阻值为(320.056±32.833) $\Omega \cdot cm^2$ ,符合体外血脑屏障模型的要求<sup>[7]</sup>。

**2.5 实验分组与荧光素钠通透性的测定** 补肾益精方含药血清(简称含药血清)包含菟丝子、蛇床子、覆盆子、楮实子、熟地黄、人参、茯苓、白术、海风藤、石菖蒲,制备方法参见文献[6]。实验分组:空白组(体外血脑屏障模型)、模型组( $A\beta_{1-42}$ 5 $\mu$ mol/L)、 $A\beta_{1-42}$ +补肾益精方低剂量组( $A\beta_{1-42}$ 5 $\mu$ mol/L+10%含药血清+20%正常血清+70%培养液)、 $A\beta_{1-42}$ +补肾益精方中剂量组( $A\beta_{1-42}$ 5 $\mu$ mol/L+20%含药血清+10%正常血清+70%培养液)、 $A\beta_{1-42}$ +补肾益精方高剂量组( $A\beta_{1-42}$ 5 $\mu$ mol/L+30%含药血清+70%培养液)。首先在供给池中加入200 $\mu$ L含有荧光素钠10mg/L、不同浓度中药组分和5 $\mu$ mol/L  $A\beta$ 的Hanks液,在接受池中加入Hanks液,使插板内外液面平行,于10、20、30、40、60min分别从接受池中取200 $\mu$ L溶液,测定荧光强度,再通过荧光素钠标准曲线,计算荧光

素钠透过血脑屏障模型及无细胞对照组的量。根据文献报道方法计算各组血脑屏障通透性<sup>[7]</sup>。

### 3 实验结果

与空白组比较, $A\beta_{1-42}$ 模型组荧光素钠通透性明显增加( $P<0.01$ );与模型组比较,补肾益精方低、中剂量组荧光素钠通透性明显降低( $P<0.05$ )。见表1。

表1 各组荧光素钠通透性比较

| 组别                         | 荧光素钠通透性(Pe)             |
|----------------------------|-------------------------|
| 空白组                        | 0.41±0.01               |
| 模型组                        | 0.66±0.03 <sup>△△</sup> |
| $A\beta_{1-42}$ +补肾益精方低剂量组 | 0.47±0.03*              |
| $A\beta_{1-42}$ +补肾益精方中剂量组 | 0.53±0.03*              |
| $A\beta_{1-42}$ +补肾益精方高剂量组 | 0.58±0.05               |

注:△△与空白组比较, $P<0.01$ ;\*与模型组比较, $P<0.05$ 。

### 4 讨论

AD是临床发病率最高的痴呆类型,针对其致病毒素 $A\beta$ 和Tau蛋白开发的药物,临床研究均证明无效,目前该病现代医学尚无针对病因治疗的药物<sup>[8]</sup>。 $A\beta$ 破坏血脑屏障功能是该病发病的重要机制<sup>[2-3]</sup>。

补肾益精方是我们依据元代宫廷医家许国祯的《御药院方》神仙六子丸,并根据《难经》“损其肾者益其精”理论结合临床实践化裁而成,有补肾益精、健脾化痰、活血化瘀之功效,临床治疗AD取得较好的疗效<sup>[5]</sup>。

本研究通过测定TEER值评价血脑屏障体外模型的完整性。TEER值是反映小离子通透物理屏障的电阻抗,是公认的测定血脑屏障完整性的最精确和最敏感的指标。本研究结果显示,补肾益精方各剂量组对 $A\beta_{1-42}$ 引起的血脑屏障破坏有保护作用,其中中剂量和低剂量的保护作用更明显。血脑屏障的通透性是由脑微血管内皮细胞的生物学特征控制的<sup>[9]</sup>,这些特征与内皮细胞、星形胶质细胞、神经元等的相互作用有关,它们统称为神经血管单元,形成了一个调节分子进出大脑的功能性屏障<sup>[10-12]</sup>。我们既往研究发现补肾益精方含药血清对D-半乳糖诱导原代神经元氧化应激损伤有抑制作用<sup>[6]</sup>,本实验显示其对 $A\beta_{1-42}$ 诱导的血脑屏障破坏有保护作用,我们推测补肾益精方含药血清可能通过保护内皮细胞及星形胶质细胞等的完整性而起作用。该方保护血脑屏障的分子生物学机制将是我们下一步研究的重点。

综上,补肾活血化痰对血脑屏障损伤有保护作用,该方法可延缓或减轻 $A\beta$ 引起的继发损害。另外,该模型可用于阿尔兹海默病有效中药筛查,为开发符合中医理论的有效方药提供方便高效的研究平台。下一步研究可应用该体外模型筛查补肾益精方中有效中药单体,进一步研究中药对 $A\beta$ 诱导血脑屏障组成成分内皮细胞、星形胶质细胞

## 麻杏石甘汤对肺炎支原体诱导巨噬细胞凋亡的保护作用

龙 燕<sup>1</sup> 王叶芳<sup>2</sup>

(1.中国药科大学药理教研室,江苏南京 210009; 2.南京市中西医结合医院儿科,江苏南京 210014)

**摘 要** 目的:观察麻杏石甘汤对肺炎支原体(MP)诱导巨噬细胞凋亡的保护作用。方法:培养巨噬细胞 RAW246.7,分别将麻杏石甘汤 1、5、10、20 $\mu$ L 与巨噬细胞共孵育,模型组与空白对照组分别加入磷酸盐缓冲液(PBS)20 $\mu$ L 与细胞共孵育。除空白对照组,72h 后利用灭活 MP 感染其余各组细胞 24h。通过 MTT 检测各组细胞活力,LDH 检测细胞损伤率,流式细胞仪检测细胞凋亡率。结果:与空白对照组比较,模型组细胞活力显著降低( $P<0.05$ ),LDH 释放、细胞凋亡百分比显著增加( $P<0.05$ );与模型组比较,麻杏石甘汤 10 $\mu$ L 与 20 $\mu$ L 组细胞活力显著提高( $P<0.05$ ),LDH 释放、细胞凋亡百分比显著降低( $P<0.05$ )。结论:麻杏石甘汤能对抗 MP 引起的 RAW246.7 细胞活力下降,抑制 MP 诱导的 RAW246.7 细胞凋亡,对细胞具有明显的保护作用。

**关键词** 麻杏石甘汤 巨噬细胞 细胞凋亡 细胞活力 体外实验

**中图分类号** R289.51 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X(2015)10-0074-03

肺炎支原体(mycoplasma pneumoniae,MP)是儿童呼吸道感染较常见的病原体,其发病率在婴幼儿中有逐年升高的趋势。麻杏石甘汤是辨证治疗痰热闭肺型肺炎支原体肺炎(mycoplasmal pneumoniae pneumonia,MPP)的常用方剂,经临床验证疗效确切<sup>[1]</sup>。课题组前期的研究也发现,麻杏石甘汤可降低 MP

感染后巨噬细胞内 TNF- $\alpha$  蛋白水平的表达<sup>[2]</sup>。本研究通过体外培养巨噬细胞 RAW246.7 细胞株,给予麻杏石甘汤预孵育后感染灭活 MP,观察细胞活力及细胞凋亡水平的变化,现将结果报道如下。

## 1 实验材料

1.1 药品、菌株与试剂 MP 菌株 29342(ATCC,

凋亡的影响,同时可研究中药对内皮细胞膜 A $\beta$  转运体的影响,以明确中药保护血脑屏障的靶点。

## 参考文献

- [1] Manji H,Kato T,Di Prospero NA,et al.Impaired mitochondrial function in psychiatric disorders.Nat Rev Neurosci,2012,13(5):293
- [2] Erickson MA,Banks WA.Blood-brain barrier dysfunction as a cause and consequence of Alzheimer's disease. J Cereb Blood Flow Metab,2013,33(10):1500
- [3] Li JC,Han L,Wen YX,et al.Increased permeability of the blood-brain barrier and Alzheimer's disease-like alterations in slit-2 transgenic mice. J Alzheimers Dis, 2015,43(2):535
- [4] 王永炎.关于提高脑血管疾病疗效难点的思考.中国中西医结合杂志,1997,17(4):195
- [5] 贺燕勤,于顾然.运用《难经》“益精”理论治疗痴呆.陕西中医,2012,33(6):746
- [6] 史国娟,贺燕勤,于顾然.补肾益精方含药血清对 D-半乳糖致原代培养神经元损伤影响的研究.江苏中医药, 2015,47(2):80
- [7] 张水华,季龙凤,马璟.非接触式共培养体外血脑屏障模型的跨膜电阻及通透性.中国药理学与毒理学杂志, 2012,26(6):882

- [8] Corbett A,Ballard C.New and emerging treatments for Alzheimer's disease.Expert Opin Emerg Drugs,2012,17 (2):147
- [9] Pardridge WM.Blood-brain barrier biology and methodology.J Neurovirol,1999,5(6):556
- [10] Lo EH,Dalkara T,Moskowitz MA.Mechanisms,challenges and opportunities in stroke.Nat Rev Neurosci,2003,4 (5):399
- [11] Hermann DM,C'hopp M.Promoting brain remodelling and plasticity for stroke recovery;therapeutic promise and potential pitfalls of clinical translation. Lancet Neurol,2012,11(4):369
- [12] Zlokovic BV. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders.Nat Rev Neurosci,2011,12(12):723

第一作者:王丹丹(1990—),女,硕士研究生,神经内科学专业。

通讯作者:于顾然,医学博士,主任医师,教授,硕士研究生导师。dr.ygrdf@163.com

收稿日期:2015-06-04

编辑:吴 宁