

• 药理 •

脑脊液药理实验条件规范化初探 ——当归芍药散精简方的神经保护作用

张启春¹, 寇俊萍², 朱丹妮², 王秋娟¹, 严永清^{2*}

(1. 中国药科大学生理教研室, 江苏 南京 210038; 2. 中国药科大学中药复方研究室, 江苏 南京 210009)

[摘要] 目的: 通过观察当归芍药散精简方(FBD)含药脑脊液对过氧化氢所致PC12细胞损伤模型的保护作用, 对脑脊液药理实验条件规范化进行初步探讨。方法: 以MTT法观察不同实验条件下(给药方案、添加量、处理方法、批次及保存时间), FBD大鼠含药脑脊液对过氧化氢损伤的PC12细胞存活率的影响。结果: 过氧化氢损伤的PC12细胞存活率随FBD含药脑脊液添加量增加而提高; 相同添加量多次给药(2次/d×3.5d)含药脑脊液的保护率均高于单次给药的含药脑脊液; 未处理含药脑脊液与经56℃、乙醇、丙酮处理含药脑脊液对PC12细胞均有显著的保护作用($P < 0.01$), 各组保护率无明显差异; 同时观察到不同批次大鼠及不同保存时间的含药脑脊液对受损PC12细胞均有显著保护作用, 但随保存时间的延长, 其保护率下降。结论: 含药脑脊液的制备可采用连续多次给药方案, 无需灭活处理, 一般以体外添加终体积的10%, -20℃冻存不超过30d为宜。

[关键词] 脑脊液药理; 当归芍药散精简方(FBD); 条件规范化

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)08-0010-04

Preliminary Studies on Standardization of Cerebrospinal Fluid Pharmacological Experimental Methods

——Protective Effect of CSF of Optimized Danggui Shaoyao San on PC12 Cells

ZHANG Qi-chun¹, KOU Jun-ping², ZHU Dan-ni², WANG Qiu-juan¹, YAN Yong-qing^{2*}

(1. Department of Physiology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China;

2. Department of Complex Prescription of TCM, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the standard conditions of the cerebrospinal fluid pharmacological method, by investigating the neural protective effect of cerebrospinal fluid(CSF) containing FBD. **Methods:** The effect of rat CSF with FBD on injured PC12 cell induced by hydrogen peroxide was observed by MTT assay under various experimental conditions (dosage regiment, addition level, treatment process). **Results:** The viability of PC12 cell injured by hydrogen peroxide increased with the addition level of CSF with FBD, and at the same addition level (5%, 10%, 20%), CSF of rat after administrating FBD repetitiously (2 times/d) × 3.5 d exerted higher protective efficacy on PC12 cell than that of after administrating FBD once. The raw CSF with FBD and the CSF with FBD treated by heat (56℃), ethanol, acetone all had notable protective effects on PC12 cell ($P < 0.01$), and there was no significant statistical difference among them. Meanwhile, CSF with FBD of different batch of rats and with different preserved time also showed distinct activities, however, protective rate declined with prolonging of the preserved time. **Conclusion:** It is proposed that the CSF containing

[收稿日期] 2007-01-04

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30271604)

[通讯作者] * 严永清, Tel: (025) 85391042; E-mail: yqyan1@sina.com

drugs may be prepared with 10% rat CSF without treating after administrating drugs repetitiously and preserved at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ no more than 30 days.

[**Key words**] cerebrospinal fluid pharmacology; optimized Danggui Shaoyao San (FBD); method standardization

脑脊液药理实验方法学, 是一种新兴的主要评价作用于中枢神经系统药物的药理实验方法学^[1]。有学者认为, 以含药脑脊液代替含药血清观察药物作用, 能避免血清中复杂成分的干扰, 体现有效成分的药理作用, 增加有效成分研究的针对性, 已越来越多地被应用于中药研究^[2-4]。但作为新方法, 其实验条件尚不十分成熟, 还需要进一步完善。FBD 是当归芍药散的精简方, 本课题组对其防治血管性痴呆的物质基础及作用机理已进行了较深入的研究^[5-11]。在此以 FBD 为研究对象, 考察不同制备条件下 FBD 脑脊液的神经保护作用, 以期脑脊液药理学实验条件规范化提供一定参考依据。

1 材料与方 法

1.1 药品与试剂 当归芍药散精简方(FBD, 茯苓: 白朮: 当归; 10: 5: 3, 专利证书号 02112711.5) 水提取物, 由中国药科大学中药复方研究室提供; 尼莫地平(分子量 418.45, 纯度为 99%), 购于山东新华制药有限公司, 批号: 030124; 过氧化氢, 购自南京化学试剂一厂; 谷氨酸, 购于江苏生兴生物工程有限公司; 高糖 DMEM 培养基, 购自 Gibco 公司; 小牛血清, 购自杭州四季青生物工程有限公司; 多聚赖氨酸 (Poly2L2Lys) MTT[溴化-(4, 5-二甲基-2-噻唑基)-2, 5-二苯基四氮唑], 购自 Sigma 公司。

1.2 动物 雄性清洁级 SD 大鼠, 体重 $250\text{ g} \pm 20\text{ g}$, 购于南京医科大学实验动物中心, 合格证号: (苏) SCXK2001-0015。

1.3 细胞 PC12 细胞株(大鼠肾上腺嗜铬肿瘤细胞株), 中国科学院上海生物化学与细胞研究所提供, 以高糖 DMEM 培养液, 内含 10% 小牛血清, $100\text{ u}\cdot\text{L}^{-1}$ 青霉素, $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 链霉素, pH7.2 培养。

1.4 给药方案 FBD $300\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 单次灌胃给药和多次灌胃给药(2 次/d \times 3.5 d)。

1.5 脑脊液的制备^[12] 取体重(250 \pm 20) g 的雄性 SD 大鼠, 随机分为 2 组, 给药组大鼠灌胃给予 FBD 水煎液, 正常对照组给予同体积($10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$) 生理盐水。于末次灌胃后 1.5 h, 以 3% 水合氯醛($10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$) 麻醉大鼠, 颈后部备皮, 75% 酒精消毒, 将大鼠颈部弯曲以暴露枕骨大孔, 用 1 mL 无菌注射器, 从

枕骨大孔刺入延髓池, 取 50 μL 脑脊液后迅速抽出针头, 合并脑脊液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件离心($3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1} \times 10\text{ min}$), 收集上清, $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存备用。

1.6 脑脊液的灭活处理

1.6.1 热灭活 脑脊液 $56\text{ }^{\circ}\text{C}$, 灭活 30 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心($3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1} \times 10\text{ min}$), 收集上清。

1.6.2 乙醇灭活 脑脊液与乙醇 1: 4 混匀, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心, 收集上清, 氮气吹干乙醇, 加磷酸盐缓冲液(PBS) 至原体积。

1.6.3 丙酮灭活 脑脊液与丙酮 1: 4 混匀, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心, 收集上清, 氮气吹干丙酮, 加 PBS 至原体积。

处理的样品经 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存备用。

1.7 PC12 细胞氧化损伤模型制作 将复苏后的 PC12 细胞接种于 25 cm^2 培养瓶, 培养液为含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液, 待 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 饱和湿度下长成单层后, 加入 0.25% 胰蛋白酶于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 消化, 接种于涂有多聚赖氨酸的 96 孔培养板, 细胞密度为 1×10^5 细胞/mL, 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 下继续培养 24 h 后, 加 H_2O_2 ($397\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 作用 4 h, 正常组加无血清培养基。在造模过程中及造模后加入相应浓度的脑脊液或尼莫地平($1 \times 10^{-7}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 观察其对损伤的 PC12 细胞的影响。

1.8 细胞活力的测定(MTT 法) 药物作用相应时间后, 加入终浓度为 $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MTT, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 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 A_{570} 值, 观察细胞活力。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 进行 t 检验及单因素方差分析, 并计算含药脑脊液对 PC12 细胞的保护率 = (含药脑脊液组 A_{570} - 空白脑脊液组 A_{570}) / (正常组 A_{570} - 模型组 A_{570}) $\times 100\%$ 。

2 结果

2.1 不同添加量的 FBD 含药脑脊液对 PC12 细胞 H_2O_2 损伤模型的影响 由表 1 可见, 与模型组相比, 单次给药 20% 含药脑脊液、多次给药 10% 与 20% 含药脑脊液对受损细胞的保护作用均具有显著统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 不同添加量的 FBD 含药脑脊液对 PC12 细胞 H₂O₂ 损伤模型的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	单次给药		多次给药	
	A ₅₇₀	保护率(%)	A ₅₇₀	保护率(%)
正常	1.10 ± 0.064 ²⁾		1.01 ± 0.067 ²⁾	
模型	0.53 ± 0.028		0.44 ± 0.022	
尼莫地平 (1 × 10 ⁻⁷ mol/L)	0.92 ± 0.052 ²⁾	68.42	0.92 ± 0.047 ²⁾	84.21
5% 空白脑脊液	0.54 ± 0.051		0.45 ± 0.046	
5% 含药脑脊液	0.60 ± 0.032	10.53	0.54 ± 0.073	15.79
10% 空白脑脊液	0.56 ± 0.038		0.46 ± 0.068	
10% 含药脑脊液	0.66 ± 0.064	17.54	0.71 ± 0.089 ^{1, 3)}	43.86
20% 空白脑脊液	0.57 ± 0.052		0.49 ± 0.088	
20% 含药脑脊液	0.69 ± 0.040 ^{1, 4)}	21.05	0.89 ± 0.040 ^{1, 4)}	70.18

注:与模型组比较,¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 含药脑脊液与相应空白脑脊液组比较,³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

2.2 经不同方法灭活的 FBD 含药脑脊液对 PC12 细胞 H₂O₂ 损伤模型的影响 由表 2 可见,未处理的 10% FBD 含药脑脊液对 H₂O₂ 损伤的 PC12 细胞的保护率为 43.86%,热灭活、乙醇灭活、丙酮灭活的 10% FBD 含药脑脊液对 PC12 细胞的保护率分别为 42.11%, 36.84%, 35.09%,与模型组相比,均存在显著统计学意义($P < 0.015$),但未经灭活处理的含药脑脊液与经不同方法灭活处理的含药脑脊液各组之间,细胞存活率无明显差异。

表 2 经不同方法灭活的 FBD 含药脑脊液对 PC12 细胞 H₂O₂ 损伤模型的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	灭活方法	A ₅₇₀	保护率(%)
正常		1.01 ± 0.067 ¹⁾	
模型		0.44 ± 0.022	
尼莫地平(1 × 10 ⁻⁷ mol/L)		0.92 ± 0.046 ¹⁾	84.21
空白脑脊液		0.46 ± 0.068	
含药脑脊液	未灭活	0.71 ± 0.089 ^{1, 2)}	43.86
含药脑脊液	加热	0.70 ± 0.034 ^{1, 2)}	42.11
含药脑脊液	乙醇	0.67 ± 0.014 ^{1, 2)}	36.84
含药脑脊液	丙酮	0.66 ± 0.040 ^{1, 2)}	35.09

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$;与空白脑脊液组比较²⁾ $P < 0.01$ 。脑脊液终体积为 10%。

2.3 不同批次大鼠 FBD 含药脑脊液对 PC12 细胞 H₂O₂ 损伤模型的影响 由表 3 可见,3 批大鼠的 FBD 含药脑脊液对 H₂O₂ 损伤的 PC12 细胞有非常显著的保护作用($P < 0.01$)。通过单因素方差分析求得各批次的大鼠含药脑脊液对 PC12 细胞的保护作

用无显著差异($P > 0.05$)。

表 3 不同批次大鼠 FBD 含药脑脊液对 PC12 细胞 H₂O₂ 损伤模型的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	批次	A ₅₇₀	保护率(%)
正常	—	0.65 ± 0.049 ¹⁾	
模型	—	0.30 ± 0.028	
尼莫地平(1 × 10 ⁻⁷ mol/L)	—	0.52 ± 0.073 ¹⁾	62.86
空白脑脊液	1	0.30 ± 0.026	
含药脑脊液	1	0.44 ± 0.033 ²⁾	40.00
空白脑脊液	2	0.30 ± 0.033	
含药脑脊液	2	0.43 ± 0.027 ²⁾	37.14
空白脑脊液	3	0.33 ± 0.038	
含药脑脊液	3	0.48 ± 0.073 ²⁾	42.86

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$;不同批次含药脑脊液与相应空白脑脊液比较²⁾ $P < 0.01$ 。

2.4 不同保存时间大鼠 FBD 含药脑脊液对 PC12 细胞 H₂O₂ 损伤模型的影响 由表 4 可见, - 20 °C 冻存 1 d, 15 d 及 30 d 的大鼠 FBD 含药脑脊液对 PC12 细胞的 H₂O₂ 损伤模型均存在显著的保护作用,保护率分别为 65.43%, 50.18% 及 24.86%。说明保存 30 d 的 FBD 含药脑脊液对 PC12 细胞的 H₂O₂ 损伤模型亦有保护作用,但保护率低于较短的保存时间 1 d 与 15 d。

表 4 不同保存时间大鼠 FBD 含药脑脊液对 PC12 细胞 H₂O₂ 损伤模型的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	保存时间(d)	A ₅₇₀	保护率(%)
正常		0.50 ± 0.028 ¹⁾	
模型		0.25 ± 0.022	
尼莫地平(1 × 10 ⁻⁷ mol/L)		0.43 ± 0.034 ¹⁾	72.84
空白脑脊液	1	0.22 ± 0.031	
含药脑脊液	1	0.39 ± 0.051 ^{1, 2)}	65.43
空白脑脊液	15	0.25 ± 0.025	
含药脑脊液	15	0.37 ± 0.017 ^{1, 2)}	50.18
空白脑脊液	30	0.31 ± 0.062	
含药脑脊液	30	0.37 ± 0.043 ²⁾	24.86

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$;不同保存时间含药脑脊液与相应空白脑脊液组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

3 讨论

首先,关于给药方案的研究,已有文献报道,梅建勋等采用单次给药后 1 h 取大鼠脑脊液,观察了清脑益智方对大鼠原代皮层神经元的保护作用^[11];邹纯朴采用连续给药 3 d,合并每天给药后的脑脊液,观察其对海马神经元的保护作用^[14];我们对比研究了单次给药与连续多次给药 FBD 含药脑脊液对过氧化氢诱导 PC12 细胞损伤的影响,结果发现,

多次给药的含药脑脊液比单次给药更能够体现药物的作用,可能与多次给药可增加脑脊液中有效成分的含量有关。此与血清药理学的通用采血方案的给药方案较为一致^[13]。建议含药脑脊液的制备,采用多次给药方案为宜。

其次,就样品添加量而言,本研究结果发现,5%,10%,20%的 FBD 含药脑脊液对 PC12 细胞 H₂O₂ 损伤模型的保护作用强度存在一定的添加量依赖性。10%,20%的 FBD 含药脑脊液均有显著的细胞保护作用,未观察到上述浓度的含药脑脊液对 PC12 细胞有抑制作用,而有研究发现血清对星形胶质神经细胞的生长有抑制作用^[15],此可能与血清中含有大量复杂的成分有关。考虑到实际应用,建议体外脑脊液药理实验,采用终体积的 10% 添加量为宜。

随后,对于脑脊液是否需要灭活处理,我们实验结果发现,FBD 含药脑脊液未经灭活与几种灭活处理的含药脑脊液对 PC12 过氧化氢损伤模型均呈保护作用,组间无统计学上的显著差异,可能是因为脑脊液中成分简单,蛋白质含量低,其中蛋白质不足以对细胞活性产生影响,而血清中成分可影响血清药理学的实验结果,提示含药血清多经灭活处理,含药脑脊液则无需灭活处理。

此外,我们还观察到不同批次大鼠 FBD 含药脑脊液及不同保存时间(< 30 d)对 PC12 细胞均具有显著的保护作用,但保护率随保存时间延长而降低,表明脑脊液药理学实验方法具有良好的重复性和一定时间范围内的稳定性。建议含药脑脊液以新鲜制备为宜,-20℃保存期不超过 30 d。

综上所述,本研究以 FBD 为对象,初步探讨了中药脑脊液药理实验方法的实验条件规范化技术,结果表明,含药脑脊液的制备,可采用连续多次给药方案,无需灭活处理,一般以添加终体积的 10% 为宜,并证明该方法重复性较好。

[参考文献]

[1] 梅建勋,张伯礼. 中药脑脊液药理学研究方法的初建——对中药影响星形胶质细胞神经营养作用的观察[J]. 中草药,2000,31(7):523-526.
[2] 滕弘,高丹宇,朱晓峰. 脑缺血大鼠脑脊液对神经干细

胞存活及分化的影响[J]. 黑龙江医药科学,2003,26(5):10-12.

[3] 郭建文,何迎春,陈绍宏,等. Beagle 犬含药脑脊液干预皮层神经元出血损伤细胞凋亡时间窗的实验研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2005,3(10):884-886.
[4] 谢宁,邹纯朴,牛英才,等. 地黄饮子对海马神经元 AD 模型细胞凋亡的调控作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2004,10(4):29-32.
[5] 林志宏,朱丹妮,严永清,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 I——组方作用协同性与选择性研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2002,8(1):16-19.
[6] 林志宏,朱丹妮,严永清,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 II. [J]. 中国实验方剂学杂志,2002,8(4):18-20.
[7] 王鹏,余伯阳,林志宏,等. 当归芍药散精简方对小鼠学习记忆障碍改善作用的物质基础与作用机理研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2004,10(2):18-21.
[8] 顾维,朱丹妮,严永清. 当归芍药散防治老年期痴呆的物质基础与作用机理研究 IV——有效部位化学成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2004,10(2):1-3.
[9] 顾维,朱丹妮,张志宇,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 V——FBD 多糖的组成[J]. 中国实验方剂学杂志,2005,11(4):20-23.
[10] 张启春,王秋娟,寇俊萍,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.
[11] 罗兰,朱丹妮,严永清. 当归芍药散精简方 CO-2 超临界萃取部位化学成分研究[J]. 中成药,2005,27(11):1251-1254.
[12] Van den Berg MP, Romeijn SG, Verhoef JC, et al. Serial cerebrospinal fluid sampling in a rat model to study drug uptake from the nasal cavity[J]. J Neurosci Methods, 2002, 116(1):99-107.
[13] 李仪奎,吴健宇. 血清药理实验中采血时间的通法方案[J]. 中国药理学通报,1999,15(6):569-570.
[14] 邹纯朴,谢宁,宋诚挚,等. 地黄饮子含药脑脊液对海马神经元损伤的影响[J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版),2004,20(1):1-3.
[15] 梅建勋,张伯礼. 采用脑脊液药理学方法对中药影响星形胶质细胞神经营养作用的观察[J]. 中药材,2000,23(8):467-469.