

- tection of the extract of leaves of *Ginkgo biloba* L. on cardiac muscle ischemia-reperfusion [J]. *Mod Med J* (现代医学), 2006, 34(3): 183-186.
- [4] Wang P, Wang W, Xu Y L, et al. Comparison of focal cerebral ischemia/reperfusion-induced apoptosis of astrocytes and neu-rons in mice [J]. *Chin J Histochem Cytochem* (中国组织化学与细胞化学杂志), 2006, 16(2): 113-118.
- [5] Trapp T, Korhonen L, Besselmann, et al. Transgenic mice over expressing XIAP in neurons show better outcome after transient cerebral ischemia [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2003, 23(2): 302-313.
- [6] Xiao Z Y, Sun C K, Xiao X W, et al. Protective effects of *Ginkgo biloba* extract on cerebral ischemia and the responses of CD11 b-immunoreactivity positive cells [J]. *Chin J Clin Rehabil* (中国临床康复), 2006, 10(43): 55-57.
- [7] Kato H, Liu Y, Araki T, et al. Temporal profile of the effects of pretreatment with brief cerebral ischemia on the neuronal damage following secondary ischemic insult in the gerbil: cumulative damage and protective effects [J]. *Brain Res*, 1991, 553(2): 238-242.
- [8] Jiang M H, Kaku T, Hada J, et al. Different effects of eNOS and nNOS inhibition on transient forebrain ischemia [J]. *Brain Res*, 2002, 946(1): 139-147.
- [9] Beibarz E J, Willials C E, Dragunow M, et al. Mechanisms of delayed cell death following hypoxic-isehemic injury in the immature rat: evidence for apoptosis during selective neuronal loss [J]. *Mol Brain Res*, 1995, 29: 1-5.
- [10] Hallenbeck J M, Dutka A J. Background review and current concepts of reperfusion injury [J]. *Arch Neurol*, 1990, 47: 1245-1255.
- [11] Khan M, Sekhon B, Jatana M, et al. Administration of N-acetylcysteine after focal cerebral ischemia protects brain and reduces inflammation in a mice model of experimental stroke [J]. *J Neurosci Res*, 2004, 6(4): 519-527.
- [12] Rami A. Ischemic neuronal death in the mice hippocampus: the calpain-calpastain-caspase hypothesis [J]. *Neurobiol Dis*, 2003, 13(2): 75-88.
- [13] Clem R J, Duckett C S. The iap genes: unique arbiters of cell death [J]. *Trends Cell Biol*, 1997, 7: 337-339.
- [14] Liu L Q, Wang Y, Zhou S N. Effect of *Ginkgo biloba* extract for neurocyto apoptosis [J]. *Chin J Clin Rehabil* (中国临床康复), 2004, 8(25): 5360-5361.

## 天麻素对酸中毒诱导的大鼠海马神经元损伤的保护作用

曾祥慧, 葛亚坤, 严 明, 郑筱祥\*

(浙江大学生物医学工程与仪器科学学院, 浙江 杭州 310027)

脑组织 pH 值下降、酸中毒是很多疾病如脑外伤、癫痫、脑中风的病理现象,也是导致神经元损伤的主要致病因素<sup>[1,2]</sup>。天麻素是天麻的主要有效成分,具有抗谷氨酸兴奋性毒性和氧自由基损伤作用<sup>[3,4]</sup>,并且广泛用于神经系统疾病的治疗。近年来,对天麻素的药理作用展开了广泛的研究,如抗血管性痴呆、抗神经衰弱、抗癫痫等作用。本实验采用原代培养的大鼠海马神经细胞,建立酸中毒细胞模型,观察天麻素对酸性环境下海马神经元的影响,为该药更好的临床应用提供进一步的理论基础。

### 1 材料

1.1 动物:新生 SD 大鼠(1 日龄),由浙江省医学科学院动物中心提供,动物合格证号:SCXK(浙)2003-0001。

1.2 药品与试剂:天麻素(质量分数 99.6%),由昆明制药集团有限公司提供;阿米洛利(中国药品生物制品检定所);Fluo-3/AM (Molecular Probe, 美国);PI 染料 (Caltag, 美国);胰蛋白酶 (Amresco 公司, 美国);胎牛血清(杭州四季青生物材料有限公司);DEME 培养基 (Gibco, 美国);Neurobasal 培

养液及 B27 补充物 (Gibco, 美国)。

1.3 仪器:FACSsort 流式细胞仪,美国 BD 公司产品;Zeiss 510 型激光共聚焦显微镜,德国 Zeiss 公司产品;inoLab Level 1 pH 计,德国 WTW 公司产品;BB5060 型 CO<sub>2</sub> 恒温培养箱为德国 Heraeus 公司产品。

### 2 方法

2.1 海马神经细胞原代培养:取 1 日龄 SD 大鼠,处死后无菌条件分离出海马组织,剪碎后加入 0.25% 胰蛋白酶液,37 °C 振荡消化 20 min,1 000 r/min 离心 10 min,收集细胞,用 DMEM 完全培养液(含 10% 胎牛血清)重新悬浮后,以 2×10<sup>5</sup>/cm<sup>2</sup> 将海马细胞分别接种于涂有多聚赖氨酸的 24 孔培养板和培养皿内。置 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱内培养,12 h 细胞贴壁后 DMEM 完全培养液换为 Neurobasal 培养液(加 2% B27 补充物、0.5 mmol/L 谷氨酰胺、50 U/mL 青霉素、50 μg/mL 链霉素)。以接种当天为培养第 1 天,至培养第 3 天加入终浓度为 3 μmol/L 的阿糖胞苷以抑制非神经细胞的增殖,培养 9 d 后用于各项实验。

收稿日期:2007-04-25

作者简介:曾祥慧(1976—),男,江西省南康市人,博士研究生,研究方向为抗心脑血管疾病药物及抗肿瘤药物筛选与评价。

E-mail: zeng\_89@hotmail.com

\* 通讯作者 郑筱祥 Tel: (0571) 87951091 E-mail: zxx@mail.bme.zju.edu.cn

2.2 酸中毒细胞模型的建立:参考文献方法<sup>[2]</sup>。神经细胞培养 9 d 后,细胞分为正常组、模型组、天麻素组 (25、50、100 μg/mL) 和阿米洛利组 (100 μmol/L)。正常组加入 pH 7.4 的平衡盐溶液 (BSS),其他各组加入 pH 6.5 的平衡盐溶液 [BSS (mmol/L) NaCl 140、KCl 5.5、CaCl<sub>2</sub> 1.8、MgCl<sub>2</sub> 1.0、HEPES 20、葡萄糖 10],2 h 后,移去 BSS 液,清洗细胞,加入新鲜 Neurobasal 培养液,继续培养 22 h。实验结束后用流式细胞仪检测细胞死亡率和活性氧 (ROS) 水平。BSS 和新鲜 Neurobasal 培养液含有阿米洛利和不同终质量浓度的天麻素。

2.3 流式细胞仪检测细胞死亡率:根据本室建立的实验方法<sup>[5]</sup>,将培养于 24 孔板的各组海马神经细胞消化收集,每组 5 个复孔,PBS 清洗 1 遍,细胞调为 8×10<sup>4</sup>/mL,取 0.2 mL,加入 20 μL PI 染料浓缩液 (50 μg/mL),孵育 5 min 后,在流式细胞仪上检测,数据用流式细胞仪携带的 Cell Quest™ 软件分析,实验重复 3 次。

2.4 细胞内 ROS 水平的测定:将培养于 24 孔板的各组海马神经细胞消化收集,PBS 清洗 2 遍,细胞调为 8×10<sup>4</sup>/mL,取 0.19 mL。加入 10 μL H<sub>2</sub>DCFDA 溶液 (DCF,0.2 mmol/L) 混匀,室温下避光孵育 30 min。离心吸弃上清液,PBS 清洗 2 遍,加入 0.2 mL PBS 待测。流式细胞仪选用激发波长为 488 nm,吸收波长为 530 nm,测定细胞内二氯荧光素的荧光强度,DCF 的荧光强度反映细胞内 ROS 水平,实验重复 3 次。

2.5 细胞内钙离子浓度 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 的测定:培养于 35 mm 培养皿的各组细胞经药物预处理 15 min 后,Fluo-3 染色,室温下避光孵育 30 min。PBS 清洗 2 遍后,激光共聚焦显微镜进行时间序列扫描 (激发波长 488 nm,发射波长 500~550 nm)。每 60 秒扫描一幅图像并自动记录细胞内钙离子荧光强度 *F* (第一幅图荧光强度值记作 *F*<sub>0</sub>),扫描时间为 30 min。给药组细胞在扫描第一幅图像后迅速于培养皿中加入含不同质量浓度药物的 pH 6.5 的 BSS,正常组加 pH 7.4 的 BSS。用 *F*/*F*<sub>0</sub> 表示第 30 分钟 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 的变化。

2.6 统计学分析:数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 统计软件包,多组间比较用单因素方差分析 (one-way ANOVA),两两比较用 Student's *t* 检验。

### 3 结果

3.1 对神经细胞死亡率的影响:见表 1。与正常组比较,模型组海马神经细胞死亡率明显升高,差异极

显著 ( $P < 0.001$ );与模型组比较,天麻素低、中、高 3 个剂量组细胞死亡率都有不同程度的降低,尤以中、高剂量组作用明显,差异显著 ( $P < 0.05$ ),阿米洛利组神经细胞死亡率明显减少,差异显著 ( $P < 0.01$ )。

3.2 对神经细胞内 ROS 水平的影响:见表 1。与正常组比较,模型组细胞内 ROS 水平明显升高,差异极显著 ( $P < 0.001$ );与模型组比较,阿米洛利组和天麻素中、高剂量组神经细胞内 ROS 水平明显降低,差异显著 ( $P < 0.01, 0.05$ ),且天麻素组表现出明显的量效关系。

3.3 对神经细胞 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 的影响:见表 1。与正常组比较,模型组细胞 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 明显升高,差异极显著 ( $P < 0.001$ );与模型组比较,阿米洛利组和天麻素中、高剂量组细胞 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 升高明显减轻,差异显著 ( $P < 0.01, 0.05$ ),且天麻素组有量效关系。

表 1 天麻素对酸中毒损伤的大鼠海马神经细胞死亡率、细胞内 ROS 水平和 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 1 Effect of gastrodin on death rate, ROS level, and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in rat hippocampal neurons induced by acidosis ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	浓度	死亡率/%	ROS(荧光强度)	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> ( <i>F</i> / <i>F</i> <sub>0</sub> )
正常	-	9.2±2.5	53.4±5.7	1.096±0.154
模型	-	37.6±5.3***	108.6±8.7***	3.131±0.351***
阿米洛利	100 μmol·L <sup>-1</sup>	20.3±3.4△△	65.5±6.5△△	1.581±0.274△△
	25 μg·mL <sup>-1</sup>	31.6±5.5	98.7±7.9	2.864±0.302
天麻素	50 μg·mL <sup>-1</sup>	28.1±4.2△	92.2±6.3△	2.529±0.244△
	100 μg·mL <sup>-1</sup>	24.0±5.6△	85.4±8.1△	2.252±0.189△

与正常组比较:\*\*\* $P < 0.001$

与模型组比较:△ $P < 0.05$  △△ $P < 0.01$

\*\*\* $P < 0.001$  vs normal group

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

### 4 讨论

Xiong 等<sup>[1]</sup>及 Gao 等<sup>[2]</sup>运用生化及电生理等手段论证了酸敏感钙离子通道 (ASICs) 是介导缺血性脑损伤的重要因子,发现酸敏感离子通道阻断剂阿米洛利可以有效减轻脑中风的损伤。酸中毒是很多疾病的病理现象,抑制神经细胞酸中毒则可能成为重要的神经保护途径。本实验用原代培养的大鼠海马神经元以酸性细胞外液诱导建立酸中毒细胞模型,研究了天麻素对酸中毒损伤下神经细胞的调控作用,结果显示天麻素降低了海马神经细胞的死亡率,表明天麻素对酸中毒下的神经细胞具有保护作用。

神经细胞内钙超载是引起神经细胞坏死和凋亡的重要途径。细胞内钙超载使 ROS 大量产生。ROS 能引起细胞膜的脂质过氧化,产生许多生化改变,如

改变细胞膜的物理特性、使膜上结合的调节细胞膜通透性的酶失活。研究证明细胞膜的脂质过氧化能促进细胞的凋亡<sup>[6]</sup>,而且某些脂质过氧化产物还能继发性地引起细胞内钙失衡<sup>[7]</sup>,加重细胞损伤。

在本实验中,天麻素可剂量依赖性地抑制酸中毒引起的神经细胞 ROS 的升高,该结果与既往研究结果一致<sup>[4]</sup>,表明天麻素有清除过多的 ROS 的作用,这可能是其发挥神经保护作用的机制之一。本实验还应用激光共聚焦显微镜结合特异性荧光染色技术,研究发现了天麻素对酸中毒引起的细胞  $[Ca^{2+}]_i$  的升高具有明显的抑制作用,提示这可能是其发挥神经保护作用的另一重要机制。

本实验在细胞水平上研究了天麻素对酸中毒神经细胞的作用,结果显示天麻素具有明显的神经细胞保护作用,为天麻素在神经系统疾病上的应用提供了实验依据。

## References:

- [1] Xiong Z G, Zhu X M, Chu X P, et al. Neuroprotection in ischemia: Blocking calcium-permeable acid-sensing ion channels [J]. *Cell*, 2004, 118(6): 687-698.
- [2] Gao J, Duan B, Wang D G, et al. Coupling between NMDA receptor and acid-sensing ion channel contributes to ischemic neuronal death [J]. *Neuron*, 2005, 48(4): 635-646.
- [3] Li Y M, Chen F P, Liu G Q. Studies on inhibitive effect of gastrodin on PC12 cell damage induced by glutamate and  $H_2O_2$  [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2003, 34(5): 456-460.
- [4] Xue L H, Tang Y P, Sun C L, et al. Gastrodin inhibits ischemia-induced membrane damage in cultured rat neurons [J]. *J Beijing Univ Tradit Chin Med* (北京中医药大学学报), 1998, 21: 18-21.
- [5] Wang Y Y, Zheng X X. A flow cytometry-based assay for quantitative analysis of cellular proliferation and cytotoxicity in vitro [J]. *J Immunol Methods*, 2002, 268(2): 179-188.
- [6] Santanam N, Ramachandran S, Parthasarathy S. Oxygen radicals, antioxidants, and lipid peroxidation [J]. *Semin Reprod Endocrinol*, 1998, 16(4): 275-280.
- [7] Camandola S, Poli G, Mattson M P. The lipid peroxidation product-4-hydroxy-2, 3-nonenal increases AP-1-binding activity through caspase activation in neurons [J]. *J Neurochem*, 2000, 74(1): 159-168.

## 升黄克痛软膏药效学实验研究

杨洁,赵夕秋,顾苏俊

(解放军总医院 药品保障中心,北京 100853)

带状疱疹是由水痘-带状疱疹病毒感染引起的一种以沿周围神经分布的群集疱疹和以神经痛为特征的病毒性皮肤病,中医称为缠腰火丹,其发病率(0.14%~0.48%)在近年来呈现不断增高的趋势。本课题组通过查阅大量的中医药经典文献和多年的实际应用,研制出针对带状疱疹疗效确切的纯中药复方制剂——升黄克痛软膏。其由大黄、升麻两味中药组成,体外抗病毒实验证明作用相当显著,并对正常细胞的毒性作用很小。在此基础上,本实验主要探讨升黄克痛软膏的体内抗病毒作用。

### 1 材料与方

1.1 药物及剂量:升黄克痛软膏(生药量 29 g/100 mL),由本院中药房提供。用时将其稀释成 0.5 g/mL,豚鼠用 0.8 mL/200 g,折合为生药 0.58 g/kg(高剂量),中、低剂量(0.29、0.14 g/kg)依次对倍稀释。酞丁安软膏(批号 040702,0.01 g/g),北京协和药厂生产,用时将其稀释成 0.5 g/mL,豚鼠用 0.8 mL/200 g,折合为 0.02 g/kg。

1.2 实验动物:豚鼠,体重(180±10)g,北京通利实验动物养殖场提供,动物合格证号第 069 总 024 号。

1.3 病毒细胞株:单纯疱疹病毒 I (HSV-I),购自中国预防医学科学院病毒学研究所,本实验室传代后使用(由于带状疱疹病毒管制,目前都用单纯疱疹病毒替代)。

### 1.4 实验方法

1.4.1 感染模型的建立<sup>[1]</sup>:将豚鼠背部去毛,划分出前后 2 个感染区,用针头刺入皮肤深层,1~1.2 cm 直径内呈梅花样均匀刺 7 针,除正常对照组外,以原倍 HSV-I 0.07 mL 滴加于针刺区内,用无菌玻棒涂开感染。

1.4.2 给药:于感染后第 5 天,按组(除模型对照组外,酞丁安软膏,升黄克痛软膏高、中、低剂量组)每鼠分别取试药 0.8 mL 滴于各感染区内,以无菌玻棒涂开,每日 1 次进行治疗,连续 5 d。模型对照组给予无菌蒸馏水。

1.4.3 观察:每日按表 1 标准,观察记录感染区皮

# 天麻素对酸中毒诱导的大鼠海马神经元损伤的保护作用

作者: 曾祥慧, 葛亚坤, 严明, 郑筱祥  
作者单位: 浙江大学生物医学工程与仪器科学学院, 浙江, 杭州, 310027  
刊名: 中草药 **ISTIC** **PKU**  
英文刊名: CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS  
年, 卷(期): 2007, 38(12)  
被引用次数: 3次

## 参考文献(7条)

1. Xiong Z G;Zhu X M;Chu X P [Neuroprotection in ischemia:Blocking calcium-permeable acid-sensing ion channels](#)[外文期刊] 2004(06)
2. Gao J;Duan B;Wang D G [Coupling between NMDA receptor and acid-sensing ion channel contributes to ischemic neuronal death](#)[外文期刊] 2005(04)
3. Li Y M;Chen F P;Liu G Q [Studies on inhibitive effect of gastrodin on PC12 cell damage induced by glutamate and H2O2](#)[期刊论文]-[中国药科大学学报](#) 2003(05)
4. Xue L H;Tang Y P;Sun C L [Gastrodin inhibites ischemia-induced membrane damage in cultured rat neurons](#) 1998
5. Wang Y Y;Zheng X X [A flow cytometry-based assay for quantitative analysis of cellular proliferation and cytotoxicity in vitro](#)[外文期刊] 2002(02)
6. Santanam N;Ramachandran S;Parthasarathy S [Oxygen radicals, antioxidants, and lipid peroxidation](#) 1998(04)
7. Camandola S;Poli G;Mattson M P [The lipid peroxidation product-4-hydroxy-2,3-nonenal increases AP-1-binding activity through caspase activation in neurons](#)[外文期刊] 2000(01)

## 本文读者也读过(10条)

1. 谢琳. 李茂进. 刘永霞. 刘衍忠. 张梦萍. 天麻素对染铅大鼠脑细胞凋亡影响[期刊论文]-[中国公共卫生](#)2007, 23(4)
2. 连亚军. 孙圣刚. 方树友. 杨改清. 张志强. 托吡酯及天麻素对戊四氮点燃大鼠的行为、脑电图和海马生长相关蛋白-43表达的影响[期刊论文]-[中华神经科杂志](#)2005, 38(11)
3. 高冬丽. 潘娅. 李永江. 陈燊. 张敏. GAO Dongli. PAN Ya. LI Yongjiang. CHEN Can. ZHANG Min. 天麻素对血管性痴呆大鼠学习记忆能力和海马p53表达的影响[期刊论文]-[贵阳医学院学报](#)2009, 34(4)
4. 曹亚芹. 苏怡凡. 陈虹. 王建平. 董皎. CAO Ya-qin. SU Yi-fan. CHEN Hong. WANG Jian-ping. DONG Jiao. 戊四氮致痫幼鼠颞叶和海马区Cx43的表达及天麻素干预[期刊论文]-[兰州大学学报\(医学版\)](#) 2008, 34(3)
5. 赵燕玲. 张博爱. 贾延劼. 籍扬飞. 孙桂芳. 文全庆. ZHAO Yan-ling. ZHANG Bo-ai. JIA Yan-jie. JI Yang-fei. SUN Gui-fang. WEN Quan-qing. EphA4在海人酸诱导大鼠大脑皮层神经元凋亡中的表达及天麻素的影响[期刊论文]-[中国病理生理杂志](#)2009, 25(10)
6. 谢惠定. 柳波. 黄燕. 郭蕴苹. 黄大荣. XIE Hui-ding. LIU Bo. HUANG Yan. GUO Yun-ping. HUANG Da-rong. 天麻素苷元同系物的定量构效关系研究[期刊论文]-[昆明医学院学报](#)2008, 29(5)
7. 李茂进. 胡俊峰. 张春玲. 于素芳. 韩惠芬. 天麻和阿胶联合对染铅大鼠海马一氧化氮含量及学习记忆的影响[期刊论文]-[中国职业医学](#)2002, 29(1)
8. 李茂进. 胡俊峰. 李国珍. 谢林. 天麻对铅所致大鼠海马损害的拮抗作用[期刊论文]-[中华劳动卫生职业病杂志](#) 2002, 20(5)
9. 胡俊峰. 李国珍. 李茂进. 天麻和阿胶对铅所致大鼠海马结构及功能损害的保护作用[期刊论文]-[中华劳动卫生职业](#)

业病杂志2003, 21 (2)

10. 徐纪伟, 陈旭东, 刘喜民, 康红玉, 孙丹华 天麻素对大鼠脊髓损伤后神经元的保护作用 [期刊论文]-时珍国医国药 2011, 22 (3)

#### 引证文献(3条)

1. 张媛元, 毛瑞阳, 杜晓红, 刘毅 天麻素对终末糖基化产物诱导神经小胶质细胞炎症因子表达的影响 [期刊论文]-中草药 2011 (2)

2. 江曙, 段金彪, 陶金华, 严辉, 钱大玮 天麻退化机制及其防治技术体系的研究思路与方法 [期刊论文]-中草药 2011 (1)

3. 陈维红, 罗栋 天麻素、天麻多糖药理作用研究进展 [期刊论文]-中国药物评价 2013 (3)

本文链接: [http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_zcy200712036.aspx](http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200712036.aspx)