

·基础研究·

灵孢多糖对脂多糖诱导的原代多巴胺能神经元
变性的保护作用杨海华, 徐评议, 刘焯霖, 朱 雯, 李 毅, 叶钦勇
(中山大学附属第一医院神经内科, 广东 广州 510080)

摘 要:【目的】观察灵孢多糖对脂多糖诱导的原代多巴胺能神经元变性的保护作用。【方法】建立原代中脑多巴胺能神经元与胶质细胞的共培养, 随机分为 6 组: 对照组、脂多糖组 (20 ng/mL); 单纯灵孢多糖组、脂多糖+灵孢多糖 (50, 100, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 3 组。通过免疫组化检测酪氨酸羟化酶, OX-42 的阳性细胞数, 以 RT-PCR 检测 TNF- α mRNA 和 iNOS mRNA 表达。【结果】灵孢多糖 (100, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 组的酪氨酸羟化酶阳性细胞数明显多于脂多糖组, 分别为 (30.1 \pm 3.1, 34.2 \pm 3.2, 23.4 \pm 2.8)。脂多糖组激活的小胶质细胞体积增大, 细胞数量增多 (30.6 \pm 4.5), TNF- α mRNA 和 iNOS mRNA 表达增高, 但经较大剂量灵孢多糖 (100, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 预处理后, 小胶质细胞的激活被抑制, 总的细胞数量显著减少 (26.4 \pm 5.1, 25.1 \pm 4.6), TNF- α mRNA 和 iNOS mRNA 表达量降低 ($P < 0.01$)。【结论】灵孢多糖预处理对脂多糖诱导的原代中脑多巴胺能神经元变性具有保护作用, 可能是由于灵孢多糖的预处理阻断了由脂多糖诱导的小胶质细胞的激活, 从而减少了 TNF- α mRNA 和 iNOS mRNA 的表达。

关键词: 多巴胺能神经元; 脂多糖; 灵孢多糖; 肿瘤坏死因子 α ; 一氧化氮合酶

中图分类号: R363

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)03-0241-05

Ganoderma Lucidum Polysaccharides Protects Rat Primary Dopaminergic
Neurons Induced by Lipopolysaccharides

YANG Hai-hua, XU Ping-yi, LIU Zhuo-lin, ZHU Wen, LI Yi, YE Qing-yong

(Department of Neurology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the effects of Ganoderma lucidum polysaccharides (GLPS) on the protection of rat primary dopaminergic neurons induced by lipopolysaccharides (LPS). 【Methods】 We co-cultured the rat primary neuron-glia. The co-cultured cells were divided into 6 groups ($n=5$): control group, LPS group (20 ng/mL), GLPS group and LPS+GLPS (50, 100, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) group. The positive cells of TH, ox-42 and the expression of TNF- α mRNA and iNOS mRNA were observed by immunohistochemistry and RT-PCR. 【Results】 The numbers of TH positive neurons in the groups of GLPS (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were more than those in LPS group (30.1 \pm 3.1, 34.2 \pm 3.2, 23.4 \pm 2.8). The microglia can be activated by LPS and the total number of microglia was increased (30.6 \pm 4.5). The expression of TNF- α mRNA and iNOS mRNA was increased. Pretreatment with GLPS (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) could block LPS-induced activated microglia and the total number of microglia was also decreased (26.4 \pm 5.1, 25.1 \pm 4.6). Consequently the expression of TNF- α mRNA and iNOS mRNA was also significantly inhibited ($P < 0.01$). 【Conclusion】 Pretreatment with GLPS could protect the rat primary DA neurons induced by LPS. The effects may be contributed to GLPS-blocked activity of microglia induced by LPS and reduced the expression of TNF- α mRNA and iNOS mRNA.

Key words: dopaminergic neurons; lipopolysaccharides; Ganoderma lucidum polysaccharides; TNF- α ; iNOS

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(3):241-245]

收稿日期: 2005-10-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30370509, 30570645); 留学回国人员基金资助项目 (2003-406)

作者简介: 杨海华 (1980-), 男, 安徽安庆人, 硕士生; 徐评议, 教授, 硕士生导师, 通讯作者. E-mail: Pingyixu@sina.com

帕金森病(Parkinson's disease)是一种多发于老年期的中枢神经系统退变性疾病,其主要病理特征是黑质致密部多巴胺(dopamine)能神经元选择性变性、丢失,导致纹状体多巴胺含量下降。帕金森病的发病机制至今还不清楚,其中炎症免疫学说日益受到关注^[1]。在帕金森病患者脑中,小胶质细胞异常激活,激活的小胶质细胞可分泌 TNF- α 及 NO 等炎症相关因子,这些炎症因子可诱导 DA 能神经元变性、丢失。近来本实验室研究发现灵芝孢子粉对帕金森病大鼠模型中的多巴胺能神经元有一定的保护作用,但其有效成份及相关机制尚不清楚。灵孢多糖是灵芝孢子粉中最有效的成分之一,具有广泛药理活性,能够抑制 PC12 细胞凋亡,且对大脑皮层神经元具有保护作用。但对脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)诱导的多巴胺能神经元变性的保护作用的研究尚无报道,有研究表明雷公藤在体内外实验中对 LPS 诱导的多巴胺能神经元变性具有保护作用^[2-3],但其毒副作用较大,而灵孢多糖无明显毒副作用,且有广泛的药理活性,具有研发价值。因此,本研究通过共培养乳鼠原代神经元与胶质细胞(mic),用 LPS 为工具药激活小胶质细胞,建立炎症/免疫异常细胞模型,观察灵孢多糖(Ganoderma lucidum polysaccharides, GLPS)对 LPS 诱导的多巴胺能神经元变性的保护作用。

1 试剂和方法

1.1 主要试剂

脂多糖(escherichiacoli, Serotype026:B6),酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)多克隆抗体,小鼠抗大鼠 Mic 表面补体受体单克隆抗体(OX-42, CHEMICON 公司),荧光二抗 FITC(DAKO 公司), Trizol(GIBCO 公司),逆转录试剂盒,Taq 酶和 dNTPs(Fermentas 公司),灵孢多糖(北京协和药厂)。

1.2 细胞培养

取新生 SD 大鼠(出生 24 h 内)在无菌的条件下剪开颅骨,去除脑膜和血管,分离出中脑组织,用 0.01 mol/L PBS 液清洗脑组织,并入 0.125 g/L 胰蛋白酶,37 $^{\circ}$ C,消化 15 min,加入等体积的 DMEM 培养液,终止酶反应,离心去掉上清,加入 DMEM 培养液,用吸管反复吹打制成单细胞悬液,

200 目筛网机械过滤,按 1×10^6 个细胞/孔的密度接种在预先涂有多聚赖氨酸的 6 孔板培养板上,置于培养箱中,体积分数 5%CO₂、95%空气、37 $^{\circ}$ C 条件下培养,次日用等量培养基换液 1 次,以后每 2-3 d 更换培养基,细胞贴壁生长至 6-7 d 则共培养出中脑原代神经元与胶质细胞。

1.3 LPS 诱导多巴胺能神经元的变性与小胶质细胞的激活

待细胞达到融合后,换用 20 mL/L FBS 的 DMEM 培养基,在加入 LPS 前 30 min 加入 GLPS,使各孔终体积为 2 mL, GLPS 的质量浓度为 50 μ g/mL、100 μ g/mL、300 μ g/mL,作用时间为 24 h。分为 6 组:正常对照组,DMEM 细胞培养液培养;LPS 组,加入 LPS 使其质量终浓度为 20 ng/mL;GLPS 预处理组 3——在加入终质量浓度 20 ng/mL 的 LPS 之前 30 min 加入 GLPS,终浓度分别为 50、100、300 μ g/mL;单纯 GLPS 组,不加 LPS,而加入 GLPS,终质量浓度为 300 μ g/mL。

1.4 免疫组化检测 GLPS 对 TH 细胞及小胶质细胞激活及数量的影响

作用 24 h 后弃去培养基以终止细胞培养,0.01 mol/L PBS 清洗 1 次,吸尽 PBS,40 g/L 多聚甲醛室温固定 20 min, PBS 冲洗 5 min, 3 次。滴加 30 mL/L 过氧化氢-甲醇 50 μ L 阻断内源性过氧化物酶,室温下湿盒孵育 10 min, PBS 冲洗 5 min, 3 次。滴加 100 mL/L 正常山羊封闭血清,室温下湿盒孵育 20 min。吸去细胞表面多余液体不洗,滴加一抗 50 μ L(TH 1 100, OX-42 1 100 稀释),湿盒内 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h。然后加标记过氧化物酶的链酶素-亲和素复合物,37 $^{\circ}$ C, 20 min, PBS 冲洗 3 min, 3 次。新鲜配制的 DAB 在显微镜检测下,适时终止。免疫荧光染色二抗为荧光素 FITC 标记,室温 1 h, PBS 冲洗 3 \times 5 min。倒置荧光显微镜观察拍照。

1.5 RT-PCR 检测 GLPS 对 TNF- α 及 iNOS mRNA 的影响

在 6 孔板中各孔加入 1 mL Trizol,按分子克隆方法提取总的 RNA,各组样品的 RNA 在 260 nm 与 280 nm 时的 A 值比为 1.7 至 2.0,将总 RNA 反转录成相应的 cDNA。引物合成由上海博亚生物公司合成。 β -actin 上游:TGTGATGGTGGGAA TGGGTCA,下游:TTTGATGCACGACGATTTCC,扩增片段长为 514 bp。TNF- α 上游:TACTGAA

CTTCGGGGTGATTGGTCC, 下游: CAGCCTTGTC CCTTGAAGAGAACC, 扩增片段长为 297 bp。iNOS, 上游: TCGAGCCCTGGAAGACCCACATC, 下游: GTTGTT CCTCTTCCAAGGTGTTTGCCTTAT 扩增片段长为 250 bp。PCR 反应条件: 用 DNA 聚合酶, 94 预变性 4 min, 94 变性 45 s, 55 退火 1 min, 72 延伸 1 min, 循环 32 次结束后于 72 延伸 8 min。反应完成后, 取 10 μ L 反应产物在含溴化乙锭的 20 g/L 的琼脂糖凝胶中电泳, 在凝胶成像分析仪上采用 Alphasizer 2200 软件测定 TNF- mRNA、iNOS mRNA 和 β -actin mRNA 的吸光度(A)比值, 前两者的吸光值分别与 β -actin 的吸光值相比较即得到 mRNA 的相对表达量。

1.6 统计学处理

全部资料采用 SPSS10.0 for Windows 统计软件包进行统计分析, 正态分布资料用均数 \pm 标准差表示, 统计分析采用单因素的方差分析, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TH 免疫组化检测

在正常未予干预的共培养体系中具有较多的 TH 阳性细胞的表达, LPS 处理后, TH 阳性细胞数明显减少 (图 1), 但在 LPS+GLPS100 μ g/mL 及 LPS+GLPS300 μ g/mL 组中, TH 阳性细胞数量较单

纯 LPS 组明显增多 ($P < 0.01$, 见表 1)。

表 1 免疫组化检测共培养体系中 TH 阳性神经元的表达
Table 1 TH positive neurons in co-culture by immunohistochemistry ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	TH	Ox-42
Control	10	42.4 \pm 4.4	19.5 \pm 3.4
GLPS 300 μ g/mL	10	41.3 \pm 4.3	20.4 \pm 3.3
LPS	10	23.4 \pm 2.8 ¹⁾	30.6 \pm 4.5 ¹⁾
LPS+GLPS 50 μ g/mL	10	25.3 \pm 2.8 ²⁾	29.6 \pm 4.9 ²⁾
LPS+GLPS 100 μ g/mL	10	30.1 \pm 3.1 ³⁾	26.4 \pm 5.1 ³⁾
LPS+GLPS 300 μ g/mL	10	34.2 \pm 3.2 ⁴⁾	25.1 \pm 4.6 ⁴⁾
F		53.09	24.85
P		< 0.001	< 0.001

Compared with control group: 1) $P < 0.001$; Compared with LPS group: 2) $P < 0.05$, 3) $P < 0.05$, 4) $P < 0.001$

2.2 OX-42 免疫组化检测

对照组 Mic 体积较小, 为分枝状, 数量也较 LPS 组少, 在 GLPS 300 μ g/mL 组中, 未发现激活的小胶质细胞, 数量也较 LPS 明显减少, 对小胶质细胞没有激活作用。LPS 组, LPS 诱导前的 Mic 体积较小, LPS 诱导后细胞体积明显增大, 为圆形或吞噬状, 数量明显增多 (图 2)。LPS+GLPS 50 μ g/mL 中 Mic 大部分被激活, 其激活的 Mic 数量及 Mic 总量上与 LPS 组无明显差异。但在 LPS+GLPS 100 μ g/mL 及 LPS+GLPS 300 μ g/mL 组中, 激活的小胶质细胞明显被抑制, 细胞总数较 LPS 组明显下降, 见表 1。

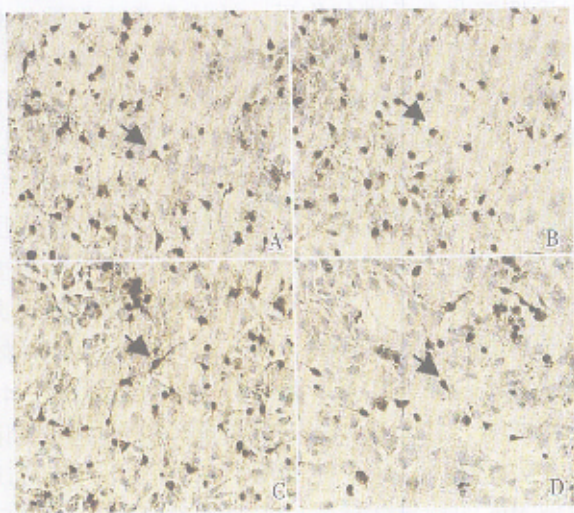


图 1 免疫组化 TH 阳性细胞 (400 \times)

Fig.1 TH positive neurons by immunohistochemistry

A: control group, B: GLPS300 μ g/mL group, C: LPS+GLPS300 μ g/mL group, D: LPS group

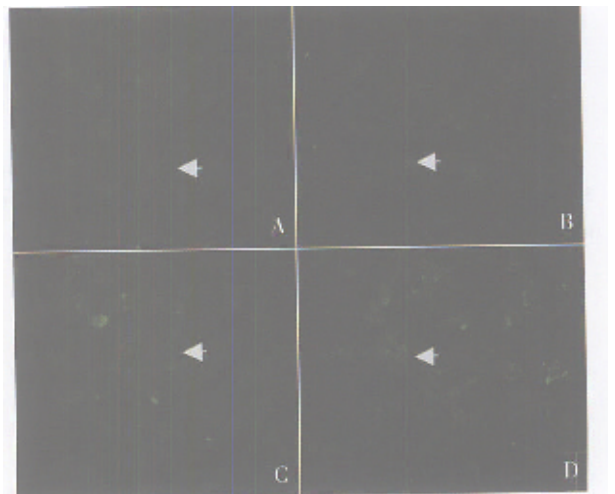


图 2 OX-42 的免疫组化

Fig.2 OX-42 stained by immunohistochemistry (400 \times)

A: control group; B: GLPS 300 μ g/mL group; C: LPS group; D: LPS+GLPS 300 μ g/mL group

2.3 RT-PCR 检测 TNF- α 和 iNOS mRNA 的表达

如图 3, 4 所示, 对照组和 GLPS300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组中有少量的 TNF- α mRNA、iNOS mRNA 表达, LPS 处理 24 h 后, TNF- α mRNA、iNOS mRNA 表达则明显增多, LPS+GLPS 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 中 TNF- α mRNA、iNOS mRNA 表达量较 LPS 组的表达量稍低, 但无统计学意义, LPS+GLPS 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及 LPS+GLPS 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 中 TNF- α mRNA、iNOS mRNA 表达量较 LPS 组的表达量明显降低(表 2)。

表 2 RT-PCR 检测 TNF- α 和 iNOS mRNA 的表达量
Table 2 Expression of TNF- α and iNOS mRNA detected by RT-PCR

Group	n	TNF α mRNA	iNOS mRNA
Control	5	0.144 \pm 0.023	0.018 \pm 0.008
GLPS 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5	0.188 \pm 0.013	0.020 \pm 0.008
LPS	5	1.164 \pm 0.053 ¹⁾	0.876 \pm 0.057 ¹⁾
LPS+GLPS 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5	1.082 \pm 0.010 ²⁾	0.788 \pm 0.029 ²⁾
LPS+GLPS 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5	0.662 \pm 0.047 ³⁾	0.516 \pm 0.042 ³⁾
LPS+GLPS 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5	0.446 \pm 0.045 ⁴⁾	0.300 \pm 0.053 ⁴⁾
F		326.3	469.5
P		< 0.001	< 0.001

Compared with control group: 1) $P < 0.001$; Compared with LPS group: 2) $P < 0.05$; 3) $P < 0.05$; 4) $P < 0.001$

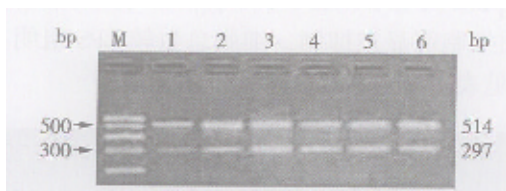


图 3 RT-PCR 检测 TNF- α mRNA 表达

Fig.3 Expression of TNF- α mRNA by RT-PCR

M: DNA marker; 1: control group; 2: GLPS 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group; 3: LPS group; 4: LPS+GLPS 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group; 5: LPS+GLPS 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group; 6: LPS+GLPS 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group

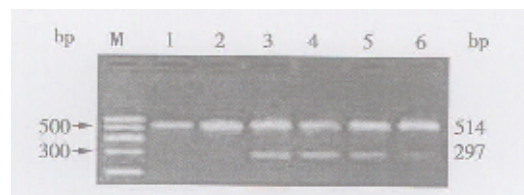


图 4 RT-PCR 检测 iNOS mRNA 表达

Fig.4 Expression of iNOS mRNA by RT-PCR

M: DNA marker; 1: control group; 2: GLPS 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group; 3: LPS group; 4: LPS+GLPS 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group; 5: LPS+GLPS 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group; 6: LPS+GLPS 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group

3 讨论

3.1 GLPS 对多巴胺能神经元的保护作用

有研究发现灵芝孢子粉可有效改善 6-OHDA 及 LPS 模型鼠的行为学反应, 对多巴胺能神经元具有保护作用^[4,5]。灵芝多糖是灵芝孢子粉中最有效成分之一, 具有调节免疫功能、抗肿瘤、清除自由基、抗衰老作用, 且可诱导 PC12 细胞分化为神经元且能明显的抑制 NGF 依赖的 PC12 细胞的凋亡^[6,7]。在 BCG 诱导的肝损伤模型中, GLPS 可抑制 NO 表达, 从而起到肝保护作用^[8]。另有研究表明灵芝多糖对于 hypoxia/reoxygenation 引起的大脑皮层神经元损伤具有神经保护作用^[9]。本实验以 LPS 为工具药激活 Mic, 建立炎症/免疫异常细胞模型, 探讨 GLPS 对 LPS 诱导 Mic 激活的抑制作用及其对多巴胺能神经元的保护作用。LPS 经处理诱导后, TH 阳性细胞数较对照组的阳性细胞数量明显下降, 经 GLPS(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 干预后, TH 阳性细胞数较单纯 LPS 的明显增多。TH 是多巴胺合成的一种重要限速酶, 是多巴胺能神经元的蛋白标志。本实验研究表明, LPS 可诱导共培养体系中多巴胺能神经元的变性, 但 GLPS 的干预可明显增加存活的多巴胺能神经元数量。

3.2 GLPS 对小胶质细胞的影响

Mic 是脑内免疫反应的抗原递呈细胞和主要的免疫效应细胞, 在中枢神经系统免疫反应过程中发挥着非常关键的作用, 被认为是中枢神经系统中主要的宿主巨噬细胞, 除具有吞噬清除变性死亡神经元的“看家”功能外, 还有诸多证据表明 Mic 异常激活可释放多种细胞因子和神经营养因子^[10]。在 LPS 等刺激因素的作用下可激活 Mic, 导致炎症因子在短时间呈爆发式释放, 激发炎症反应, 产生大量的神经毒性物质, 从而启动多巴胺能神经元的损伤反应, 因此 Mic 是构成帕金森病炎症损伤机制的重要环节。OX-42 是 Mic 表面补体型受体(CR3, CD11b), 激活的 Mic 可导致 OX-42 显著增加, 因此 OX-42 单克隆抗体的免疫组织化学方法已被广泛用于评价各个时期的 Mic, 并被认为是 Mic 的特异性标志。本研究发现 LPS 注入后 24 h, 单纯 LPS 组表现为大部分 Mic 完全激活, 呈“阿米巴状”; LPS+GLPS (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 干预组则表现为“阿米巴状”Mic 数目较单纯

LPS组明显减少,且总的Mic数量较LPS组明显减少,尤为重要的是视野尚共存有少许“分枝样”Mic。结果表明GLPS干预可显著抑制Mic激活和增生。

3.3 GLPS对炎症相关因子的影响

NO在帕金森病发病中所起的细胞毒性作用被学者认识,离体实验表明经LPS处理的小胶质细胞能产生NO杀伤神经元^[11]。iNOS是NO生成过程中最主要的限速因子,活化iNOS可导致细胞毒性NO持续释放。本实验发现LPS处理24h后iNOS mRNA表达明显增加,进而可介导NO大量生成,但经GLPS(100 μg/mL和300 μg/mL)预处理后,iNOS mRNA的表达较LPS组明显下降,且呈剂量依赖关系,从而相应的减少了NO生成量。TNF-在炎性细胞因子网络中起核心作用,其毒性作用可能通过激活细胞凋亡途径,诱导多种炎症相关因子表达以及自分泌,促进星形胶质细胞和小胶质细胞合成集落刺激因子,形成一个正反馈环路,从而放大炎症反应,此外,还可促进炎性细胞渗入、脑内免疫炎症反应及其它细胞因子产生^[12]。本实验发现LPS处理24h后TNF- mRNA表达明显增加,但经GLPS(100 μg/mL和300 μg/mL)预处理后,TNF- mRNA表达较LPS组明显下降。

本研究发现LPS激活Mic的同时伴随多巴胺能神经元大量缺失,GLPS干预可显著抑制Mic激活和增生,减轻LPS对多巴胺能神经元的毒性作用。该结果提示GLPS对多巴胺能神经元保护作用的重要作用机制之一可能是通过抑制Mic激活,进而影响Mic激发的级联免疫炎症反应。

参考文献:

[1] HIRSCH E C, HUNOT S, HARTMANN A, et al. Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease [J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2005,11(Suppl 1):S9- S15.
 [2] LI F Q, LU X Z, LIANG X B, et al. Triptolide, a Chinese herbal extract, protects dopaminergic neurons from inflammation-mediated damage through inhibition

of microglial activation [J]. *J Neuroimmunol*, 2004,148 (1-2):24- 31.

- [3] ZHOU H F, LIU X Y, NIU D B, et al. Triptolide protects dopaminergic neurons from inflammation-mediated damage induced by lipopolysaccharide intranigral injection [J]. *Neurobiol Dis*, 2005,18(3):441- 449.
 [4] 谢安木,刘焯霖,朱蔚文,等. 灵芝孢子粉对帕金森病模型鼠黑质酪氨酸羟化酶的影响 [J]. *中华神经科杂志*,2005,38(6):355- 358.
 [5] 朱蔚文,刘焯霖,徐浩文,等. 灵芝孢子油干预治疗6-羟多巴帕金森病大鼠模型的实验研究 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2005, 26(4): 417- 420.
 [6] CHEUNG W M, HUI W S, CHU P W, et al. Ganoderma extract activates MAP kinases and induces the neuronal differentiation of rat pheochromocytoma PC12 cells [J]. *FEBS Letters*, 2000,486 (3):291- 296.
 [7] 张丽,彭少平,韩蓉,等. 灵芝酯溶性提取物诱导PC12细胞分化的研究 [J]. *中国药理学通报*, 2005,21(6): 662- 667.
 [8] ZHANG G L, WANG Y H, NI W, et al. Hepatoprotective role of ganoderma lucidum polysaccharide against BCG-induced immune liver injury in mice [J]. *World J Gastroenterol*, 2002,8(4):728- 733.
 [9] ZHAO H B, LIN S Q, LIU J H, et al. Polysaccharide extract isolated From ganoderma lucidum protects rat cerebral cortical neurons from hypoxia/reoxygenation injury [J]. *J Pharmacol Sci*, 2004,95(2):294- 298.
 [10] VILA M, JACKSON LEWIS V, GUEGAN C, et al. The role of glial cells in Parkinson's disease [J]. *Curr Opin Neurol*, 2001,14(4):483- 489.
 [11] IRAVANI M M, KASHEFI K, MANDER P, et al. Involvement of inducible nitric oxide synthase in inflammatory induced dopaminergic neurodegeneration [J]. *Neuroscience*, 2002,110 (1):49- 58.
 [12] MOGI M, HARADA M, RIEDERER P, et al. Tumor necrosis factor-α (TNF-α) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients [J]. *Neurosci Lett*, 1994,165(1-2): 208- 210.

(编辑 刘清海)