

• 药理 •

当归芍药散防治老年期痴呆的物质基础 与作用机理研究 IX ——当归芍药散精简方多糖部位的 抗氧化作用研究

吴 枫, 朱丹妮*, 林志宏, 严永清
(中国药科大学中药复方研究室, 南京 210038)

[摘要] 目的: 研究当归芍药散精简方(FBD)多糖部位(P1)的抗氧化作用。方法: 采用 MTT 法测定 H₂O₂ 所致氧化损伤后 PC12 及 ECV304 细胞的活力; 分别采用黄嘌呤氧化酶法和硫代巴比妥酸比色法测定环磷酰胺损伤后小鼠脑组织中超氧化物歧化酶(SOD)的活性和丙二醛(MDA)含量。结果: 200 mg/kg 400 mg/kg FBD 多糖部位 10% 含药血清均能对细胞的氧化损伤起到显著的保护作用; 200 mg/kg 400 mg/kg FBD 多糖部位能显著降低氧化损伤小鼠脑内 MDA 的含量, 有增加小鼠脑内 SOD 活性的趋势。结论: FBD 多糖部位具有显著的抗氧化作用, 这可能是其防治血管性痴呆的作用基础。

[关键词] 当归芍药散; 多糖; 抗氧化; 羟自由基; 超氧化物歧化酶; 丙二醛

[中图分类号] 285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)07-0023-04

Study on Material Basis and Mechanism of Action of Dangguishaoyaosan in the Prevention and Treatment of Senile Dementia IX: The Anti-oxidative Activity of The Polysaccharides of FBD

WU Feng, ZHU Dan-ni*, LIN Zhi-hong, YAN Yong-qing
(Department of Chinese Prescription, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the anti-oxidative activity of the polysaccharides(P1) of FBD. **Methods:** The oxidative injured model of PC12 and ECV304 cells induced by H₂O₂ were used to measure the oxidation prevention of FBD Ps on cells which was observed with MTT method. The oxidative injured model of mice induced by cyclophosphamide was used, the activities of SOD and MDA in brains were measured. **Results:** The FBD Ps has notable functions of oxidation prevention on the oxidative injured model of PC12 and ECV304 cells in concentrations of 200 mg/kg and 400 mg/kg FBD Ps. They also can rise the activity of SOD and decline the content of MDA. **Conclusions:** FBD Ps has notable function for oxidation prevention. This maybe the basis of its function for VD prevention.

[Key words] FBD; polysaccharides; oxidation prevention; hydroxy radical; SOD; MDA

当归芍药散出自张仲景所著《金匮要略》。全方由当归、芍药、川芎、茯苓、白术和泽泻 6 味中药组成, 主治“妇人怀孕, 腹中痛”、“妇人腹中诸疾痛”。日本学者首先用当归芍药散防治老年期痴呆, 我国将当归芍药散用于治疗老年期痴呆, 也取得良好疗

[收稿日期] 2006-05-19

[基金项目] 国家自然科学基金(30271604, 30500683)

[通讯作者] * 朱丹妮, Tel: (025) 85391042; E-mail: Danizhu@163.com

效。本实验室对当归芍药散治疗老年性痴呆的药效学进行了研究,并在此基础上对该方优化精简,得到治疗血管性痴呆(VD)的最佳处方 FBD(茯苓:白术:当归= 10: 5: 3)^[1,2],并筛选出了 FBD 防治血管性痴呆的有效部位^[3]。

由于血管性痴呆患者体内抗氧化物 VE、VC 和抗氧化酶超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Per)的活性显著降低,不能有效捕捉和清除体内过量的羟自由基($\cdot\text{OH}$)等活性氧(ROS)物质,致使氧自由基反应及脂质过氧化反应病理性加剧,通过恢复和提高体内抗氧化物的活性,防止氧自由基对机体的损害,对于防治血管性痴呆有积极的作用。为进一步阐明 FBD 抗 VD 的作用机制,本实验考察了 FBD 多糖部位的体内外抗氧化作用。

1 材料

1.1 药物 FBD 多糖样品由本实验室制备。制备方法如下:当归芍药散(FBD)药材 10 倍量水,煎煮 1 h,过滤,滤渣再加 8 倍量水煎煮 1 h,合并过滤液,浓缩至 2 倍体积。冷却后加入 95% 乙醇使含醇量达到 60%,静置 24 h。过滤,沉淀冻干后 Sevage 除蛋白即得 FBD 多糖部位(Ps)。

1.2 主要试剂和仪器 RP1640 培养基,高糖 DMEM 培养基购自 GIBCO 公司;小牛血清(NCS)为四季青优质产品;多聚赖氨酸购自 SIGMA 公司;环磷酰胺(Cyclophosphamide, Cy, 上海华联制药有限公司);超氧化物歧化酶(SOD)测试盒、丙二醛(MDA)测试盒、考马斯亮兰蛋白测定试剂盒,均购自南京建成生物工程研究所;过氧化氢(H_2O_2)、冰醋酸、无水乙醇、氯化钠、磷酸氢二钠为南京化学试剂一厂生产;磷酸二氢钠为汕头金砂化学厂生产。

Sunrise 酶标仪,奥地利 Tecan GmbH; PB 303-N 电子天平,德国 Mettler-Toledo Group; Z-323K 冷冻离心机,德国 HERMLE 公司。

1.3 实验动物及细胞 昆明种小鼠,体重(18~20)g,雌雄各半,购自中国药科大学实验动物中心;大鼠嗜铬细胞瘤株 PC12 细胞、脐静脉内皮 ECV304 细胞,购自中科院上海细胞所。

2 方法

2.1 FBD 多糖部位体外抗氧化实验^[4] 含药血清制备:小鼠随机分为 4 组,即正常组,Ps 100 mg/kg 组,Ps 200 mg/kg 组,Ps 400 mg/kg 组,连续灌胃给药 7

d,每天 1 次,d7 给药后 1 h 摘眼球取血,血液室温静置 1 h,4℃静置过夜,次日 4℃下 $4\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}\times 15\text{ min}$,取上清,合并相同组别小鼠血清,56℃,30 min 灭活,分装于 0.5 mL doff 管,-20℃冻存备用。

2.2 FBD 多糖部位对 H_2O_2 所致 ECV304 细胞氧化损伤的影响 ECV304 细胞株保存于-80℃冰箱。实验前 37℃快速复苏, $1\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}\times 5\text{ min}$, RP1640 洗涤 1 次,用含 10% NCS 的 1640 接种于涂有多聚赖氨酸的 75 mL 培养瓶,待 37℃ 5% CO_2 饱和湿度培养箱内长满成单层后,用 0.25% 胰蛋白酶消化(3~5) min,10% NCS 1640 终止消化,反复吹打成细胞悬液,接种于涂有多聚赖氨酸的 96 孔培养板,接种密度 $1\times 10^5/\text{mL}$,每孔 100 μL ,37℃ 5% CO_2 培养箱中培养。待 PC12 细胞生长至对数生长期且覆盖 96 孔培养板的 80% 培养室底面积,弃原培养液,用 D-Hank's 液洗涤细胞 2 次,加入 D-Hank's 液配制的 0.1 mmol 过氧化氢溶液 100 μL 与细胞作用 50 min,造成细胞氧化损伤。细胞损伤以后, D-Hank's 液洗涤细胞 1 次,换 1640 培养液,按终体积 10% 比例(V/V)加入正常血清和含药血清,每组 6 孔,37℃ 5% CO_2 培养箱中培养至 12 h 时,每孔加入终浓度 0.5 mg/mL 的 MTT 继续培养(3.5~4) h 后,小心吸取上清,加入 90 μL DMSO,微型振荡器上振荡 10 min,室温静置 10 min,酶标仪测定 A_{570} ,以吸光度表示细胞活力。

2.3 FBD 多糖部位对 H_2O_2 所致 PC12 细胞氧化损伤的影响 PC12 细胞株保存于-80℃冰箱。实验前 37℃快速复苏, $1\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}\times 5\text{ min}$, DMEM 洗涤 1 次,用含 10% NCS 的高糖 DMEM 接种于涂有多聚赖氨酸的 75 mL 培养瓶,待 37℃ 5% CO_2 饱和湿度培养箱内长满成单层后,用 0.25% 胰蛋白酶消化(3~5) min,10% NCS 高糖 DMEM 终止消化,反复吹打成细胞悬液,接种于涂有多聚赖氨酸的 96 孔培养板,接种密度 $1\times 10^5/\text{mL}$,每孔 100 μL ,37℃ 5% CO_2 培养箱中培养。待 PC12 细胞生长至对数生长期且覆盖 96 孔培养板的 80% 培养室底面积,弃原培养液,用 D-Hank's 液洗涤细胞 2 次,加入 D-Hank's 液配制的 0.1 mmol 过氧化氢溶液 100 μL 与细胞作用 30 min,造成细胞氧化损伤。细胞损伤以后, D-Hank's 液洗涤细胞 1 次,换 DMEM 培养液,按终体积 10% 比例(V/V)加入正常血清和含药血清,每组 6 孔,37℃ 5% CO_2 培养箱中培养至 12 h 时每孔加入终浓

度 0.5 mg/mL 的 MTT 继续培养(3.5~ 4) h 后,小心吸取上清;加入 90 μ L DMSO,微型振荡器上振荡 10 min,室温静置 10 min,酶标仪测定 A_{570} ,以吸光度表示细胞活力。

2.4 FBD 多糖部位对脑组织中超氧化物歧化酶(SOD)活性以及丙二醛(MDA)含量的影响^[5,6] 昆明种小鼠 60 只, (18~ 22) g,雌雄各半,随机分成 6 组,每组 10 只,即 NS 对照组、模型组、Vc、Ps100 mg/kg、Ps200/kg、Ps400 mg/kg 组。除 NS 对照组外,全部动物 ip Cy 20 mg/kg 造成 SOD 低下模型,同时每天 ig 给予相应剂量的药物,连续 7 d。末次给药后 2 h 处死,分离脑组织,匀浆,分别采用 SOD 试剂盒测定脑匀浆中的 SOD 活性,MDA 试剂盒测定脑匀浆中的 MDA 含量。

2.5 统计方法 使用 Office Excel 2000 软件进行统计,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。显著性检验均采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 FBD 多糖部位对 H₂O₂ 所致 ECV304 细胞氧化损伤的影响 由表 1 可见,200 mg/kg 及 400 mg/kg 组 10% FBD 多糖含药血清均能对 ECV304 细胞的氧化损伤起到显著的保护作用($P < 0.01$)。

表 1 灌胃不同剂量 FBD 多糖含药血清对 H₂O₂ 所致 ECV304 细胞氧化损伤的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	H ₂ O ₂ (μ L)	细胞活力(A_{570})
	0.1 mmol/L	
正常对照组	—	0.505 \pm 0.027 ²⁾
模型组	100	0.200 \pm 0.012 ⁹
空白血清组	100	0.233 \pm 0.008 ⁶
ig 100 mg/kg Ps 血清组	100	0.249 \pm 0.018 ⁷
ig 200 mg/kg Ps 血清组	100	0.292 \pm 0.015 ⁵⁾
ig 400 mg/kg Ps 血清组	100	0.339 \pm 0.019 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;各组血清终体积为 10% (V/V),H₂O₂ 损伤后 50 min 加入(下同)。

3.2 FBD 多糖部位对 H₂O₂ 所致 PC12 细胞氧化损伤的影响 由表 2 可见,200 mg/kg 及 400 mg/kg 组 10% FBD 多糖含药血清均能对 PC12 细胞的氧化损伤起到显著的保护作用($P < 0.01$)。

3.3 FBD 多糖部位对脑组织中超氧化物歧化酶活性以及丙二醛含量的影响 由表 3 可见,200 mg/kg 及 400 mg/kg 组小鼠脑内 SOD 活性有增强的趋势,但与模型组比较,并无显著性差异;各剂量组小鼠脑内 MDA 含量均有所降低,其中 100 mg/kg 组具有降低

趋势,而 200 mg/kg ($P < 0.05$) 及 400 mg/kg ($P < 0.01$) 组小鼠脑内 MDA 显著降低。

表 2 FBD 多糖含药血清对 H₂O₂ 所致 PC12 细胞氧化损伤的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	0.1 mmol/L	细胞活力(A_{570})
	H ₂ O ₂ (μ L)	
正常对照组	—	0.499 \pm 0.020 ³⁾
模型组	100	0.197 \pm 0.011 ⁷
空白血清组	100	0.202 \pm 0.011 ⁷
ig 100 mg/kg Ps 血清组	100	0.208 \pm 0.013 ⁸
ig 200 mg/kg Ps 血清组	100	0.282 \pm 0.013 ⁵⁾
ig 400 mg/kg Ps 血清组	100	0.310 \pm 0.018 ⁸⁾

表 3 FBD 多糖对环磷酰胺所致氧化损伤小鼠脑内 SOD 活性,MDA 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量	SOD 活性	MDA 含量
	(mg/kg)	(U/mgprotein)	(nmol/mgprotein)
正常对照组	—	52.3 \pm 7.28	1.18 \pm 0.234 ¹⁾
模型组	—	38.5 \pm 14.5	2.45 \pm 0.298
Cy-Vc 组	50	49.3 \pm 5.22 ¹⁾	1.36 \pm 0.240 ²⁾
Cy-Ps 组	100	40.5 \pm 14.7	2.05 \pm 0.599
Cy-Ps 组	200	43.3 \pm 5.44	1.82 \pm 0.599 ¹⁾
Cy-Ps 组	400	47.0 \pm 8.37	1.66 \pm 0.537 ²⁾

4 讨论

羟自由基(\cdot OH)是目前所知活性氧中对生物体毒性最强、危害最大的一种自由基。它可以通过电子转移、加成以及脱氢等方式与生物体内的多种分子作用,造成糖类、氨基酸、蛋白质、核酸和脂类等物质的氧化性损伤,使细胞坏死或突变。羟自由基还与衰老、肿瘤、辐射损伤和细胞吞噬等有关^[7]。体外的抗氧化实验结果显示,FBD 多糖对 H₂O₂ 所致 PC12、ECV304 细胞的氧化损伤有显著的保护作用,且其作用呈明显的剂量依赖关系。

环磷酰胺在抑制肿瘤生长的同时可明显抑制机体的免疫功能和造血系统,其对骨髓的抑制作用与自由基的损伤有关,还可损伤机体的 SOD 合成系统,造成脂质过氧化物堆积,引发过氧化损伤。体内的抗氧化实验结果显示,FBD 多糖能显著降低氧化损伤小鼠脑内 MDA 的含量;具有升高 SOD 活性的趋势,其作用具有一定的剂量依赖关系。

大量研究表明多糖具有清除活性氧(ROS)的抗氧化作用,其作用机制可能在于:(1)直接清除 ROS^[8]。(2)络合产生 ROS 所必需的金属离子。(3)促进 SOD 从细胞表面释放。(4)提高抗氧化酶的活

性^[8,9]。多糖可通过提高 SOD、CAT、GSH-Px 等抗氧化酶活性,发挥抗氧化的作用。结合本实验及本研究室前期的研究结果,推测 FBD 多糖部位的抗氧化活性,可能是其在防治 VD 中的作用基础。

[参考文献]

- [1] 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 [J].中国实验方剂学杂志,2002,8(1):16-19.
- [2] 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.
- [3] 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,2004,8(2):18-21.
- [4] 吴玉林,杨政.MCI2186 对 H₂O₂ 所致 PC12 细胞氧应激

损伤及细胞内活性氧的影响[J].中国药科大学学报,2004,35(6):565-568.

- [5] 康国贵,郭仁寿,陈重义.自由基清除剂对环磷酰胺致大鼠血清和卵巢 MDA 含量及 SOD 活性的影响[J].中国病理生理杂志,1995,11(3):311-313.
- [6] 许爱华,陈华圣,王玲,等.银杏外种皮多糖对不同状态小鼠血清 SOD 和 MDA 形成的影响[J].中国中药杂志,1998,23(12):746-748.
- [7] 韩鹤友,何治柯,曾云鹗.羟自由基的分析研究进展 [J].分析科学学报,2001,17(1):83-88.
- [8] 谭建权,魏文树,陈海生.彩云多糖药理研究进展 [J].中成药,1999,21(5):2592260.
- [9] Zhou M, Chen Y, Ouyang Q, *et al.* Reduction of the oxidative injury to the rabbits with established atherosclerosis by protein bound polysaccharide from *Coriolus vesicolor* [J]. *Am J Chin Med*, 2000, 28(2): 2392249.