

含当归芍药散筒方脑脊液对神经细胞的保护作用

马丽君^{1,2}, 马科³, 李霞², 王燕蓉^{2,4}, 田建英^{2*}

- (1. 宁夏医科大学总医院 宁夏人类干细胞研究所, 银川 750004;
2. 宁夏医科大学基础学院, 银川 750004; 3. 宁夏医科大学中医学院, 银川 750004;
4. 宁夏医科大学生育力保持省部共建教育部重点实验室, 银川 750004)

[摘要] **目的:** 探讨含当归芍药散筒方脑脊液的神经保护作用及其可能的机制。**方法:** 采用 FeSO_4 和 H_2O_2 作用产生自由基的方法诱导建立 PC12 细胞氧化损伤模型, 分别用当归芍药散筒方 ($0.135 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$) ig 家兔 ($1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 于 1, 14 d 时取脑脊液添加于培养液中 (每组分 5%, 10%, 20% 3 个体积分数) 处理 PC12 细胞, MTT 法测定细胞活性, 硫代巴比妥酸 (TBA) 比色法测定丙二醛 (MDA) 含量, 黄嘌呤氧化酶法测定超氧化物歧化酶 (SOD) 活力, 甲基百里香酚蓝 (MTB) 比色法测定细胞内 Ca^{2+} 水平, 免疫细胞化学法测定 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体 (nAChR) 阳性表达, BCA 蛋白定量及斑点印迹法测定 $\alpha 7$ nAChR 亚单位水平。**结果:** 含 20% 当归芍药散筒方脑脊液对 PC12 细胞活性 (以吸光度表示, A) 1 d 组 (1.241 ± 0.117) 和 14 d 组 (1.297 ± 0.213) 与损伤组 (0.986 ± 0.051) 比较能明显增加 PC12 细胞活性 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)、显著提高 SOD 活力 (19.48 ± 0.34), (19.52 ± 0.33) $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对 (18.18 ± 0.12) $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($P < 0.01$), 有效降低 MDA 含量及细胞内 Ca^{2+} 水平均降低, 与损伤组比较 $P < 0.01$; 明显上调 $\alpha 7$ nAChR 的表达, 14 d 组与 1 d 组比较有显著性差异 ($P < 0.05$)。**结论:** 当归芍药散筒方对 FeSO_4 和 H_2O_2 诱导建立 PC12 细胞氧化损伤模型具有保护作用, 其机制与保护 $\alpha 7$ nAChR 有关。

[关键词] 老年性痴呆; 当归芍药散筒方脑脊液; $\alpha 7$ nAChR

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)09-0165-04

[DOI] CNKI:11-3495/R.20120224.1733.002 **[网络出版时间]** 2012-02-24 17:33

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120224.1733.002.html>

The Protective Effect of Cerebrospinal Fluid Containing Optimized Danggui Shaoyao San on PC12 Cell Injury Induced by $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$

MA Li-jun^{1,2}, MA Ke³, LI Xia², WANG Yan-rong^{2,4}, TIAN Jian-ying^{2*}

- (1. Ningxia Human Stem Cell Institute, the General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 2. College of Basic Medical Science, Ningxia Medical University, Yinchuan, 750004, China; 3. College of Traditional Chinese Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan, 750004, China; 4. The Major Laboratory of Fecundity Preserve Affiliated to Province-ministry Co-construct, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the protective effect of cerebrospinal fluid (CSF) with the optimized Danggui Shaoyao San (FBD) and its underlying mechanisms. **Method:** PC12 cells were treated with $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ to reproduce the cell injury model. The rabbits were randomly divided into 1 d group and 14 d group and they were given FBD by intragastric administrate. PC12 cells were treated with different concentrations of CSF containing FBD (5%, 10%, 20%). Cell survival was assessed by Thiazolyl blue (MTT) assay. The content of maleic diadehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) activity were determined respectively by thiobarbituric acid

[收稿日期] 20110928(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81060231,81160338);国家中医药管理局项目(04-05zp62)

[第一作者] 马丽君, 硕士, 技师, 从事神经干细胞基础研究, Tel:0951-6743751, E-mail:MLJ2026@hotmail.com

[通讯作者] * 田建英, 教授, 从事老年痴呆的发病机制及防治研究, Tel:13469594687, E-mail:jianningt@hotmail.com

and xanthine oxidation enzyme. The Ca^{2+} content within cell was measured by MTB colorimetry. The protein expression of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) was examined by using immunocytochemical detecting kit, bicinchoninic acid (BCA) protein kit and Dot blot assay. **Result:** The 20% group for 1 day (1.241 ± 0.117) and 14 days (1.297 ± 0.213) of FBD improved the survival of the PC12. The content of SOD increased from (18.18 ± 0.12) $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ in the 20% group for 1 d to (19.48 ± 0.34) $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ and 14 d (19.52 ± 0.33) $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($P < 0.01$). In addition, $\alpha 7$ nAChR in PC12 cells was significantly up-regulated. The expression of $\alpha 7$ nAChR in 20% group for 14 d (0.161 ± 0.024) was significantly higher than that in the group for 1 d (0.132 ± 0.021) ($P < 0.05$). These groups reduced MDA and Ca^{2+} within cell from (3.26 ± 0.13) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, (74.89 ± 3.66) $\text{nmol}/10^5$ cell and (2.77 ± 0.05) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, (74.25 ± 2.64) $\text{nmol}/10^5$ cell to (4.41 ± 0.23) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, (82.42 ± 4.25) $\text{nmol}/10^5$ cells). **Conclusion:** The CSF containing FBD can prevent from the neurotoxicity induced by $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$. It may be related to $\alpha 7$ nAChR up-regulation.

[Key words] Alzheimer's disease (AD); FBD CSF; $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor (nAChR)

近年研究报道当归芍药散可以减轻 AD 病人认知功能紊乱^[1-2]。当归芍药散精简方(FBD),由茯苓(F)、白术(B)、当归(D)组成,从经典方“当归芍药散”筛选优化而来^[3]。研究表明 FBD 具有良好的抗脑缺血、改善脑微循环作用;对不同机制所致的小鼠和大鼠记忆功能障碍有明显的改善作用,可用于脑缺血性疾病的预防和治疗。Nordberg 等在 AD 病人脑组织活检以及活体 PET 分析显示 $\alpha 4, \alpha 3, \alpha 7$ 受体亚型位点数降低,但只有 $\alpha 7$ 亚型 mRNA 水平有明显改变,认为 $\alpha 7$ 亚型特异性改变与 AD 早期记忆力改变等密切相关。本实验拟以 $\alpha 7$ nAChR 为靶点探讨 FBD 对 PC12 细胞损伤的作用机制,探讨 AD 预防和早期治疗新途径。

1 材料

1.1 动物和细胞 清洁级大耳白家兔 36 只,体重 1.8 ~ 2.2 kg,雌雄各半,由宁夏医科大学实验动物中心提供,合格证号医动字 13-104;PC12 细胞(大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞),购自中科院上海细胞所。

1.2 试剂和药物 兔抗人 $\alpha 7$ 多克隆抗体(Santa Cruz),S-P 试剂盒(福州迈新生物工程有限公司),MDA 检测试剂盒、SOD 检测试剂盒、钙离子测定试剂盒(南京建成生物化学有限公司),DAB 染色试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司),ND(nimodipine,尼莫地平 50 mg/支,批号 100270-200002)购于中国药品生物制品鉴定所,中药材购自宁夏午阳中西药有限公司:茯苓(产地云南,批号 061001),白术(产地浙江,批号 061101),当归(产地甘肃,批号 070401)。

1.3 仪器 S721 型分光光度计(上海),302 型二氧化碳孵育箱(SHELLAB,美国),LG15-W 离心机(北京),RC5C 高速低温冷冻离心机(Sorvall,美

国),Olympus CHC-212 型光学显微镜(日本),Motic images advanced 3.2 图像分析系统,550 型酶标仪(BIO-RAD)。

2 方法

2.1 当归芍药散精简方(FBD)水煎剂制备 当归 3 g,茯苓 10 g,白术 5 g,合计 18 g;3 付混合加水 900 mL 冷浸 1 h,文火煮沸 30 min,倒出滤液 250 mL,第二次加水 500 mL 武火煮沸 20 min,合并 2 次滤液,浓缩至生药含量为 $0.135 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,4 °C 保存备用^[4]。

2.2 当归芍药散精简方脑脊液的制备 以临床成人剂量的 10 倍($0.9 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$)给家兔 ig 当归芍药散精简方浓缩煎液($1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),1 d 和 14 d,2 次/d,间隔 4 h,末次给药后 1.5 h 经枕骨大孔采集脑脊液。同组混合,-80 °C 保存备用。

2.3 细胞培养与实验分组 PC12 细胞,用 10% 小牛血清,青-链霉素各 10 万单位的 DMEM 培养基在 37 °C 5% CO_2 培养箱中培养,3 d 换液,每周传代 1 次。细胞进入对数生长期时,以 $1 \times 10^4/\text{mL}$ 密度接种于 96 孔板中。实验分为 ① 对照组(CON 组):加入 20% 的正常脑脊液。② $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ 处理组(FR 组):加入 20% 的正常脑脊液 + $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{FeSO}_4$ 和 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ 处理。③ ND + $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ 组:ND 终浓度为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。④ 含当归芍药散精简方 1 d 脑脊液 + $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ 组:分别加入 5%,10%,20% 的简方 1 d 脑脊液(FBD 1 d 5%,10%,20% + FR 组)。⑤ 含当归芍药散精简方 14 d 脑脊液 + $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ 组:分别加入 5%,10%,20% 的简方 14 d 脑脊液(FBD 14 d 5%,10%,20% + FR 组),培养 48 h 进行指标测定。

2.4 测定 PC12 细胞活性 终止反应前 4 h,每孔

加入 10 μL 的 5 g·L⁻¹ MTT,吸弃培养液,每孔加入 100 μL 的二甲基亚砷(DMSO)振荡 10 min,于酶联免疫监测仪上检测各孔的吸光度(A_{490 nm})。

2.5 SOD, MDA 检测方法 取细胞培养液,黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活性;TBA 法测定 MDA 含量。

2.6 PC12 细胞内 Ca²⁺ 水平测定 收集测定 MDA 含量和 SOD 活力的细胞,匀浆,采用 MTB 比色法检测细胞内 Ca²⁺ 水平。

2.7 PC12 细胞 α7nAChR 的阳性表达 细胞进入对数生长期时,以 4 × 10⁴/mL 密度接种于 24 孔板中,24 h 后取出盖玻片进行免疫组化染色,一抗兔抗人 α7 多克隆抗体(1:150 稀释),阴性对照加 PBS 液;光镜下进行形态学观察,阳性表达为细胞膜着色,显示为棕色。结果分析方法:采用 Motic images advanced3.2 图像分析系统,每组 6 张,每张连续选取 3 个视野,进行统计分析。

2.8 蛋白定量 BCA 蛋白浓度测定试剂盒:稀释对照品,将待测样品分别加入 96 孔板中,37 °C 孵箱作用 30 min,检测其吸光值(A),检测波长为 562 nm,根据标准曲线计算不同样品组细胞总蛋白的含量。

2.9 Dot-blot 检测 α7nAChR 亚单位蛋白水平 取定量后的细胞蛋白样品点膜,PBS 洗膜 Tween-200 的 PBS 封闭,将膜放入稀释的抗体(α7nAChR 1:500)中,4 °C 过夜。洗膜 3 次,加入 HRP 标记的二抗,DAB 显色 5 min,膜片自然晾干,扫描后进行灰度分析。

2.10 统计学方法 所有检测结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 13.0 统计软件包统计分析,以单因素方差分析和组间 *t* 检验进行统计学处理。*P* < 0.05 有统计学意义。

3 结果

3.1 含 FBD 脑脊液对 PC12 细胞活性的影响 MTT 检测结果:FR 组细胞活性明显低于正常对照组(*P* < 0.01),预先加入 ND 处理细胞后,结果显示与 FR 组比较,ND 组细胞活性明显升高(*P* < 0.05)。预先加入 FBD 脑脊液后,与 FR 组比较,细胞活性明显改善,并呈剂量、时间依赖性增强。其中 1 d FBD 20% 组及 14 d 20% 组细胞活性明显增加(*P* < 0.05, *P* < 0.01)(表 1)。

3.2 含 FBD 脑脊液对 MDA 含量和 SOD 活力及细胞内 Ca²⁺ 水平的影响 损伤组 MDA 含量明显高于对照组(*P* < 0.01);预先加入 FBD 脑脊液后,MDA 含量增加幅度降低,与 FR 组比较,培养液中 MDA

表 1 FBD 脑脊液对 PC12 细胞活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	A _{490 nm}
对照组	1.298 ± 0.085
损伤组(FR)	0.986 ± 0.051 ¹⁾
ND + FR	1.192 ± 0.081 ²⁾
1 d FBD 5% + FR	1.065 ± 0.072
14 d FBD 5% + FR	1.107 ± 0.081
1 d FBD 10% + FR	1.111 ± 0.097
14 d FBD 10% + FR	1.112 ± 0.113
1 d FBD 20% + FR	1.241 ± 0.117 ²⁾
14 d FBD 20% + FR	1.297 ± 0.213 ³⁾

注:与对照组比较¹⁾ *P* < 0.01;与损伤组比较²⁾ *P* < 0.05,³⁾ *P* < 0.01;与 1 d 含 FBD 20% 组比较⁴⁾ *P* < 0.05(表 2~3 同)。

含量呈剂量、时间依赖性地降低;FR 组 SOD 活力明显低于对照组(*P* < 0.01);预先加入 FBD 脑脊液后,与 FR 组比较,培养液中 SOD 活性下降幅度减小,其中 1 d FBD 20% 组,14 d FBD 10% 组、20% 组增加明显(*P* < 0.01)。预先加入 10 μmol·L⁻¹ ND,细胞内 Ca²⁺ 水平明显低于 FR 组(*P* < 0.01)。预先加入 FBD 脑脊液后,与 FR 组比较,细胞内 Ca²⁺ 增加量呈剂量、时间依赖性地减少(表 2)。

表 2 含 FBD 脑脊液对 PC12 细胞培养液中 MDA 含量和 SOD 活性及细胞内 Ca²⁺ 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	MDA	SOD	Ca ²⁺
	/mmol·L ⁻¹	/U·mL ⁻¹	/nmol/10 ⁵ cells
对照组	2.83 ± 0.05	19.57 ± 0.26	58.35 ± 3.68
损伤组(FR)	4.41 ± 0.23 ¹⁾	18.18 ± 0.12 ¹⁾	82.42 ± 4.25 ¹⁾
ND + FR	4.34 ± 0.07	18.31 ± 0.01	64.33 ± 3.37 ³⁾
1 d FBD 5% + FR	4.37 ± 0.27	18.30 ± 0.09	79.46 ± 3.41
14 d FBD 5% + FR	4.23 ± 0.31	18.28 ± 0.11	77.97 ± 2.64
1 d FBD 10% + FR	3.42 ± 0.21 ²⁾	18.90 ± 0.24	76.55 ± 3.81
14 d FBD 10% + FR	2.98 ± 0.18 ³⁾	19.37 ± 0.12 ³⁾	76.23 ± 3.48
1 d FBD 20% + FR	3.26 ± 0.13 ²⁾	19.48 ± 0.34 ³⁾	74.89 ± 3.66 ³⁾
14 d FBD 20% + FR	2.77 ± 0.05 ³⁾	19.52 ± 0.33 ³⁾	74.25 ± 2.64 ³⁾

3.3 α7nAChR 免疫细胞化学法和 Dot blot 蛋白定量分析 细胞图像和 Dot blot 蛋白定量分析(表 3)显示,FR 组 α7nAChR 亚单位蛋白水平低于对照组(*P* < 0.01),合并加入 ND 后,其下降程度明显得到抑制(*P* < 0.05)。FBD 脑脊液预处理组 α7nAChR 亚单位蛋白水平升高,并随脑脊液浓度的升高和时间的延长呈梯度递增趋势,1 d 或 14 d 20% 组显著(*P* < 0.01),14 d 组脑脊液和 1 d 组脑脊液相同浓度比较,20% 组明显升高(*P* < 0.05)。

表 3 含 FBD 脑脊液对 PC12 细胞 $\alpha 7nAChR$ 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	$\alpha 7nAChR$	$A_{490\text{ nm}}$
对照组	0.238 ± 0.043	0.603 ± 0.025
损伤组 (FR)	0.091 ± 0.027 ¹⁾	0.219 ± 0.016 ¹⁾
ND + FR	0.125 ± 0.033 ²⁾	0.416 ± 0.020 ²⁾
1 d FBD 5% + FR	0.093 ± 0.032	0.259 ± 0.012
14 d FBD 5% + FR	0.093 ± 0.010	0.275 ± 0.031
1 d FBD 10% + FR	0.105 ± 0.033	0.290 ± 0.024
14 d FBD 10% + FR	0.102 ± 0.040	0.312 ± 0.013
1 d FBD 20% + FR	0.132 ± 0.021 ³⁾	0.424 ± 0.035 ³⁾
14 d FBD 20% + FR	0.161 ± 0.024 ⁴⁾	0.452 ± 0.029 ⁴⁾

4 讨论

在 AD 病人脑组织中含 nAChRs 胆碱能神经元大量丢失是其最突出的病理特征,本课题组以往研究结果显示低于 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 FeSO_4 可引起 PC12 细胞 [¹²⁵I] α -Bungarotoxin 和 [³H] Epibatidine 结合位点数量,甚至 $\alpha 3\alpha 7$ 亚单位蛋白, $\alpha 7mRNA$ 基因转录水平的改变,证实 nAChR 的缺失确与 Fe^{2+} 的增高有关,而且,早于细胞凋亡、坏死的发生^[5]。 Fe^{2+} 和 $\alpha 7AChR$ 的相互作用可引起 Ca^{2+} 通道的开放,导致大量细胞外 Ca^{2+} 内流,使细胞内 Ca^{2+} 超载。 $\text{H}_2\text{O}_2 / \text{Fe}^{2+}$ 反应产生 $\text{HO} \cdot$ 引发脂质过氧化链式反应,产生大量自由基,导致细胞膜脂质过氧化生成增多,破坏细胞膜结构的完整性,进一步引起 $\alpha 7nAChR$ 的缺损,细胞膜通透性增加,细胞外 Ca^{2+} 进入细胞内,激活钙依赖性蛋白激酶,使细胞内自由基生成增多。尼莫地平是第二代电压依赖性钙通道阻滞剂,可通过阻断细胞外钙内流,保证细胞内钙稳定,维持细胞正常生理功能^[6]。

本实验结果显示 $\text{H}_2\text{O}_2 / \text{Fe}^{2+}$ 加入后, $\alpha 7nAChR$ 明显下调,同时细胞内 Ca^{2+} 含量明显增加,表明 $\alpha 7nAChR$ 缺损与 Ca^{2+} 通道异常开放伴行发生。预先加入含当归芍药散简方脑脊液后,与 $\text{H}_2\text{O}_2 / \text{Fe}^{2+}$ 处理组比较,细胞内 Ca^{2+} 增加量呈剂量、时间依赖性地减少,高剂量组细胞内 Ca^{2+} 水平显著下降,表明 $\text{H}_2\text{O}_2 / \text{Fe}^{2+}$ 引起的细胞活性下降,与 Ca^{2+} 内流紊乱有关,当归芍药散简方的药效成分能够明显改善细胞活性,其机制可能与抑制 Ca^{2+} 内流有关。

当归芍药散可清除多个脏器组织的自由基^[7],

本实验结果表明, $\text{H}_2\text{O}_2 / \text{Fe}^{2+}$ 产生大量自由基,能损伤神经细胞,使 MDA 含量明显升高 ($P < 0.01$),并降低 SOD 的活性 ($P < 0.01$)。由于氧化系统被激活,防御氧自由基功能受损或降低,氧自由基的大量生成而清除减少,从而引发一定程度的脂质过氧化反应,细胞膜脂质过氧化能引起 PC12 细胞 [¹²⁵I] α 银环蛇毒素结合位点减少,即 $\alpha 7nAChR$ 的减少,预先给予抗氧化剂可对抗这种作用。而 FBD 脑脊液能明显提高 SOD 活性,抑制 MDA 的生成,表明当归芍药散简方的药效成分有抑制脂质过氧化,保护 $\alpha 7nAChR$ 的作用,提示当归芍药散简方为预防和早期治疗 AD 的潜在用药。

[参考文献]

[1] Hu Z Y, Liu G, Yuan H, et al. Danggui-Shaoyao-San and its active fraction JD-30 improve Abeta-induced spatial recognition deficits in mice [J]. J Ethnopharmacol, 2010, 128(2): 365.

[2] Liu J, Wang J S, Kong L Y. Comparative pharmacokinetics of paeoniflorin in plasma of vascular dementia and normal rats orally administrated with Danggui-Shaoyao-San or pure paeoniflorin [J]. J Fitoterapia, 2011, 82(3): 466.

[3] Lin Z H, Yan Y Q, Zhu D N, et al. Protective effects of FBD—an experimental Chinese traditional medicinal formula on memory dysfunction in mice induced by cerebral ischemia-reperfusion [J]. J Ethnopharmacol, 2005, 97(3): 477.

[4] 张启春, 王秋娟. 当归芍药散防治老年期痴呆的物质基础与作用机理研究 VI——当归芍药散精简方含药脑脊液对 PC12 细胞的保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2002, 8(1): 16.

[5] 田建英, 官志忠, Nordberg Agneta, 等. 铁引起的早期 PC12 细胞 nAChRs 缺失及抗氧化剂的干预 [J]. 中国老年学杂志, 2004, 24(7): 635.

[6] 田建英, 杨浩, 马锋. 尼莫地平对胎鼠神经元烟碱型胆碱能受体缺损的干预及意义 [J]. 山东医药, 2005, 45(32): 28.

[7] 孙蓉, 钱晓路, 张丽美. 基于当归有效成分的抗早老性痴呆药理作用及分子机制研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 255.

[责任编辑 聂淑琴]