

李惠珍, 杜宝新, 杨碧莹. 中药健脾益肺方对 EAAT2 表达的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(4): 7-14.

Li HZ, Du BX, Yang BY. Effect of Jianpi Yifei Prescription on the EAAT2 expression [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(4): 7-14.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.04.002

中药健脾益肺方对 EAAT2 表达的影响

李惠珍¹, 任展能², 李雅青², 杨碧莹^{2*}, 杜宝新²

(1.广州中医药大学 第二临床医学院, 广州 510000; 2.广东省中医院, 广州 510000)

【摘要】 目的 探索健脾益肺方(JPYF)对谷氨酸转运体2(EAAT2)表达的影响及可能机制。方法 取新生24 h内的SD幼鼠, 无菌条件下取出幼鼠大脑皮层星形胶质细胞, 分离、提纯、原代培养以进行后期实验; 调整适宜的细胞浓度分5组铺板, 分别为A: 谷氨酸组(250 μmol/L), B-D: JPYF方(0.25、0.5、1 g/kg)+谷氨酸组, E: 正常组, 以JPYF方(终浓度为0.25、0.5、1 g/kg)作用B-D组24 h后, 谷氨酸250 μmol/L作用A-D组4 h诱导建立体外培养原代星形胶质细胞损伤模型; 采用噻唑蓝(MTT)法测定各组星形胶质细胞存活率, 紫外比色法检测培养基上清谷氨酸浓度, 细胞免疫荧光法(immunofluorescence)、Western blot检测星形胶质细胞EAAT2的表达量, IF法检测原代脊髓神经元细胞存活情况。结果 JPYF方可显著保护星形胶质细胞($P<0.01$), 提高谷氨酸转运蛋白的表达($P<0.05, P<0.01$), 降低细胞外液谷氨酸浓度($P<0.05, P<0.01$), 减少神经元损害($P<0.05, P<0.01$), 在0.25~1 g/L的剂量上呈现一定的量效关系。结论 JPYF方可减少谷氨酸对原代脊髓运动神经元的损伤, 其机制可能是JPYF方提高EAAT2的表达, 降低细胞外液谷氨酸浓度, 从而起到保护神经元的作用。

【关键词】 健脾益肺方; 谷氨酸; 星形胶质细胞; EAAT2; 神经元

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019)04-0007-08

Effect of Jianpi Yifei Prescription on the EAAT2 expression

LI Huizhen¹, REN Zhanneng², LI Yaqing², YANG Biying^{2*}, DU Baoxin²

(1. The Second Clinical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou 510006)

【Abstract】 Objective To explore the effect of Jianpi Yifei prescription (JPYF) on the expression of glutamate transporter 2 (EAAT2) and the possible mechanism behind this. **Methods** Neonatal Sprague-Dawley rats within 24 h of birth were used and the astrocytes of cerebral cortex were isolated under aseptic conditions, then purified, and cultured for later experiments. The appropriate cell concentration was adjusted in plates for five groups: A, glutamic acid group (250 μmol/L), B-D, JPYF prescription (final concentrations 0.25, 0.5, and 1 g/kg) + glutamic acid group; and E, normal group. After the B-D groups had been treated with JPYF prescription (final concentrations of 0.25, 0.5, and 1 g/kg) for 24 h, glutamate at 250 μmol/L was applied to the A-D groups for 4 h to induce an in vitro primary astrocyte injury model. Cell viability was determined by MTT assay. Determination of glutamic acid concentration in culture medium was performed by ultraviolet colorimetry. The expression of glutamate transporter protein in astrocytes was detected by immunofluorescence and western blotting. The injury of spinal cord neurons was detected by Immunofluorescence. **Results** JPYF Fang significantly protected the astrocytes ($P<0.01$), improved the expression of glutamate transporters ($P<0.05, P<0.01$),

【基金项目】 2014年度广东省中医药局科研项目(20181135); 广东省中医药局科研项目(2017KT1116); 广东省中医药局科研项目(20161080)。

【作者简介】 李惠珍(1993—), 女, 在读硕士, 从事中西医结合诊治神经系统疾病研究, E-mail: 632564934@qq.com

【通信作者】 杨碧莹(1986—), 女, 硕士, 主治医师, 从事肌萎缩侧索硬化症基础与临床研究, E-mail: yangbiying@126.com

reduced glutamate concentrations ($P < 0.05$, $P < 0.01$), protected neurons ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and showed a certain dose-related effect within the range of $0.25\text{--}1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. **Conclusions** Within a certain dose range, JPYF Fang can reduce the damage of glutamate to neuronal cells, the mechanism of which may involve improving the expression of glutamate transporter and decreasing the concentration of glutamate in extracellular fluid, so as to protect neurons.

[Keywords] Jianpi Yifei Fang; glutamic acid; astrocyte; EAAT2; neuron

肌萎缩侧索硬化 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS), 又名运动神经元病, 是一种破坏性的神经退行性疾病, 引起上、下运动神经元损害, 运动功能丧失, 最终导致患者死亡。目前该疾病病因未明, 关于其发病存在较多假说, 现阶段普遍接受的是谷氨酸介导的兴奋性神经毒性; JPYF 方是广东省中医院脑病四科杜宝新主任团队研发治疗 ALS 的经验复方, 本课题组数十年的前期临床研究发现, JPYF 方从肺脾论之对 ALS 患者有改善疾病预后的趋势, 一定程度上延缓疾病进展; 前期的基础研究发现, JPYF 方对 ALS 转基因小鼠起到延缓体重下降, 延缓临床发病时间, 延长生存期, 改善运动能力的作用, 但均未进一步阐明其分子生物学机制。近 30 年来, 多数学者认为谷氨酸的兴奋性毒性是导致神经元退行性变性、死亡的核心内容^[1]。谷氨酸是中枢神经系统含量最高、分布最广、作用最强的兴奋性神经递质, 其合成、释放和回收均依靠谷氨酸转运体及其相关分子完成谷氨酸-谷氨酰胺这一循环^[2]。EAAT2 是清除突触间隙谷氨酸的主力军, 在维持谷氨酸稳态和保护神经元起重要作用。研究发现, EAAT2 的下调或功能失调, 将引起多种神经变性疾病, 如癫痫、AD、ALS 等^[3]。为进一步探讨谷氨酸兴奋性毒性在 ALS 发病机制中的作用, 本研究拟通过观察 JPYF 方对谷氨酸诱导幼鼠皮层星形胶质细胞 EAAT2 的表达及对元代脊髓神经元的影响, 探讨 ALS 的发病机制及 JPYF 方的作用机理。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

孕 14~16 d SPF 级 SD 母鼠 (15 只), 体重 290~350 g, 由南方医科大学实验动物中心提供 [SYXK (粤) 2013-0094], 待产, 取新生 24 h 内幼鼠以提取大脑皮层星形胶质细胞; 取胎鼠以提取脊髓神经元。无菌手术在广东省中医院科学院动物实验中心生物安全柜进行 [SCXK (粤) 2013-0002]。本实验由广东省中医院动物伦理中心审核动物伦理: 伦理编号 2017039。

1.1.2 JPYF 方组成及冻干粉制备

黄芪 30 g, 党参 15 g, 云苓 10 g, 白术 15 g, 五味子 10 g, 菟丝子 10 g, 麦冬 10 g, 陈皮 5 g, 法夏 6 g, 制马钱子 0.2 g, 甘草 6 g 等均来自本院中药房, 购于康美药业。双蒸水 (没过药物) 浸泡 3 h, 煮沸 1 h, 10 层纱布过滤, 收集滤液; 再加双蒸水 (没过药渣), 煮沸 40 min, 10 层纱布过滤后合并滤液, 滤液回旋冷凝浓缩, 收集浓缩液, 冷冻干燥得冻干粉, 以两剂生药 (222.4 g), 制得 206.2 g 冻干粉; -80°C 保存, 备用。体外实验药液配制: 称取 1 g 中药冻干粉加入 20 mL 无血清 DMEM/F12 培养基中, 配置浓度为 50 g/L 的母液, 震荡至完全溶解, 0.22 μm 针头过滤器过滤, 4°C 保存备用, 每次母液使用周期不超过 1 周。

1.2 主要试剂与仪器

Neurobasal™ Medium 培养基、谷氨酰胺、多聚赖氨酸 (10888022、25030081、P1399) 购自 SIGMA; B-27 (17504044) 购自 LIFE; FBS (1600044) 购自 GIBCO; 马血清 (SH30074.03) 购自 Hyclone; GFAP、EAAT2、ChAT 抗体 (ab7260、ab41621、ab18736) 购自 Abcam; NEUN 抗体 (MAB377) 购自 Chemicon millipore 公司; 谷氨酸试剂盒 (A074) 购自南京建成; 培养基 A 配制: 89% DMEM/F12+10% FBS+1% 双抗; 培养基 B 配制: 90% DMEM/F12+5% FBS+4% 马血清+1% 双抗; 培养基 C 配制: 96.5% Neurobasal™+2% B27+1% 谷氨酰胺+0.5% 双抗。

冷冻干燥机 ALPHA2-4/LSC (德国 Martin Christ 公司); Countstar 型细胞计数仪 (美国 Inno-Alliance Biotech 公司); 多功能酶标仪 Victor X5 (美国 Perkin Elme 公司); 奥林巴斯光学显微镜 SZ61 (日本 Olympus 光学工业株式会社); TS-1000 型脱色摇床 (其林贝尔仪器制造有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 星形胶质细胞、神经元原代分离、提取与培养

取新生 24 h 内 SD 幼鼠, 断头处死, 仔细提取大脑皮质组织; 胰酶+DNA 酶消化 20 min, 取上清经 200 目细胞筛过滤, 重复 3 次; 收集滤液, 离心, 悬

液; 差速贴壁 30 min, 取上清, 重悬后调整密度到 1×10^6 /mL, 于含有培养基 A 的培养瓶中培养, 每 3 d 换液。培养至 10 d 左右将细胞至于 37°C 恒温摇床 24 h, 去除小胶质细胞及其他杂质细胞, 收集纯化细胞传代备用。

取胎龄 16 天的 SD 孕鼠, 麻醉、消毒, 立即取出串珠样子宫放入预冷培养基 B 中; 参考上述步骤取胎鼠脊髓, 调节密度 1×10^5 /mL, 每孔 0.1 mL 接种到 96 孔板, 每孔 7×10^5 接种于 6 孔板细胞爬片上(取材前一天用 $50 \mu\text{mol}/\text{mL}$ 多聚赖氨酸包被 4 h, 晾干, PBS 洗 3 次后烘干备用), 2 h 后补足培养液, 4~6 h 后更换培养基 C; 之后每 3 d 半量换液。

1.3.2 IF 法鉴定星形胶质细胞、神经元

收集对数生长期的星形胶质细胞种板于共聚焦培养皿中(或培养至 6~7 d 的神经元细胞爬片), 次日 PBS 摇洗 3 次, 每次 10 min, 4% 多聚甲醛固定, 0.3% 曲通室温通透 20 min, 摇洗, 10% 山羊血清室温封闭 60 min; 一抗(星形胶质: GFAP (1:1500); 神经元: ChAT (1:500)) 4°C 过夜; 复温, 摇洗后, 加入对应种属二抗 (FITC (1:200) 和 cy3 (1:300)) 37°C 孵育 1 h; DAPI 染核 5 min, 摇洗; 风干, 滴加荧光淬灭剂, 晾干后共聚焦显微镜下观察。

1.3.3 MTT 法检测星形胶质细胞活力

调整星形胶质细胞密度每孔 1×10^4 接种于 96 孔板, 24 h 后, 吸去培养液, 加入含 JPYF 方的培养液 A 预处理 24 h(终浓度 0.25、0.5、1 g/L) 分别为 B、C、D 组, PBS 冲洗后处理同 A 组; 谷氨酸(A)组: 加入含谷氨酸培养液 ($250 \mu\text{mol}/\text{L}$ 培养 4 h; 对照(E)组: 正常培养相应时间的星形胶质细胞, 每组均 6 个复孔。药物作用足够时间后, 去培养液, 加入每孔 $110 \mu\text{L}$ 含 5% MTT 的培养基, 4 h 后, 吸去培养基加入每孔 $150 \mu\text{L}$ DMSO, 震荡混匀 10 min, 570 nm 波长检测吸光度 A, 按照以下公式: 细胞存活率 = (A 加药组 - A 空白组) / (A 正常组 - A 空白组) $\times 100\%$ 计算细胞活力。

1.3.4 IF 法检测 EAAT2 的荧光强度

将星形胶质细胞每孔 2 万接种于共聚焦培养皿, 48 h 后, 分组处理同 MTT 法, 药物作用时间足够后, 进行 IF 法检测, (一抗 EAAT2 (1:500)), 二抗 (cy3 (1:500))。

1.3.5 Western blot 法检测 EAAT2 蛋白的表达

将星形胶质细胞以每孔 5×10^5 接种于 6 孔板, 分组处理同 MTT 法。药物作用时间足够后, 吸去原

培养液, PBS 冲洗 2 次, 每孔加入 $30 \mu\text{L}$ 裂解液, 充分裂解, 刮板, 收集裂解液, 涡旋离心取上清, BCA 测蛋白浓度, 按每孔 $40 \mu\text{g}$ 蛋白样品, 加入 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 中电泳, 转膜, 5% 牛奶封闭 60 min, 洗净封闭液, 加入一抗 (1:1000) 4°C 过夜。次日加入二抗 (1:2000) 孵育 60 min。在 PVDF 膜上加入适量 ECL 显影液, 用 Image Lab 显影成像并进行数据分析。

1.3.6 紫外比色法测定谷氨酸浓度

将星形胶质细胞以每孔 5×10^5 接种于 6 孔板, 分组处理同 MTT 法。药物作用时间足够后, 收集各组上清培养液; 严格按照谷氨酸试剂盒操作方法, 取各组上清液、双蒸水、谷氨酸标准应用液各 $50 \mu\text{L}$ 于 96 孔板, 每组 6 个复孔, 加入按比例配置好的工作液 $150 \mu\text{L}$, 混匀, 340 nm 波长检测各孔吸光度 A1, 每孔加入 $2 \mu\text{L}$ 配置好的试剂五, 充分混匀后, 37°C 孵育 40 min, 340 nm 波长检测各孔吸光度 A2; 按照以下公式: 谷氨酸浓度 ($\mu\text{mol}/\text{L}$) = (测定 A2 值 - 测定 A1 值) - (空白 A2 值 - 空白 A1 值) / (标准 A2 值 - 标准 A1 值) - (空白 A2 值 - 空白 A1 值) * 标准品浓度 ($200 \mu\text{mol}/\text{L}$) * 样品测试前稀释倍数。

1.3.7 IF 法检测神经元存活情况

取各组培养基上清作用于培养至 6~7 d 的神经元, 培养 4 h 后, 按 IF 法检测各组神经元存活情况。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 23.0 统计学软件先进行方差分析和齐性检验, 当满足正态分布及方差齐性时, 采用单因素方差分析; 若不满足采用非参数检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, 所有指标至少重复 3 次。

2 结果

2.1 IF 法鉴定原代星形胶质细胞和神经元细胞

传至第三代的星胶细胞, 核呈圆球形常位于中央, 胞突丰富, 分支长而多, 细胞之间联系紧密; 运用 GFAP 特异性染色, FITC 标记成绿色所占 DAPI 核染比例为 96% 以上, 结果见图 1。

培养至 6 d 的脊髓神经元, 细胞数量稳定, 核大而圆, 胞体饱满, 立体感强, 折光性好, 突起细长, 各细胞之前有聚集生长趋势, 轴突紧密联系, Cy3 标记红色所占 DAPI 核染比例为 90% 以上, 结果见图 2。

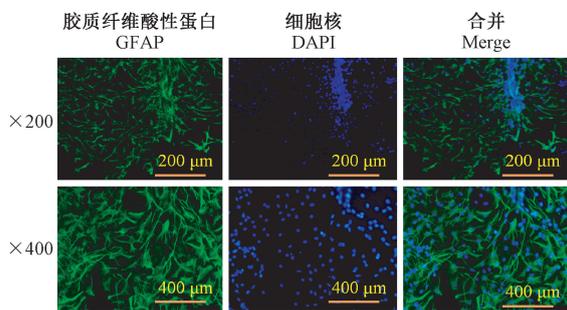


图 1 荧光镜下观察、鉴定原代星形胶质细胞(IF, × 200, ×400)

Figure 1 Observation and identification of primary astrocytes under a fluorescence microscope

2.2 MTT 法检测星形胶质细胞活力

与正常组比较, 谷氨酸造模组细胞存活率明显降低($P < 0.01$), 与造模组比较, 不同浓度的 JPYF 方预处理组差异均具有统计学意义($P < 0.01$), 并在 0.25 ~ 1 g/L 浓度范围内呈浓度依赖, 详见表 1、图 3。

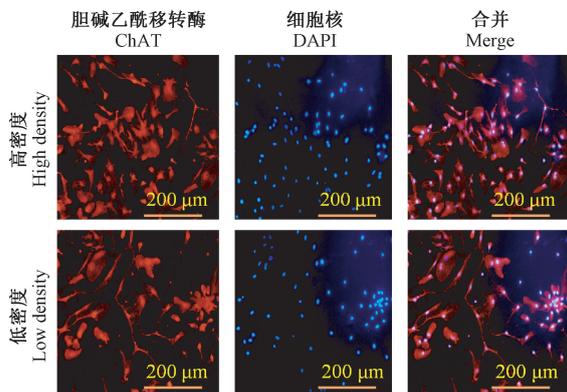
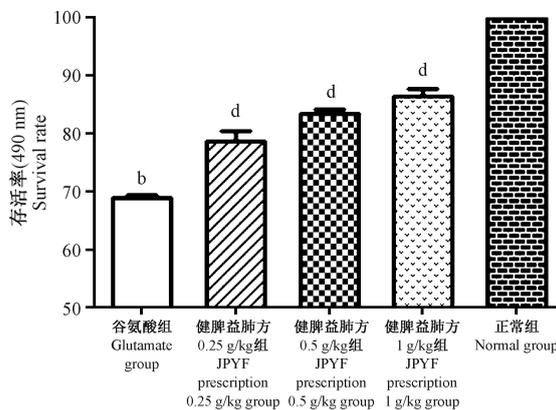


图 2 荧光镜下观察、鉴定原代神经元细胞(IF, × 200)

Figure 2 Observation and identification of primary neuronal cells under a fluorescence microscope



注: 与正常组比较, ^b $P < 0.01$; 与模型组比较, ^d $P < 0.01$ 。

图 3 谷氨酸对星形胶质细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Note. Compared with the normal group, ^b $P < 0.01$. Compared with the model group, ^d $P < 0.01$.

Figure 3 Effect of glutamate on the astrocyte viability

2.3 EAAT2 蛋白表达情况

2.3.1 IF 法检测 EAAT2 蛋白荧光强度

与造模组比较, 不同浓度 JPYF 方预处理组蛋白荧光强度比差异均具有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$), 提示 JPYF 方可增加 EAAT2 蛋白的表达。详见表 2, 图 4。

2.3.2 Western blot 法检测 EAAT2 蛋白表达

JPYF 方预处理 24 h, 谷氨酸作用 4 h 后, 对照组 EAAT2 蛋白有一定基础表达, JPYF 方组从 0.25 g/L 开始, 随着浓度增加, EAAT2 蛋白表达依次提高, 差异均具有统计学意义($P < 0.01$), 提示 JPYF 方可提高 EAAT2 蛋白水平。详见图 5、图 6。

2.4 各组星形胶质细胞培养基上清谷氨酸浓度测定

与谷氨酸组比较, JPYF 方预处理组上清谷氨酸浓度随 JPYF 方浓度增高而下降, 差异具有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$), 但均高于正常组。详见表 3、图 7。

表 1 不同分组星形胶质细胞存活率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Survival rates of the astrocytes in different groups

组别 Groups	剂量 Dose		星形胶质细胞存活率 (%) Astrocyte survival rate
	健脾益肺方 (g/kg) JPYF prescription	谷氨酸 ($\mu\text{mol/L}$) Glutamate	
谷氨酸组 (Glutamate group)	-	250	0.68 ± 0.006 ^b
	0.25	250	0.78 ± 0.031 ^d
JPYF 方组 (JPYF prescription group)	0.5	250	0.83 ± 0.010 ^d
	1	250	0.86 ± 0.0224 ^d
正常组 (Normal group)	-	-	1

注: 与正常组比较, ^b $P < 0.01$; 与模型组比较, ^d $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the normal group, ^b $P < 0.01$. Compared with the model group, ^d $P < 0.01$.

表 2 IF 法检测 EAAT2 蛋白荧光强度 ($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 2 Fluorescence intensity of EAAT2 protein dwtected by immunofluorescence

组别 Groups	剂量 Dose		平均光密度测定(光密度/个数) Average optical density measurement (optical density / number)
	健脾益肺方(g/kg) JPYF prescription	谷氨酸($\mu\text{mol/L}$) Glutamate	
谷氨酸组(Glutamate group)		250	0.61±0.004 ^b
JPYF 方组(JPYF prescription group)	0.25	250	0.69±0.001 ^d
	0.5	250	0.79±0.005 ^d
	1	250	0.87±0.002 ^d
正常组(Normal group)	-	-	0.94±0.006

注:与正常组比较,^b $P<0.01$;与模型组比较,^d $P<0.01$ 。

Note. Compared with the normal group, ^b $P<0.01$. Compared with the model group, ^d $P<0.01$.

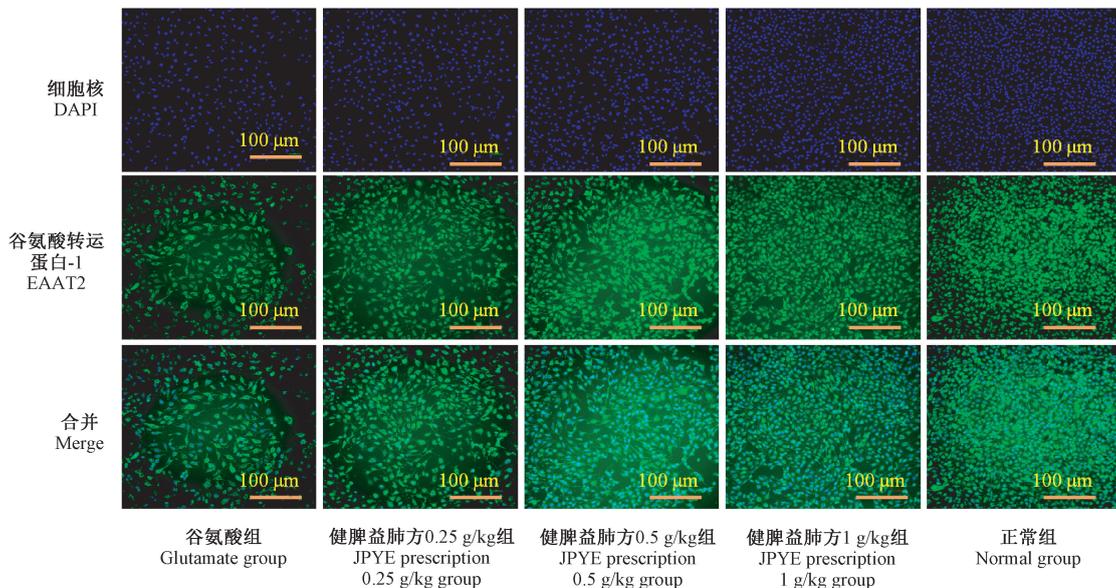
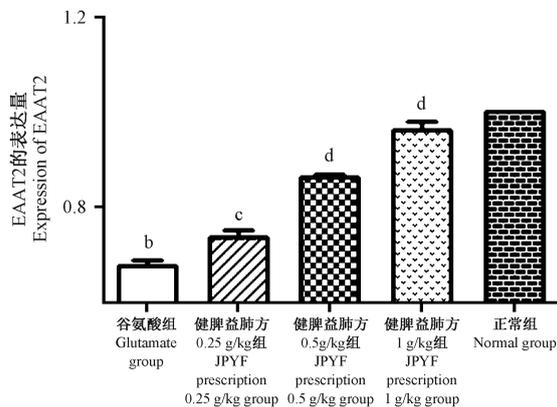


图 4 荧光镜下观察各组 EAAT2 蛋白表达(IF, ×100) ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Figure 4 Expression of EAAT2 protein in each group was observed under a fluorescence microscope



注:与正常组比较,^b $P<0.01$;与模型组比较,^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$ 。

图 5 Western blot 法检测 EAAT2 蛋白表达水平 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Note. Compared with the normal group, ^b $P<0.01$. Compared with the model group, ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$.

Figure 5 Determination of EAAT2 protein expression levels by Western blotting

2.5 各组星形胶质细胞培养基上清对原代脊髓神经元细胞的影响

与造模组比较,不同浓度 JPYF 方预处理组神经元存活个数差异均具有统计学意义($P<0.05, P<0.01$),提示健脾益肺方可提高 EAAT2 活性及蛋白水平,降低细胞外液谷氨酸含量,减少谷氨酸兴奋性毒性,从而保护神经元。详见表 4、图 8。

3 讨论

本课题组结合自身临床经验及查阅 ALS 相关古籍发现该病以肺脾两虚为主者居多,中医认为“脾主肌肉,主四肢”,“肺主气,司呼吸”,脾为肺之母,肺为脾之子,故参考《脾胃论》补中益气汤和《备急千金要方》补肺汤自拟治疗 ALS 的经验方;JPYF 方以黄芪、党参为君,补益肺脾之气缓解临床出现肢体肌无力、肌萎缩,气短的患者,臣以白术、茯苓、麦冬补脾气而生肺气;佐以健脾理气化痰之陈皮、

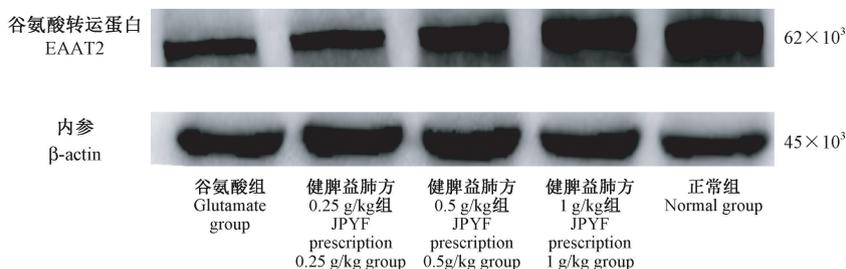


图 6 星形胶质细胞 EAAT2 蛋白的表达($\bar{x}\pm s, n=3$)

Figure 6 Expression of EAAT2 protein in the astrocytes

表 3 谷氨酸试剂盒检测各组培养基上清谷氨酸浓度($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Determination of glutamic acid concentration in each medium using the glutamic acid kit

组别 Groups	原始给药浓度 (Original dose)		上清液谷氨酸浓度 ($\mu\text{mol/L}$) Supernatant glutamate concentration
	健脾益肺方 (g/kg) JPYF prescription	谷氨酸 ($\mu\text{mol/L}$) Glutamate	
谷氨酸组 (Glutamate group)		250	113.98 \pm 11.19 ^b
	0.25	250	94.30 \pm 4.80 ^d
JPYF 方组 (JPYF prescription group)	0.5	250	80.53 \pm 4.32 ^d
	1	250	64.47 \pm 0.30 ^d
正常组 (Normal group)	-	-	26.09 \pm 1.22

注:与正常组比较,^b $P<0.01$;与模型组比较,^d $P<0.01$ 。

Note. Compared with the normal group, ^b $P<0.01$. Compared with the model group, ^d $P<0.01$.

表 4 荧光镜下观察不同原始给药浓度组上清液对脊髓神经元细胞影响 (IF, $\times 100$) ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effects of supernatants from different original drug concentration groups on spinal cord neurons observed under a fluorescence microscope

组别 Groups	原始给药浓度 (Original dose)		细胞个数/个 Number of cells/piece
	健脾益肺方 (g/kg) JPYF prescription	谷氨酸 ($\mu\text{mol/L}$) Glutamate	
谷氨酸组 (Glutamate group)		250	72.67 \pm 2.082 ^b
	0.25	250	92.33 \pm 3.055 ^c
JPYF 方组 (JPYF prescription group)	0.5	250	133.67 \pm 6.429 ^d
	1	250	143.33 \pm 1.528 ^d
正常组 (Normal group)	-	-	160.67 \pm 8.327

注:与正常组比较,^b $P<0.01$;与模型组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$ 。

Note. Compared with the normal group, ^b $P<0.01$. Compared with the model group, ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$.

法夏,使补而不膩,射干、杏仁宣肺利咽、开音散结,马钱子健脾益气,强肌,诸药合用,已达健脾补肺强肌之效,前期临床及基础研究多有见效^[4-6];现代研究证明,中药可减轻谷氨酸兴奋性毒性,黄芪可明显改善谷氨酸损伤后细胞的活性^[7],黄芪益母草注射液、人参皂甙 R 均可减轻神经兴奋毒性^[8-9]。

肌萎缩侧索硬化是一种主要累及上、下运动神经元的进行性致死性神经变性疾病,病变主要损害脊髓前角细胞、脑干运动神经元,临床表现为进行性加重的肌萎缩、无力,80%~90%的患者于发病后3~5年因呼吸衰竭死亡^[10]。目前该病发病机制尚不清楚,有学者发现 ALS 患者血浆和脑脊液中谷氨酸水平较正常人高^[1],在 ALS 模型小鼠的脊髓中也发现谷氨酸水平升高的情况^[11],认为 ALS 的发病与

谷氨酸兴奋性毒性密切相关。谷氨酸是中枢神经系统中主要的兴奋性神经递质,胞外谷氨酸的代谢再循环只能依靠谷氨酸转运体 (EAATs) 来完成,EAATs 分子的作用是通过再摄取来调节胞外谷氨酸的浓度,并因此保持胞外静息状态 1~3 $\mu\text{mol/L}$ 的谷氨酸浓度^[12]。EAAT2 是脑内兴奋性氨基酸转运体中最主要的转运蛋白,负责中枢神经系统 90% 的谷氨酸再摄取,其表达主要在星形胶质细胞胞膜上^[13]。研究发现通过翻译活化提高 EAAT2 表达,可以保护培养的神经元免受谷氨酸介导的兴奋毒性损伤和死亡,延迟 ALS 动物模型运动功能的下降和延长其寿命^[14]。Rothstein 等表示在 ALS 患者的尸解中谷氨酸盐的功能性运输减少和 EAAT2 免疫反应性降低^[15-16],并且转基因小鼠中 EAAT2 的消

耗会直接导致神经元死亡^[17]。Chen 等组合编码 EAAT2、GDH2 和 NRF2 的慢病毒三者协同作用可延缓 ALS 转基因小鼠的疾病发展及改善小鼠运动功能和神经科量表评分^[18]。

因此,本课题组不断从转运体的角度研究能够调节谷氨酸水平的方药,提高谷氨酸转运体的表达并维持其功能,从而有利于神经元的保护。通过建立谷氨酸诱导的体外星形胶质细胞损伤模型探索 JPYF 方对谷氨酸转运蛋白-2(EAAT2)表达的影响及可能机制。结果发现,JPYF 方在一定范围内可显

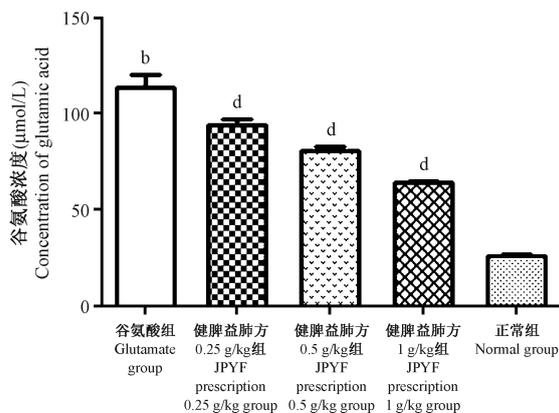


图 7 紫外比色法检测各组培养基上清谷氨酸浓度($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Figure 7 Concentrations of glutamic acid in each medium determined by UV colorimetric assay

著保护星形胶质细胞,提高谷氨酸转运蛋白 2 的表达,降低细胞外液谷氨酸浓度,减少神经元损害;然而,在实验中发现,在诱导体外星形胶质细胞损伤模型时,给予人体正常胞外水平的谷氨酸浓度并不能成功建立星形胶质细胞损伤模型,与正常组比较,细胞存活情况、形态及 EAAT2 的表达与正常组比较均无显著差异,这与相关文献报道提示突触传递过程中,囊泡释放的 Glu 可使突触间隙的浓度由静息的 1 μmol/L 升高到 1.1 mmol/L,而维持在此峰值的时间仅约为 1.2 ms 相符合^[19];故研究人员筛选出适合本课题组实验的最佳给药时间 4 h 及浓度 250 μmol/L;星形胶质细胞和神经元细胞均表达摄取谷氨酸的载体,星形胶质细胞的摄取是清除突触间隙谷氨酸的主要途径,只有当谷氨酸溢出时,神经元的谷氨酸载体才发挥作用,引起谷氨酸兴奋性毒性;本课题组在检测培养基上清谷氨酸浓度时发现正常组谷氨酸浓度高于体内正常胞外静息状态水平,这可能与基础培养基谷氨酸水平含量相关,而该浓度仍在溢出浓度之内。

综上所述,JPYF 方(0.25 ~ 1 g/L)呈浓度依赖的增加谷氨酸诱导的星形胶质细胞膜上 EAAT2 蛋白水平,降低谷氨酸浓度,保护培养的神经元免受谷氨酸介导的兴奋毒性损伤和死亡。在今后的实验研究中,本课题组将会深入探索健脾益肺方对 ALS 的作用机制,期望研究成果为临床应用提供理

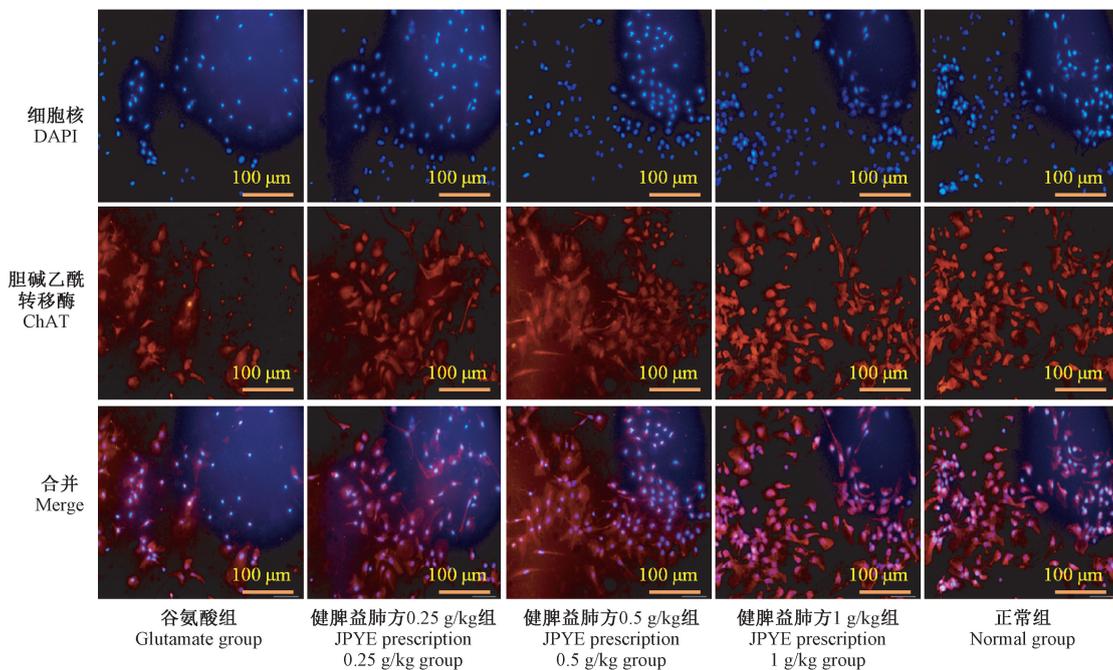


图 8 上清液处理后脊髓神经元存活情况(IF, $\times 100, \bar{x} \pm s, n = 3$)

Figure 8 Survival of the spinal cord neurons after supernatant treatment

论与实验基础,为 ALS 患者的综合治疗提供新的选择。

参考文献:

- [1] Blasco H, Mavel S, Corcia P, et al. The glutamate hypothesis in ALS: Pathophysiology and drug development [J] *Curr Med Chem*, 2014, 21 (31) : 3551-3575.
- [2] Hertz L. Intercellular metabolic compartmentation in the brain: past, present and future [J] *Neurochem Int*, 2004, 45 (2-3) : 285-296.
- [3] Hubbard JA, Binder DK. Targeting glutamate transporter-1 in neurological diseases [J] *Oncotarget*, 2017, 8 (14) : 22311-22312.
- [4] 郑瑜,任展能,王安琦,等.肺脾论治对肌萎缩侧索硬化运动和生活质量的疗效观察[J]时珍国医国药,2016,27(02):391-392.
- [5] 郑瑜,周炜,杨碧莹,等.肺脾论治对肌萎缩侧索硬化肌力及呼吸功能的影响[J]辽宁中医杂志,2016,43(08):1676-1677.
- [6] 王安琦,李秀兰,任展能,等.健脾益肺法治疗肌萎缩侧索硬化的疗效研究[J]世界中医药杂志,2017,12(6):1364-1367.
- [7] 崔梅,陆征宇,董强.黄芪对谷氨酸损伤海马神经元的保护作用[J]中西医结合心脑血管病杂志,2014,12(6):734-736.
- [8] 朱兆洪.黄芪益母草注射液对脑缺血再灌注大鼠 NMDA 受体的影响[J]浙江中医学院学报,2005,29(6):47-9.
- [9] 张敏,徐丽,刘黎星,等.人参皂苷 RS2 对脑缺血再灌注大鼠学习记忆及海马神经元 Glu 和 NMDA 受体亚单位表达的影响[J]齐鲁医学杂志,2006,21(4):286-9.
- [10] Andersena PM, Borasiob GD, Dengler R, et al. EFNS task force on management of amyotrophic lateral sclerosis: guidelines for diagnosing and clinical care of patients and relatives [J] *Eur J Neurol*, 2005, 12 (12) : 921-938.
- [11] 曾含漪,徐仁佃.肌萎缩侧索硬化运动神经元选择性损伤的可能发病机制[J].中国老年学杂志,2013,33(4):972-975.
- [12] Heath PR, Shaw PJ. Update on the glutamatergic neurotransmitter system and the role of excitotoxicity in amyotrophic lateral sclerosis [J] *Muscle Nerve*, 2002. 26 (4) : 438-458.
- [13] Sheldon AL, Robinson MB. The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention [J] *Neurochem Int*, 2007, 51 (6-7) : 333-355.
- [14] Kong Q, Chang LC, Takahashi K, et al. Small-molecule activator of glutamate transporter EAAT2 translation provides neuroprotection [J] *J Clin Invest*, 2014. 124 (3) : 1255-1267.
- [15] Rothstein JD, Martin LJ, Kuncel RW. Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis [J] *N Engl Med*, 1992, 326 (22) , 1464-1468.
- [16] Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, et al. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis [J] *Ann Neurol*, 1995, 38 (1) , 73-84.
- [17] Rothstein JD, Dykes-Hoberg MP, ardo CA. et al. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate [J] *Neuron*, 1996, 16 (3) , 675-686.
- [18] Chen Benkler, Yael Barhum, Tali Ben-Zur, et al. Multifactorial gene therapy enhancing the glutamate uptake system and reducing oxidative stress delays symptom onset and prolongs survival in the SOD1-G93A ALS mouse model [J] *Mol Neurosci*, 2019, 58 (1) : 46-58.
- [19] Clements JD, Lester RA, Tong G, et al. The time course of glutamate in the synaptic cleft [J] *Science*, 1992, 258 (5087) : 1498-1501.

[收稿日期] 2018-09-30