

50、100、200 $\mu\text{g/mL}$ 组均表现出明显的刺激作用 ($P < 0.01$), 且有剂量依赖性。

3 讨论

制首乌具有补肝肾、益精血的作用。据《本草纲目》记载, 该药有“养血益肝, 固精益肾, 健筋骨, 乌髭发, 为滋补良药。不寒不燥, 功在地黄、天门冬诸药之上”。周志文等发现, 何首乌提取物 (水煎醇沉粗提物) 能增加 CFU-S、BFU-E、CFU-E 和 CFU-GM 集落产率^[2]。表明何首乌有促进造血作用, 但是对于巨核系祖细胞的影响及对骨髓抑制贫血小鼠造血恢复的作用却未见报道。

本研究结果显示, PPS 体内用药后能明显增加骨髓抑制贫血小鼠 BMC 数, 促进骨髓抑制贫血小鼠红系、巨核系、粒系造血祖细胞的增殖; 体外用药后对红系和粒系祖细胞的增殖均无明显的直接刺激

作用, 但对巨核系祖细胞的增殖仍表现出刺激作用。提示 PPS 的对红系和粒系祖细胞的增殖似乎是一种间接作用, 而对巨核系则表现出直接/间接的刺激作用。目前还不能解释 PPS 对巨核系祖细胞增殖的直接刺激作用机制, 其间接作用可能与刺激造血生长因子分泌, 促进生长因子受体、转录因子、抗凋亡蛋白等的表达有关, 有待进一步的研究。

References:

- [1] Shang P, Yang T H, Jia M, et al. Purification and analysis of polysaccharides of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels [J]. *J Fourth Mil Med Univ* (第四军医大学学报), 2001, 22(14): 1311-1314.
- [2] Zhou Z W, Zhou J H, Xing S T. Effects of *Polygonum multiflorum* extract on murine hematopoietic functions [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 1991, 7(5): 19-21.
- [3] Liu X Z. *Experimental Handbook of Technologies on Cell Culture of Hematopoietic Progenitors* (造血祖细胞培养技术实验手册) [M]. Beijing: Beijing Publishing House, 1993.

脑舒宁胶囊对培养皮层神经细胞自由基损伤的保护作用及其机制研究

彭 伟

(山东中医药大学附属医院, 山东 济南 250011)

缺血性中风是临床常见的疑难病, 其发病率、病死率居高不下, 对人类健康危害极大, 因此, 对脑缺血神经元损伤机制进行研究并寻找有效的药物进行治疗具有重要意义。本实验采用血清药理学方法, 通过离体神经细胞培养, 制备自由基损伤模型, 以神经细胞存活率, 丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD) 水平测定和细胞凋亡率检测探讨脑舒宁胶囊对神经细胞损伤的保护作用及其机制。为临床防治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂: MTT 购自美国 Sigma 公司, DMSO 购自北京化学试剂三厂, MDA、SOD 试剂盒购自南京建成生物工程研究所, 原位凋亡检测试剂盒购自北京医科大学病理系。

1.2 神经细胞培养: 无菌条件下分离新生大鼠 (出生 0~1 d) 大脑皮层, 置于预冷的 D-Hank's 液中, 仔细剔除软脑膜及血管, 0.25% 胰酶 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 30 min, 终止消化, 1 000 r/min 离心 10 min, 沉淀用接种液悬浮, 机械吹打制成单细胞悬液, 调细胞计数约

为 $1 \times 10^6/\text{mL}$, 接种到经 0.1% 多聚赖氨酸过夜处理的 12 孔培养板和培养瓶中。置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱中培养。24 h 后全量换液 1 次以去除死细胞, 以后每 3 天换液 1 次, 第 5 天加阿糖胞苷以抑制非神经细胞的增殖。接种液成分: 85% DMEM/F₁₂、15% 小牛血清、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素。维持液为含 10% 小牛血清的 DMEM/F₁₂ 培养液。

1.3 神经细胞自由基损伤模型的建立

1.3.1 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 损伤模型: 生物体内自由基生成途径之一是酶促催化产生自由基, 黄嘌呤氧化酶催化产生自由基通常称为 X (黄嘌呤)/XO (黄嘌呤氧化酶) 模式。参照文献方法^[1], 采用 X/XO 体系, 将培养细胞用 D-Hank's 液洗 2 次, 加入含有 0.08 U/mL 黄嘌呤氧化酶和 1 mmol/L 黄嘌呤的无血清培养液作用 1 h, 然后吸除培养液, 加入无血清的 DMEM 培养液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱中继续培养。

1.3.2 H_2O_2 损伤模型: 取培养 8 d 的神经细胞, 吸除原培养液, D-Hank's 液洗 2 次, 加入终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用 1 h, 换以无血清的 DMEM

收稿日期: 2006-02-21

作者简介: 彭 伟 (1970—), 女, 山东济南人, 副主任医师, 副教授, 硕士, 主要研究方向为中西医结合治疗神经内科系统疾病。

Tel: (0531) 82613190 E-mail: pengwei0625@163.com

继续培养。

1.4 实验药物及含药血清的制备:脑舒宁胶囊(相当于生药 1.52 g/g)由川芎、三七、胆南星、陈皮、人参、制首乌、葛根、冰片等药物组成,由山东中医药大学附属医院制剂室制备。Wistar 雄性大鼠,由山东大学动物实验中心提供。大鼠禁食 12 h 后,ig 给药。脑舒宁胶囊分为 3 个剂量组,分别相当于成人等效剂量的 20 倍 (13.3 g/kg)、10 倍 (6.6 g/kg)、5 倍 (3.3 g/kg)。采用两次给药法,即于首次给药后 2 h,重复给药 1 次,剂量相同,第 2 次给药后 1 h,1.2% 戊巴比妥钠麻醉大鼠,无菌条件下心脏取血,分离血清,2 000 r/min 离心 20 min,取上清液即为含药血清。56 ℃ 灭活 40 min, -20 ℃ 冻存,用前 4 ℃ 融化,按照含药血清体积分数 10% 分别于损伤前 24 h 及损伤后加入培养液中,空白血清按相同剂量给大鼠 ig 蒸馏水,相同方法分离制备血清。

1.5 培养细胞分组:培养细胞分为正常对照组、模型组、空白血清组、脑舒宁胶囊含药血清高、中、低 3 个剂量组。

1.6 神经细胞存活率测定:6 组培养细胞,每组 4 孔。每孔随机选定 5 个视野,以倒置相差显微镜 (10×40) 分别计数每个视野实验前后的存活细胞数,计算实验后的细胞存活率,取其平均值为该孔的细胞存活率,取 4 孔的平均值为该组的细胞存活率,统计各组之间的差异。存活细胞标准为细胞形态及突起完整,胞体呈暗相,周围光晕完整清晰。

1.7 MDA、SOD 检测:培养细胞损伤后继续培养 24 h,去除原培养液,D-Hank's 液洗 2 次,加入 0.1 mol/L PBS-0.05 mmol/L EDTA (pH 8.0) 及 1% Triton X-100 溶解细胞,加入 25% H₃PO₄ 沉淀蛋白,6 000 r/min 离心 30 min,取上清液,按试剂盒说明,分别采用硫代巴比妥酸法、黄嘌呤氧化酶法测定^[2]。

1.8 细胞凋亡检测:按原位细胞凋亡检测试剂盒程序进行。培养的神经细胞分别于自由基损伤模型建立后,4% 多聚甲醛固定 20 min,0.1 mol/L HCl 室温处理 10 min,加蛋白酶 K,37 ℃ 作用 20 min,加 TUNEL 反应混合液 37 ℃,封闭液作用 1 h,用碱性磷酸酶标记的 Anti-Dig-AP 37 ℃ 孵育 1 h,NBT-BCIP 暗处显色 30 min,核固红复染,封片。阴性对照反应液中不加 TdT 酶。每组取 2 张盖片,10×40 倍光镜下随机计数 10 个视野内的凋亡细胞数,取其平均值。

1.9 统计方法:计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用统计软

件 SPSS 12.0 进行单因素变量的方差分析。

2 结果

2.1 光镜观察:培龄 9 d 的正常对照组的神经细胞晕光明显,胞体饱满,多聚集成团,细胞团之间可见粗大的突起并互相连接,网络稠密。暴露于 O₂⁻ 继续培养 24 h 后,O₂⁻ 模型组神经细胞损伤明显,漂浮细胞明显增多,神经细胞数目减少,大多数细胞失去突起,网络消失,胞体光晕消失,仅有少数神经细胞存活,突起萎缩,仅存胞体。H₂O₂ 模型组神经细胞损伤程度与 O₂⁻ 模型组大致相同。脑舒宁胶囊各剂量组以高剂量组损伤最轻微,仅少数细胞突起消失,神经细胞数目无明显减少,绝大部分神经细胞突起仍互相连接,网络稠密;中剂量组神经细胞数目减少,网络仍存在,少数细胞突起萎缩;低剂量组漂浮细胞数目增多,神经细胞数目减少,网络稀疏,多数细胞突起消失,有些仅留胞体。空白血清组与模型组情形大致相同。

2.2 神经细胞存活率:经 O₂⁻、H₂O₂ 损伤继续培养 24 h 后,模型组的神经细胞存活率明显下降,与正常对照组比较差异显著 ($P < 0.01$)。脑舒宁胶囊各剂量均能不同程度地提高神经细胞的存活率,其中以中、高剂量作用明显,与模型组比较差异显著 ($P < 0.05$ 、 0.01);空白血清组与模型组比较,神经细胞存活率差异无显著性 ($P > 0.05$),结果见表 1。

表 1 脑舒宁胶囊对 O₂⁻ 或 H₂O₂ 损伤的神经细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

Table 1 Effect of Naoshuning Capsule on survival rate of neuronal cells injured by O₂⁻ or H₂O₂ ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

组别	剂量/ (g · kg ⁻¹)	神经细胞存活率/%	
		O ₂ ⁻	H ₂ O ₂
正常对照	—	95.47 ± 9.6	95.77 ± 8.3
模型	—	35.28 ± 7.5 ^{△△}	32.00 ± 4.8 ^{△△}
空白血清	—	37.08 ± 6.9	31.67 ± 5.7
脑舒宁胶囊含药血清	3.3	44.05 ± 6.3	49.20 ± 7.7
	6.6	71.65 ± 7.2 [*]	73.26 ± 6.9 [*]
	13.3	87.73 ± 8.3 ^{**}	89.35 ± 8.5 ^{**}

与正常对照组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$

与模型组比较: $^* P < 0.05$ $^{**} P < 0.01$

$\Delta\Delta P < 0.01$ vs normal control group

$^* P < 0.05$ $^{**} P < 0.01$ vs model group

2.3 MDA、SOD 检测结果:神经细胞经 O₂⁻ 或 H₂O₂ 损伤后,MDA 生成增多,SOD 活力则显著降低,与正常对照组比较差异显著 ($P < 0.01$),空白血清组与模型组相比,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。脑舒宁胶囊中、高剂量能减少 MDA 的生成,并能明

显地提高 SOD 的活力,与模型组比较,差异显著 (P<0.05、0.01)。而脑舒宁胶囊低剂量虽有使 MDA 生成减少、SOD 活性提高的趋势,但与模型组比较,差异无显著性 (P>0.05)。结果见表 2。

表 2 脑舒宁胶囊对 O₂⁻或 H₂O₂损伤的神经细胞的 MDA 和 SOD 的影响 ($\bar{x}\pm s$, n=4)

Table 2 Effect of Naoshuning Capsule on MDA and SOD in neuronal cells injured by O₂⁻ or H₂O₂ ($\bar{x}\pm s$, n=4)

组 别	剂量/ (g · kg ⁻¹)	O ₂ ⁻		H ₂ O ₂	
		MDA/(nmol · mL ⁻¹)	SOD/(nU · mL ⁻¹)	MDA/(nmol · mL ⁻¹)	SOD/(nU · mL ⁻¹)
正常对照	—	1.39±0.65	130.84±12.45	1.26±0.47	129.90±13.52
模型	—	14.06±1.03 ^{△△}	55.63±9.78 ^{△△}	15.92±1.58 ^{△△}	52.33±7.26 ^{△△}
空白血清	—	14.27±1.15	57.05±9.91	16.07±1.32	53.11±8.67
脑舒宁胶囊含药血清	3.3	12.25±1.30	65.20±8.98	13.55±1.41	68.07±9.10
	6.6	9.07±0.99*	93.64±10.21*	11.12±1.25*	90.88±10.75*
	13.3	8.51±0.83**	115.98±15.50**	9.75±1.01**	108.27±13.63**

与正常对照组比较: ^{△△}P<0.01; 与模型组比较: *P<0.05 **P<0.01

^{△△}P<0.01 vs normal control group; *P<0.05 **P<0.01 vs model group

2.4 原位凋亡检测结果:阳性结果为细胞核呈蓝紫色。阴性对照片无细胞核被标记,说明阳性标记具有特异性。培养细胞经 O₂⁻、H₂O₂处理后,继续培养,第 1 天,未见凋亡细胞,第 3 天模型组可见少量散在分布的凋亡细胞,凋亡细胞核呈圆形或新月形,深染呈蓝紫色,有的核外周深染而中央淡染,随着培养时间的延长,凋亡细胞数量逐渐增多,至第 7 天凋亡细胞数达高峰。正常对照组经无血清的 DMEM 处理后,第 1、3、5 天均未见凋亡细胞,第 7 天可见少量散在分布的凋亡细胞。空白血清组细胞凋亡时程与模型组相似,两组凋亡细胞数比较无显著差异 (P>

0.05)。脑舒宁胶囊中、高剂量组于 O₂⁻、H₂O₂损伤后第 1、3 天未见凋亡细胞,第 5、7 天可见数量不等的凋亡细胞,较模型组均明显减少,差异具有显著性意义 (P<0.01)。低剂量组第 3 天可见少量凋亡细胞,第 5、7 天凋亡细胞逐渐增多,与模型组相比有显著性差异 (P<0.05)。结果见表 3 和 4。

3 讨论

脑缺血再灌流时,可产生大量化学性质非常活跃的自由基。由于自由基产生的量很大,超过了机体的清除能力,自由基在活性铁的催化下,起动脂质过氧化。脂质过氧化是引起脑再灌流性损害的重要因

表 3 O₂⁻介导的神经细胞损伤后 TUNEL 检测结果 ($\bar{x}\pm s$, n=10)

Table 3 TUNEL Detecting results of neuronal cells injured by O₂⁻ ($\bar{x}\pm s$, n=10)

组 别	剂量/ (g · kg ⁻¹)	细胞凋亡数/(个 · 视野 ⁻¹)		
		第 3 天	第 5 天	第 7 天
正常对照	—	—	—	4.026 7±1.003 6**
模型	—	17.968 3±1.298 2	27.865 7±4.636 0	31.678 1±6.187 7
空白血清	—	18.871 5±2.377 2	26.796 2±3.078 1	30.671 1±5.917 1
脑舒宁胶囊含药血清	3.3	8.968 0±1.922 4*	19.865 7±3.326 2*	23.651 3±4.781 5*
	6.6	—	12.313 2±2.877 0**	18.856 7±3.078 7**
	13.3	—	10.092 3±2.283 1**	15.223 3±3.670 7**

与模型组比较: *P<0.05 **P<0.01

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

表 4 H₂O₂介导的神经细胞损伤后 TUNEL 检测结果 ($\bar{x}\pm s$, n=10)

Table 4 TUNEL Detecting results of neuronal cells injured by H₂O₂ ($\bar{x}\pm s$, n=10)

组 别	剂量/ (g · kg ⁻¹)	细胞凋亡数/(个 · 视野 ⁻¹)		
		第 3 天	第 5 天	第 7 天
正常对照	—	—	—	4.627 3±1.100 3**
模型	—	18.872 6±1.392 7	28.899 0±4.360 2	33.575 6±4.238 1
空白血清	—	18.037 2±2.051 3	27.923 5±4.267 8	34.035 7±4.328 6
脑舒宁胶囊含药血清	3.3	9.106 2±1.833 4*	20.066 5±3.286 6*	24.689 9±4.650 5*
	6.6	—	12.689 7±1.665 6**	19.066 7±3.087 7**
	13.3	—	10.967 3±1.980 1**	14.366 8±3.781 5**

与模型组比较: *P<0.05 **P<0.01

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

素,从而加重了脑再灌注性损害,脑缺血后,ATP 减少,AMP 增多,后者分解产生次黄嘌呤,脑组织中正常存在的次黄嘌呤脱氢酶,在钙的参与下转变为黄嘌呤氧化酶,该酶在次黄嘌呤和黄嘌呤存在下,使再灌注期进入脑组织的 O_2 转变为超氧阴离子 ($O_2^{\cdot-}$)。这是缺血时产生自由基的主要途径之一^[3]。

$O_2^{\cdot-}$ 进一步启动 Haber-Weiss 反应生成毒性更强的羟自由基。这些自由基可以攻击细胞膜,并可以造成许多大分子如核酸、蛋白质损伤,最终导致神经细胞的损伤。本实验利用黄嘌呤氧化酶-黄嘌呤(X/XO)反应系统产生 $O_2^{\cdot-}$ 。利用 $O_2^{\cdot-}$ 及 H_2O_2 作为外源性自由基损伤因素,研究自由基对培养神经细胞的损伤,并用于筛选有效的抗自由基损伤的药物。本实验结果表明,神经细胞经 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 损伤后,神经细胞存活率及活性均明显下降,说明外源性自由基的确造成了神经细胞的损伤。

本研究发现外源性 $O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 作用于神经细胞,使 MDA 生成量显著增加,说明生成了大量的脂质过氧化物,间接地反映出细胞受到自由基的严重损伤。同时 SOD 活力则明显下降,说明清除自由基的能力下降,原位 DNA 缺口末端标记法检测到阳

性细胞,说明自由基造成的神经细胞死亡包括坏死和凋亡。

脑舒宁胶囊能提高自由基损伤的神经细胞的存活率及细胞活性,减少凋亡细胞数量,并能降低 MDA 的生成量,提高 SOD 活力,有效地减轻了 $O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 对神经细胞的损伤作用。脑舒宁胶囊保护神经细胞免受自由基损伤的可能机制:(1)直接清除自由基,起到天然抗氧化剂的作用;(2)提高机体内抗氧化酶的活性,启动内源性抗自由基系统来清除过量产生的自由基;(3)增强细胞膜等易受自由基攻击的目标的耐受性;(4)抑制自由基引起的神经细胞凋亡。但其具体机制仍有待进一步研究。

References:

- [1] Li T W, Kong L K, Xiong W. Protection of ginsenosides against $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 damage to cultured rat cortical neuronal cells [J]. *J Norman Bethune Univ Med Sci* (白求恩医科大学学报), 1998, 24(2): 130-133.
- [2] Zhang J J, Cai Z, Liu X M. The change of LPO and SOD on acute ischemic stroke patients and effect of antioxidants [J]. *J Apoplexy Nerv Dis* (中风与神经疾病杂志), 1992, 9(4): 213-216.
- [3] Wang S M, He C M. Anti-lipid peroxidation and oxygen free radical scavenging activity of Pericarpium Citri Reticulatae extract [J]. *J Chin Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1998, 29(6): 462-465.

蛇床子素抑制大鼠骨质疏松的实验研究

汤群芳¹, 孔令军², 顾振纶¹, 谢梅林^{1*}

(1. 苏州大学医学院 药理研究室, 江苏 苏州 215123; 2. 苏州大学医学院 儿科系, 江苏 苏州 215123)

蛇床子素 (osthole) 为从伞形科植物蛇床 *Cnidium monnieri* (L.) Cusson 果实中提取得到的香豆素类化合物。具有抗炎、抗心律失常、抗诱变、抗肿瘤、抗变态反应以及抑制伴刀豆球蛋白 A 所致小鼠肝炎等作用^[1,2]。近年来有报道蛇床子素能够防治去卵巢致大鼠高转换型骨质疏松, 促进成骨细胞的增殖和成骨作用^[3]。本实验以地塞米松诱导大鼠实验性骨质疏松症为模型, 进一步观察蛇床子素对激素引发骨质疏松大鼠的骨代谢血清学指标、骨矿化密度 (bone mineral density, BMD) 及骨小梁结构的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物: 选用 3 月龄健康 SD 雌性大鼠, 体重

(160±20) g, 清洁级。实验动物生产许可证: XCYK (苏) 2002-0008, 实验动物使用许可证号: SYXK (苏) 2002-0037, 苏州大学实验动物中心供应。

1.2 药品与试剂: 地塞米松磷酸钠注射液, 江苏第六制药厂生产, 批号 020802; 维生素 D₃ (Vit D₃), 上海罗氏制药有限公司惠赠; 蛇床子素, 质量分数为 95%, 西安绿泉生物技术有限公司提供, 批号 030516; 血清碱性磷酸酶 (ALP)、磷 (P³⁺) 及钙 (Ca²⁺) 测定试剂盒均购于南京建成生物技术公司, 批号均为 20050104; 甲状旁腺激素 (PTH) 和雌二醇 (E₂) 放免测定试剂盒购于北京中国原子能科学研究院, 批号均为 200501; 白细胞介素-1 (IL-1)、骨钙素 (BGP) 和降钙素 (CT) 放免测定试剂盒购于

收稿日期: 2006-03-08

作者简介: 汤群芳 (1975—), 女, 江苏苏州人, 在读硕士, 研究方向为中药药理。Tel: (0512) 65471556

* 通讯作者 谢梅林 Tel: (0512) 65880320 E-mail: Xiemeilin@suda.edu.cn