

($P < 0.01$),表明生骨灵颗粒能促进大鼠骨折端软骨细胞骨化。

表 3 生骨灵颗粒对大鼠抗折力及骨组织的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	剂 量 /(g·kg ⁻¹)	动物数 /只	抗折力 /kg	断端软骨细胞		
				全部骨化	50 % 骨化	小于 50 %骨化
生骨灵颗粒	10.3	11	8.43 ±1.66 **	8 **	3 **	0 **
	5.1	11	7.21 ±2.74 **	8 **	3 **	0 **
阳性对照	1.5	9	8.83 ±2.79 **	9 **	0 **	0 **
模型	-	10	2.40 ±0.76	0	8	2

与模型组比较: ** $P < 0.01$ (t 检验)

** $P < 0.01$ vs model group (t -test)

2.4 小鼠腿部软组织撞击损伤试验:选取 NIH 小鼠 40 只,雌雄各半,体重 23 ~ 25 g。每鼠右后足腿部剪毛,用 200 g 砝码,在 20 cm 高度的圆筒内自由落下,经砧木锤伤右后腿软组织,锤击后肉眼可见锤击部位皮下有出血块,数分钟后看见明显肿胀。次日将软组织损伤的小鼠随机分组并给药,方法同 2.1 项,每天 1 次,连续 6 d,末次给药后 24 h 处死小鼠,取下右后腿,剥离皮肤,按动物软组织损伤的实验方法观察评分^[4]。结果生骨灵颗粒两个剂量组和阳性对照组的评分均比模型组低,经等级序值法统计分析,差异显著 ($P < 0.05$),见表 4。

表 4 生骨灵颗粒对小鼠软组织撞击损伤的影响

组 别	剂 量 /(g·kg ⁻¹)	评分			
		0	1	2	3
生骨灵颗粒	10.3	2	8	0	0 *
	5.1	0	8	2	0 *
阳性对照	1.5	1	9	0	0 *
模型	-	5	5	5	0

与模型组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs model group

3 讨论

骨折愈合过程是一个复杂的组织学、生物学、神经内分泌学及骨生物力学的动态过程。临床上,各种原因所致的骨折延迟愈合和骨折不愈合是常见病。本实验研究表明,生骨灵颗粒能促进小鼠骨折断端软骨细胞骨化,促进骨折的愈合;明显促进大鼠骨折断端骨膜反应及骨痂生成,提高骨痂质量,明显增强抗折力;明显减轻小鼠右腿部软组织撞击损伤所致水肿,加速瘀血的吸收,促进损伤的修复。由此可见,生骨灵颗粒具有明确的促进骨折愈合效果,为临床应用提供了可靠的理论依据。

References:

[1] Qiu T. The influence of Conjuncting-fracture Pellet on the callus of femur fracture in mice [J]. *J Gansu Coll Tradit Chin Med* (甘肃中医学院学报), 1989, 6(1): 50.
[2] Liu Y S. The experimental research about the influence of Conjuncting-fracture Pellet on fracture in rabbit [J]. *Fujian J Tradit Chin Med* (福建中医药), 1994, 25(3): 19-22.
[3] Liu R T. The research on traditional Chinese medicine Conjuncting-fracture Pellet promoting fracture healing [J]. *Tianjin J Tradit Chin Med* (天津中医药), 1962, 4(8): 457.
[4] Zhou G L. An experimental method about animal soft tissue injury [J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学通报), 1991, 7(5): 396.

丹参素对缺糖-缺氧损伤神经细胞的保护作用

张文生¹,朱陵群²,牛福玲^{2*}

(1. 北京师范大学资源学院,北京 100875; 2. 北京中医药大学东直门医院 中医内科学教育部重点实验室,北京 100700)

研究表明脑组织缺血性损伤过程中存在着神经细胞凋亡^[1],且神经细胞凋亡在缺血性脑损伤中起十分重要的作用。药物可通过干预神经细胞凋亡过程阻止缺血性损伤的进一步发展,而发挥对神经细胞损伤的保护作用。细胞内 Ca²⁺ 超载是缺血性脑

损伤的发病机制之一,在缺血后神经元凋亡发生中也起关键作用,而钙离子抑制剂或药物可抑制细胞内 Ca²⁺ 浓度 ([Ca²⁺]_i) 升高,可阻止凋亡的发生^[2,3]。丹参素是丹参的有效活性成分,具有抗缺血缺氧、抗自由基、抑制细胞内 [Ca²⁺]_i 升高等作

* 收稿日期:2003-12-24

作者简介:张文生(1966—),男,河北衡水市人,副教授,医学博士,现任北京师范大学资源学院资源药物与中药资源研究所副所长,研究方向为中药神经药理及中药资源研究。Tel: (010) 62205268 E-mail: zws@bnu.edu.cn

用^[3,4],临床上丹参被广泛用于治疗缺血性心脑血管疾病,但对其作用机制缺乏深入研究。本实验通过缺糖-缺氧细胞损伤模型观察丹参素对神经细胞凋亡及细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 变化等相关因素的影响,探讨其对神经细胞保护作用的机制。

1 材料与方法

1.1 神经细胞系:SH—SY5Y 由武汉大学典型培养物保藏中心提供(ATCC CRL—2266)。

1.2 药品与试剂:MEM 培养基为美国 Gibco 公司产品;新生牛血清为 HyClone 公司产品;碘化丙啶(PI)购自 Sigma 公司;Fluo-3、Rhodamine123 购自 Molecular Probes;连二亚硫酸钠(Na_2SO_4)及其他试剂为国产分析纯。丹参素(纯度 $\geq 98\%$)购自中国药品生物制品检定所。尼莫地平(Nimodipine)购自美国 ICN 公司。

1.3 SH—SY5Y 细胞的缺糖-缺氧模型制备及分组:将冻存的 SH—SY5Y 细胞株从 $-196^\circ C$ 液氮罐中取出,细胞常规复苏及传代,计数细胞并稀释至 $1 \times 10^5/L$,接种于 25 mL 培养瓶中(5 mL)。随机分为 5 组:缺糖-缺氧模型组,用无糖 Earle's 液[含(mmol/L) NaCl 143、KCl 5.4、 $CaCl_2$ 21.8、 $MgSO_4$ 10、 Na_2PO_4 1.0、HEPES 2.4, pH 7.4]洗细胞 2 次,加入含 0.3 mmol/L 连二亚硫酸钠的无糖 Earle's 液;正常对照组:细胞不经缺糖-缺氧损伤处理;尼莫地平组:100 $\mu mol/L$ 尼莫地平于缺糖-缺氧损伤时加入培养液中;丹参素组:于缺糖-缺氧损伤时加入丹参素(质量终浓度分别为 15、30 mg/L)。各组细胞处理后置 50% CO_2 、37 $^\circ C$ 培养箱中分别培养 2、4、6、12 h,收集细胞进行相关实验。

1.4 凋亡细胞计数:收集细胞悬液,1 000 $\times g$ 离心 5 min,弃上清液,沉淀用 70%乙醇悬浮,4 $^\circ C$ 冰箱内固定 12 h 以上。取固定后的细胞用 0.1 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)洗 2 遍并悬浮,加入质量终浓度为 20 mg/L RNase A, 37 $^\circ C$ 恒浴 1 h,再加入 PI 染液 50 mg/L,摇匀后 4 $^\circ C$ 避光静置 1 h,经

尼龙网滤过,在 FACS Calibur 型流式细胞仪上计数 10 000 个细胞,测定各期细胞 DNA 含量并计算凋亡细胞所占比例。

1.5 细胞形态学观察:参照文献方法^[2]。细胞用 Hoechst3342 和 PI 双染色 15 min,用磷酸缓冲液 PBS 洗 1 次,重悬于 PBS 中。用荧光显微镜观察。

1.6 乳酸脱氢酶(LDH)释放的测定:用 LDH 试剂盒(北京化学试剂公司提供)测定培养液中 LDH 含量,并将相应的培养细胞置于 $-30^\circ C$,3 h 以上,融解后以同法测定总 LDH。神经细胞损伤程度以培养细胞释放的 LDH 占总 LDH 的百分比表示。

1.7 细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的测定:收集细胞,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,用新鲜培养基重悬细胞,加入 Fluo-3 (50 $\mu mol/L$) 的无血清 MEM,37 $^\circ C$ 、45 min, PBS 洗细胞 3 次,取细胞悬液 1 mL,过 200 目尼龙网,在流式细胞仪上用 LOG 软件分析,绘制 Ca^{2+} 的平均荧光值分布图。其中横坐标为钙离子平均荧光值的对数值,纵坐标为细胞体积。Fluo-3 是新一代细胞膜透性的 Ca^{2+} 特异性荧光染料,其与细胞内游离 Ca^{2+} 结合后发出荧光,直接以荧光强度变化表示细胞内游离 Ca^{2+} 变化(激发光波长 480 nm,发射光波长 530 nm 和 620 nm)。

2 结果

2.1 丹参素对 LDH 释放的影响:缺糖-缺氧损伤后 2 h 细胞释放 LDH 显著增加,并随损伤时间的延长而增加,丹参素能够减少 LDH 的释放,并随着剂量的增加而作用增强,见表 1。

2.2 丹参素对细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响:正常对照组细胞在不同时间内钙离子含量及分布较稳定。缺糖-缺氧损伤不同时间后,细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 明显增加,并随损伤时间延长而增加,尼莫地平明显减少 Ca^{2+} 的过量产生,丹参素能抑制或减少 Ca^{2+} 的过量产生,随浓度增加作用增强,与模型组相比差异显著($P < 0.05, 0.01$),见表 2。

2.3 丹参素对神经细胞凋亡的影响:缺糖-缺氧损

表 1 丹参素对 LDH 释放的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Table 1 Effect of Danshensu on LDH release ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	剂量	LDH 释放/ %			
		2 h	4 h	6 h	12 h
正常对照	-	10.26 $\pm$ 3.58 **	11.95 $\pm$ 2.71 **	12.36 $\pm$ 2.84 **	13.07 $\pm$ 3.66 **
模型	-	16.59 $\pm$ 3.90	21.43 $\pm$ 4.05	28.72 $\pm$ 5.25	41.17 $\pm$ 7.03
丹参素	15 mg L^{-1}	13.71 $\pm$ 5.03 *	15.41 $\pm$ 3.70 **	20.14 $\pm$ 3.31 **	28.22 $\pm$ 5.37 **
	30 mg L^{-1}	11.69 $\pm$ 2.72 **	13.92 $\pm$ 3.75 **	15.01 $\pm$ 4.11 **	25.61 $\pm$ 4.83 **
尼莫地平	100 $\mu mol L^{-1}$	13.96 $\pm$ 3.11 *	15.68 $\pm$ 4.57 **	16.48 $\pm$ 2.71 **	19.63 $\pm$ 4.01 **

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

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

伤不同时间后,细胞凋亡发生率明显增高,并随损伤时间的延长,凋亡的细胞增多,尼莫地平能够拮抗这种作用,丹参素能抑制细胞凋亡的发生,与模型组相比差异显著,并随剂量的增加抑制作用更加明显,与尼莫地平组相比差异不显著 ($P > 0.05$),见表 3。

2.4 丹参素对神经细胞形态及细胞坏死的影响: Hoechst33342 和 PI 双染色检测时在荧光显微镜下

可观察到正常细胞发蓝色荧光,染色质均匀分布,凋亡小体产生,坏死细胞发红色荧光。正常对照组只可见少量的凋亡细胞和极少量的坏死细胞。缺糖-缺氧损伤后,可见大量的凋亡细胞及少量坏死细胞,并随损伤时间的延长而凋亡细胞及坏死细胞均增加,以凋亡细胞为主,加入丹参素及尼莫地平后,凋亡及坏死细胞均明显减少,见表 4。

表 2 丹参素对细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Table 2 Effect of Danshensu on cell $[Ca^{2+}]_i$ ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组 别	剂 量	细胞 $[Ca^{2+}]_i$ (平均荧光强度)			
		2 h	4 h	6 h	12 h
正常对照	-	4.76 $\pm$ 0.15 **	4.51 $\pm$ 0.11 **	4.84 $\pm$ 0.22 **	4.97 $\pm$ 0.18 *
模型	-	8.46 $\pm$ 0.34	9.89 $\pm$ 0.54	7.45 $\pm$ 0.40	6.25 $\pm$ 0.32
丹参素	15 mg L^{-1}	7.61 $\pm$ 0.61	6.79 $\pm$ 0.57 **	6.13 $\pm$ 0.62 **	5.53 $\pm$ 0.66
	30 mg L^{-1}	6.87 $\pm$ 0.79 *	5.92 $\pm$ 0.42 **	5.47 $\pm$ 0.49 **	5.09 $\pm$ 0.46 **
尼莫地平	100 μ mol L^{-1}	6.25 $\pm$ 0.44 *	5.58 $\pm$ 0.39 **	5.38 $\pm$ 0.41 **	5.15 $\pm$ 0.34 *

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

表 3 丹参素对神经细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Table 3 Effect of Danshensu on neuron apoptosis ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组 别	剂 量	神经细胞凋亡率/ %			
		2 h	4 h	6 h	12 h
正常对照	-	3.71 $\pm$ 1.24 **	3.89 $\pm$ 1.62 **	4.01 $\pm$ 1.77 **	4.29 $\pm$ 1.81 **
模型	-	18.59 $\pm$ 5.37	38.63 $\pm$ 10.24	42.05 $\pm$ 8.16	45.92 $\pm$ 10.22
丹参素	15 mg L^{-1}	15.37 $\pm$ 3.41 *	21.73 $\pm$ 5.13 *	29.78 $\pm$ 6.20 **	36.34 $\pm$ 5.05 *
	30 mg L^{-1}	13.92 $\pm$ 4.68 **	16.25 $\pm$ 3.38 **	22.02 $\pm$ 7.19 **	28.99 $\pm$ 7.02 *
尼莫地平	100 μ mol L^{-1}	10.90 $\pm$ 3.15 **	14.31 $\pm$ 5.17 **	17.96 $\pm$ 4.42 **	20.81 $\pm$ 5.66 **

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

表 4 丹参素对神经细胞坏死的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Table 4 Effect of Danshensu on neuron necrosis ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组 别	剂 量	神经细胞坏死率/ %			
		2 h	4 h	6 h	12 h
正常对照	-	0.69 $\pm$ 0.48 **	0.75 $\pm$ 0.32 **	0.94 $\pm$ 0.46 **	1.07 $\pm$ 0.68 **
模型	-	4.94 $\pm$ 0.85	6.14 $\pm$ 1.02	7.86 $\pm$ 0.72	9.41 $\pm$ 0.43
丹参素	15 mg L^{-1}	2.83 $\pm$ 0.31 *	3.68 $\pm$ 0.47 **	4.55 $\pm$ 0.57 **	5.13 $\pm$ 0.39 **
	30 mg L^{-1}	3.27 $\pm$ 0.39 *	3.46 $\pm$ 0.41 **	3.82 $\pm$ 0.35 **	4.32 $\pm$ 0.64 **
尼莫地平	100 μ mol L^{-1}	2.88 $\pm$ 0.38 **	3.02 $\pm$ 0.50 **	3.51 $\pm$ 0.73 **	4.58 $\pm$ 0.29 **

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

3 讨论

缺血再灌注性脑损伤所致的神经细胞死亡有坏死和凋亡两种方式,在脑缺血-缺氧早期引起的神经元死亡主要以坏死为主,而继发性或迟发性神经元死亡 (delayed neuronal death, DND) 则以凋亡为主。缺血性再灌注性脑损伤时神经细胞凋亡和坏死并存,共同参与梗死区的形成,凋亡主要位于半暗区,坏死发生于缺血中心区,抑制半暗区向缺血中心区的发展是缺血性脑血管病治疗的关键,即抑制神

经细胞凋亡的发生有利于缺血性脑血管疾病的治疗。

脑缺血再灌注后细胞内钙稳态异常,大量 Ca^{2+} 蓄积在细胞内产生严重的毒性作用,参与兴奋性神经毒、自由基等因素介导的 DND 的病理级联反应,导致神经细胞功能与结构的障碍。缺血损伤引起了大脑不同区域的细胞内钙集聚,尤其在海马更明显。脑缺血再灌后神经元钙稳态的维持,是细胞生存的

关键。细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高被认为是凋亡的始动因素。有研究表明各种原因诱导的细胞凋亡出现之前,胞浆内游离 Ca^{2+} 浓度均持续升高,抑制 Ca^{2+} 浓度的升高则可阻止诱导的细胞发生凋亡^[1,2]。Taket 等在胎鼠皮层神经元培养液中加入 Ca^{2+} 载体 (ionomycin),使细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高,诱发了神经元凋亡,提示 Ca^{2+} 与迟发性神经元凋亡有关^[3]。大量实验证明:阻止 Ca^{2+} 内流可明显减轻细胞损伤的程度。

SH-SY5Y 细胞来源于人的神经母细胞瘤,细胞的形态与正常神经元相似,呈锥形,而且具有明显的轴突,某些生理功能亦与正常神经元有相似之处,是目前国际上研究神经细胞功能较好的一种细胞模型^[5]。本实验以培养神经细胞 SH-SY5Y 缺糖-缺氧损伤为模型,模拟脑缺血状态,诱导培养的 SH-SY5Y 细胞凋亡的发生。结果发现,随着缺糖-缺氧损伤时间的延长,细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 随之明显增高,细胞凋亡的发生也越来越多,坏死的细胞也增多,代表细胞损伤程度的 LDH 的释放也越来越多。丹参素能明显改善这种情况,使 LDH 的释放、细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 水平、细胞凋亡及坏死的百分率均明显降低,对缺血性损伤的神经细胞有保护作用。尼莫地平是 L 型

钙通道阻断剂,能阻止 Ca^{2+} 跨膜内流,抑制细胞内 Ca^{2+} 的释放,使细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 保持在一定的水平。丹参素降低缺糖-缺氧损伤后 SH-SY5Y 细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 水平的效应与尼莫地平相仿。实验结果提示丹参素对缺糖-缺氧损伤后 SH-SY5Y 细胞的凋亡过程具有抑制作用,神经细胞具有保护作用,这种作用可能与其抑制神经细胞内钙超载有关,但丹参素的作用机制是影响细胞外钙的内流,还是调整细胞内钙库的释放,尚需进一步研究。

References:

- [1] Tennesi L D, Emilia D M, Lipton S A. Suppression of neuronal apoptosis by S-nitrosylation of caspases [J]. *Neurosci Lett*, 1997, 236(3): 139-142.
- [2] Zhu L Q, Fan J P, Huang Q F, et al. Study on the anti-apoptosis induced by hypoxia/hypoglycemia and reoxygenation of *Panax notoginseng* saponins in cultured rat hippocampal neurons [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2003, 28(1): 52-55.
- [3] Taket N, Endo Y. Ca^{2+} ionophore-induced apoptosis on cultural embryonic rat cortical neurons [J]. *Brain Res*, 1994, 652(1): 65-70.
- [4] Qian W M, Deng C Y, Xue Y M, et al. Effects of Danshen on L-type calcium channels in isolated cardiomyocytes of guinea pig [J]. *South China J Cardiol Dis* (岭南心血管病杂志), 2002, 8(4): 276-278.
- [5] Ghatan S, Larner S, Kinoshita Y, et al. p38 MAP Kinase mediates bax translocation in nitric oxide-induced apoptosis in neurons [J]. *Cell Biol*, 2000, 150(2): 335-347.

四季青鲜汁治疗烫伤的实验研究

潘秋文*

(杭州市预防保健门诊部,浙江 杭州 310007)

四季青为冬青科植物冬青 *Ilex purpurea* Hassk. 的叶,味苦、微涩,性凉,具有清热解毒、凉血止血、收敛生肌等功效。浙江民间有鲜叶捣烂外敷治疗烧烫伤的使用习惯,本实验观察四季青鲜汁对实验性大鼠烧烫伤模型的治疗作用。

1 材料

1.1 动物:SD 大鼠,雄性,体重 200~250 g,购自浙江省实验动物中心,动物合格证号:浙实验动准字 2001001 号;饲料:标准大鼠颗粒饲料,含蛋白质 20%,含钙 0.6%,由浙江省实验动物中心提供。

1.2 药物与试剂:四季青,鲜用榨汁,相当于鲜药 1.6 g/mL,由浙江省医学科学院药物研究所天然药物研究室提供。烫伤宁气雾剂,贵州远东药业有限公司产品,批号 20000518。戊巴比妥钠,上海医药集团生化试剂厂进口分装,批号 890416。0.9% 氯

化钠注射液,慈溪制药有限公司生产,批号 010224。硫化钠,浙江省兰溪市化工试剂厂生产,批号 971006。

1.3 仪器:D. SCr420 型可控硅控温三用水箱,通州市长江实验仪器厂产品;AEL200 型电子分析天平,LIBOR 公司产品。

2 方法与结果

雄性 SD 大鼠 50 只,按文献^[1]方法,将大鼠背部剃毛后用硫化钠脱毛(脱毛剂配制:2%CMC-Na 水溶液加 10%硫化钠溶液);次日 ip 戊巴比妥钠 40 mg/kg 麻醉,将去毛的背部皮肤浸入 85℃ 恒温水浴中持续 15 s,使之造成深度烫伤,烫伤面积为 5 cm×8 cm,约是体表面积 10%;随后立即 ip 灭菌生理盐水每只 5 mL;次日,用透明硫酸纸描绘大鼠皮肤烫伤面积的图形,电子天平称取烫伤面积图纸

* 收稿日期:2003-10-15