

。药理实验与临床观察。

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

天津中医学院中医工程研究所 (300193) 梅建勋* 张伯礼
天津医科大学 陆融

摘要 目的: 探求一种合理有效的中药作用于中枢神经系统药效研究的方法。方法: 利用体外细胞培养的方法, 以 3 种不同浓度观察血清、中药血清、脑脊液、中药脑脊液对于星形胶质细胞和神经元的影响。结果: 苔盼蓝染色和 LDH 检测证明正常血清和中药血清在 3 种浓度均出现对细胞的毒害作用, 尤以 100、200 μ L 为重, 且在同一浓度时, 两组之间没有明显的差异。而正常脑脊液组和中药脑脊液组与空白对照组相比, 未见明显差异。MTT 检测证明中药脑脊液组吸光度 (A) 明显高于其余各组。结论: 利用脑脊液进行中药对中枢神经系统的药效观察明显优于血清, 提出“脑脊液药理学”的概念; 中药可诱导星形胶质细胞产生神经营养作用。

关键词 脑脊液药理学 神经元 星形胶质细胞 神经营养因子

A Preliminary Attempt to Develop the New “Cerebrospinal Fluid Pharmacology of Chinese Materia Medica on Neurotrophic Effects of Astrocytes

Tianjin College of Traditional Chinese Medicine (Tianjin 300193) Mei Jianxun and Zhang Boli

Tianjin University of Medical Sciences Lu Rong

Abstract To explore an effective method by which the pharmacological effects of Chinese materia medica (CMM) of the central nervous system (CNS) could be correctly investigated. Cerebrospinal fluid (CSF) and serum were taken 1~1.5 h after administration of CMM and added into the astrocyte cell culture medium. After 48 h, the incubated medium was transferred in proportion to the neuron culture medium. Typan blue staining, LDH and MTT test were performed to observe the drug effect on the rate of neuron survival. The serum, but not the CSF, showed certain degree of cytotoxicity on the astrocyte. MTT test on the neuron survival showed that the $A_{492\text{ nm}}$ value of the CMM group was higher than that of the other groups. The astrocyte medium stimulated by the CSF containing CMM could promote the neuron axon growth. Since CSF is better than serum to evaluate the CMM effects on CNS *in vitro*, it was deemed that the “Cerebrospinal Fluid pharmacology of Chinese Materia Medica” is worth for further study. Furthermore, the CMM could induce the neurotrophic effects of astrocytes.

Key words cerebrospinal fluid pharmacology neuron astrocyte neurotrophic factor

自日本学者田代真一等首次提出“血清药理学”和“血清药化学”的概念以来, 人们对于中药的评价系统在观念上产生了更新, 尽管仍存在很多争议, 但应用此种方法对中药进行药理特别是药效研究仍倍受关注^[1,2]。在中枢神经系统, 由于血脑屏障的存在, 使得神经胶质细胞和神经元的微观生存环境和屏障以外的其它体细胞有很大差别, 这促使我们思考, “血清药理学”的方法在中枢神经系统是否也同样适用? 为此, 我们利用星形胶质细胞和神经元体外培养的方法, 观察了血清、中药血清、脑脊液、中药脑脊液

对于星形胶质细胞和神经元的影响。

1 材料与方法

1.1 星形胶质细胞的体外培养^[3]: 出生后 2 d 内 Wistar 大鼠 (天津药物研究院提供), 无菌条件下断头处死, 取脑, 投入 D-Hank's 平衡盐溶液中, 去除中脑、脑脊膜及大血管, 皮层剪碎成 1~2 mm³ 小块, 吸管吹打 1 min, 0.25% 胰蛋白酶 (trypsin, Sigma, D-Hank's 液配成) 消化 10 min, 1 500 r/min 离心 10 min, 收集沉淀, DMEM 重悬, 75 μ m 筛网过滤, 滤液 1 500 r/min 离心 10 min, 收集沉淀, 以

* Address: Mei Jianxun, Tianjin College of Traditional Chinese Medicine, Tianjin

[△]国家“九·五”科技攻关项目 (96-906-0903) 资助

培养液重悬,调整细胞至 1.5×10^6 个/毫升,接种于 75 cm^2 培养瓶 (Falcon), 5% CO_2 95% 空气, 37°C , 饱和湿度。培养液组成: DMEM (Gibco), 添加 10% 胎牛血清 (Hyclone), 4 mmol/L L-谷氨酰胺 (Sigma), 10万 U 青霉素、10万 U 链霉素、15 mmol/L HEPES (Sigma)。4 h 后换液,弃掉非贴壁细胞。5 d 后将培养瓶置于水平摇床, 160 r/min, 2 h, 37°C , 换液弃除小胶质细胞,恢复 1 h 后,重新置于水平摇床, 160 r/min, 18 h, 37°C , 换液弃除少突胶质细胞。免疫组织化学染色证明星形胶质细胞纯度大于 95%。2 d 后以胰蛋白酶 (0.1%, 8 min) 消化,传代培养。细胞长至近 80% 融合时用于实验。

1.2 脑皮层神经元的原代培养^[4]: 无菌条件下,取 16 d 龄 Wistar 大鼠胚胎脑,置于含 7.5 mmol/L 葡萄糖 (Sigma) 的 DMEM 中,解剖显微镜下,去除嗅球、脑脊膜、海马和基底核,将皮质剪碎成 1 mm^3 小块,吸除 DMEM, 0.2% 胰蛋白酶 /0.02% EDTA 消化 1 min, 10% FCS 终止消化, 1 000 r/min 离心 10 min, 用培养液重悬沉淀, $75 \mu\text{m}$ 筛网过筛,调整细胞密度至 1.0×10^6 个/毫升,接种于预先涂有 0.005% 多聚赖氨酸 (poly-L-lysine, Sigma) 的培养板中, 5% CO_2 95% 空气, 37°C , 饱和湿度。培养液组成: DMEM, 添加 15% FCS (Hyclone), 4 mmol/L L-谷氨酰胺、10万 U 青霉素、10万 U 链霉素、15 mmol/L HEPES。30 min 后换液,弃掉非贴壁细胞。2 d 后培养液中添加 $2 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 阿糖胞苷 (Arac, Sigma), 以抑制胶质细胞生长。以后每 3 天换液一半。经神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 免疫组织化学染色鉴定,神经元纯度大于 90%。

1.3 血清及中药血清的收集: 4 kg 重大耳白家兔 (天津药物研究院), 适应性喂养 3 d 后, ig 中药水煎剂 (1.4 g 生药/kg 体重, 主要成分为人参、丹参、麦冬、黄连等, 制备成 1.12 g 生药/mL), 1 h 后, 中药血清组与空白血清组同时处理: 清醒状态下, 于无菌条件心内采血每只 30 mL, 4 000 r/min 离心 15 min, 收集血清, 56°C 、30 min 补体灭活后, -80°C 冻存备用。

1.4 脑脊液及中药脑脊液的收集: 灌服中药 (步骤同 1.3) 1 h 后, 耳缘动脉注入空气处死, 然后在无菌条件下, 于小脑延髓池穿刺每只采集脑脊液 600~800 μL , -80°C 冻存备用。

1.5 对星形胶质细胞生存能力的影响: 24 孔培养板接种星形胶质细胞, 空白血清组、中药血清组、空白脑脊液组和中药脑脊液组又分成 3 个浓度组, 每

组 8 孔, 每孔分别加入正常血清、中药血清、正常脑脊液和中药脑脊液 50, 100, 200 μL , 最后补加 DMEM/F12 (Gibco) 至 1 mL, 48 h 后, ① 收集培养液, 应用 LDH 检测试剂盒 (LDH-L, 99031, 北京中生物生物工程高技术公司) 和 Unifast Analyzer (Italy) 测定乳酸脱氢酶含量; ② 细胞用 PBS 缓冲液轻洗 2 次, 每孔滴 PBS 缓冲液配制的 0.4% 苌盼蓝 (Sigma) 溶液 200 μL , 3 min 左右倒置相差显微镜 (Nikon) 下观察, 随机计数 400 个相邻细胞中蓝染 (死亡细胞) 和未蓝染 (存活细胞) 的细胞个数, 计算细胞死亡百分比。

1.6 中药对星形胶质细胞神经营养作用的影响: 75 cm^2 培养瓶 (Costar) 接种星形胶质细胞分别加入正常血清、中药血清、正常脑脊液和中药脑脊液 4 mL, 补加 DMEM/F12 至 20 mL, 48 h 后收集培养液, 称为正常血清胶质液、中药血清胶质液、正常脑脊液胶质液和中药脑脊液胶质液。96 孔酶标板 (Falcon) 接种神经元, 每孔体积 100 μL , 在第一次加阿糖胞苷时, 加入正常胶质培养液和上述 4 种液体各 5, 10, 20 μL , 最后加培养液补至 1 mL, 每个浓度组各 8 孔, 每次换液时重复上述操作, 第 10 天时, ① 倒置显微镜下观察摄片; ② MTT 检测: 每孔加入 MTT 溶液 (Sigma, 5 mg/mL PBS) 10 μL , 继续孵育 4 h, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃掉上清, 每孔加入 DMSO (Sigma) 100 μL , 振荡 10 min, 使结晶物充分溶解, 在酶联免疫检测仪 (SPECTRA) 上测定各孔之吸光度 ($A_{492\text{nm}}$)。

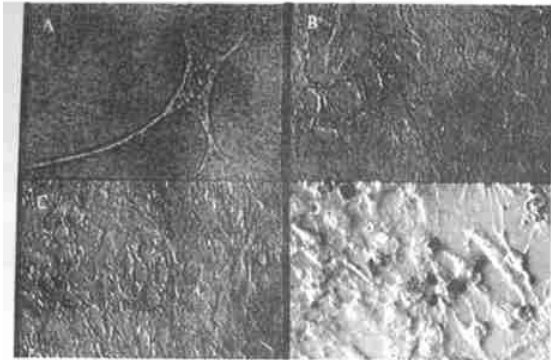
2 结果

2.1 对星形胶质细胞生存能力的影响: 正常血清和中药血清在 3 种浓度均出现对细胞的毒害作用, 尤以 100, 200 μL 为重, 且在同一浓度时, 两组之间没有明显的差异。而正常脑脊液组和中药脑脊液组与空白对照组相比, 未见明显差异, 提示脑脊液和中药脑脊液对星形胶质细胞没有毒害作用。苌盼蓝染色和 LDH 检测结果具有比较一致的规律性。见图 1 和表 1, 2。

2.2 中药对星形胶质细胞神经营养作用的影响: 体外培养皮层神经元在第 3 天时长出突起并联成网状, 第 10 天时无论是细胞的数量还是突起的长度或数量都明显减少, 而在加入中药胶质液后, 上述情况得以明显改善 (图 2)。MTT 的检测结果 (表 3) 也支持上述结论。

3 讨论

实验结果可以得出结论: ① 对于星形胶质细胞,



A 星形胶质细胞伸出突起； B 星形胶质细胞长至融合；
C 加入中药脑脊液后，细胞未见明显变化； D 加入正常血清（200μL）后，死亡细胞（蓝染）明显增多

图 1 中药脑脊液和正常血清对星形胶质细胞的影响

表 1 各组星形胶质细胞死亡率 (%)

组别	剂量 (μL)	例数	死亡率 ($\bar{x} \pm s$)
空白对照	-	8	0.2 ± 0.2
正常血清	50	8	3.9 ± 0.7
	100	8	15.0 ± 1.3
	200	8	16.0 ± 1.4
中药血清	50	8	3.4 ± 0.7
	100	8	15.2 ± 1.1
	200	8	16.2 ± 1.6
正常脑脊液	50	8	0.2 ± 0.2
	100	8	0.3 ± 0.3
	200	8	0.3 ± 0.3
中药脑脊液	50	8	0.3 ± 0.2
	100	8	0.3 ± 0.4
	200	8	0.3 ± 0.3

与空白对照组比较: * $P < 0.05$

表 3 各组吸光度 (A_{492nm}) 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	不同浓度 A_{492nm}		
		50μL	100μL	200μL
空白对照组	8	0.28 ± 0.16	0.35 ± 0.03	0.43 ± 0.03
正常血清组	8	0.20 ± 0.05 [*]	0.22 ± 0.02 [*]	0.19 ± 0.03 [*]
中药血清组	8	0.20 ± 0.62	0.20 ± 0.04 [*]	0.21 ± 0.02 [*]
正常血清组	8	0.30 ± 0.39	0.37 ± 0.03	0.46 ± 0.04
中药脑脊液组	8	0.36 ± 0.19 [*]	0.62 ± 0.02 [*]	0.87 ± 0.03 [*]

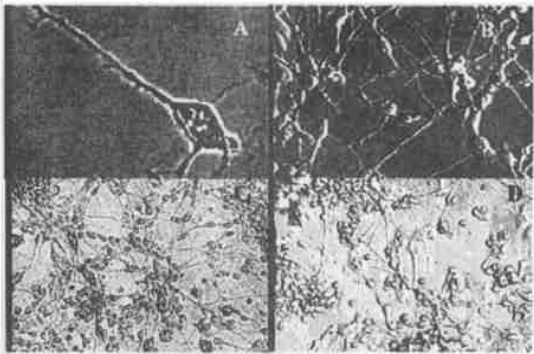
与空白对照组比较: * $P < 0.05$

血清与脑脊液相比,出现明显的毒害作用;②对于这种毒害,正常血清与中药血清之间没有明显的差别;③中药脑脊液相对于中药血清,可明显诱导出星形胶质细胞的神经营养作用。对于血脑屏障以内的细胞诸如胶质细胞和神经元,如果采用血清药理学的实验方法,那么血清本身的毒害作用将遮盖药效作用,严重影响实验结果的可靠性。而如果采用脑脊液,则可以避免上述缺陷,同时由于脑脊液中真正含有通透血脑屏障的成分,增加了实验结果的可信度。按照“血清药理学”的称谓,我们称这种方法为“脑脊液药理学”。

表 2 各组 LDH 含量 (U) 之比较

组别	剂量 (μL)	例数	LDH ($\bar{x} \pm s$)
空白对照	-	8	10 ± 3.7
正常血清	50	8	31.63 ± 4.41 [*]
	100	8	135.50 ± 11.50
	200	8	151.00 ± 11.95 [*]
中药血清	50	8	34.00 ± 3.07 [*]
	100	8	133.75 ± 12.44 [*]
	200	8	152.75 ± 8.20
正常脑脊液	50	8	12.00 ± 6.05
	100	8	12.00 ± 6.05
	200	8	12.00 ± 6.05
中药脑脊液	50	8	11.00 ± 5.95
	100	8	10.00 ± 3.70
	200	8	12.00 ± 6.04

与空白对照组比较: * $P < 0.05$



A 第 3 天时神经元长出突起； B 神经元联结成网状；
C 第 10 天时，加中药胶质液组，神经元生长旺盛；
D 第 10 天时空白对照组神经元数量和突起数量减少

图 2 中药对神经元生长的影响

对于中风,现在认为在有效的时间窗内,半暗带神经元可以得到保护,在凋亡的发生机制中,神经营养因子的作用是不容忽视的环节,在临床治疗中,神经营养因子脑室注射和转基因技术由于操作复杂和价格昂贵在目前仍没有被广泛采用,作为神经元“伙伴”的胶质细胞,其营养作用在体外实验中已被证明可被某些因素诱导^[5,6]。本实验证明,中药同样可诱导星形胶质细胞的神经营养作用,这为中风后神经元的保护治疗提示了一种思路,同时由于其易于操作,因此将具有良好的应用前景。

参考文献

1 贺玉琢 . 国外医学·中医中药分册, 1999, 20(5): 3

2 张志军 . 国外医学·中医中药分册, 1999, 20(4): 11

3 Aleksandra P G, Donald B, Etsuro U. Brain Res, 1997, 754 65

4 Jean-Christophe C, Yibing L, Lita R, *et al.* Brain Res, 1998, 784 25

5 Irina S, Philipp W, Matthias S, *et al.* Eur J Pharmacol, 1996, 315 19

6 Yasuhiro A, Ritsuko K S, Chika N. Brain Res, 1998, 809 115

(1999-09-16收稿)

荷叶大豆及其合剂调脂活性部位的研究

中国医学科学院 药用植物研究所 (北京 100094) 杜力军* 孙虹 李敏 金文 徐丽珍
中国协和医科大学

摘 要 目的: 通过体内外实验探讨荷叶大豆调脂的活性部位及其作用特点。方法: 以急性高脂血症小鼠为整体模型观察药物对血清胆固醇及甘油三酯的影响。体外给药观察药物对肝细胞合成胆固醇的影响。结果: 荷叶大豆的水提取部分及其生物碱和黄酮均有调脂作用。大豆黄酮对体外肝细胞合成胆固醇有抑制的趋势。结论: 荷叶和大豆均有调脂作用, 其主要活性部位在黄酮和生物碱, 其作用特点在于促进胆固醇的代谢方面。
关键词 荷叶 大豆 调血脂

Studies on the Active Components in the Leaf of *Nelumbo nucifera* and Black Soybean and Their Mixture with Blood Lipid Regulating Effect

Institute of Medicinal Plant Developments, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College (Beijing 100094) Du Lijun, Sun Hong, Li Min, Jin Wen and Xu Lizhen

Abstract To study the effect of the leaf of *Nelumbo nucifera* Gaertn. and black soybean (*Glycine soja* Sieb. et Zucc.) on blood lipid level, in order to identify the active Components of the two herbs by experiments *in vivo* and *in vitro*. By determining the change of serum, cholesterol (TC) and triglycende (TG) of acute hyperlipemic mouse model after drug administration. By culturing liver cells with the test drugs to assess the effect on TC synthesis. The aqueous extracts of both test drugs and their alkaloid and flavonoid contents could lower serum TC and TG levels of hyperlipemic mice and inhibit the synthesis of TC by liver cells *in vitro*. Both lotus leaf and soybean could lower blood lipid levels due to their water soluble active Component of flavonoids and alkaloids.

key words the leaf of *Nelumbo nucifera* Gaertn. black soybean blood lipid

传统医学认为荷叶具有清暑利湿,升发清阳,止血的作用。近年的研究表明,荷叶内的黄酮具有调血脂活性。临床用荷叶水煎剂口服有一定的调脂作用^[1]。大豆古代即有入药的记载,且多以黑豆入药。如李时珍在《本草纲目》中指出:大豆有黑黄褐青斑数色,黑者名乌豆,可入药及充食,作豉。黄者可作腐,榨油,造酱。余但可作腐及炒食而已。又黑大豆具有“制诸风热,活血,解诸毒”的作用。

近年来对大豆的研究逐渐增多,如从大豆皂苷,大豆磷脂和大豆异黄酮等就抗肿瘤、抗炎、心肌动作电位等方面进行了探讨。但对于其调脂作用的临床及实验研究则较少报道。二药配伍其调脂作用及其活性部位的分布更未见报道。故对此进行研究,对于阐明二药及其配伍的调脂作用及其可能的物质基础

都具有重要的理论意义。

1 材料

1. 1 药物: 大豆、荷叶及其配伍水提取物由徐州百谷神生物工程有限公司提供。其中生物碱和黄酮部分由本所植物化学研究室制备。
1. 2 实验动物: KM小鼠,购自中国医学科学院实验动物所,合格证号: (96) 01-3001,体重 (31. 84± 6. 99) g (21. 49± 0. 44) g
1. 3 试剂与测试仪器: 总胆固醇 (TC)和甘油三酯 (TG)试剂盒购自北京中生生物工程高技术公司,批号分别为: 990101, 990211,按试剂盒要求进行测试。以 ZX-1A型半自动生化分析仪测试 (北京中生生物工程高技术公司生产)

2 方法

* Address: Du Lijun, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing
杜力军 男,教授,1990年毕业于成都中医药大学药学院,获医学博士学位。1992年军事医学科学院毒物药物研究所访问研究。现任中国医学科学院中国协和医科大学药用植物研究所药理二室主任。研究方向: 心脑血管药理。近五年来先后负责和承担国家及院课题 9项。获国家中医药科技进步奖 1项。在国内外杂志上发表论文 30余篇。