

# 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

张启春<sup>1</sup>, 王秋娟<sup>1</sup>, 寇俊萍<sup>2</sup>, 朱丹妮<sup>2</sup>, 严永清<sup>2</sup>, 余伯阳<sup>2</sup>

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

**摘要:** 目的: 通过观察当归芍药散精简方(FBD)含药脑脊液对不同因素所致的 PC12 细胞损伤模型的保护作用, 来探讨当归芍药散精简方(FBD)防治痴呆的作用机理。方法: 以 MTT 法观察 FBD 含药脑脊液对谷氨酸、过氧化氢、连二亚硫酸钠和氯化钾造成的 PC12 细胞损伤模型中细胞存活率的影响。结果: 连续多次给药(1.62g 生药·kg<sup>-1</sup>)后 0.5h~2.5h 的 FBD 含药脑脊液对过氧化氢损伤的 PC12 细胞均有明显保护作用( $P < 0.05 \sim 0.01$ ), 其中以 1.5h 的 FBD 含药脑脊液保护作用最明显; 该时间点 FBD 含药脑脊液对谷氨酸、连二亚硫酸钠和氯化钾造成的 PC12 细胞损伤模型亦有显著保护作用, 且随脑脊液添加量增加保护率提高。结论: FBD 含药脑脊液对 PC12 细胞损伤有显著保护作用, 其机制与抑制细胞内钙超载、对抗自由基的氧化损伤和谷氨酸的兴奋性毒性等有关。

**关键词:** 当归芍药散精简方(FBD); 脑脊液; PC12 细胞; 钙超载

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2005)05-0055-04

## Protective Effect of Cerebrospinal Fluids Containing Optimized Dang

### Gui Shao Yao San(FBD) on Injured PC12 Cells

ZHANG Qi-chun<sup>1</sup>, WANG Qiu-juan<sup>1</sup>, KOU Jun-ping<sup>2</sup>, ZHU Dan-ni<sup>2</sup>, YAN Yong-qing<sup>2</sup>, YU Bo-yan<sup>2</sup>

(1 Department of Physiology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;

2 Department of Chinese Prescription, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China)

**Abstract:** Objective: Investigating the protective effect of CSF of rat administrating FBD orally on various injured PC12 cells models to indicate the mechanism of FBD therapying dementia. Methods: Four injured PC12 models induced by hydrogen peroxide, hydrosulfurous sodium, glutamate and potassium chloride accordingly were used to assay the effect of CSF sample on PC12 cells. Results: It was found that the rat CSF sample at different time points from 0.5h to 2.5h after taking FBD repetitiously (1.62g crude herb·kg<sup>-1</sup>) could obviously increase the viability of PC12 cells injured by hydrogen peroxide, which peaked at 1.5h. The rat CSF containing FBD of 1.5h could also protect PC12 cells injured by hydrosulfurous sodium, glutamate and potassium chloride, and the protection rate increases with the concentration of CSF containing FBD. Conclusion: CSF of rat administrating FBD orally could protect PC12 cells, possibly by antagonizing the overload of calcium, oxidant injury of free radicals and excitatory neurotoxicity of glutamate.

**Key words:** Optimized Dang Gui Shao Yao San(FBD); cerebrospinal fluids; PC12 cell; overload of calcium

脑脊液是包围在中枢神经系统周围的组织液, 与血液相比, 脑脊液成分比较简单, 主要含无机盐及少量蛋白质, 其中也包含脑组织的各种生理和病理

产物。在中枢神经系统药物的研究中, 脑脊液主要用来研究药物的转运以及各种蛋白质的种类和数量的表达, 其蛋白质的定性定量研究也被广泛应用于临床诊断。近来有学者提出用含药脑脊液通过体外实验研究药物的药理作用<sup>[1]</sup>。以含药脑脊液代替含药血清观察作用于中枢神经系统药物特别是中药复方避免血清中复杂成分的干扰, 更能体现有效成分的药理作用, 增加有效成分研究的针对性。我室前

收稿日期: 2004-10-11

基金项目: 国家新药基金资助项目(969010538); 国家自然科学基金资助项目(30271604)

通讯作者: 王秋娟; Tel: (025) 83271341, E-mail: qjwangnj@sina.com

期研究表明,一种防老年性痴呆的中药组合物——当归芍药散精简方(FBD,茯苓:白术:当归=10:5:3)对多种动物记忆障碍模型有明显的改善作用<sup>[2,3]</sup>,但其作用机理尚不十分清楚。本研究首次尝试用脑脊液药理实验方法初步考察 FBD 对多因素诱导 PC12 细胞损伤的保护作用,为阐明其防治老年性痴呆的作用机理提供实验依据。

## 1 实验材料

**1.1 药品与试剂** 当归芍药散精简方(FBD,茯苓:白术:当归;10:5:3)水煎剂,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;连二亚硫酸钠、氯化钾、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(NCS),购自杭州四季青生物工程公司;多聚赖氨酸(Poly-L-Lys) 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** SD 大鼠,雄性,体重(250±20)g,购于中国药科大学实验动物中心。

**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,0.0583mg/L 青霉素,100mg/L 链霉素,pH7.2 培养。

## 2 方法与结果

**2.1 脑脊液的制备**<sup>[4]</sup> 取体重(250±20)g 的 SD 雄性大鼠 60 只,随机分为 6 组,每组 10 只,(1)~(5)组大鼠灌胃给予水煎液 1.62g 生药·kg<sup>-1</sup>,2 次/d×3.5d。第(6)组为正常对照组,给予同等体积(10mL/kg)的生理盐水。(1)~(5)组分别于末次给药后 0.5h、1.0h、1.5h、2.0h、2.5h,以 3% 水合氯醛(10mL·kg<sup>-1</sup>)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 1mL 无菌注射器,从枕骨大孔刺入延髓池,取 50μL 脑脊液后迅速抽出针头,合并脑脊液,4℃ 条件离心(3000r·min<sup>-1</sup>×10min),收集上清,0.22μm 滤膜过滤,-20℃ 冻存备用。第(6)组正常脑脊液的制备同上。

**2.2 PC12 细胞培养** 将复苏后的 PC12 细胞接种于 75mL 培养瓶,培养液为含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液,待 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度下长成单层后,加入 0.25% 胰蛋白酶于 37℃ 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<sup>5</sup> 细胞/mL,置于 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 下继续培养 24h 后,观察 FBD 含

药脑脊液对 PC12 细胞损伤模型的影响。

**2.3 MTT 法测定细胞活力** 于实验结束前 4h 加入终浓度为 0.5g/L 的 MTT,37℃ 5% CO<sub>2</sub> 下作用 4h 后弃去上清液,每孔加入 DMSO 100μL,置振荡器上振荡 10min 使结晶充分溶解,用酶标仪测定 OD<sub>570</sub> 值,观察细胞活力。数据用  $\bar{X} \pm S$  表示,进行 *t* 检验,并计算含药脑脊液对 PC12 细胞的保护率=(含药脑脊液组 OD<sub>570</sub>-空白脑脊液组 OD<sub>570</sub>)/(正常组 OD<sub>570</sub>-模型组 OD<sub>570</sub>)×100%。

**2.4 不同取样时间点 FBD 含药脑脊液对过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)诱导的 PC12 细胞损伤的影响**<sup>[8]</sup> 取长满单层 PC12 细胞的 96 孔培养板,弃去培养液,用 D-Hank's 液洗涤 2 次,加入无血清 DMEM,细胞分为(1)正常组、(2)模型组、(3)尼莫地平组、(4)正常脑脊液组、(5)0.5hFBD 含药脑脊液组、(6)1.0h FBD 含药脑脊液组、(7)1.5h FBD 含药脑脊液组、(8)2.0h FBD 含药脑脊液组、(9)2.5h FBD 含药脑脊液组,4 孔/组。(1)组加入无血清的 DMEM,(2)~(9)组每孔加入终浓度 200μmol/L 的过氧化氢造模,然后(3)组加入终浓度为 1×10<sup>7</sup>mol/L 尼莫地平,(4)组加入 10% 正常脑脊液(v/v),(5)~(9)组分别加入各时间点的 10% FBD 含药脑脊液(v/v)。37℃,5% CO<sub>2</sub> 培养箱作用 3h 后,弃去培养液用 D-Hank's 液洗涤 2 次,加入无血清 DMEM 培养 24h。在造模过程中及造模后,(3)~(9)组均加入相应浓度的药物及脑脊液。MTT 法观察细胞活力,实验重复一次。

由表 1 可见,10% FBD 含药脑脊液于上述各时间点均能够明显提高 PC12 细胞存活率(*P*<0.05),提示对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 造成的 PC12 细胞损伤有显著的保护作用,从给药后到 1.5h,FBD 含药脑脊液对 PC12 细胞的保护作用随着时间的增加而增加,而给药后 1.5h 到 2.5h,FBD 含药脑脊液对 PC12 细胞的保护作用随着时间的增加而呈下降趋势,其中末次给药后 1.5h FBD 含药脑脊液的保护作用最为明显,其保护率可达 56.77%。因此以末次给药后 1.5h FBD 含药脑脊液作为研究对象观察 FBD 含药脑脊液对 PC12 细胞的保护作用。

**2.5 FBD 含药脑脊液对谷氨酸诱导的 PC12 细胞损伤的影响**<sup>[5]</sup> 取长满单层 PC12 细胞的 96 孔培养板,弃去培养液,用 D-Hank's 液洗涤 2 次,加入无血清 DMEM,细胞分为(1)正常组、(2)模型组、(3)尼莫地平组、(4)10% 正常脑脊液组、(5)10% FBD 含药脑脊液组、(6)20% 正常脑脊液组、(7)20% FBD 含药脑

脊液组, 4 孔/组。(1) 组加入无血清的 DMEM, (2) ~ (7) 组每孔加入终浓度 20mmol/L 的谷氨酸造模, 然后(3) 组加入终浓度为  $1 \times 10^7$  mol/L 尼莫地平, (4) 组、(6) 组分别加入 10% 和 20% 的正常脑脊液(v/v), (5) 组和(7) 组分别加入 10% 和 20% 的 FBD 含药脑脊液(v/v)。37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱作用 4h 后, 弃去培养液用 D-Hank's 液洗涤 2 次, 加入无血清 DMEM 培养 24h。在造模过程中及造模后, (3) ~ (7) 组均加入相应浓度的药物及脑脊液。MTT 法观察细胞活力。实验重复一次。

由表 2 可见, 末次给药后 1.5h, 10% 和 20% FBD 含药脑脊液均能够明显提高 PC12 细胞存活率 ( $P < 0.05$ ), 对谷氨酸造成的 PC12 细胞损伤有显著的保护作用, 保护率分别为 38.85%、42.04%。

**2.6 FBD 含药脑脊液对过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 诱导的 PC12 细胞损伤的影响<sup>[6]</sup>** 细胞分组及各组的给药方法同 2.5。(2) ~ (7) 组每孔加入终浓度 200μmol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 造模, 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱作用 3h, 弃去培养液用 D-Hank's 液洗涤 2 次, 加入无血清 DMEM 培养 24h。MTT 法观察细胞活力。

由表 2 可见, 通过比较不同添加量的 FBD 含药脑脊液与正常脑脊液对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 造成的 PC12 细胞损伤的细胞存活率的影响可知, 10% 与 20% 的 FBD 含药脑脊液均能够提高 PC12 细胞存活率 ( $P < 0.01$ ), 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 造成的 PC12 细胞损伤的保护率分别为 44.21%、76.18%。

**2.7 FBD 含药脑脊液对连二亚硫酸钠(Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) 诱导的 PC12 细胞损伤的影响<sup>[5]</sup>** 细胞分组及各组的给药方法同 2.5。(2) ~ (7) 组每孔加入终浓度 8mmol/L 的 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 造模, 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱作用 4h, 弃去培养液用 D-Hank's 液洗涤 2 次, 加入无血清 DMEM 培养 24h。MTT 法观察细胞活力。

由表 2 可见, 对于 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 造成的 PC12 细胞损

伤, FBD 含药脑脊液对其均有明显的保护作用, 提高 PC12 细胞存活率 ( $P < 0.01$ ), 保护率与脑脊液的添加量之间在一定剂量相关性, 10% 与 20% FBD 含药脑脊液对 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 造成的 PC12 细胞损伤的保护率分别为 46.35%、49.78%。

**2.8 FBD 含药脑脊液对 KCl 诱导的 PC12 细胞损伤的影响<sup>[7]</sup>** 细胞分组及各组的给药方法同 2.5。(2) ~ (7) 组每孔加入终浓度 800mmol/L 的 KCl 造模, 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱作用 15min, 弃去培养液用 D-Hank's 液洗涤 2 次, 加入无血清 DMEM 培养 6h。MTT 法观察细胞活力。

由表 2 可见, 对于 KCl 造成的 PC12 细胞高钙损伤, 10% 与 20% 的 FBD 含药脑脊液对 PC12 细胞可产生 38.45%、48.45% 的保护率, 与正常脑脊液相比具有明显的统计学意义, ( $P < 0.01$ )。

表 1 FBD 含药脑脊液对过氧化氢诱导的 PC12 损伤的保护作用( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	OD <sub>570</sub>	保护率(%)
正常	0.816 ± 0.075 <sup>1)</sup>	
模型	0.435 ± 0.077	
尼莫地平( $1 \times 10^7$ mol/L)	0.762 ± 0.052 <sup>1)</sup>	85.90
空白脑脊液	0.482 ± 0.048	
0.5h FBD 含药脑脊液	0.551 ± 0.050 <sup>2)</sup>	17.5
1.0h FBD 含药脑脊液	0.604 ± 0.076 <sup>3)</sup>	31.47
1.5h FBD 含药脑脊液	0.701 ± 0.087 <sup>3)</sup>	56.77
2.0h FBD 含药脑脊液	0.677 ± 0.086 <sup>3)</sup>	50.61
2.5h FBD 含药脑脊液	0.637 ± 0.064 <sup>3)</sup>	40.05

与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与空白脑脊液组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>3)</sup>  $P < 0.01$ 。

#### 4 讨论

PC12 细胞是大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤克隆化的细胞株, 被广泛的用于研究神经细胞的分化, 受体及递质的释放等作用于中枢神经系统药物的作用机理。钙超载, 自由基过剩, 兴奋性递质损伤是造成神经细胞正常生理功能障碍的主要原因, 各个病理环节之间彼此联系紧密, 其中钙离子发挥关键作用。

表 2 FBD 含药脑脊液对多种因素造成的 PC12 细胞损伤的保护作用( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	谷氨酸		过氧化氢		连二亚硫酸钠		氯化钾	
	OD <sub>570</sub>	保护率(%)	OD <sub>570</sub>	保护率(%)	OD <sub>570</sub>	保护率(%)	OD <sub>570</sub>	保护率(%)
正常	0.341 ± 0.023 <sup>1)</sup>		1.008 ± 0.067 <sup>1)</sup>		0.737 ± 0.045 <sup>1)</sup>		0.627 ± 0.029 <sup>1)</sup>	
模型	0.204 ± 0.020		0.442 ± 0.022		0.365 ± 0.066		0.326 ± 0.037	
尼莫地平( $1 \times 10^7$ mol/L)	0.323 ± 0.065 <sup>1)</sup>	86.84	0.975 ± 0.107 <sup>1)</sup>	94.1	0.688 ± 0.095 <sup>1)</sup>	86.71	0.587 ± 0.059 <sup>1)</sup>	86.62
10% 空白脑脊液	0.230 ± 0.031		0.462 ± 0.068		0.392 ± 0.064		0.378 ± 0.071	
10% FBD 含药脑脊液	0.283 ± 0.040 <sup>2)</sup>	38.85	0.712 ± 0.089 <sup>3)</sup>	44.21	0.564 ± 0.059 <sup>3)</sup>	46.35	0.494 ± 0.085 <sup>2)</sup>	38.45
20% 空白脑脊液	0.247 ± 0.072		0.493 ± 0.088		0.443 ± 0.082		0.412 ± 0.070	
20% FBD 含药脑脊液	0.304 ± 0.043 <sup>4)</sup>	42.04	0.924 ± 0.049 <sup>5)</sup>	76.18	0.628 ± 0.087 <sup>5)</sup>	49.78	0.558 ± 0.036 <sup>5)</sup>	48.45

与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与 10% 空白脑脊液组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>3)</sup>  $P < 0.01$ ; 与 20% 空白脑脊液组比较<sup>4)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>5)</sup>  $P < 0.01$ 。

通过体外药理实验研究中药及复方制剂药理作用, 由于其成分复杂而不能正确客观的体现其药效。1987 年, 日本学者田代真一提出了中药血清药理学方法的概念。血清药理学与血清药物化学的发展为中药现代化提供了有利的手段。但是, 在机体服用一定剂量的某种药物后, 药物的成分或代谢产物经过血液循环到达其作用的靶器官, 而最终与靶器官的细胞上的作用靶点直接接触的并不是含药血清, 而是含有一定浓度活性成分的组织液。在机体产生的组织液中, 脑脊液产生的量较多且容易取得。由于血脑屏障(BBB)作用, 使得脑脊液的成分与血清的成分, 不论是生理性还是药物成分都存在差异, 以作用于中枢神经系统药物的含药脑脊液来代替含药血清通过体外实验研究药物的药理作用及确定药物的有效成分将缩小研究范围, 突出重点。

兴奋性谷氨酸通过作用于 N-甲基-D-天门冬氨酸(NMDA)受体离子通道和细胞内钙离子重分配机制, 导致 PC12 细胞钙离子内流<sup>[8]</sup>; 而过氧化氢不但可以产生氧自由基造成细胞氧化损伤, 而且能通过 L-型电压门控  $Ca^{2+}$  通道和钠通道直接或间接导致 PC12 细胞钙离子内流<sup>[7]</sup>; 利用连二亚硫酸钠作为氧清除剂消除培养基中的氧可使 PC12 细胞兴奋性氨基酸 NMDA 受体活性明显增强, 导致 PC12 细胞钙离子内流<sup>[9]</sup> 高钾离子引起 PC12 细胞内钙升高以细胞质膜上 L-型电压门控钙离子通道开放为基础<sup>[10]</sup>。以上各因素均可直接或间接地造成 PC12 细胞内钙超载。本实验结果表明, FBD 含药脑脊液对谷氨酸、过氧化氢、连二亚硫酸钠和氯化钾造成的 PC12 细胞损伤模型均有明显的保护作用, 其中对过氧化氢造成的氧化损伤及细胞内钙超载损伤的保护作用最明显, 提示 FBD 可能是通过抑制细胞内钙超载、对抗自由基的氧化损伤等多种途径发挥神经保护作用的。究竟是 FBD 中哪些成分直接进入脑脊液还是间接影响脑脊液成分含量或功能发挥作用, 我们目

前正在研究 FBD 中的化学成分在体内外血脑屏障中的摄取与吸收, 以探讨 FBD 防治血管性痴呆及其含药脑脊液对 PC12 细胞保护作用的物质基础。

#### 参考文献:

- [1] 梅建勋, 张伯礼, 陆融. 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] 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.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 何丽娜, 杨军, 姜洁, 等. 丹参酮对培养 PC12 细胞损伤模型的保护作用[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(6): 413-316.
- [6] Hong wang, James A. Joseph. Mechanisms of hydrogen peroxide induced calcium dysregulation in PC12 cells[J]. Free Radical Biology & Medicine, 2000, 28(8): 1222-1231.
- [7] 何丽娜, 何素冰, 杨军. 丹参酮氯化钾及 N-甲基-D-天门冬氨酸诱导 PC12 细胞钙超载损伤的保护作用[J]. 中国现代应用药学杂志, 2001, 18(3): 179-181.
- [8] 李小刚, 朱克, 李楠, 等. 谷氨酸对神经元钙离子内流和凋亡的影响及谷氨酸受体拮抗剂保护作用的研究[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2001, 3(2): 122-125.
- [9] 刘娜, 左萍萍, 周帆, 等. 连二亚硫酸钠致 PC12 和 NG108-15 细胞拟缺血损伤研究[J]. 中国药理学通报, 1998, 14(6): 525-529.
- [10] 娄淑杰, 王晨光, 黄秀英, 等. 高钾离子引起 PC12 细胞内游离  $Ca^{2+}$  浓度升高的机制[J]. 第二军医大学学报, 1998, 19(4): 343-346.