

甘草酸与乌头碱配伍对神经细胞的作用

吕佳韵, 彭成*

(成都中医药大学药学院, 成都 610075)

[摘要] **目的:**研究甘草酸与乌头碱配伍对神经细胞的作用。**方法:**利用细胞培养技术体外培养大鼠大脑皮质神经细胞,运用 MTT 法测定甘草酸与乌头碱配伍对神经细胞存活率的影响,采用比色法测定甘草酸与乌头碱配伍对神经细胞内 Na^+ , K^+ 含量,钠-钾三磷酸腺苷酶 (Na^+ , K^+ -ATPase) 活力的影响。**结果:**1, 2, 4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的甘草酸分别与 2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 乌头碱配伍作用神经细胞 30 min 后,能不同程度拮抗乌头碱所致活细胞数降低,以及拮抗乌头碱所引起的神经细胞内 Na^+ 含量降低, K^+ 含量和 Na^+ , K^+ A-TPase 活力的升高。**结论:**甘草酸能降低乌头碱所致神经细胞毒性,拮抗乌头碱所引起的神经细胞内环境的紊乱,乌头碱与甘草酸以 1:2 配伍为佳。

[关键词] 甘草酸; 乌头碱; 神经细胞; 配伍

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)07-0192-04

[doi] 10.11653/zgsyfyjxzz2013070192

Effect of the Compalibility of Glycyrrhizic Acid and Aconitine on Nerve Cell

LV Jia-yun, PENG Cheng*

(Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of the compalibility of glycyrrhizic acid and aconitine on nerve cell. **Method:** Neuron cells were prepared from neonatal SD rats and cultured *in vitro*. The MTT assay was used to determine how mixture of the glycyrrhizic acid and aconitine in different proportions infect the survival of nerve cell. Then the activity of Na^+ , K^+ -ATPase and the contents of [Na^+], [K^+] in the cells were measured using colorimetric method. **Result:** The activity of Na^+ , K^+ -ATPase and the contents of [K^+] in the cells were

[收稿日期] 20121118(009)

[基金项目] 国家“十二五”科技支撑计划(2010BAE00406);重大新药创制科技重大专项(2013ZX09201-018)

[第一作者] 吕佳韵,硕士研究生,从事疾病动物模型与中药复方药理研究,Tel:13666261152,E-mail:ljj415934299@163.com

[通讯作者] *彭成,博士,研究员,博士生导师,从事疾病动物模型与中药复方药理研究,E-mail:pengchengchengdu@126.com

- [5] 王岚,彭成,郭力. 附子大黄配伍对阳虚便秘动物的治疗作用及其机制研究[J]. 中国中西医结合消化杂志,2006,14(2):82.
- [6] 王嫣红,彭成,朱力阳,等. 大黄素对结肠 Cajal 间质细胞毒-效作用的研究[J]. 中国中西医结合消化杂志,2010,18(3):141.
- [7] 杨福愉. 生物膜[M]. 北京:科学出版社,2005
- [8] 游宇,刘玉晖,高书亮. 参苓白术散抗小鼠炎症性肠病的机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(5):136.
- [9] 杨波,张钧. 氧自由基脂质过氧化反应致运动性疲劳产生的机制研究[J]. 中国临床康复,2005,9(4):188.
- [10] 郭俊华,李保平. 依达拉奉对脑梗死患者血清超氧化物歧化酶、脂质过氧化物和丙二醛的影响[J]. 中原医刊,2006,33(24):15.
- [11] 岳仁宋,陈忠义,申勇. 脑力苏胶囊对血管性痴呆大鼠海马 CA1 区 ACP、CCO 活性的影响[J]. 成都中医药大学学报,2006,29(13):1611.

[责任编辑 聂淑琴]

increased, while the contents of $[Na^+]$ in the cells and the survival rate of nerve cell were decreased, after administration by the $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ aconitine for 30 min. The mixture of glycyrrhizic acid and aconitine in different proportions could lighten those changes caused by aconitine. **Conclusion:** Glycyrrhizic acid probably can decrease the toxicity of aconitine and antagonise the disturbance of internal environment in nerve cells. Besides, the best compatibility proportion is 1:2.

[Key words] glycyrrhizic acid; aconitine; neural cells; compatibility

甘草性味甘、平,功效缓急止痛,调和诸药^[1]。甘草主要含有三萜皂苷类和黄酮类成分,三萜皂苷类主要包括甘草酸和甘草次酸。甘草酸是甘草的主要有效成分之一(如图1所示),具有广泛的药理作用,已有研究证实其对神经系统有一定的保护作用,可以改善脑血循环^[2],提高线粒体 ATP 酶和组织 LDH 活性^[3],抑制脂质过氧化反应等。

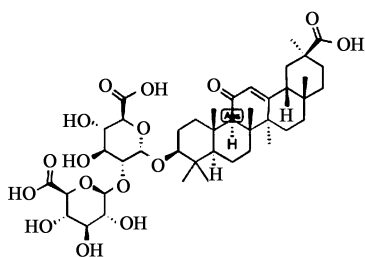


图1 甘草酸

乌头碱是附子中一种剧毒的双酯型生物碱(如图2所示),主要毒性为心脏毒性和神经毒性^[4]。现代药理研究表明乌头碱具有抗炎、麻醉止痛、调节免疫、抗肿瘤等作用^[5],但因其毒性较大而使临床应用受限。在神经系统方面的毒性表现为轻者出现口、舌及四肢的麻木,皮肤感触的减退或消失,同时还伴有头晕头痛;重者出现全身发硬及四肢抽搐,语言及神志不清,呼吸紊乱直至麻痹^[6]。

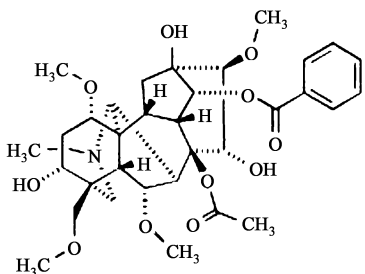


图2 乌头碱

《景岳全书·本草正·毒草部》所云:“附子之性急,得甘草而后缓;附子之性毒,得甘草而后减”。附子能解甘草之毒已被广泛认可,且普遍认为其配伍解毒的相互作用的物质基础为乌头碱和甘草酸。但目前关于其解毒机制的研究大多数研究集中在药

对配伍,组分配伍方面,单成分配伍研究很少,尤其缺乏细胞水平上的研究,特别是附子和甘草配伍对神经细胞的研究几乎是空白。本实验旨在通过研究甘草酸与乌头碱配伍对神经细胞毒性的影响,为中药复方配伍减毒的研究提供依据。

1 材料

1.1 动物 出生 24 h 以内的 SD 大鼠乳鼠, SPF 级,雌雄均可,由成都中医药大学实验动物研究中心提供,许可证号 SCXK(川)2008-11。

1.2 药物 甘草酸(购于成都曼思特生物科技有限公司,批号 MUST-11122218,含量为 98.65%),以 DMSO 助溶,加热至完全溶解,无血清培养基稀释。乌头碱(购于中国药品生物制品检定所,批号 110720-200410)以 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 溶解, $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 调 pH 6.8 ~ 7.0,无血清培养基稀释,现用现配。

1.3 试剂 DMEM 高糖培养基(海克隆生物化学制品有限公司,批号 NXJ0712),类标准胎牛血清(中美合资兰州民海生物工程有限公司,批号 20120510),噻唑蓝(Solarbio 公司),L-多聚赖氨酸(Sigma 公司)、阿糖胞苷(Sigma 公司),胰蛋白酶(GIBCO 公司,批号 27250-018),B27(GIBCO 公司),钠测定试剂盒、钾测定试剂盒、钙测定试剂盒(批号 20100024)均购自长春汇力生物技术有限公司,超微量 Na^+ , K^+ -ATPase(批号 20100024)购于南京建成科技有限公司。

1.4 仪器 MCO-15AC CO_2 孵箱(SANYO Electric Co, Ltd), SW-CJ-2F 型双人双面净化工作台(苏州净化设备有限公司),Olympus CK40 型倒置显微镜,酶标定量分析仪(Therm),LDZ4-18 型低速自动平衡离心机(北京雷勃尔),微量电动组织匀浆器(美国 KIMBLE)等。

2 方法

2.1 神经细胞分离培养 将乳鼠断颈处死,用碘伏消毒其头、颈部及背部皮肤,在无菌环境下取出大脑,置于 PBS 液中。分取大脑皮质部分,仔细除去脑膜和血管,用 PBS 冲洗 3 次,剪成 1 mm^3 左右的

组织块,加入 0.025% 胰酶在 37 °C 孵箱中消化 30 min,每隔 10 min 吹打 1 次。消化完成后,加入等量的含血清培养基终止消化,吹打混匀,200 目筛网过滤,滤液用 PBS 液稀释后,以 900 r·min⁻¹ 离心 10 min,弃上清液,用完全培养基(20% 胎牛血清 + DMEM 高糖培养基)重悬细胞,调整细胞密度为 10⁶ 个/mL,接种于预先用 L-多聚赖氨酸包被的 24 孔培养板中,置 37 °C 5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养。培养的第 3 天用含 3.5 μg·L⁻¹ 阿糖胞苷的培养基(2% B27 + 20% FBS + DMEM 高糖培养基)全量换液,作用 48 h 后更换新培养液。以后每 2 d 半量换液,采用培养 5 d 的细胞进行实验。

2.2 对神经细胞存活率的测定 将神经细胞接种于 96 孔板上,将细胞分为 6 个组,包括正常组、溶剂对照组及 4 个给药组(2 g·L⁻¹ 乌头碱单独作用 30 min 组,乌头碱与甘草酸以 1:1, 1:2, 1:0.5 混合作用 30 min 组),每组 6 个孔。用 PBS 冲洗细胞后,分组给予不同药物作用 30 min,给药量为 30 μL/孔,正常组加入等量的无血清培养基,作用完成后,去掉药液,用 PBS 冲洗细胞 1 次后加入 200 μL 浓度低于 10% 的血清培养基和 30 μL 的 MTT,置于 37 °C 5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养 4 h 后,除去液体,每孔加入 200 μL 的 DMSO,于摇床上振摇 15 min,使结晶完全均匀溶解。将 96 孔板放入酶标仪中,测定各孔在 570 nm 处的吸光度(A),以 630 nm 为背景波长。

2.3 神经细胞内离子含量的测定 细胞分组、给药同 2.2。用 PBS 冲洗细胞后,分别给予不同药物作用 30 min,正常组给予等量无血清培养基,给药量 100 μL/孔,作用完成后用 PBS 冲洗细胞,加入 0.025% 的胰酶消化,4 min 左右加入等量完全培养基终止消化,收集消化液,3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,去除上清液,细胞以微量电动组织匀浆器破

碎后按照试剂盒说明书测定细胞内离子含量。

2.4 Na⁺, K⁺-ATPase 活力的测定 细胞分组、给药同 2.2,药物作用 30 min 后用 PBS 冲洗细胞,按 2.3 收集细胞,细胞以微量电动组织匀浆器破碎后按照试剂盒说明书测定酶的活力。

2.5 统计学处理 实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 SPSS 13.0 进行单因素方差分析。P < 0.05 有统计学意义。

3 结果

3.1 乌头碱与甘草酸配伍对神经细胞存活率的影响 与正常组相比,2 g·L⁻¹ 的乌头碱作用 30 min 后,神经细胞活细胞数显著降低,对原代培养神经细胞有显著毒性作用;乌头碱与甘草酸混合使用后,细胞存活率较单独使用乌头碱有提高的趋势,由此推断甘草酸对乌头碱的毒性可能有拮抗作用。见表 1。

表 1 乌头碱与甘草酸配伍对神经细胞活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分组	乌头碱 /g·L ⁻¹	甘草酸 /g·L ⁻¹	A
正常	-	-	0.592 ± 0.151
溶剂对照	-	-	0.609 ± 0.064
乌头碱	2	-	0.485 ± 0.069 ¹⁾
乌头碱与甘草酸 1:1	2	2	0.516 ± 0.087
乌头碱与甘草酸 1:2	2	4	0.550 ± 0.0334
乌头碱与甘草酸 1:0.5	2	1	0.500 ± 0.046

注:与正常组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01; 与乌头碱组比较³⁾ P < 0.05, ⁴⁾ P < 0.01(下同)。

3.2 乌头碱与甘草酸配伍对神经细胞内离子含量的影响 与正常组相比,乌头碱组钠离子含量显著降低,钾离子含量显著升高,乌头碱与甘草酸按 1:0.5 配伍组细胞内钠离子含量显著降低,钾离子含量显著升高。与乌头碱组相比较,乌头碱与甘草酸按 1:2, 1:0.5 配伍组钾离子含量显著降低,

表 2 乌头碱与甘草酸配伍对神经细胞内离子含量及 Na⁺, K⁺-ATP 酶活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分组	乌头碱 /g·L ⁻¹	甘草酸 /g·L ⁻¹	Na ⁺ /mmol·L ⁻¹	K ⁺ /mmol·L ⁻¹	Na ⁺ , K ⁺ -ATPase /μmol·mg ⁻¹ ·h ⁻¹
正常	-	-	30.946 ± 2.118	0.205 ± 0.044	24.31 ± 8.67
溶剂对照	-	-	31.635 ± 2.254	0.188 ± 0.039	22.74 ± 7.85
乌头碱	2	-	10.823 ± 4.658 ¹⁾	0.437 ± 0.053 ²⁾	37.36 ± 2.20 ²⁾
乌头碱与甘草酸 1:1	2	2	23.119 ± 1.757	0.272 ± 0.119	19.74 ± 5.37 ⁴⁾
乌头碱与甘草酸 1:2	2	4	27.268 ± 2.423 ³⁾	0.217 ± 0.072 ⁴⁾	18.62 ± 3.12 ⁴⁾
乌头碱与甘草酸 1:0.5	2	1	12.300 ± 7.034 ¹⁾	0.275 ± 0.045 ^{1,4)}	30.31 ± 3.01 ^{2,3)}

见表2。

3.3 乌头碱与甘草酸配伍对神经细胞内 Na^+ , K^+ -ATPase 活力的影响 与正常组相比,乌头碱组和1:0.5组 Na^+ , K^+ -ATPase 活力显著升高。与乌头碱组相比较,乌头碱与甘草酸按1:1,1:2配伍可显著降低细胞 Na^+ , K^+ -ATPase 活力,见表2。

4 讨论

成分配伍研究是中药复方配伍研究的较深层次,是在组分配伍的基础上,进一步对其中的化学成分之间的配伍进行研究,以期较清晰地说明其与组分配伍、药材配伍的内在、本质联系,是配伍研究中最能与国际接轨,最能体现质量可控、安全有效、机制清楚的研究目的的方法。附子燥热峻猛毒烈,配甘润之品甘草,可收和药缓急制毒之效。普遍认为附子与甘草配伍能减毒增效的物质基础为以乌头碱为代表的附子生物碱和以甘草酸和甘草苷为代表的甘草三萜皂苷和黄酮^[7],故本实验采用原代细胞培养技术,探索甘草酸是否具有拮抗乌头碱神经毒性的作用,并研究甘草酸与乌头碱配伍对神经细胞内环境的影响。

细胞中无机盐的生理作用主要有:维持细胞内外的酸碱平衡和渗透压;维持细胞正常新陈代谢;维持神经肌肉的应激性等。神经细胞中的钠、钾、钙、镁离子还与神经递质的转运与释放^[8]和电信号传导^[9]等有关。而 Na^+ , K^+ -ATPase 和 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase 能直接分解 ATP,为相关离子进行逆浓度差的转运提供能量来源,继而维持细胞内环境的相对稳定。本实验参考附子与甘草临床常用配伍比例设置配伍比例为1:1,1:2,1:0.5。通过实验我们发现,乌头碱与甘草酸分别以以上3种比例配伍作用神经细胞30 min后,可不同程度的拮抗乌头碱所致活细胞数的降低,推测甘草酸对乌头碱所致神经毒性可能有一定的拮抗作用。有研究已发现乌头碱能损伤生物膜,使细胞内 Na^+ , Mg^{2+} 含量降低, K^+ , Ca^{2+} 含量升高,代偿性增强 Na^+ , K^+ -ATPase 活力,同时降低 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 活力,造成内环境紊乱^[10]。本实验亦发现甘草酸可使细胞内 Na^+ 含量升高, K^+ 含量降低,降低 Na^+ , K^+ -ATPase 活力,部分指标可维持在正常水平。同时,研究发现,甘草酸对乌头碱毒性的对抗与配伍比例可能有一定的关系,大体上看,配伍比例越高,减毒的作用也越强,在

本次的实验中乌头碱与甘草酸以1:2配伍为最佳。

综上所述,甘草酸对乌头碱所致神经细胞毒性可能有一定的拮抗作用,并且甘草酸可能拮抗对乌头碱引起的神经细胞内环境的紊乱。此次实验仅仅是从甘草酸与乌头碱以3种比例配伍对神经细胞内环境的影响进行的初步研究,其他比例配伍以及对神经细胞膜,能量代谢、神经递质等方面的影响还有待进一步探索。

[参考文献]

- [1] 孙付军,周倩,王春芳,等.甘草炮制前后药效学比较[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(14):115.
- [2] 王云姣,程智刚,郭曲练,等.甘草酸对犬心脏停跳复苏后脑复苏的影响[J].中华麻醉学杂志,2006,26(2):163.
- [3] 蔡宏伟,谭秀娟,王云姣,等.甘草酸对缺血再灌注犬脑线粒体ATP酶活性的影响[J].中国药理学通报,1996,12(6):549.
- [4] 李启艳,朱日然,张学顺,等.附子及其炮制品中生物碱类成分的ESI-MS研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(17):90.
- [5] 杨姝,金振辉,羊晓东,等.乌头属植物的化学成分及药理作用研究进展[J].云南农业大学学报,2007,22(2):293.
- [6] 王彦.对乌头类药物毒性反应的探讨[J].中国中医药现代远程教育,2008,6(1):36.
- [7] 王律韵,杨洁红,张宇燕,等.附子与甘草配伍减毒增效的物质基础初探[J].中国中医急症,2011,20(2):248.
- [8] Chang Y, Huang W J, Tien L T, et al. Ginsenosides Rg₁ and Rb₁ enhance glutamate release through activation of protein kinase A in rat cerebrocortical nerve terminals (synaptosomes) [J]. Eur J Pharmacol, 2008,578(1):28.
- [9] Osanai M, Tanaka S, Takeno Y, et al. Spatiotemporal properties of the action potential propagation in the mouse visual cortical slice analyzed by calcium imaging [J]. PLoS One, 2010,5(10):e13738.
- [10] Cheng Peng, Tao Zheng, Fan Yang, et al. Study of neurotoxic effects and underlying mechanisms of aconitine on cerebral cortex cells[J]. Arch Pharm Res, 2009,32(11):1533.

[责任编辑 聂淑琴]