

通络化痰胶囊对 H₂O₂ 所致的 PC12 细胞凋亡的保护作用及机制

富苏¹, 范吉平², 王新志^{3*}

(1. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100700; 2. 中国中医科学院, 北京 100700;
3. 河南中医学院第一附属医院, 郑州 450000)

【摘要】 目的:探讨通络化痰胶囊对过氧化氢(H₂O₂)所致的大鼠嗜铬瘤细胞(PC12)细胞凋亡的保护作用及机制。**方法:**PC12细胞常规培养后,首先通过MTT检测细胞存活率的方法进行H₂O₂损伤模型的摸索和通络化痰胶囊药物浓度的筛选;确定造成PC12细胞损伤的H₂O₂浓度和通络化痰胶囊的安全作用浓度后,将处于对数生长期的PC12细胞分为对照组、模型组和通络化痰胶囊6.25,12.5,25,50,100mg·L⁻¹5个治疗组。用200 μmol·L⁻¹ H₂O₂刺激PC12细胞使其发生凋亡,MTT法检测PC12细胞存活率、Hoechst33342荧光核染色观察细胞凋亡形态学改变、流式细胞仪检测PC12细胞凋亡率、Western blot方法检测与细胞凋亡线粒体途径密切相关的蛋白细胞色素C(CytC)和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(caspase-3)表达的变化。**结果:**200 μmol·L⁻¹ H₂O₂诱导PC12细胞损伤明显,浓度小于等于100 mg·L⁻¹的通络化痰胶囊浓度对正常PC12细胞的存活率没有抑制作用。与模型组比较,各通络化痰治疗组PC12细胞存活率提高(P<0.01),凋亡率下降(P<0.01),CytC和Caspase-3的表达减少(P<0.01),其作用与剂量有关。**结论:**通络化痰胶囊可抑制H₂O₂诱导的PC12细胞凋亡,其机制可能与抑制细胞凋亡线粒体途径中凋亡相关CytC和caspase-3的表达有关。

【关键词】 H₂O₂; PC12; 细胞凋亡; 线粒体; 通络化痰胶囊; 细胞色素C; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2013)12-0188-06

【doi】 10.11653/syfyj2013120188

Protective Effects of Tongluo Huatan Capsule on H₂O₂-induced Apoptosis in PC12 Cells

FU Su¹, FAN Ji-ping², WANG Xin-zhi^{3*}

(1. Dongzhimen Hospital Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China;

2. China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

3. First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China)

【Abstract】 Objective: To investigate the protective effect and mechanism of Tongluo Huatan capsule on H₂O₂-induced apoptosis in PC12 cells. **Method:** PC12 cells were cultured, and the cell viability of PC12 cells injured by different H₂O₂ concentrations and proliferated by different Tongluo Huatan Capsule were observed by MTT assay to determine the concentration that will cause a H₂O₂-induced apoptosis model of PC12 cells and the security concentrations of Tongluo Huatan Capsule for PC12 cells. PC12 cells in the logarithmic growth phase were divided into control group, model group and low, medium and high dose Tongluo Huatan capsule treatment groups. Apoptosis of PC12 cells were induced by H₂O₂ at the concentration of 200 μmol·L⁻¹, MTT assay was used to detect the cell viability of PC12 cells protected by Tongluo Huatan capsule at different concentrations, Hoechst33342 fluorescent staining was used to observe morphological changes of cell apoptosis, the flow cytometry were used to detect the rate of apoptosis in PC12 cells, and the Western blot technology was used to detect the expressions of

【收稿日期】 20130110(017)

【第一作者】 富苏, 博士研究生, 从事中医药防治脑病临床与实验研究, E-mail: fpianpian@hotmail.com

【通讯作者】 * 王新志, 主任医师, 教授, 博士生导师, 从事中西医结合治疗脑血管病研究, E-mail: zqnzqn@163.com

protein CytC and Caspase-3. **Result:** PC12 cells were injured by H₂O₂ at 200 μmol·L⁻¹ concentration, while Tongluo Huatan capsule at less than or equal to the concentration of 100 μmol·L⁻¹ did not inhibit the cell viability of PC12 cells. Compared with the model group, Tongluo Huatan capsule groups improved cell viability ($P < 0.01$), decreased apoptotic cells and apoptosis rate ($P < 0.01$), and decreased the expression of CytC and Caspase-3 ($P < 0.01$) which was related to doses Tongluohuatan capsule. **Conclusion:** Tongluo Huatan capsule can inhibit H₂O₂-induced apoptosis in PC12 cells, while the mechanism may be related to the inhibition of the expression of apoptosis-related protein CytC and caspase-3 in the mitochondrial pathway.

[**Key words**] H₂O₂; PC12; apoptosis; mitochondria; Tongluo Huatan capsule; CytC; caspase-3

近几年在各种脑缺血模型中均看到神经元坏死伴有凋亡发生,并认为凋亡是缺血性神经元死亡的一种形式。研究证实,缺血性脑损伤时的细胞死亡不仅存在坏死,而且会有大量细胞凋亡^[1-2]。细胞凋亡成为脑缺血损伤中的研究热点,并成为开发治疗药物的治疗靶点。治疗中风病的专利新药通络化痰胶囊,源于王永炎院士所创立的“毒损脑络”的理论,由“中风病系列方药”中的“化痰通络汤”经导师范吉平教授依据多年中风病治疗的临床经验,在“化痰通络汤”的基础上加减配伍对脑损伤具有特殊保护作用的熊胆粉等药科学组方、总结优化而成,具有解毒、通络、化痰的三重作用。本研究拟以大鼠嗜铬细胞瘤细胞株(pheochromocytoma cells, PC12)为对象,用200 μmol·L⁻¹ H₂O₂造成体外神经细胞凋亡模型,观察不同浓度通络化痰胶囊对PC12细胞的存活率、形态学改变及凋亡率的改变以研究通络化痰胶囊对H₂O₂诱导的PC12细胞凋亡的保护作用,同时通过测定蛋白细胞色素C(Cytochrome C, CytC)和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cysteinylasparate specific proteinase-3, caspase-3)表达的变化深入研究通络化痰胶囊抗凋亡的作用机制。

1 材料

1.1 细胞株 大鼠嗜铬瘤细胞(PC12)株由中国医学科学院基础医学研究所惠赠。

1.2 药物 通络化痰胶囊(由山东沃华医药科技股份有限公司提供,生产批号110701)。通络化痰药液制备:用100 mg通络化痰药粉溶于250 μL DMSO配制400 g·L⁻¹储备液,振荡混合仪上搅拌至充分溶解,经0.22 μm滤器过滤除菌后分装,-20℃保存。实验过程中用含血清DMEM配制6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 mg·L⁻¹工作液。保证DMSO的终浓度小于0.1%。

1.3 仪器和试剂 超净台(HDL);CO₂培养箱(日本,Sanyo);DGG-9140B烘干机(中国,森信);Anke

TDL-5-A离心机(德国,Eppendorf);冷冻离心机(美国,Sigma);电子精密天平(德国,Sartorius);倒置显微镜(德国,Leica);酶标仪(美国,Synergy);流式细胞仪(美国,BD);匀浆机(中国,PRO200);电泳仪(中国,伯乐);转膜仪(中国,伯乐);JD801凝胶成像仪(德国,JeDa);DM4000B图像采集系统(德国,Leica);Image-pro Plus 5.0图像分析系统。

DMEM完全培养基(Gibco);优质胎牛血清(杭州四季青);马血清(兰州民海生物);1:250胰蛋白酶(北京拜尔迪);H₂O₂(北京化工);MTT(Amresco);DMSO(北京化工);Hoechst33342染色试剂盒(Sigma);Annexin-v-FITC凋亡检测试剂盒(Biomiga);兔抗大鼠Cyt-C多克隆抗体(CST);兔抗大鼠caspase-3多克隆抗体(CST)。

2 方法

2.1 PC12细胞培养 PC12细胞用含体积分数为10%胎牛血清、1%马血清、1%双抗的DMEM完全培养基,置于含5%CO₂37℃培养箱中培养,隔2天传1代,取对数生长期细胞进行下述实验。

2.2 造模 取对数生长期PC12细胞以密度10⁵/mL(10⁴/每孔),每孔100 μL接种于96孔板,并留2个孔只加入100 μL含血清DMEM作为空白孔,置于CO₂培养箱37℃培养。待细胞贴壁后,将细胞分为8组,每组8个复孔。分别为对照组(100 μL含血清DMEM)、7个损伤组(100 μL终浓度分别为50,100,150,200,250,300,400 μmol·L⁻¹ H₂O₂),空白孔加入100 μL含血清DMEM,CO₂培养箱37℃培养20 h。每孔避光加入20 μL 5 g·L⁻¹的MTT,CO₂培养箱37℃培养4 h后,吸去上清,每孔加入150 μL DMSO,振荡10 min后,选择490 nm波长处,用酶标仪检测各孔吸光值(A)。计算各组细胞存活率。细胞存活率计算方法为:

$$\text{细胞存活率} = (\text{实验组} A - \text{空白组} A) / (\text{对照组} A - \text{空白组} A) \times 100\%$$

2.3 通络化痰胶囊药物浓度筛选 取对数生长期

PC12 细胞以密度 $10^5/\text{mL}^{-1}$, 每孔 $100\ \mu\text{L}$ 接种于 96 孔板, 并留 2 个孔只加入 $100\ \mu\text{L}$ 含血清 DMEM 作为空白孔, 置于 CO_2 培养箱 $37\ ^\circ\text{C}$ 培养。待细胞贴壁后, 将细胞分为 8 组, 每组 8 个复孔。分别为对照组 ($100\ \mu\text{L}$ 含血清 DMEM)、7 个通络化痰胶囊治疗组 ($100\ \mu\text{L}$ 终质量浓度分别为 $50, 100, 150, 200, 250, 300, 400\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 通络化痰胶囊 DMEM 溶液), 空白孔加入 $100\ \mu\text{L}$ 含血清 DMEM, CO_2 培养箱 $37\ ^\circ\text{C}$ 培养 20 h。每孔避光加入 $20\ \mu\text{L}$ $5\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MTT, CO_2 培养箱 $37\ ^\circ\text{C}$ 培养 4 h 后, 吸去上清, 每孔加入 $150\ \mu\text{L}$ DMSO, 振荡 10 min 后, 选择 $490\ \text{nm}$ 波长处, 用酶标仪检测各孔 A。按 2.2 计算各组细胞存活率。

2.4 MTT 法检测细胞活性 取对数生长期 PC12 细胞以密度 $10^5/\text{mL}$ ($10^4/\text{每孔}$), 每孔 $100\ \mu\text{L}$ 接种于 96 孔板, 并留 2 个孔只加入 $100\ \mu\text{L}$ 含血清 DMEM 作为空白孔, 置于 CO_2 培养箱 $37\ ^\circ\text{C}$ 培养。待细胞贴壁后, 将细胞分为 7 组, 每组 8 个复孔。分别为对照组 ($100\ \mu\text{L}$ 含血清 DMEM)、模型组 ($50\ \mu\text{L}$ 终浓度为 $200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{H}_2\text{O}_2 + 50\ \mu\text{L}$ 含血清 DMEM)、5 个浓度治疗组 ($50\ \mu\text{L}$ 终浓度为 $200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{H}_2\text{O}_2 + 50\ \mu\text{L}$ 终质量浓度分别为 $6.25, 12.5, 25, 50, 100\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 通络化痰胶囊 DMEM 溶液), 空白孔加入 $100\ \mu\text{L}$ 含血清 DMEM, CO_2 培养箱 $37\ ^\circ\text{C}$ 培养 20 h。每孔避光加入 $20\ \mu\text{L}$ $5\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MTT, CO_2 培养箱 $37\ ^\circ\text{C}$ 培养 4 h 后, 吸去上清, 每孔加入 $150\ \mu\text{L}$ DMSO, 振荡 10 min 后, 选择 $490\ \text{nm}$ 波长处, 用酶标仪检测各孔 A。按 2.2 计算各组细胞存活率。

2.5 细胞凋亡形态学改变 (Hoechst 33342 荧光核染色) 取对数生长期 PC12 细胞接种于 6 孔板, 置于 CO_2 培养箱 $37\ ^\circ\text{C}$ 培养。待细胞贴壁后, 将细胞分为 5 组, 分别为空白对照组 (含血清 DMEM)、模型组 (终浓度为 $200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{H}_2\text{O}_2 +$ 含血清 DMEM)、3 个浓度治疗组 (终浓度为 $200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{H}_2\text{O}_2 +$ 终质量浓度分别为 $6.25, 25, 100\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 通络化痰胶囊 DMEM 溶液), CO_2 培养箱 $37\ ^\circ\text{C}$ 培养 24 h。造模 24 h 后, 冷的 PBS 洗涤 2 遍, 每次 3 min, 加入 4% 多聚甲醛室温固定 10 min; 去固定液, 用 PBS 洗 2 遍, 每次 3 min; 加入 $10\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Hoechst 33342 染色液, 室温避光染色 10 min; 去染色液, 用 PBS 洗 2 遍, 每次 3 min, 吸尽液体; 用盖玻片封片, 荧光显微镜下 (激发波长 $346\ \text{nm}$, 发射波长 $460\ \text{nm}$) 观察凋亡细胞的形态学改变。

2.6 检测细胞凋亡率 培养、分组和造模方法同

2.5, 每组 3 个复孔。造模 24 h 后, 用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 调整待测细胞密度为 2×10^5 个/mL; 取 1 mL 细胞, $800\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}\ 4\ ^\circ\text{C}$ 离心 5 min, 弃掉上清液; 加入冷的 PBS, $800\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}\ 4\ ^\circ\text{C}$ 离心 10 min, 洗涤两遍收集细胞 2×10^5 个; 加入 $500\ \mu\text{L}$ Annexin V Binding Buffer 悬浮细胞, 加入 $5\ \mu\text{L}$ AnnexinV-FITC 和 $5\ \mu\text{L}$ PI, 轻轻混匀, 避光室温反应 10 min; 立即上流式细胞仪 ($\text{Ex} = 488\ \text{nm}$, $\text{Em} = 530\ \text{nm}$) 检测细胞凋亡情况。FITC 激光后发绿色荧光, PI 发红色荧光。

2.7 细胞凋亡线粒体途径密切相关的蛋白 CytC 和 caspase-3 表达 (Western blot) 培养、分组和造模方法同 2.5, 每组 3 个复孔。造模 24 h 后, 加入适量细胞裂解液, 冰上裂解 30 min; 用细胞刮刮下细胞, 离心吸取上清液, Bradford 法测定蛋白的含量; 将蛋白与加样缓冲液按照 1:1 比例混合, $100\ ^\circ\text{C}$ 煮沸 5 min 变性, $-20\ ^\circ\text{C}$ 储存; 按蛋白质含量测定结果加样, 10% SDS-PAGE 电泳分离样品; 电转移 30 min 将蛋白转至 PVDF 膜上, 用封闭液室温封闭 1 h; 将膜与溶于封闭液中的一抗室温孵育过夜, PBS 洗 10 min $\times 3$ 次; 将膜与溶于封闭液中的二抗室温孵育 30 min, PBS 洗 5 min $\times 2$ 次; ECL 检测试剂与膜作用 3 min 后暗室中曝光, X 射线显影、定影; 将结果输入凝胶成像系统, 进行分析。

2.8 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 来表示, 采用 SPSS 17.0 软件作统计分析, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

3 结果

3.1 不同浓度 H_2O_2 诱导 PC12 细胞损伤的细胞存活率 不同浓度 H_2O_2 损伤 24 h, PC12 细胞的存活率见表 1。随 H_2O_2 浓度增高 PC12 细胞存活率逐渐下降。选择细胞存活率为 47.3% 时的 H_2O_2 损伤浓度 $200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为损伤模型的浓度。

3.2 通络化痰胶囊对正常 PC12 细胞增殖的影响 药物和 PC12 细胞共同孵育 24 h 后, MTT 结果表明, 各浓度的通络化痰胶囊对正常 PC12 细胞的存活率均有促增殖活性, 不同浓度通络化痰胶囊处理 PC12 细胞 24 h, PC12 细胞的存活率见表 1。

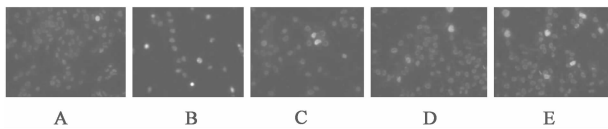
3.3 通络化痰胶囊对 H_2O_2 诱导 PC12 细胞损伤的保护作用 模型组 PC12 细胞存活率明显低于对照组 ($P < 0.01$), 说明 H_2O_2 引起 PC12 细胞损伤; 与模型组比较, 通络化痰胶囊 $6.25, 12.5, 25, 50, 100\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 剂量组细胞存活率明显提高 ($P < 0.01$), 且随着剂量增加细胞存活率提高。见表 1。

表1 细胞存活率的改变(n=8)

组别	剂量 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	存活率 /%	组别	剂量 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	存活率 /%	组别	剂量 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	存活率 /%
正常	-	100	正常	-	100	正常	-	100
H ₂ O ₂	50	84.3	通络化痰	6.25	110.1 ¹⁾	模型	-	47.3 ²⁾
	100	77.6		12.5	118.9 ²⁾	通络化痰	6.25	74.4 ⁴⁾
	150	65.5		25	159.4 ²⁾		12.5	82.2 ⁴⁾
	200	47.3		50	139.4 ²⁾		25	86.8 ⁴⁾
	250	21.5		100	126.1 ²⁾		50	94.7 ⁴⁾
	300	15.9		200	155.7 ²⁾		100	97.3 ⁴⁾
	400	12.3		400	151.8 ²⁾			

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表2同)。

3.4 Hoechst33342 荧光核染色 正常对照组 PC12 细胞的细胞核有完整的轮廓,尺寸大而且呈圆形,而小的细胞核和染色质浓缩的 PC12 细胞很少看到。相反,H₂O₂ 处理的 PC12 细胞大多数核出现明显的固缩。与 H₂O₂ 损伤组相比较,6.25,25,100 mg·L⁻¹ 剂量的通络化痰胶囊组固缩的细胞核的数量明显减少。细胞凋亡的形态学变化见图 1。



A. 正常组;B. 模型组;C. 通络化痰胶囊 6.25 mg·L⁻¹组;
D. 通络化痰胶囊 25 mg·L⁻¹组;
E. 通络化痰胶囊 100 mg·L⁻¹组(图2同)

图1 通络化痰胶囊对 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞凋亡形态学改变的影响(×200)

3.5 流式细胞仪检测细胞凋亡率 流式细胞仪检测结果显示,正常组细胞基本不存在凋亡,模型组细胞凋亡率明显增加,与模型组相比有显著的统计学差异($P < 0.01$)。通络化痰胶囊 6.25,25,100 mg·L⁻¹ 剂量组细胞凋亡率均明显下降,与模型组相比具有统计学差异($P < 0.01$, $P < 0.05$),且随着通络化痰胶囊剂量增加凋亡比率降低,见表 2。

3.6 Western blot 法检测 PC12 细胞 CytC, caspase-3 蛋白表达的变化 结果表明,对照组 PC12 细胞中 CytC, caspase-3 蛋白呈低水平表达,模型组 CytC, caspase-3 蛋白表达量较对照组明显增高($P < 0.01$),通络化痰胶囊 6.25,25,100 mg·L⁻¹ 剂量组 CytC, caspase-3 蛋白表达量与模型组比较明显降低($P < 0.01$, $P < 0.05$),且随着通络化痰胶囊剂量增加 CytC, caspase-3 蛋白表达减少,见表 2,

图 2。

表2 通络化痰胶囊对 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞凋亡率和 CytC, caspase-3 的影响($\bar{x} \pm s$, n=3)

组别	剂量 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	凋亡率 /%	CytC	caspase-3
正常	-	0.16 ± 0.07	0.318 ± 0.019	0.268 ± 0.024
模型	-	32.76 ± 3.12 ²⁾	0.488 ± 0.021 ²⁾	0.497 ± 0.043 ²⁾
通络化痰	6.25	18.35 ± 2.34 ⁴⁾	0.411 ± 0.015 ³⁾	0.415 ± 0.018 ³⁾
	25	15.72 ± 1.38 ⁴⁾	0.354 ± 0.019 ⁴⁾	0.363 ± 0.018 ⁴⁾
	100	12.47 ± 2.01 ⁴⁾	0.311 ± 0.013 ⁴⁾	0.326 ± 0.014 ⁴⁾

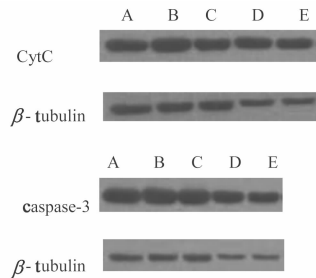


图2 通络化痰胶囊对 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞线粒体途径相关蛋白 CytC, caspase-3 蛋白表达的影响

4 讨论

大鼠嗜铬细胞瘤细胞(PC12细胞),诱导后可获得类似神经元的表型和突触,为国内外研究神经元损伤的常见细胞系^[3]。研究发现,氧应激与急性和慢性神经退行性病变有关,虽然其确切机制不十分清楚,但氧应激可介导细胞凋亡^[4]。暴露于 H₂O₂ 可造成 PC12 细胞及原代培养神经,细胞等多种细胞凋亡而非坏死^[5-8]。

细胞凋亡又称程序性细胞死亡(programed cell death, PCD),是由基因控制的细胞自主的有序的死

亡。Mac Manu S等在1993年首次报道大鼠全脑缺血与神经细胞凋亡的关系,神至此之后经细胞凋亡在脑缺血损伤中的作用日益受到关注。研究表明神经细胞凋亡是脑缺血损伤病理作用的重要环节,是造成脑缺血损伤后继发性损害的重要机制^[9-10]。脑缺血损伤既可造成细胞坏死,又可诱导细胞凋亡。细胞坏死是一个不可逆的过程,而细胞凋亡则是受一系列程序调控的过程,在脑缺血损伤后及早进行抗凋亡治疗具有重要意义^[11]。细胞凋亡中最经典的途径之一为线粒体途径(内途径)。线粒体对于多细胞生物至关重要。没有线粒体,细胞停止有氧呼吸,并迅速死亡,这一机制也是很多凋亡通路的关键。凋亡蛋白通过不同的方式以线粒体为靶点破坏线粒体的作用,通过线粒体膜孔道的形成导致了线粒体肿胀,或者通过提高线粒体膜的通透性导致凋亡效应器的漏出^[12]。线粒体直接或间接地形成特定的孔道来释放凋亡因子,例如细胞色素C。在细胞质内,细胞色素C与Apaf-1聚合,吸引caspase-9前体形成凋亡小体(apoptosome)。这导致了caspase-9的分裂和激活,caspase-9同时可以反过来分裂和激活下游的caspase-3,后者起到细胞凋亡过程的效应器的作用。研究表明^[13-15],在caspase家族中,caspase-3是caspase级联“瀑布”下游最关键的凋亡执行蛋白酶,它在正常细胞中是以酶原形式存在,受凋亡刺激因素作用后激活,活化的caspase-3可以激活核因子、细胞骨架蛋白及DNA修复酶等,引起细胞形态的变化如出现细胞皱缩、DNA裂解、染色体浓缩和凋亡小体的形成等,最终导致细胞凋亡,caspase-3在各种因素启动的凋亡程序中起最后的枢纽作用。通过抑制caspase-3的活化,可以产生对缺血性脑损伤的保护作用^[16-18]。

通络化痰胶囊由熊胆、天麻、三七、丹参、天竺黄、大黄组成,全方活血化瘀,化痰通络,临床使用对于中风病急性期和亚急性期有着良好的疗效。既往研究显示通络化痰胶囊可改善脑缺血再灌注损伤大鼠的神经行为学评分,可减少脑梗死面积,增加BDNF、bFGF的表达升高,激活内源性神经保护机制,发挥其抗凋亡作用^[19-20]。本研究揭示对于体外培养的神经细胞凋亡模型应用通络化痰胶囊可显著减少细胞凋亡率,其机制可能与调节神经细胞凋亡线粒体途径中调控因子CytC和caspase-3的表达相关。

[参考文献]

[1] Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil

hippocampus following ischemia[J]. Brain Res, 1982, 239(1):57.

[2] Arvin K L, Han B H, Du Y, et al. Minocycline markedly protect the neonatal brain against hypoxic-ischemic injury[J]. Ann Neurol, 2001, 52(1):54.

[3] Zhang S, Ye J, Dong G. Neuroprotective effect of baicalein on hydrogen peroxide-mediated oxidative stress and mitochondrial dysfunction in PC12 cells[J]. Mol Neurosci, 2010, 40(3):311.

[4] 姜泊. 细胞凋亡基础与临床[M]. 北京:人民军医出版社, 1999.

[5] Enokido Y, Hatanaka H. High oxygen atmosphere for neuronal cell culture with nerve growth factor. Survival and growth of clonal rat pheochromocytoma PC12 cells[J]. Brain Res, 1990, 536(1/2):23.

[6] Troy C M, Shelanski M L. Down-regulation of copper/zinc superoxide dismutase causes apoptotic death in PC12 neuronal cells. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(14):6384.

[7] Enokido Y, Hatanaka H. Apoptotic cell death occurs in hippocampal neurons cultured in a high oxygen atmosphere[J]. Neuroscience, 1993, 57(4):965.

[8] Ratan R R, Murphy T H, Baraban J M. Oxidative stress induces apoptosis in embryonic cortical neurons[J]. J Neurochem, 1994, 62(2):376.

[9] WANGP, WANGW, XUYL, et al. Comparison of focal cerebral ischemia-reperfusion induced apoptosis of astrocytes and neurons in rats[J]. Chin J Histochem Cytochem, 2006, 16(2):113.

[10] Kalimichenko S G, Matveeva N Y. Morphological Characteristic of apoptosis and its significance in neurogenesis[J]. J Morfologija, 2007, 131(2):16.

[11] Douglas R G, Guido K. Pharmacological manipulation of cell death: clinical applications in sight[J]. J Clin Invest, 2005, 115(10):2610.

[12] Cotran, Kumar, Collins. Robbins Pathologic Basis of Disease. Philadelphia London Toronto Montreal Sydney Tokyo Saunders, 1999

[13] John C R. Mechanisms of apoptosis[J]. Am J Path, 2000, 157(5):1415.

[14] Cohen G M. Caspase: The executioners of apoptosis[J]. Biochem J, 1997, 326(2):1.

[15] Earnshaw W C, Martins L M, Kaufmann S H. Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis[J]. Annu Rev Biochem, 1999, 68:383.

[16] Reed J C. Apoptosis-based therapies[J]. Nat Rev Drug Discov, 2002, 1(2):111.

补肾、健脾和补肾健脾方对尾部悬吊大鼠钙、磷代谢的影响

张林^{1*}, 范颖¹, 陈文娜², 孙宏伟², 马贤德²

(1. 辽宁中医药大学基础医学院方剂学科, 沈阳 110847;

2. 辽宁中医药大学教学实验中心, 沈阳 110847)

[摘要] **目的:**观察补肾、健脾和补肾健脾 3 方对模拟失重大鼠钙、磷代谢的作用,比较其促进骨矿化能力的异同。**方法:**大鼠随机分为正常对照、悬吊、补肾、健脾和补肾健脾共 5 组。后 4 组大鼠头低位 -30 度尾部悬吊连续 21 d 模拟失重,补肾、健脾和补肾健脾组大鼠从实验第 1 天开始依次按 2.4, 3.2, 5.7 g·kg⁻¹·d⁻¹ 给予补肾方、健脾方和补肾健脾方灌胃,其余各组大鼠灌服等容积的生理盐水。实验第 22 天取材,双能 X 射线骨密度仪测左侧胫骨骨密度,全自动生化分析仪检测血和尿中钙磷含量,EDTA 法检测粪钙和饲料钙含量。**结果:**较之正常对照组,悬吊组大鼠左侧胫骨骨密度显著降低 ($P < 0.01$),血钙和血磷含量、钙的表观吸收率明显降低 ($P < 0.01$),尿钙、尿磷、粪钙含量明显增高 ($P < 0.01$);较之悬吊组,补肾健脾组大鼠左侧胫骨骨密度、血钙和血磷含量、摄入钙量、钙的表观吸收率明显升高 ($P < 0.01$),尿钙、尿磷、粪钙含量明显降低 ($P < 0.01$),补肾组和健脾组大鼠左侧胫骨骨密度、血钙升高 ($P < 0.05$),钙的表观吸收率均明显升高 ($P < 0.01$),补肾组大鼠血磷含量明显升高 ($P < 0.01$),尿钙、尿磷含量显著降低 ($P < 0.01$),粪钙含量降低 ($P < 0.05$),健脾组大鼠血磷和摄入钙量增加 ($P < 0.05$),尿钙、尿磷和粪钙含量降低 ($P < 0.05, P < 0.01$);较之补肾健脾组,补肾组和健脾组大鼠左侧胫骨骨密度、血钙含量降低 ($P < 0.05$),补肾组大鼠钙的表观吸收率明显降低 ($P < 0.01$)。**结论:**补肾、健脾和补肾健脾 3 方均能改善模拟失重引起的钙磷代谢异常,健脾方在促进钙吸收和维持血钙处于正常水平方面对补肾方具有协同增效作用。

[关键词] 补肾健脾;模拟失重;尾部悬吊;钙代谢;磷代谢

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)12-0193-04

[doi] 10.11653/syfy2013120193

Effects of Tonifying Kidney and Invigorating Spleen Prescription on the Metabolism of Calcium and Phosphorus in Rat Tail Suspension Model

ZHANG Lin^{1*}, FAN Ying¹, CHEN Wen-na², SUN Hong-wei², MA Xian-de²

(1. Formulaology Discipline, Liaoning University of Chinese Medicine, Shenyang 110847, China;

2. Teaching and Experiment Center, Liaoning University of Chinese Medicine, Shenyang 110847, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the action of tonifying kidney prescription, invigorating spleen

[收稿日期] 20121224(022)

[基金项目] 国家自然科学基金(81001493);教育部博士点新教师基金(20102133120001);辽宁省教育厅基金(L2011162)

[通讯作者] *张林,副教授,从事方剂配伍规律与效用机制研究, Tel: 13066705263, E-mail: zhanglin770622@hotmail.com

[17] Cheng Y, Deshmukh M, D'Costa A, et al. Caspase inhibitor affords neuroprotection with delayed administration in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury[J]. J Clin Invest, 1998, 101(9): 1992.

[18] Inna N L, Alexander G, Peter H K. Caspase; pharmacological manipulation of cell death[J]. J Clin Invest, 2005, 115(10): 2665.

[19] 熊露,田少霞,范吉平,等. 脑脉康对脑缺血再灌注损伤后 BDNF、bFGF 蛋白表达的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2004, 10(7): 67.

[20] 熊露,田少霞,范吉平,等. 脑脉康对脑缺血再灌注损伤后神经细胞凋亡的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2004, 10(8): 24.

[责任编辑 聂淑琴]