

# 补阳还五汤含药血清对缺氧缺糖损伤 PC12 细胞形态和活力的影响

刘俊娥<sup>1,2</sup>, 张继平<sup>2\*</sup>, 姚晖<sup>2</sup>, 方永奇<sup>3</sup>, 梁毅<sup>3</sup>, 文凤妮<sup>1</sup>

(1. 广东医学院药理学教研室, 广东 湛江 524023;

2. 南方医科大学附属佛山医院, 广东 佛山 528000;

3. 广州中医药大学第一附属医院实验中心, 广州 510405)

**[摘要]** 目的:探讨补阳还五汤含药血清对缺氧缺糖(oxygen-glucose deprivation, OGD)损伤 PC12 细胞形态和活力的影响。方法:采用中药血清药理学方法制备补阳还五汤含药血清,以 5%,10%,20% 的含药血清作用于 OGD 损伤 PC12 细胞,于倒置显微镜下观察细胞形态,用四甲基偶氮唑盐法检测细胞活力。结果:PC12 细胞 OGD 损伤后形态发生改变、细胞活力降低;5%,10% 补阳还五汤含药血清作用于 OGD 损伤 PC12 细胞 12,18,24 h,均可减轻细胞形态损伤、提高细胞活力( $P < 0.01$ );而 20% 补阳还五汤含药血清随作用时间的延长对 OGD 损伤 PC12 细胞的形态和活力具有双向调节作用。结论:一定浓度的补阳还五汤含药血清对 OGD 损伤 PC12 细胞的形态和活力具有保护作用。

**[关键词]** 补阳还五汤; 含药血清; 缺氧缺糖; PC12 细胞

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)19-0186-05

## Effects of Buyang Huanwu Decoction Containing Serum on the Morphology and Viability of PC12 Cells During Oxygen-glucose Deprivation

LIU Jun-e<sup>1,2</sup>, ZHANG Ji-ping<sup>2\*</sup>, YAO Hui<sup>2</sup>, FANG Yong-qi<sup>3</sup>, LIANG Yi<sup>3</sup>, WEN Feng-ni<sup>1</sup>

(1. Department of Pharmacology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China;

2. Foshan Hospital Affiliated to Southern Medical University, Foshan 528000, China;

3. Laboratory Center, The First Hospital Affiliated to Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

**[收稿日期]** 20120410(013)

**[基金项目]** 广东省科技厅科技攻关项目(2004B36001009);广东省中药局中医药强省课题(2010008)

**[第一作者]** 刘俊娥,硕士研究生, Tel:18024190213, E-mail:ljune.2008@163.com

**[通讯作者]** \* 张继平,硕士生导师,研究员,主任中医师,从事中药药理研究, Tel:18665466131, E-mail:fszjping@163.com

- [2] 李学东,陈斌,郑创义,等.三七总皂甙通过 P38MAPK 信号通路促进大鼠骨髓基质细胞向成骨细胞的增殖、分化[J].中国伤残医学,2009,17(4):167.
- [3] 蔡曼玲,季晖,李萍,等.5种淫羊藿黄酮类成分对体外培养成骨细胞的影响[J].中国天然药物,2004,2(4):235.
- [4] 于波,杨久山,刘岩,等.淫羊藿苷对人成骨细胞的作用[J].中医正骨,2006,18(6):17.
- [5] 蒋绍艳,宋丹妮,史玉朋,等.淫羊藿苷对大鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的影响[J].海南医学院学报,2009,15(10):1198.
- [6] 刘芳.菟丝子总黄酮对成骨细胞骨代谢的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(19):232
- [7] 钟代彬,孙立婷,吴培福,等.氟对山羊成骨细胞增殖分化及钙化功能的调节[J].中国兽医科技,2005,35(11):895.
- [8] 樊秦,赵文君,李应东.华中五味子含药血清对成骨细胞增殖分化的影响[J].中国实验方剂学杂志,2009,15(2):33.

[责任编辑 聂淑琴]

**[ Abstract ] Objective:** To investigate effects of Buyang Huanwu decoction containing serum on the morphology and viability of PC12 cells during oxygen-glucose deprivation. **Method:** Buyang Huanwu decoction containing serum was obtained by the seropharmacological method. PC12 cells were treated with different concentrations (5%, 10%, 20%) of the serum during oxygen-glucose deprivation. The cell morphology was observed with inverted microscopy, and the cell viability was examined by methyl thiazolyl tetrazolium assay. **Result:** The cell morphology was changed and the cell viability was decreased during oxygen-glucose deprivation, and the injured degree of cell morphology was relieved and the cell viability was increased in PC12 cells which treated with concentrations of 5%, 10% Buyang Huanwu decoction medicated serum for 12, 18, 24 h ( $P < 0.01$ ). However, 20% Buyang Huanwu decoction containing serum had the bidirectional regulation effects on the morphology and viability of PC12 cells during oxygen-glucose deprivation. **Conclusion:** The certain concentration of Buyang Huanwu decoction containing serum has protective effects on the morphology and viability of PC12 cells during oxygen-glucose deprivation.

**[ Key words ]** Buyang Huanwu decoction; medicated serum; oxygen-glucose deprivation; PC12 cells

在诸多神经疾病中,神经元损伤是主要原因,因而保护神经元是卒中等神经疾病治疗的一个着眼点<sup>[1]</sup>。补阳还五汤出自清代名医王清任的《医林改错》<sup>[2]</sup>,临床用于防治缺血性脑卒中疗效显著<sup>[3]</sup>。探讨补阳还五汤对脑缺血损伤神经细胞的影响及其机制具有重要意义。细胞实验研究发现,补阳还五汤可抑制缺氧损伤神经元的凋亡<sup>[4-5]</sup>、提高谷氨酸损伤皮质神经细胞的活力<sup>[6]</sup>,但关于补阳还五汤对缺氧缺糖(oxygen-glucose deprivation, OGD)损伤神经细胞的影响尚未见报道。鉴于体外 OGD 损伤可有效反映体内脑缺血损伤病理变化,本实验以 OGD 诱导 PC12 细胞损伤模型模拟脑缺血损伤神经细胞,观察补阳还五汤含药血清作用于细胞模型后对细胞形态和活力的影响,为后续实验奠定基础。

## 1 材料

**1.1 动物** 普通级新西兰兔 4 只,体重 2.0 ~ 2.5 kg,雌雄各半,由广州中医药大学实验动物中心提供动物和动物设施,动物生产许可证号 SCXK(粤)2008-0020,动物质量合格证明编号 0083958,动物使用许可证号 SYXK(粤)2008-0001,动物实验证明编号 0054544。

**1.2 细胞株** PC12 细胞由广州中医药大学第一附属医院实验中心馈赠。

**1.3 药物** 中药配方颗粒由广东一方制药有限公司提供(黄芪,批号 1103193,赤芍,批号 1101098,归尾,批号 1009036,地龙,批号 1101139,川芎,批号 1102065,桃仁,批号 1009046,红花,批号 1101133)。补阳还五汤全方由黄芪 120 g,归尾 6 g,赤芍 4.5 g,桃仁 3 g,红花 3 g,地龙 3 g,川芎 3 g 组成,按照方剂

配比称取相当于 3.2 倍原方剂量共 456 g 药材的中药配方颗粒,充分混匀,加入煮沸的去离子水 237.5 mL,搅拌至完全溶解配制成终质量浓度为  $1.92 \times 10^6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的药液。

**1.4 试剂** 高糖 DMEM 培养基(批号 8111100),无糖 DMEM 培养基(批号 933304),青霉素-链霉素(批号 847137)为 Gibco 公司产品;胎牛血清(批号 NVJ0313),马血清(批号 AVJ82494)为 HyClone 公司产品;0.25% 胰酶(批号 10090801),磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline, PBS,批号 10123001)为杭州吉诺生物医药技术有限公司产品;四甲基偶氮唑盐(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT,批号 2497B516)为 Sigma 公司产品;二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO,批号 1948B407)为 Amresco 公司产品。

**1.5 仪器设备** HW0301T-VBA 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Harris 公司),3131 型三气培养箱(美国 Thermo Scientific 公司),LX70 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司),Multiskan MK3 型酶标仪(美国 Thermo Scientific 公司),AE200 型 AE200 型电子分析天平(美国 Mettler 公司)。

## 2 方法

**2.1 补阳还五汤含药血清的制备** 根据补阳还五汤临床用量按“等效剂量的直接换算法”<sup>[7]</sup>计算出新西兰兔用药量。将普通级新西兰兔 4 只随机分为 2 组,每组 2 只。含药血清组给药剂量为临床等效剂量的 5 倍即  $2.875 \times 10^4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,用已配置好的补阳还五汤药液  $15 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ ig}$ ;空白血清组则以蒸馏水  $15 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ ig}$ 。家兔给药次数和时间间隔参考文献[8]:ig 前禁食 12 h,连续 ig3 次,第 1,2 次间隔

20 h, 第 2, 3 次间隔 4 h。末次给药 1 h 后, 无菌条件下取耳中央动脉血 15 mL, 室温静置 1 h, 2 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 30 min 分离血清, 同组血清混匀, 于 56 °C 水浴 30 min 灭活处理, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 用一次性冻存管分装置 -80 °C 冰箱保存备用。

**2.2 细胞培养** 复苏后的 PC12 细胞接种于含 5% 胎牛血清, 5% 马血清的高糖 DMEM 培养基中, 于 37 °C, 95% 空气, 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱内培养。根据细胞生长情况, 2~3 d 传代 1 次。取对数生长期的 PC12 细胞, 经 0.25% 胰蛋白酶消化、离心、完全培养基重悬后, 调整细胞密度为 1 × 10<sup>6</sup> 个/mL, 按每孔 100 μL 接种在 96 孔培养板内培养。每块 96 孔板四周边孔均用 PBS 液 100 μL 填充, 以防止“边缘效应”。

**2.3 模型制备及实验分组** 造模方法参考文献[9-10], 根据实验室条件和实验内容略有改动。实验分为正常组、对照组、模型组、药物组。正常组 PC12 细胞于 96 孔培养板内培养 48 h 后, 终止实验进行指标观察。其余各组细胞弃上清更换培养基, 对照组加入含空白血清的高糖 DMEM 培养基 100 μL, 置原培养箱内继续培养; 模型组加入含空白血清的无糖 DMEM 培养基 100 μL, 药物组加入含药物血清的无糖 DMEM 培养基 100 μL, 置 37 °C, 94% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> 的三气培养箱内培养。为消除家兔空白血清及其他非药物因素的干扰, 本实验对不同浓度的药物组均设置相应的对照组和模型组, 使对照组、模型组、药物组的血清和时间条件达到均衡。根据更换培养基中血清浓度的不同, 每组再细分为 5%, 10%, 20% 血清组。各组分设 3 个复孔, 另设调零孔 (仅加入相应培养基, 无细胞), 实验重复 3 次。

**2.4 细胞形态学观察** 倒置显微镜下观察各组细胞的生长情况和形态变化, 运用图像采集系统拍照记录同一时间的各组细胞形态。

**2.5 细胞活力检测** 采用 MTT 法, 正常组于 PC12 细胞接种至 96 孔培养板内培养 48 h 后检测, 其余各组分别在含药血清作用 12, 18, 24 h 时检测。每孔加入 MTT 溶液 (5 g·L<sup>-1</sup>) 20 μL, 于 37 °C, 95% 空气, 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱内避光孵育 4 h 后, 吸弃上清, 每孔加入 DMSO 150 μL, 振摇 5 min 使甲瓚结晶完全溶解, 用酶标仪检测各孔 492 nm 处的吸光度 (A)。以 A 和细胞存活率反映细胞活力。

细胞存活率 = 模型组或药物组 A / 正常组 A × 100%

**2.6 统计学分析** 应用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析, 定量指标数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 两样本均数

的比较采用 *t* 检验, 多样本均数的比较采用单因素方差分析, 以  $\alpha = 0.05$  (双侧) 为检验水准,  $P < 0.05$  时为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 补阳还五汤含药血清对 OGD 损伤 PC12 细胞形态的影响** 倒置显微镜下观察, 对照组细胞数量较正常组增加, 除此之外两组细胞形态无明显差异; 而对照组、模型组、药物组 3 组细胞形态之间存在较大差异, 以含药血清作用 12 h 时的同时期各组细胞图片作为示意图进行比较说明。见图 1。

**3.1.1 对照组细胞形态** PC12 细胞形态正常, 呈梭形或多角形, 贴壁成簇生长, 细胞折光性好、数量多, 突起较长、较多并相互交织, 细胞互联呈网状。随培养基中空白血清浓度的升高和培养时间的延长, 细胞数量有所增加。

**3.1.2 模型组细胞形态** 与同浓度的对照组相比, OGD 损伤后的 PC12 细胞回缩变圆、脱壁聚集, 部分细胞漂浮, 细胞折光性下降、数量减少, 突起变短、减少或消失, 细胞排列紊乱。随培养基中空白血清浓度的降低和造模时间的延长, 细胞损伤程度有所加重。

**3.1.3 药物组细胞形态** 与同浓度的模型组相比, 5%, 10% 含药血清组细胞损伤明显减轻, 细胞生长密集、交叉成网, 形态接近对照组, 仅细胞数量较对照组稍减少、细胞突起较对照组稍粗短、细胞连接较对照组稍紊乱, 并随培养基中补阳还五汤含药血清浓度的增加和作用时间的延长细胞损伤程度进一步减轻; 但 20% 含药血清组细胞损伤严重, 细胞圆缩聚集、折光性骤降、突起减少, 细胞数量随作用时间的延长稍有增加, 提示 20% 含药血清可能对细胞具有毒性作用。

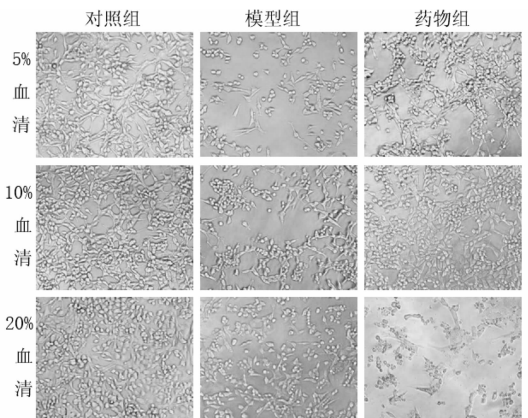


图 1 补阳还五汤含药血清对 OGD 损伤 PC12 细胞形态的影响 (100 ×)

**3.2 补阳还五汤含药血清对 OGD 损伤 PC12 细胞活力的影响** MTT 法检测结果显示,与同时间同浓度的对照组相比,模型组细胞活力显著降低 ( $P < 0.01$ );与同时间同浓度的模型组相比,5%,10% 含药血清组细胞活力显著增加 ( $P < 0.01$ ),而 20% 含药血清组细胞活力在含药血清作用 12 h 时降低 ( $P < 0.01$ ),24 h 时升高 ( $P < 0.01$ )。这说明 5%,10% 补阳还五汤含药血清能显著提高 OGD 损伤 PC12 细胞活力,而 20% 补阳还五汤含药血清早期对细胞活力无明显保护作用,但随着作用时间延长表现出对细胞的保护作用。见表 1。

表 1 补阳还五汤含药血清对 OGD 损伤 PC12 细胞活力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	血清体积分数 /%	A		
		12 h	18 h	24 h
对照	5	1.185 ± 0.028	1.404 ± 0.023	1.437 ± 0.038
模型	5	0.613 ± 0.011 <sup>1)</sup>	0.520 ± 0.033 <sup>1)</sup>	0.403 ± 0.024 <sup>1)</sup>
补阳还五汤	5	0.710 ± 0.016 <sup>2)</sup>	0.830 ± 0.026 <sup>2)</sup>	0.883 ± 0.042 <sup>2)</sup>
对照	10	1.399 ± 0.014	1.525 ± 0.034	1.625 ± 0.027
模型	10	0.687 ± 0.032 <sup>1)</sup>	0.639 ± 0.017 <sup>1)</sup>	0.564 ± 0.031 <sup>1)</sup>
补阳还五汤	10	0.895 ± 0.012 <sup>2)</sup>	0.921 ± 0.015 <sup>2)</sup>	0.951 ± 0.032 <sup>2)</sup>
对照	20	1.690 ± 0.028	1.796 ± 0.051	1.812 ± 0.037
模型	20	0.855 ± 0.030 <sup>1)</sup>	0.716 ± 0.021 <sup>1)</sup>	0.637 ± 0.012 <sup>1)</sup>
补阳还五汤	20	0.626 ± 0.014 <sup>2)</sup>	0.699 ± 0.015 <sup>2)</sup>	0.740 ± 0.019 <sup>2)</sup>

注:与同浓度同时时间的对照组相比<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与同浓度同时时间的模型组相比<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

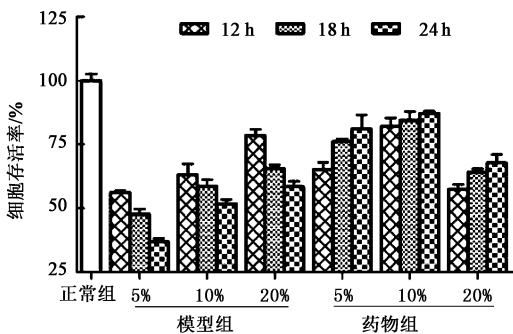


图 2 不同浓度的补阳还五汤含药血清对 PC12 细胞活力的影响

#### 4 讨论

PC12 细胞株来源于大鼠的肾上腺嗜铬细胞瘤细胞,其细胞形态和功能都接近神经元,被广泛应用于神经系统疾病的体外研究<sup>[11]</sup>。OGD 损伤 PC12 细胞可在体外模拟体内脑缺血对神经细胞的损伤<sup>[12]</sup>。本实验于三气培养箱中通入氮气和二氧化碳混合气体造成缺氧环境,并结合无糖培养基制备 PC12 细胞 OGD 损伤模型,结果显示,模型组细胞圆缩脱落、数量减少,其活力显著低于对照组,提示以

以存活率进行模型组和药物组组内及组间细胞活力的比较,结果显示,同一浓度模型组的 PC12 细胞随 OGD 损伤时间的延长其细胞活力降低(组间比较  $P < 0.01$ ),同一时间模型组的 PC12 细胞随空白血清浓度的增加其细胞活力增加(组间比较  $P < 0.01$ ),但均小于同时间同浓度的药物组;同一浓度药物组的 PC12 细胞随补阳还五汤含药血清作用时间的延长其细胞活力增加(组间比较  $P < 0.01$ ),同一时间 5%、10% 浓度的药物组随含药血清浓度的增加其细胞活力也增加,且高于 20% 浓度的药物组(组间比较  $P < 0.01$ )。见图 2。

OGD 诱导 PC12 细胞损伤模型造模成功。

研究发现,补阳还五汤能够抑制脑缺血再灌注损伤神经细胞的凋亡、促进脑缺血后神经干细胞的迁移,其作用机制可能为上调 Bcl-2/Bax 比值和保护线粒体<sup>[13]</sup>、干预细胞内  $Ca^{2+}$  浓度及细胞  $Ca^{2+}$  通道的开放<sup>[14]</sup>、抑制 p38MAPK 磷酸化及环氧合酶-2 蛋白的表达<sup>[15]</sup>、上调基质细胞衍生因子 1 蛋白的表达<sup>[16]</sup>,提示补阳还五汤可能对缺血损伤神经细胞具有保护作用。本实验采用类神经细胞缺血模型,在细胞形态学观察中发现,OGD 过程中加入 5%,10% 补阳还五汤含药血清的 PC12 细胞形态接近于有氧有糖条件下培养的 PC12 细胞,其损伤程度明显轻于未加含药血清的模型组和 20% 的药物组。这表明 5%,10% 补阳还五汤含药血清能够减轻 OGD 对 PC12 细胞的形态损伤;同时在细胞活力检测中发现,5%,10% 补阳还五汤含药血清可显著提高 OGD 损伤 PC12 细胞的活力。本实验从细胞水平证实了一定浓度的补阳还五汤含药血清对 OGD 损伤 PC12 细胞的形态和活力具有保护作用,其作用机制将在后续实验中进一步探讨。

与模型组 PC12 细胞相比,加入 20% 补阳还五汤含药血清作用 12 h 其细胞活力反而降低,其原因可能有两点:一是含药血清浓度过高,超出了补阳还五汤安全用量的极限,表现出对细胞的毒性作用;二是高浓度的含药血清加入到培养基中,改变了原培养基合适的 pH 值及渗透压等,细胞生存环境变化导致细胞损伤。随作用时间的延长 20% 含药血清组的细胞形态和活力较模型组有所改善,但均不及 5%, 10% 含药血清组。推测 20% 补阳还五汤含药血清的这种双向调节作用可能与细胞适应相关,随时间延长细胞适应新的生存环境后,补阳还五汤对 OGD 损伤 PC12 细胞的保护作用就显现出来,但这种双向调节作用需要进一步验证。

[致谢]感谢广州中医药大学第一附属医院实验中心对本实验给予的大力支持与帮助。

### [参考文献]

- [ 1 ] 潘树义,王苏平,钟世镇. 神经细胞损害机制和保护治疗的若干进展[J]. 国外医学:脑血管疾病分册, 2001,9(1):24.
- [ 2 ] 王清任. 医林改错[M]. 北京:人民卫生出版社, 2005:36.
- [ 3 ] 陈冬,杨洁红. 补阳还五汤抗脑缺血作用的研究进展[J]. 中华中医药学刊,2010,28(1):72.
- [ 4 ] 曲宏达,佟丽,沈剑刚,等. 补阳还五汤药物血清对体外培养大鼠皮层神经元缺氧后 p53 和 p21 表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2004,24(2):133.
- [ 5 ] 郭咏霞,吴正治,张继平. 补阳还五汤含药血清对缺氧损伤 PC12 细胞的保护作用[J]. 中医药导报, 2010,16(10):80.
- [ 6 ] 邹纯朴,陈晓,杨柳. 补阳还五汤含药脑脊液对受损皮质神经细胞应急反应的调节作用[J]. 四川中医, 2008,26(11):9.
- [ 7 ] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2001:203.
- [ 8 ] 徐海波,李彩君. 中药血清药理学方法探讨[J]. 中国中医基础医学杂志,1999,5(8):13.
- [ 9 ] Huang H M, Yu J Y, Ou H C, et al. Effect of naloxone on the induction of immediately early genes following oxygen-and glucose-deprivation in PC12 cells [ J ]. Neuroscience Letters, 2008, 438(2): 252.
- [ 10 ] Kritis A, Pourzitaki C, Klagas I, et al. Proteases inhibition assessment on PC12 and NGF treated cells after oxygen and glucose deprivation reveals a distinct role for aspartyl proteases [ J ]. PLoS One, 2011, 6 ( 10 ):e25950.
- [ 11 ] Westerink R H, Ewing A G. The PC12 cell as model for neurosecretion [ J ]. Acta Physiologica ( Oxf ), 2008, 192(2):273.
- [ 12 ] 江伟,温恩懿,龚敏,等. ATRA 和 9-cis-RA 对缺氧缺糖损伤 PC12 细胞凋亡的影响[J]. 第三军医大学学报,2010,32(24):2595.
- [ 13 ] 王新高,童萼塘,孙圣刚. 补阳还五汤对脑缺血再灌注大鼠皮质神经细胞凋亡的影响[J]. 中国比较医学杂志,2005,15(6):363.
- [ 14 ] 关莉,闫福曼,张晓东,等. 补阳还五汤对全脑缺血模型大鼠再灌注不同时点皮质神经细胞钙超载的影响[J]. 安徽中医学院学报,2008,27(4):45.
- [ 15 ] 孙立倩,赵雅宁,李建民,等. 补阳还五汤对大鼠脑缺血/再灌注后 p38MAPK 磷酸化、COX2 表达的影响[J]. 中国现代医学杂志,2010,20(10):1450.
- [ 16 ] 苏晓慧,孔祥英,庞宗然,等. 补阳还五汤对大鼠局灶性脑缺血后神经干细胞迁移的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(6):159.

[责任编辑 聂淑琴]