

# 脑复聪对 PC12 细胞拟缺血损伤保护作用的血清学研究

张孟仁 徐惠媛 郭赛珊 左萍萍

**[摘要]** 目的 观察中药复方脑复聪颗粒对  $H_2O_2$  损伤的大鼠肾上腺髓质嗜铬瘤分化细胞株(PC12 细胞)的影响。方法 选用 SD 雄性大鼠,分别灌胃脑复聪和蒸馏水后制备血清。培养的 PC12 细胞加入不同血清孵育后,再加入不同浓度的超氧化物  $H_2O_2$  造成拟缺血模型,采用 MTT 法观察细胞生存率。结果 对受不同剂量  $H_2O_2$  损伤的 PC12 细胞,脑复聪含药血清可明显提高其生存率( $P < 0.05 \sim 0.01$ );加入脑复聪血清后的神经细胞可明显抵抗  $H_2O_2$  所致的损伤,细胞形态基本恢复正常。结论 脑复聪颗粒对  $H_2O_2$  损伤的 PC12 细胞有明显保护作用。

**[关键词]** 中药;脑复聪;药物血清;PC12 细胞;缺血模型

**Studies on the protective effect of drug serum taken from rats administered with Naofucong in PC12 cell ischemic model** ZHANG Meng-ren, XU Hui-yuan, GUO Sai-shan, et al. Department of Traditional Chinese Medicine, Peking Union Medical College Hospital, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China

**[Abstract]** **Objective** To examine effects of traditional Chinese herbs Naofucong grain on PC12 cells injured by  $H_2O_2$  in vitro. **Methods** Rats random divided into 2 groups: Naofucong grain treating group (administered with Naofucong grain) and control group (administered with distilled water). After 3 days administration, serums were obtained and added to cultured PC12 cells which were under different concentrations of  $H_2O_2$ . Morphological examinations in PC12 cells were detected by MTT measurement. **Results** MTT measurement showed that Naofucong grain administered rats serums significantly increased the survival number of PC12 cells in different concentrations of  $H_2O_2$ . **Conclusion** Naofucong grain may have obvious protective effects on PC12 cells injured by  $H_2O_2$ .

**[Key words]** traditional Chinese herbs; Naofucong; drug serum; PC12 cells; ischemic model

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-9771(2003)10-0598-02

缺血性脑血管病导致的神经细胞损伤是多因素的。如微循环障碍可致细胞能量供应异常,氧自由基与缺血后再灌注损伤有密切关系。过氧化氢( $H_2O_2$ )是体内重要的活性氧,它可穿透大部分细胞膜,与胞内铁反应产生自由基,增加对细胞的毒性。我们自拟的中药复方制剂脑复聪颗粒具有改善缺血性痴呆小鼠学习记忆和脑内胆碱能系统功能的作用<sup>[1]</sup>。为进一步探讨脑复聪颗粒改善脑缺血损伤的作用机理,本实验从细胞水平观察该中药血清对  $H_2O_2$  致 PC12 细胞拟缺血损伤的作用。

## 1 材料与方法

**1.1 试剂及主要仪器** DMEM、胎牛血清、马血清均购自 Gibco 公司;MTT、SDS、胰蛋白酶为 Sigma 公司产品;其余化学试剂均购自北京化学试剂公司。PC12 细胞由医科院基础所细胞中心提供。 $CO_2$  培养箱为日本 Sanyo 公司产品;96 孔培养板及 25 ml 培养瓶为 Corning 公司产品;空气超净台购自北京昌平空气净化

设备厂;倒置显微镜为 Olympus 公司产品。

**1.2 动物** 选用 SPF 级 SD 雄性大鼠,体重( $220 \pm 10$ )g,购于中国医学科学院动物中心,许可证编号:SLXK11-00-0008,饲养于北京协和医院动物实验室,许可证号:SYXK11-00-0041。

**1.3 药物** 脑复聪颗粒由人参、何首乌、丹参、水蛭等药组成,由中国中医研究院中药研究所经过水煮醇提制成颗粒,配制成水溶液,生药含量为 0.27g/ml。

**1.4 细胞培养** PC12 细胞具有神经内分泌细胞的一般特征,可传代<sup>[2]</sup>,将其接种于 DMEM 培养液中(5% 胎牛血清、5% 马血清、青霉素/链霉素 100 U/ml),置  $CO_2$  培养箱中,在 5%  $CO_2$  37℃ 环境下培养,每周传代 1—2 次。

**1.5 中药血清制备** 动物随机分为脑复聪血清组和空白血清组,分别灌胃脑复聪和蒸馏水,1 ml/次,2 次/日,共 3 天。最后一次灌胃 1h 后无菌腹主动脉穿刺取血,离心分离血清,56℃ 水浴中灭活 30 min, -20℃ 冰箱保存备用。

**1.6 细胞生存率测定** 采用四氮唑分析(MTT)法,待 PC12 细胞生长面积达到 90% 培养瓶底面积时,加入 0.25% 胰蛋白酶轻轻震摇,倒置显微镜观察细胞分散后,加入培养液中中止消化,吹打分散细胞。然后按

基金项目:国家科技部资助课题(1999)。

作者单位:1. 100730 北京市,北京协和医院中医科(张孟仁、徐惠媛、郭赛珊);2. 100005 北京市,中国协和医科大学基础医学院药理系(左萍萍)。作者简介:张孟仁(1963-),男,山西大同市人,副主任医师,副教授,主要研究方向:脑血管病、糖尿病。

3 000—4 000 个细胞/100 $\mu$ l 接种于 96 孔培养板,在 5 % CO<sub>2</sub> 37 ℃ 环境下培养 48 h,脑复聪组加入中药血清,空白血清组加入空白血清,再加入不同稀释度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,孵育 3 h 后,每孔加入 10 $\mu$ l 5 mg/ml MTT,再孵育 2 h,加入中止液(20 % SDS .50 %二甲基甲酰胺),振荡混匀 10 min 后,置 Bio Rad 多孔光度计上,540 nm 测定吸光度值。

1.7 统计方法 数据处理采用 SPSS 8.0 统计软件,作单向方差分析。

2 结果

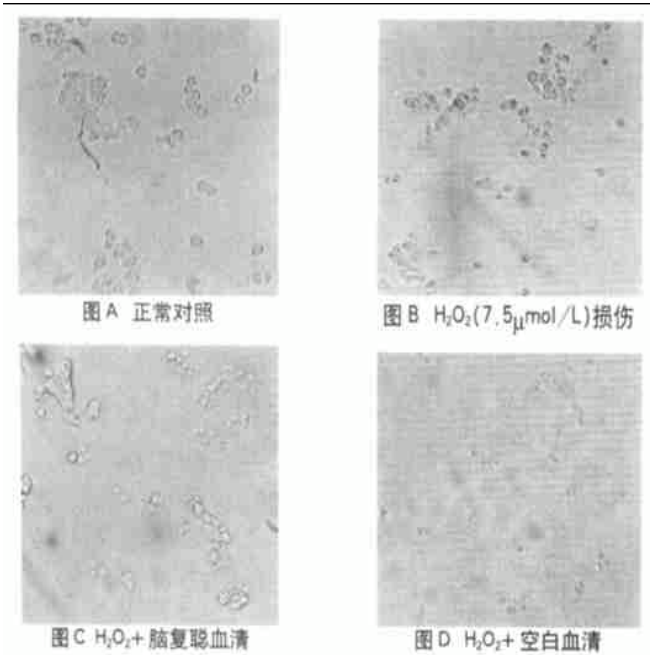
2.1 细胞 MTT 还原活性 MTT 方法主要反映细胞电子传递链的完整性,是细胞死亡的一个早期间接指标。从附表可见,随着 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度的增大,空白血清组 PC12 细胞的 MTT 还原率下降,而脑复聪血清组却升高,两者相比差异有显著性意义(  $P < 0.05$  ,  $P < 0.01$  ),表明中药血清具有明显的抗氧化应激作用。

附表 脑复聪与空白血清对不同剂量 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤 PC12 细胞的影响(OD 值)

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 浓度	n	空白血清组	脑复聪血清组
3.75 $\mu$ M	4	0.441 $\pm$ 0.018	0.543 $\pm$ 0.058 <sup>a</sup>
7.5 $\mu$ M	4	0.403 $\pm$ 0.027	0.484 $\pm$ 0.034 <sup>b</sup>
15.0 $\mu$ M	4	0.251 $\pm$ 0.067	0.457 $\pm$ 0.029 <sup>b</sup>

注:与空白血清组比较:a:  $P < 0.05$  ,b:  $P < 0.01$  。

2.2 细胞形态学变化 正常 PC12 细胞形状呈圆形,折光度强,培养后生长成簇(见图 A);加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 后可见细胞皱缩,折光度减弱,染色质浓缩,显示凋亡细胞的特征(见图 B);加入脑复聪血清组的细胞折光度明显恢复,染色质浓缩明显减少,形态基本接近正常(见图 C);加入空白血清组细胞呈虚影状,形态未见明显改善(见图 D)。



3 讨论

在正常情况下,机体内氧自由基的产生和清除是

平衡的。一旦自由基产生过多或抗氧化体系出现故障,就会导致氧自由基堆积,或称“氧应激”。目前认为,脑缺血缺氧状态下的氧化应激反应是脑损伤的主要机制<sup>[3]</sup>,它可引起神经元的凋亡或变性坏死,最终导致脑功能障碍。为此,从细胞水平探讨具有脑保护作用的中药成分的抗氧化作用,具有重要的理论意义。

中药复方制剂在体外研究中的最大问题是提取物中的杂质成分、各种电解质或鞣质成分被直接加入细胞培养基,往往不能真实反映药物的有效作用。由于多数中药复方制剂是口服的,其有效成分要经胃肠道吸收(如某些高分子化合物)入血,或药物的非有效成分被肠道菌群和肝酶转化成有效成分后才能起作用。为此,日本的 Iwama 等于 1987 年首创了用动物的含药血清研究中药的方法<sup>[4]</sup>,其最大优点是体外实验与在体实验的一致性。本实验采用脑复聪中药血清作用于 PC12 神经细胞,发现对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤细胞有明显保护作用。这不仅反映了药物中可吸收部分对细胞的直接作用,也可能包括了药物成分在机体作用下形成的代谢产物或药物诱生的机体内源性物质的间接效果,较真实地反映了临床的用药情况。

中草药是我国的宝贵财富,其中的天然抗氧化剂在协助机体维持氧代谢平衡、防止疾病发生和保持健康方面是十分有益的,科学家们对此已做了大量研究。例如脑复聪中的人参因其含有多种抗氧化成分,具有明确的抗脂质过氧化作用,被认为是抗衰老的物质基础<sup>[5]</sup>。此外,丹参酮对脂质过氧化过程中的脂类自由基有较好的清除效果<sup>[6]</sup>,而丹参素可保护线粒体的功能和结构,使其免受自由基的损伤<sup>[7]</sup>。这些研究结果与本实验从细胞水平得到结果是吻合的。脑复聪的抗氧化功效是其保护神经细胞、防治老年性痴呆的重要机理之一。

[参考文献]

[1] 张孟仁,郭赛珊,徐惠媛.脑复聪提高脑缺血小鼠记忆能力的机理研究[A].见:第四次全国中西医结合中青年学术研讨会论文集[C],2002,135—136.

[2] Frances HC, Andrea B, Francisco JM, et al. PC12 and neuro 2a cells have different susceptibilities to acetylcholinesterase-a myloid complexes, amyloid25-35 fragment, glutamate, and hydrogen peroxide[J].J Neuroscience Research,1999,56:620—631.

[3] Peruche B, Kriegelstein J. Neuroblastoma cells for testing neuroprotective effects[J].J Pharmacol Meth,1991,23:63—67.

[4] Iwata H, Amajaya S, Ojihara Y, et al. Effect of Shaosaikoto, a Japanese and Chinese traditional herbal medicinal mixture on the mitogenic activity of lipopolysaccharide: A new pharmacological testing method[J].J Ethnopharmacology,1987,21:45.

[5] Kim H. Effect of Polyacetylene from Korean Ginseng on Lioid Peroxidation Proceeding of 5th International Ginseng Symposium[M].1988.81.

[6] 江文,赵燕,赵保路,等.丹参酮对心肌肌浆网脂质过氧化过程中脂质自由基的清除作用[J].生物物理学报,1994,685—689.

[7] 张力,王孝铭,梁殿权.丹参素对大鼠心肌缺血再灌注致线粒体变化的影响[J].中国病理生理杂志,1990,6:420—428.

(收稿日期:2003-08-11)