

聪圣胶囊对拟缺血再灌注大鼠 原代培养皮层神经细胞的保护作用

赵 玲¹, 徐秋萍², 李 林¹

(1. 首都医科大学宣武医院 药理研究室, 北京脑老化重点实验室, 北京 100053; 2. 北京中医药大学 药理教研室, 北京 100029)

摘要: 目的 研究聪圣胶囊对大鼠原代培养皮层神经细胞拟缺血再灌注损伤的影响。方法 采用血清药理学和流式细胞仪的方法, 观察聪圣胶囊含药血清对缺糖缺氧 (3 h) 拟缺血再灌注 (0, 3, 6, 18 h) 损伤神经细胞乳酸脱氢酶 (LDH) 漏出及神经细胞凋亡率的影响。结果 聪圣胶囊含药血清 (2, 4, 8 g/kg) 可抑制缺糖缺氧 3 h 再灌 (0, 3, 6 和 18 h) 引起的神经细胞内 LDH 的释放, 降低缺糖缺氧 3 h 再灌 18 h 导致的凋亡细胞率。结论 聪圣胶囊可减轻缺血性脑损伤。

关键词: 聪圣胶囊; 神经细胞; 脑缺血再灌注; 细胞凋亡

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)02-0144-03

Effects of Congsheng Capsule on cultured rat cerebral cortical neurons after ischemia-reperfusion.

ZHAO Ling¹, XU Qiu-ping², LI Lin¹

(1. Department of Pharmacology, Beijing Key Laboratory for Brain Aging, Xuanwu Hospital of Capital University of Medical Sciences, Beijing 100053, China; 2. Department of Pharmacology, Beijing University of TCM, Beijing 100029, China)

Abstract Object To investigate the protective effects of Congsheng Capsule (CSC) on cultured cerebral cortical neurons after cerebral ischemia-reperfusion in order to study the anticerebral ischemia effect of CSC. **Methods** Drug-containing serum was used to study the protective effect of CSC on neurons damaged during hypo glucos and hypoxia (3 h) /reoxygenation (0, 3, 6, 18 h), the damage to neurons was reflected by the increase in activity of lactate dehydrogenase (LDH) released from cells into culture medium and the changes of apoptotic cells which were studied by flow cytometry. **Results** The serum preparation of CSC (2, 4, 8 g/kg) attenuated neuronal damage during hypo glucos and hypoxia (3 h) /reoxygenation (0, 3, 6, 18 h) by decreased LDH and changes in apoptotic cell numbers. **Conclusion** CSC has protective effects on cerebral ischemic damage.

Key words Congsheng Capsule; neuron; cerebral ischemia-reperfusion; apoptotic cell

聪圣胶囊来源于王永炎院士的临床经验方, 功能为益肾养肝、活血化浊、健脑增智, 临床主治脑血管病后出现的老年期血管性痴呆。本室前期工作表明, 本方具有缩小大鼠大脑中动脉阻断后脑梗死面积, 改善神经功能缺失症状, 减轻脑水肿; 改善早老龄小鼠脑缺血再灌注致血管性痴呆模型的学习记忆障碍程度, 提高脑血流量等作用。本研究拟进一步探讨聪圣胶囊对拟缺血再灌注损伤大鼠原代培养神经细胞的保护作用。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂: 聪圣胶囊实验用浸膏系按处方 (制首乌、荷叶、漏芦、肉苁蓉、地龙) 制成, 由吉林省辽源市亚东药业股份有限公司提供, 批号为: 970606 阳性对照药喜得镇片, 由瑞士山德士药厂与国营天津华津制药厂合作生产, 批号 971166 多聚赖氨酸 (相对分子质量 150 000~300 000), NAD, PI (propidium iodide) 和 RNase A 均为 Sigma 产品。Tris 高糖、低糖 DMEM 培养基, 为 Gibco 产品; 胎牛血清、马血清为 Hyclone 产品; 其他药品与试剂均为市售分析纯。

收稿日期: 2002-07-26

基金项目: “九·五”国家攻关课题 (96-906-09-03)

作者简介: 赵玲 (1972-), 女, 辽宁沈阳人, 助理研究员, 博士, 1996年毕业于辽宁中医学院中医系, 获医学学士学位, 同年考入北京中医药大学, 攻读硕士学位, 导师为徐萍教授, 在读期间获准硕博连读, 2001年获医学博士学位, 研究方向为脑缺血的发病机制和脑缺血与 AD 的相关因素分析及中药的影响。

1.2 动物: Wistar大鼠, 雄性, 体重 180~200 g, 合格证号为〈医动字〉第 01-3008号。24 h内新生鼠, 均由中国医学科学院动物中心繁育场提供。

1.3 仪器: FACS-420型流式细胞仪, 美国 B. D. 公司产品; 400R 低温离心机, 德国 Heraeus 产品; RCO-3000T-5V CO₂培养箱, 美国 G. S 产品; SHZ-82型水浴恒温振荡器, 江苏省太仓医疗器械厂生产。

1.4 方法

1.4.1 药物血清的制备方法: 正常 Wistar大鼠, 随机分为 5组 正常组 聪圣胶囊 2, 4, 8 g/kg 组 喜得镇 0.6 mg/kg 组 每日给药 2次, 第 5次给药后 2 h 颈总动脉取血, 4℃ 保存 4 h 后 3 000 r/min 离心 20 min, 取血清, 56℃ 灭活 30 min, 过滤除菌, 分装, -20℃ 贮存。

1.4.2 神经细胞原代培养及缺糖 缺氧诱导神经细胞拟缺血再灌注损伤模型的建立: 取新生 24 h 内大鼠脑皮层, 依 Murphy^[1]的方法进行神经细胞培养, 培养至 10 d 时, 吸去原培养液, 用无糖 Earle's 液 (mmol/L): NaCl 116.4, KCl 5.4, CaCl₂ 1.8, Mg-SO₄ 0.8, NaH₂PO₄ 2.6, NaHCO₃ 26.2, HEPES 20.1, pH 7.4 洗 2 遍, 加入无糖 Earle's 液, 放缺氧罐中通入 95% N₂ 和 5% CO₂ 30 min, 正常对照组及缺糖缺氧损伤组置 37℃ 恒温培养箱中继续培养, 3 h 后取出, 换高糖 DMEM, 并恢复氧供以模拟动物的缺血再灌注状态。正常对照组用含葡萄糖 5.5 mmol/L 的 Earle's 孵育。药物血清及正常血清在缺糖缺氧处理的同时及过程中加入, 浓度为 10%。

1.4.3 神经细胞损伤的检测: 以培养神经细胞释放 LDH 的量作为定量评价细胞损伤的指标 分别于缺糖 缺氧 3 h 再灌 0, 3, 6 和 18 h 取上清液, 测 LDH 含量, 然后置培养细胞于 -20℃ 冰箱中超过 5 h, 冻融后同法测定总 LDH 含量 细胞损伤程度以培养细胞释放的 LDH 和总 LDH 活力的百分比 (LDH%) 表示

1.4.4 凋亡细胞计数: 神经细胞培养 10 d 后, 建立“缺血再灌注”模型, 缺糖缺氧 3 h 再灌 18 h 后收集细胞计数凋亡细胞 药物血清分别于换 Earle's 液和高糖 DMEM 的同时加入 收集细胞悬液, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 沉淀用 70% 乙醇悬浮, 4℃ 冰箱内固定 12 h 以上 取固定后的细胞用 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 洗 2 遍并悬浮之, 加入终浓度为 20 mg/L RNase A, 37℃ 恒浴 45 min, 再加入 PI 染液至终浓度为 50 mg/L, 摇匀后 4℃ 避光冷藏 1 h, 经尼龙网过滤, 在 FACS 420 型流式细胞仪上计数 10 000 个细胞, 测定各期 DNA 含量并计算凋亡细胞所占比例

2 结果

2.1 聪圣胶囊对 LDH 释放的影响: 神经细胞缺糖 缺氧 3 h 再灌 0, 3, 6 和 18 h, LDH 漏出量增加, 尤以“缺血再灌”后 LDH 升高更加明显, 与正常组相比有显著性差异 这与坏死细胞数和凋亡细胞数的增加呈正相关, 说明细胞损伤程度随缺血再灌时间的延长而加重 不同剂量的聪圣胶囊药物血清和喜得镇药物血清均可明显降低 LDH 的漏出量, 见表 1

表 1 聪圣胶囊对缺糖缺氧损伤神经细胞 LDH 漏出率的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of CSC on intracellular LDH release in cultured rat cortical neurons induced by hypoglycose/hypoxia ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /(g·kg ⁻¹)	n	LDH%			
			0 h	3 h	6 h	18 h
正常	-	10	21.4 ± 7.4*	28.0 ± 5.7*	29.0 ± 4.2*	35.0 ± 8.0*
模型	-	10	28.8 ± 3.8	43.0 ± 5.0	62.0 ± 9.0	66.0 ± 5.0
喜得镇	6 × 10 ⁻⁴	10	22.5 ± 10.0	35.4 ± 6.6	50.0 ± 6.0*	56.0 ± 7.0*
聪圣胶囊	2	10	31.2 ± 12.5	38.6 ± 7.1	57.5 ± 8.8	62.0 ± 1.1
	4	10	24.1 ± 10.0	25.2 ± 8.6*	55.6 ± 8.4	57.0 ± 7.0*
	8	10	17.3 ± 6.9*	22.5 ± 5.4*	43.4 ± 2.2*	52.0 ± 3.0*

与模型组相比: * P < 0.05 ** P < 0.01

* P < 0.05 ** P < 0.01 vs model group

2.2 聪圣胶囊对神经细胞凋亡的影响: 细胞发生凋亡以后, 活化的核酸内切酶将染色质 DNA 切割成许多相对分子质量很低的小片段, 这些小片段由于相对分子质量低, 可以从细胞中扩散出去, 使细胞内 DNA 含量降低。经 PI 染色后, 在流式细胞仪上分析细胞 DNA 各期含量, 可见在正常细胞 G₁ 峰前面出现一个 DNA 含量减少的“G₁ 亚峰”, 该峰的出现

被认为是细胞发生凋亡的标志之一。在亚峰前出现的颗粒为坏死细胞活细胞碎片。本实验结果显示缺糖 缺氧 3 h 再灌 18 h 可诱导神经细胞出现“G₁ 亚峰”, 经流式细胞仪计数 分析, 凋亡细胞所占比例是 17.36%, 聪圣胶囊 4, 8 g/kg 和喜得镇 0.6 mg/kg 含药血清可明显降低缺糖 缺氧 3 h 再灌 18 h 导致的凋亡细胞比例, 见表 2

表 2 聪圣胶囊对缺糖缺氧损伤神经细胞
凋亡细胞计数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 2$)

Table 2 Effect of CSC on apoptotic cell numbers induced
by hypoglycose/hypoxia ($\bar{x} \pm s, n = 2$)

组别	剂量 / (g · kg ⁻¹)	凋亡细胞率 / %
正常	-	7.57 ± 3.12
模型	-	54.65 ± 13.49
喜得镇	6 × 10 ⁻⁴	5.90 ± 0.16
聪圣胶囊	2	20.78 ± 11.86
	4	16.65 ± 7.30
	8	15.06 ± 1.81

3 讨论

中药复方由于其成分复杂,给体外实验尤其是细胞培养研究带来诸多不便,相当多的体外实验结果不能和体内实验结果相吻合,也不被临床疗效所证实,造成这些现象有多种原因,可能是①非生理环境的影响;②缺乏有效成分;③无效成分产生假象;④体外实验的方法存在误差。近年来一些学者采用了中药含药血清体外实验的方法,即在动物口饲中药一段时间后采血、分离血清,用给药后的血清代替药物的粗提物进行体外实验的一种药理实验方法^[2-4]。本实验即采用了这种给药方法。此种方法更接近于中药复方作用于细胞的体内过程,在一定程度上克服体外实验方法中存在的不足,但由于各个复方成分在体内的代谢过程、半衰期和有效血药浓度不同,使得含药血清制备技术的规范化研究成为一切研究的基础和关键,国内外尚未有这方面的系统报道,因此,本研究参照国家自然科学基金重点项目《中药复方体外试验方法学研究》课题组提出的《中药含药血清体外实验操作规程》建议草案,采用给药 5 次,即每日早晚各给药一次,连续 2 d,第 3 天早上给药后 1~2 h 采血的方法制备含药血清^[5]。

脑组织对缺血缺氧非常敏感,寻找有效的抗缺血缺氧性脑血管疾病药物极为重要。应用整体动物实验研究药物更接近动物的实际情况,但往往容易受到某些因素如脑温、血压、药物本身的副作用及血脑屏障通透性等因素的影响。使用体外培养神经细胞的方法可得到相对均一的细胞群体,排除上述因素的影响,来研究神经细胞对缺血缺氧性刺激的直接反应。本研究采用 Goldberg 等的方法^[6],以低糖低氧损伤原代培养皮层神经细胞的方法模拟在体脑缺血再灌模型,观察聪圣胶囊含药血清的抗脑缺血再灌作用。

乳酸脱氢酶 (LDH) 是一种细胞内标志酶,其化学和生物性质十分稳定,通常情况下神经细胞内

的 LDH 漏出很少,而受损神经元由于膜通透性的改变,LDH 释放量明显增加,测定培养液中的 LDH 累计释放量是一种简单而且能够定量评价神经元损伤程度的方法^[7,8]。本实验表明,神经细胞缺糖缺氧 3 h 再灌 0, 3, 6 和 18 h, LDH 漏出量明显增加,尤以缺糖缺氧再灌后 LDH 升高更加明显。不同剂量的聪圣胶囊药物血清和喜得镇药物血清可明显抑制缺糖缺氧诱导的神经细胞内 LDH 释放,提示聪圣胶囊对缺糖缺氧诱导的神经细胞损伤有明显的保护作用。

细胞凋亡是一种生理性调节机制,不仅在正常生理发育中存在,而且在某些病理状态下也可发生,许多神经退行性疾病如 Alzheimer's disease (AD)、Parkinson's disease (PD)、脑缺血损伤、癫痫等的发生均与神经细胞凋亡有关^[9,10]。本研究以原代培养大鼠新生鼠脑皮质神经细胞为研究对象,利用缺糖-缺氧诱导神经细胞凋亡的发生,观察聪圣胶囊含药血清对凋亡的抑制作用。结果表明聪圣胶囊含药血清可以降低神经细胞凋亡率,具有抗凋亡作用。

综上所述,聪圣胶囊具有保护神经细胞缺糖缺氧性损伤的作用,此作用与其脑保护作用有关。

References

- [1] Murphy T H, Barabau J M. Glutamate toxicity in immature cortical neurons precedes development of glutamate receptor currents [J]. *Dev Brain Res*, 1990, 57: 146-150.
- [2] Liu C H, Liu C, Liu P, *et al.* Study on a seropharmacological method for an effective antifibrotic formula [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 1998, 4 (2): 16-19.
- [3] Zhang Q H, Chen K J. Evaluation on serum pharmacology and its application in study of Chinese herbal medicine and composite recipe [J]. *Chin J Integrated Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 1996, 16(3): 131.
- [4] Cui X L, He Y Z, Gao Y J, *et al.* Study on a serum-pharmacology method of a Chinese medical formula-1 [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 1998, 4(2): 13-15.
- [5] Li Y K, Wu J Y. The discussion of "ordinary method" of obtaining serum in serum pharmacology method [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 1999, 15(6): 569-570.
- [6] Goldberg M P, Strasser U, Dugan L L. *Neuroprotective Agents and Cerebral Ischemia* [M]. San Diego: Academic Press Limited, 1997.
- [7] Koh T Y, Choi D W. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase reflux assay [J]. *J Neurosci Meth*, 1987, 20: 83-90.
- [8] Han Y, Wu D, Xiao X, *et al.* Protection against ischemic injury in primary cultured astrocytes of mouse cerebral cortex by bis(7)-tacrine, a novel anti-Alzheimer's agent [J]. *Neurosci Lett*, 2000, 288(2): 95-98.
- [9] Wu J F, Wang J, Su D, *et al.* Nerve growth factor prevents apoptosis induced by N-methyl-D-aspartate and hypoxia/hypoglycemia in cultured cerebral cortical neurons [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 1999, 15(1): 80-83.
- [10] Stahl S M. Apoptosis: Neuronal death by design [J]. *J Clin Psychiatry*, 1997, 58(5): 183-184.