

乌头碱与大黄素配伍对结肠 Cajal 间质细胞生物膜的影响

胡海燕¹, 彭成^{2,3*}

(1. 成都中医药大学药学院, 成都 610075; 2. 中药材标准化教育部重点实验室, 成都 610075;
3. 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室, 成都 610075)

[摘要] **目的:**研究大黄素与乌头碱配伍对原代培养正常小鼠乳鼠结肠 Cajal 间质细胞(ICC)生物膜的影响。**方法:**采用酶解消化法原代结肠间质细胞培养技术,分别将浓度为 1, 0.3, 0.08 mg·L⁻¹的大黄素高、中、低剂量药效浓度与 1 g·L⁻¹乌头碱配伍作用于昆明种小鼠乳鼠结肠间质细胞 30 min,测定其对细胞丙二醛(MDA)含量、酸性磷酸酶(ACP)活力的影响。**结果:**1 g·L⁻¹乌头碱单独作用 30 min 后,与正常组细胞相比,其 MDA 含量(0.313 ± 0.019 nmol·mL⁻¹)和 ACP(386.63 ± 57.89) U·g⁻¹活力增加($P < 0.01$);大黄素高、中剂量药效浓度分别与乌头碱配伍作用后,相对于乌头碱单独作用组,细胞介质中 MDA 含量[(0.299 ± 0.029), (0.280 ± 0.024) nmol·mL⁻¹]和细胞中 ACP 活力[(264.31 ± 37.21), (312.23 ± 46.86) U·g⁻¹]有所降低($P < 0.05$),但仍高于正常组细胞。**结论:**大黄素与乌头碱配伍后能降低细胞膜的脂质过氧化损伤程度,且大黄素能减轻乌头碱对 ICC 溶酶体膜的损伤作用。

[关键词] 大黄素; 乌头碱; 结肠间质细胞; 生物膜

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)07-0189-04

[doi] 10.11653/zgsyfjxzz2013070189

Influences of Compatibility of Emodin and Aconitine on the Biomembrane of the Interstitial Cells of Cajal

HU Hai-yan¹, PENG Cheng^{2,3*}

(1. Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 610075, China;
2. Ministry of Education Key Laboratory of Standardization of Chinese Medicine, Chengdu 610075, China;
3. Chengdu University of TCM, Chengdu 610075, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate influences of compatibility of emodin and aconitine on the biomembrane of *in vitro* cultured interstitial cells of Cajal (ICC) from murine conlon. **Method:** ICCs of kunming mice's conlon were obtained by enzyme-digestion and culture *in vitro*. ICCs were cultured with compatibility of emodin (1, 0.3, 0.08 mg·L⁻¹) and aconitine (1 g·L⁻¹) to study the changes of malondialdehyde (MDA) and acid phosphatase (ACP). **Result:** Aconitine could increase the content of MDA and the activity of ACP in the cells ($P < 0.01$). The compatibility of emodin and aconitine could reduce the content of MDA and the activity of ACP in the cells ($P < 0.05$). **Conclusion:** Emodin can lighten the cell trauma of lysosomal membrane witch caused by aconitine. The compatibility of emodin and aconitine can protect the cell biomembrane.

[Key words] emodin; aconitine; ICC; biomembrance

临床上常将附子与大黄配伍以用于治疗消化系统方面的疾病。两者属于典型的寒热配伍,附子是

[收稿日期] 20121118(003)

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划重点项目(2009BA184B04);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] 胡海燕,硕士研究生,专业中药药效与毒理学,从事疾病动物模型与中药复方药理研究

[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

传统有毒中药^[1], 大黄为现代有毒中药^[2], 实验研究表明两者配伍用于治疗阳虚便秘证的组分物质基础是附子总碱与大黄总蒽醌或大黄结合型蒽醌, 成分物质基础是大黄素与乌头碱, 两者配伍使用具有减毒增效的作用^[3-4]。

本课题前期实验从“饮片配伍、组分配伍”2 个层次上进行了附子大黄配伍用于阳虚便秘的作用机制探讨, 初步明确了两者用于阳虚便秘的配伍本质^[5]。本实验旨在从“成分配伍”的层次, 将大黄素对 Cajal 间质细胞 (ICC) 的不同药效浓度与乌头碱对 ICC 的最大毒性浓度进行配伍, 从细胞层面探讨两者配伍使用的“减毒增效”作用机制。本文通过对结肠间质细胞的原代培养, 观察大黄素与乌头碱配伍使用对正常结肠间质细胞生物膜的影响, 以期初步揭示两者配伍使用的毒-效相关性和作用环节, 为进一步研究两者配伍的作用机制建立基础。

1 材料

1.1 试验药物 大黄素 (emodin 购于中国药品生物制品检定所)。以 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶解, $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 调整 pH 至 6.8 ~ 7.0, 无血清培养基稀释, 现用现配。乌头碱 (aconitine, 购于中国药品生物制品检定所), 以 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 溶解, $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 调整 pH 至 6.8 ~ 7.0, 无血清培养基稀释, 现用现配。

1.2 动物 出生 10 ~ 13 d 的昆明种小鼠乳鼠, SPF 级, 雌雄兼用, 由成都中医药大学实验动物研究中心提供, 合格证号 SCXK(川)2008-11。

1.3 试剂 DMEM (海克隆生物化学制品有限公司, 批号 NXJ0712); 类标准级胎牛血清 (兰州民海生物工程有限公司, 批号 20120510); 小鼠干细胞因子 (PeProTech 公司, 批号 090878); II 型胶原酶 (Sigma 公司, 批号 9001-12-1); 酸性磷酸酶 (ACP, 批号 20120510)、丙二醛 (MDA, 批号 20120504)、考马斯亮蓝蛋白 (批号 20120514) 等, 试剂盒均为南京建成生物工程研究所产品。

1.4 仪器 SW-CJ-2F 型双人双面净化工作台 (苏州净化设备有限公司), MCO-15AC 型恒温培养孵箱 (SANYO), CK40 型倒置显微镜 (Olympus), LDZ4-18 型低速自动平衡离心机 (北京雷勃尔离心机有限公司), 微量电动组织匀浆器 (美国 KMBLE)。

2 方法

2.1 结肠 Cajal 间质细胞的原代培养 以碘伏消毒乳鼠的腹部皮肤, 无菌条件下取出一段结肠, 用 PBS 将肠管内外冲洗干净, 剥去结肠浆膜及血管, 纵剖开

结肠, 再次用 PBS 液反复冲洗, 剪碎至 1 mm^3 左右的碎块, 置于 $1.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 II 型胶原酶中消化 10 ~ 15 min, $1 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3 min, 重悬细胞后过 200 目筛网, 取细胞滤液接种于含 20% 胎牛血清、双抗、干细胞因子的 DMED 培养基中培养。24 h 后换液, 此后每 2 d 换液 1 次, 采用培养 8 d 左右的细胞进行实验。

2.2 细胞介质中 MDA 含量的测定 将细胞分为 5 个组, 分别为大黄素高质量浓度 ($1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 与 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 乌头碱配伍组、大黄素中质量浓度 ($0.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 与 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 乌头碱配伍组、大黄素低质量浓度 ($0.08 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 与 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 乌头碱配伍组、 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 乌头碱单独作用组及正常组^[6]。正常组用无血清培养基作用 30 min, 其余组上述浓度药物作用 30 min。药物作用完成后用 PBS 冲洗细胞 1 次, 弃去 PBS 后每孔加入含 20% 胎牛血清的培养基培养 1 h, 分别取上清液 500 μL 装入子弹头中待测, 按照试剂盒说明书采用硫代硫酸法 (TBA 法)、比色法测定细胞内 MDA 含量。

2.3 细胞内 ACP 活力的测定 实验分组及药物处理同 2.2, 药物作用完成后用 PBS 冲洗细胞 1 次, 冲洗细胞后以 0.25% 含 EDTA 的胰酶消化细胞, $3 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 8 min 收集细胞, 用微量匀浆器匀浆破碎细胞, 按照试剂盒说明书采用比色法测定细胞内 ACP 含量和蛋白含量。

3 结果

3.1 不同浓度大黄素与乌头碱配伍对结肠 Cajal 间质细胞内 MDA 含量的影响 与正常细胞组比较, 乌头碱作用于细胞 30 min 后, MDA 含量显著升高 ($P < 0.05$); 大黄素高、中质量浓度与乌头碱配伍后, 相对于乌头碱组 MDA 含量显著降低 ($P < 0.05$), 但仍高于正常细胞组。见表 1。

3.2 不同浓度大黄素与乌头碱配伍对结肠 Cajal 间质细胞内 ACP 活力的影响 与正常细胞组比较, 乌头碱作用于细胞 30 min 后, ACP 活力显著升高 ($P < 0.05$); 大黄素高、中质量浓度与乌头碱配伍后, 相对于乌头碱组 ACP 活力显著降低 ($P < 0.05$), 但仍高于正常细胞组。见表 1。

4 讨论

细胞的生物膜主要包括细胞膜、核膜、高尔基复合体膜、内质网膜等细胞内各种细胞器的膜性结构, 它们的化学组成和功能作用相似, 主要由镶嵌蛋白质和磷脂双分子层组成, 起着保护细胞内各细胞器并将之与细胞内环境隔开的作用^[7]。在细胞内, 各

表1 乌头碱与大黄素配伍对结肠间质细胞 MDA 含量、ACP 活力的影响($\bar{x} \pm s$)

分组	乌头碱/ $g \cdot L^{-1}$	大黄素/ $mg \cdot L^{-1}$	MDA/ $nmol \cdot mL^{-1}$	ACP/ $U \cdot g^{-1}$
正常	-	-	0.232 25 \pm 0.012 35	154.41 \pm 17.59
乌头碱	1	-	0.312 74 \pm 0.018 61 ²⁾	386.63 \pm 57.89 ²⁾
乌头碱 + 大黄素	1	1	0.298 97 \pm 0.029 08 ^{1,3)}	264.31 \pm 37.21 ^{1,3)}
	1	0.3	0.280 39 \pm 0.023 87 ^{1,3)}	312.23 \pm 46.86 ^{1,3)}
	1	0.08	0.313 39 \pm 0.023 87 ¹⁾	378.35 \pm 55.57 ¹⁾

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

种生物膜在结构和功能上有着紧密的联系,形成一个统一的结构体系叫做生物膜系统。生物膜系统在细胞的生命活动中起着重要的作用,是细胞与环境之间进行物质运输、能量交换和信息传递的主要媒介,也是许多化学能量代谢的重要部位和酶结合位点,为细胞提供一个相对稳定的内环境,保证细胞的各项生命活动稳定、高效、有序的进行。因此,细胞生物膜的稳定性和通透性的改变,显示了细胞内外环境的变化,从一定程度上反应了细胞的某些病理改变和某些相关物质的变化。目前,关于大黄配伍附子的研究已有一定基础,但是都是从饮片配伍层面和组分配伍层面进行的。本实验采用原代细胞培养技术,从成分配伍的层次着手,研究了乌头碱与大黄素配伍对小鼠结肠间质细胞生物膜的影响。氧自由基对细胞的损害是许多疾病的病理基础之一。机体通过酶系统与非酶系统产生氧自由基,氧自由基可与生物膜中的主要成分多价不饱和脂肪酸作用,引发脂质过氧化反应,产生醛类(丙二醛 MDA)、酮基、羟基、羰基等脂质过氧化产物,这些产物能与膜蛋白、酶、DNA 等发生交联反应,改变细胞膜结构,使细胞膜功能和代谢发生改变^[8]。破坏细胞膜的完整性和通透性,引起细胞代谢及功能障碍,甚至死亡^[9]。丙二醛(MDA)是氧自由基与生物膜不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应的稳定代谢产物,其含量的变化可直接反映机体内脂质过氧化的程度,进而反映了细胞内酶系统或非酶系统产生的氧自由基触发细胞膜发生脂质过氧化损伤的严重程度,间接反映出细胞受自由基攻击的严重程度^[10]。溶酶体是细胞内的消化系统,内含有多种酸性水解酶,其中以酸性磷酸酶(ACP)为标志酶。正常情况下溶酶体对其所含的多种水解酶不具有通透性,但当细胞衰老、死亡或受损时,溶酶体膜的通透性增强,ACP 等水解酶就会渗入胞质,加速细胞变性、坏死等过

程^[11]。因此,酸性磷酸酶可以成为细胞损伤严重程度的定量指标。

实验结果发现,乌头碱单独作用于 ICC 后,细胞内的 MDA 含量增加,ACP 活性升高,与正常组相比有显著性差异($P < 0.01$)。说明,乌头碱对于 ICC 的毒性作用可能与其损伤细胞膜,破坏细胞内环境有关。当乌头碱与大黄素配伍使用后,配伍组相对于乌头碱组,其细胞内的 MDA 含量降低,ACP 活性减弱,结果有显著性差异($P < 0.05$)。说明,大黄素在药效浓度范围内能一定程度地抑制乌头碱对 ICC 损伤作用,保护细胞生物膜,有助于维持细胞内环境的稳定性,从而达到“减毒增效”的效果。

综上所述,乌头碱对正常 ICC 的生物膜系统具有显著的破坏作用,影响细胞膜的稳定性,增加溶酶体膜的通透性。当药效浓度的大黄素与乌头碱两者配伍使用作用于正常 ICC 后,能降低乌头碱对细胞生物膜系统的损伤作用,有助于细胞生物膜恢复到正常的状态。大黄素与乌头碱配伍对细胞 MDA、ACP 的影响仅表明两者对细胞生物膜的作用影响。推测其对细胞内环境中的电解质和酶类,以及细胞的能量代谢均具有作用。两者配伍“减毒增效”的作用机制及相互关联还有待于进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 石军民. 中药乌头的合理使用[J]. 中国当代医药, 2010,17(27):92.
- [2] 闫美娟. 大黄调节胃肠功能的作用及机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010,16(4):181.
- [3] 汪星,孙卫,张铁军. 乌头类有毒中药配伍减毒增效的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012,18(18):329.
- [4] 周静波. 附子配伍甘草、大黄、干姜调控药性物质基础研究[D]. 成都:成都中医药大学,2009.

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^+ -ATPase 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]