

当归芍药散防治老年期痴呆的物质 基础与作用机理研究 X

——精简方及其 CO₂ 超临界萃取物对星形胶质细胞缺氧损伤的保护作用

刘 洁, 林志宏, 朱丹妮, 严永清, 余伯阳*
(中国药科大学中药复方研究室, 江苏 南京 210038)

[摘要] 目的: 观察当归芍药散精简方(FBD)及其 CO₂ 超临界萃取物(P₂)对体外培养的大鼠乳鼠皮质星形胶质细胞缺氧损伤的保护作用。方法: SD 大鼠 po FBD 125 mg/kg 或 P₂ 16.3 mg/kg 后, 采集含药脑脊液(CSF-FBD/P₂); MTT 法测定 FBD、P₂ 人工脑脊液(ACSF-FBD/P₂)及其含药脑脊液(CSF-FBD/P₂)对 Na₂S₂O₄ 诱导星形胶质细胞缺氧损伤的保护作用。结果: 1 mmol/L Na₂S₂O₄ 作用 1 h 复氧 4 h 可显著降低星形胶质细胞活力($P < 0.01$); (0.1~1) mg/L ACSF-FBD 和 5%~15% CSF-FBD 可显著促进缺氧损伤星形胶质细胞活力($P < 0.01$); (0.01~1) mg/L ACSF-P₂ 和 15% CSF-P₂ 可极显著或显著促进缺氧损伤星形胶质细胞活力($P < 0.01 \sim 0.05$)。结论: FBD 及其 CO₂ 超临界萃取物对星形胶质细胞缺氧损伤具有保护作用。

[关键词] 当归芍药散精简方; 缺氧; CO₂ 超临界萃取; 脑脊液; 星形胶质细胞

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)08-0014-04

Study X on Chemical Substance and Mechanism of Danggui Shaoyao San in the Prevention and Treatment of Senile Dementia

Protective effect of FBD and CO₂ Supercritical Fluid Extract (P₂) on Astrocyte Anoxic Injury

LIU Jie, LIN Zhi-hong, ZHU Dan-ni, YAN Yong-qing, YU Bo-yang*

(Department of Chinese Medicinal Prescription, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the protective effect of FBD, the simplified formula from Danggui Shaoyao San (DSS), and CO₂ supercritical fluid extract(P₂) on the hypoxic astrocyte anoxic injury. **Methods:** Sampling cerebrospinal fluid containing FBD/P₂(CSF-FBD/P₂) after administration with FBD 125 mg/kg or P₂ 16.3 mg/kg; MTT assay was used to measure the viability in the damaged astrocyte induced by Na₂S₂O₄. **Results:** 1 h hypoxia and 4 h reoxygen significantly decreased the viability in astrocyte($P < 0.01$); (0.1~1) mg/L ACSF-FBD and 5%~15% CSF-FBD can substantially increase the viability of astrocyte induced by Na₂S₂O₄($P < 0.01$); (0.01~1) mg/L ACSF-P₂ and 15% CSF-P₂ can substantially increase the viability of astrocyte($P < 0.01 \sim 0.05$). **Conclusion:** FBD and P₂ could prevent astrocyte from Na₂S₂O₄-induced hypoxic damage, which was beneficial to the treatment of cerebral ischemia.

[Key words] FBD; hypoxia; CO₂ supercritical fluid; cerebrospinal fluid; astrocyte

[收稿日期] 2006-08-28

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30271604&30500683)

[通讯作者] * 余伯阳, Tel: (025) 85391042; E-mail: boyanguy@yahoo.com.cn

星形胶质细胞(Astrocyte)不仅促进大脑生理发育成熟,而且密切参与中枢神经系统(CNS)损伤应答^[1]。近年研究表明,在脑缺血再灌注引起神经元死亡的发生及药物治疗中,星形胶质细胞通过对CNS内环境调节、可塑性以及神经信息传递延缓神

经元的死亡,并促进大脑功能的恢复^[2]。

FBD 源于汉·张仲景《金匱要略》当归芍药散 (Danggui Shaoyao San, DSS),由茯苓、白术与当归组成,具祛湿化痰、益气活血功效,有潜力治疗脑缺血疾病,如中风及其后遗症血管性痴呆^[3,4]。本室早期研究发现,DSS 与 FBD 含药脑脊液对 PC12 细胞损伤具有保护作用^[3,5]。为探讨 FBD 抗脑缺血损伤的作用途径,本研究应用脑脊液药理学方法,在体外培养星形胶质细胞缺氧损伤模型上,进一步考察了 FBD 和 CO₂ 超临界萃取物(P₂)的保护作用。

1 材料

1.1 FBD 与 P₂ 含药人工脑脊液制备^[3] FBD 总提取物及其 CO₂ 超临界萃取物(P₂),由中国药科大学中药复方研究室制备;人工脑脊液(ACSF)(g/L: KCl 0.357 8, KH₂PO₄ 0.163 3, NaHCO₃ 2.1, NaCl 6.896, MgSO₄ 0.144, CaCl₂ 0.144, 葡萄糖 1.982, EDTA-2Na 0.0111 7, pH 7.2~7.4),磁力搅拌分别溶解干燥 FBD 总提物与 P₂(含 0.2% 乙醇与 1% 吐温-80),得 0.1% (m/v) 母液 ACSF-FBD/P₂, 0.22 μm 滤膜过滤除菌,4 °C 下保存备用。

1.2 FBD 与 P₂ 含药脑脊液制备^[6] 雄性 SD 大鼠,po FBD 125 mg/kg 或 P₂ 16.3 mg/kg,每天 2 次,连续 3.5 d,末次给药 1 h 后,水合氯醛(300 mg/kg) ip 麻醉大鼠,75% 酒精消毒颈后部皮毛,弯曲颈部,用 1 mL 无菌注射器,从枕骨大孔刺入延髓池,取 50 μL 脑脊液(cerebrospinal fluid, CSF)后迅速抽出针头,合并澄清透明的 FBD/P₂ 含药脑脊液(CSF-FBD/P₂),4 °C 下 3 000 r/min × 10 min 离心,收集上清,0.22 μm 滤膜过滤除菌,-20 °C 冻存储备用。

1.3 药品与试剂 尼莫地平购于山东新华制药有限公司,批号: 030124; 盐酸氯胺酮注射剂,购于上海中西药业股份有限公司,批号: 990601; 维生素 E 胶丸,购自厦门鱼肝油厂,批号: 10854010; 连二亚硫酸钠(Na₂S₂O₄) 购自南京化学试剂一厂; 高糖 DMEM 培养基,购自 Gibco 公司; 新生牛血清(NCS),购自杭州四季青生物工程公司; 丹曲林、多聚赖氨酸(Poly-L-Lys) MTT,均购自 Sigma 公司; 胶质原纤维酸性蛋白(GFAP) 免疫组化试剂盒购自武汉博士德。

尼莫地平和维生素 E 以 ACSF(0.1% DMSO) 溶解,得 10 μmol/L 母液; 单曲林和氯胺酮以 ACSF 溶解,得 10 μmol/L 母液。0.22 μm 滤膜过滤除菌,4 °C 下保存备用。

1.4 动物 SD 大鼠,雄性,体重(250 ± 20) g; SD 大鼠乳鼠,出生 3 d 内; 购自中国药科大学实验动物中心。

1.5 仪器 HERA 细胞培养箱(德国 Heraeus 公司); XSZ-D 倒置生物显微镜(重庆光学仪器厂); Z323K 冷冻高速离心机(德国 Hermle labor technik 公司); 洁净工作台,苏净集团安泰公司; Sunrise 酶标仪,奥地利 Tecan GmbH 公司; HH-S 电热恒温水浴锅: 江苏省东台市电器厂。

1.6 数据分析 应用 Microsoft Excel 软件的学生氏 *t*-检验,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 方法与结果

2.1 星形胶质细胞的原代培养、纯化及鉴定 原代培养: 主要根据经典的 McCarthy K. D. 与 de Vellis J. 创立的方法^[7],稍加改进。取乳鼠大脑皮层,去除脑膜,剪碎,0.25% 胰蛋白酶消化后,1 000 r/min × 5 min 离心; 含 15% NCS DMEM 培养基终止消化,反复吹打,过细胞筛,收集细胞悬液,调节细胞浓度为 5.0 × 10⁶/L,种入已包被多聚赖氨酸的培养瓶中,置 37 °C 5% CO₂ 培育箱中培养,培养(7~10) d,每 3 d 换液一次。

纯化与鉴定: 换新鲜 DMEM 培养液,正常条件下培养(2~3) h,置 37 °C 恒温摇床 240 r/min 振荡 18 h,倒掉液体,消化贴壁细胞,终止消化,吹打,收集细胞悬液,1 000 r/min × 5 min 离心,15% NCS DMEM 稀释,计数。经 GFAP 免疫组织化学鉴定,星形胶质细胞纯度在 90% 以上。

2.2 MTT 法测定细胞活力 于实验结束前 4 h 加入终浓度为 0.5 g/L 的 MTT,37 °C,5% CO₂ 下作用 4 h 后弃去上清液,每孔加入 DMSO 100 μL,置振荡器上振荡 10 min 使结晶充分溶解,用酶标仪测定 A₅₇₀ 值,观察细胞活力。

2.3 连二亚硫酸钠诱导星形胶质细胞缺氧损伤 待细胞长至 80% 融合度时,以 5 × 10⁴ 个/mL 密度,15% NCS DMEM 接种于多聚赖氨酸处理 96 孔板,每孔 100 μL,5 孔/组,在细胞培养箱内培养 48 h。用无糖 Earle's 溶液(g/L, NaCl 6.80, KCl 0.4, Na₂HPO₄·12H₂O 2.293, NaHCO₃ 2.2, CaCl₂ 0.2, MgSO₄·7H₂O 0.2, 酚红 0.02) 轻轻漂洗 1 次,空白组加入空白 DMEM 100 μL/孔,1 mmol/L 组 2 mmol/L 组 5 mmol/L 组 8 mmol/L 组和 10 mmol/L 组加入对应浓度的 Na₂S₂O₄ 无糖 Earle's 液 100 μL/孔,作用 1 h 后缺氧组换以空

白 DMEM 100 μ L/孔复氧 4 h, MTT 法检测细胞活力。

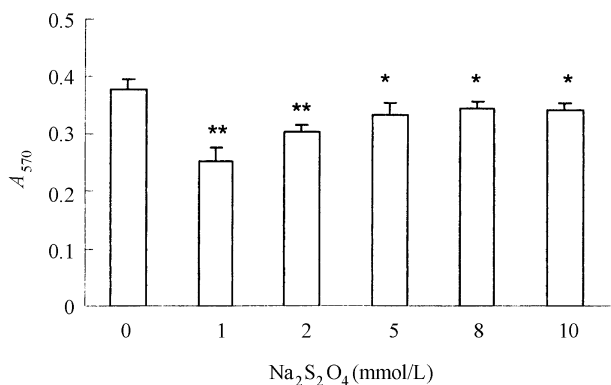


图 1 连二亚硫酸钠诱导星形胶质细胞缺氧损伤($\bar{x} \pm s, n = 5$)

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

图 1 显示, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 在(1~ 10) mmol/L 浓度范围, 可显著降低星形胶质细胞活力, 其中以 1 mmol/L 浓度抑制作用最为显著($P < 0.01$)。

2.4 ACSF-FBD/ P_2 对星形胶质细胞的影响 待细胞长至 80% 融合度时, 以(5×10^4) 个/mL 密度, 15% NCS DMEM 接种于 96 孔板, 每孔 100 μ L, 5 孔/组。培养 48 h 后, 添加(0.01~ 100) mg/L ACSF-FBD/ P_2 或空白 ACSF 与细胞继续共培养 24 h, MTT 法检测细胞活力。

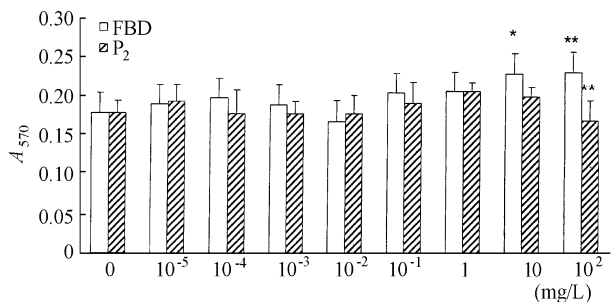


图 2 ACSF-FBD/ P_2 对星形胶质细胞的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

由图 2 可见, 与空白组比较, 在低浓度 1 μ g/L~ 1 mg/L 浓度范围, ACSF- P_2 /FBD 对星形胶质细胞活力无显著影响; 而 ACSF-FBD 在(10~ 100) mg/L 浓度, 可显著促进星形胶质细胞活力($P < 0.01 \sim 0.05$), ACSF- P_2 则在 100 mg/L 对星形胶质细胞活力有显著抑制作用($P < 0.01$)。

2.5 ACSF-FBD/ P_2 对星形胶质细胞缺氧损伤的影响 待细胞长至 80% 融合度时以(5×10^4) 个/mL 密度分别接种于 96 孔板, 每孔 100 μ L, 5 孔/组, 分为空白组; 模型组; (0.01~ 1) mg/L ACSF- P_2 组, (0.01~ 1) mg/L ACSF-FBD 组, 尼莫地平组, 丹曲林组, 氯胺酮组和维生素 E 组。细胞培养 48 h 后, 空白组和造模组换以空白 DMEM 每孔 100 μ L, ACSF- P_2 组换以

含(0.01~ 1) mg/L ACSF- P_2 的 DMEM, ACSF-FBD 组分别换含(0.01~ 1) mg/L ACSF- P_2 的 DMEM, 尼莫地平、丹曲林、氯胺酮和维生素 E 组换以含 1 μ mol/L 药物的 DMEM。作用 2 h 后, 除空白组外全部换以 1 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 处理 1 h, 再换以空白 DMEM 每孔 100 μ L 复氧 4 h。MTT 法检测细胞活力, 并按照公式计算药物对星形胶质细胞的损伤抑制率: 损伤抑制率(%) = (用药组 A_{570} - 空白组 A_{570}) / (正常组 A_{570} - 模型组 A_{570}) $\times 100\%$ 。

表 1 ACSF-FBD/ P_2 对星形胶质细胞缺氧损伤的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	浓度/L	细胞活力(A_{570})	损伤抑制率(%)
正常	—	0.420 \pm 0.011 ²⁾	—
模型	—	0.274 \pm 0.009	—
ACSF- P_2	1 mg	0.288 \pm 0.008 ¹⁾	9.28
	0.1 mg	0.288 \pm 0.009 ¹⁾	9.44
	0.01 mg	0.304 \pm 0.022 ¹⁾	20.0
ACSF-FBD	1 mg	0.311 \pm 0.018 ²⁾	24.5
	0.1 mg	0.309 \pm 0.005 ²⁾	23.5
	0.01 mg	0.283 \pm 0.027	6.30
丹曲林	1 μ mol	0.291 \pm 0.027	11.4
尼莫地平	1 μ mol	0.315 \pm 0.006 ²⁾	27.4
氯胺酮	1 μ mol	0.289 \pm 0.025	9.77
维生素 E	1 μ mol	0.299 \pm 0.019	16.7

与模型组比较,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (下同)

由表 1 可见, 与正常组比较, 经 1 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 处理 1 h 复氧 4 h 后星形胶质细胞活力极显著下降($P < 0.01$), 提示 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 诱导星形胶质细胞缺氧损伤; 与模型组比较, (0.01~ 1) mg/L ACSF- P_2 与(0.1~ 1) mg/L ACSF-FBD 均可显著提高细胞活力($P < 0.01 \sim 0.05$), 抑制缺氧损伤; 尼莫地平、丹曲林、氯胺酮和维生素 E 对星形胶质细胞缺氧损伤均有不同程度保护作用, 且以尼莫地平作用显著($P < 0.01$)。

2.6 CSF-FBD/ P_2 对星形胶质细胞缺氧损伤的影响

待细胞长至 80% 融合度时以 5×10^4 个/mL 密度分别接种于 96 孔板, 100 μ L/孔, 5 孔/组, 分为空白对照组; 模型组; 5%~ 15% (v/v) 空白 CSF 组; 5%~ 15% CSF-FBD 组; 5%~ 15% CSF- P_2 组, 与尼莫地平、丹曲林、氯胺酮和维生素 E 各 1 μ mol/L 组。各组用相应药物共培养 48 h 后, 除空白组外, 全部以 1 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 处理 1 h, 再换以空白 DMEM 100 μ L/

孔复氧 4 h。按 2.5 以 MTT 法检测细胞活力,并计算含药脑脊液对星形胶质细胞的损伤抑制率。

表 2 CSF-FBD/P₂ 对星形胶质细胞缺氧损伤的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	浓度	细胞活力(A_{570})	损伤抑制率(%)
正常	—	0.411 ± 0.013 ²⁾	—
模型	—	0.243 ± 0.014	—
CSF	5%	0.221 ± 0.016	—
	10%	0.245 ± 0.011	—
	15%	0.250 ± 0.006	—
CSF-P ₂	5%	0.256 ± 0.025	20.6
	10%	0.255 ± 0.005	6.22
	15%	0.331 ± 0.024 ³⁾	47.6
CSF-FBD	5%	0.377 ± 0.033 ³⁾	92.3
	10%	0.326 ± 0.015 ³⁾	48.2
	15%	0.291 ± 0.012 ³⁾	24.3
丹曲林	1 μmol/L	0.267 ± 0.008 ²⁾	14.0
尼莫地平	1 μmol/L	0.274 ± 0.012 ²⁾	18.3
氯胺酮	1 μmol/L	0.248 ± 0.016	2.90
维生素 E	1 μmol/L	0.246 ± 0.061	1.71

注:与同浓度空白 CSF 组比较,³⁾ $P < 0.01$

由表 2 可见,与正常组比较,经 1 mmol/L Na₂S₂O₄ 处理 1 h 复氧 4 h 后星形胶质细胞活力极显著下降 ($P < 0.01$),提示 Na₂S₂O₄ 诱导星形胶质细胞缺氧损伤;与同浓度空白 CSF 组比较,15% CSF-P₂ 与 5% ~ 15% CSF-FBD 均可显著提高细胞活力 ($P < 0.01$),抑制缺氧损伤;尼莫地平、丹曲林、对星形胶质细胞缺氧损伤也有显著保护作用。

3 讨论

研究表明,在大脑缺血缺氧损伤中星形胶质细胞比神经元具有更强的耐受能力。在脑缺血早期^[8],缺血 30 min 时,缺血中心区大脑皮质胶质原纤维酸性蛋白阳性细胞数量明显多于非缺血区;缺血 2 h 时,细胞数量进一步增加;缺血 6 h 时细胞固缩,边界不清;24 h 时阳性细胞消失。应用 Na₂S₂O₄ 可造成缺氧损伤,本实验发现,随着 Na₂S₂O₄ 浓度的增加,细胞的死亡率反而有所减小,提示随着缺氧程度的增加,一定范围内,星形胶质细胞抗缺氧能力仍然保持,可缓冲保护自身缺氧损伤。Otter D. 和 Austin C.^[9] 等也发现类似现象,用 Na₂S₂O₄ 对肠系膜进行缺氧实验时,2 mmol/L 的 Na₂S₂O₄ 能够造成明显的缺氧损伤,但是浓度增加到 10 mmol/L 时,仍然只能引起细胞轻微的反应。

药物主要通过血脑屏障(BBB)和 CSF 进入 CNS,说明 CSF 是 CNS 药物的自然载体与作用环境。为考察 FBD 对脑缺血缺氧性损伤的保护作用,本实验

应用脑脊液药理学研究发现,FBD 和其 P₂ 部位含药脑脊液对损伤细胞的修复作用强于药物直接作用,这可能由于两方面的原因:①药物通过体内吸收、代谢和通过血脑屏障的筛选去除杂质干扰成分,对缺氧损伤的有效成分进行富集,避免实验假阴性与假阳性;②含药脑脊液中,可能含有 FBD/P₂ 作用于机体后诱导生成的活性物质,可间接增强 FBD/P₂ 的神经保护作用。

本研究中,尼莫地平、丹曲林、氯胺酮和维生素 E 对星形胶质细胞缺氧损伤均有不同程度保护作用,且以 L-型钙通道阻滞剂尼莫地平、内钙通道阻滞剂丹曲林作用显著。提示,FBD/P₂ 可能通过钙拮抗等途径,发挥抗缺氧作用。

[参考文献]

- [1] Mulligan SJ, Mac Vicar BA. Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions[J]. *Nature*, 2004, 431: 195-199.
- [2] Takuma K., Baba A., Matsuda T.. Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection[J]. *Progress in Neurobiology*, 2004, 72: 111-127.
- [3] 林志宏,朱丹妮,严永清,等.当归芍药散对 β-淀粉样蛋白致 PC12 细胞损伤的保护作用[J]. *中国药科大学学报*, 2005, 36(4): 346-349.
- [4] Lin ZH, Zhu DN, Yan YQ, *et al.* Protective effects of FBD—an experimental Chinese traditional medicinal formula on memory dysfunction in mice induced by cerebral ischemia reperfusion [J]. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005, 97: 477-483.
- [5] 张启春,寇俊萍,朱丹妮,等.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*, 2005, 11(5): 55-58.
- [6] Mascha P. van Den Berg. Serial cerebrospinal fluid sampling in a rat model to study drug uptake from the nasal cavity[J]. *Journal of Neuroscience Methods*, 2002, 116: 99-107.
- [7] McCarthy KD, Develis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell culture from rat cerebral tissue [J]. *Journal of Cell Biology*, 1980, 85(3): 890-902.
- [8] 马文领,马常升,戴维国,等.脑缺血早期星形胶质细胞胶质原纤维酸性蛋白免疫组化的时程变化研究[J]. *解剖学杂志*, 2001, 24(1): 20-23.
- [9] Otter D., Austin C. Hypoxia, Metabolic inhibition, and isolated rat mesenteric tone: influence of arterial diameter [J]. *Microvascular Research*, 2000, 59: 107-114