

# 补肾益智方拆方含药血清保护 A $\beta$ 25-35 损伤 NG108-15 细胞的研究

陈云波, 赖世隆, 胡镜清, 王 奇, 程淑意  
(广州中医药大学 DME 中心, 广东 广州 510405)

**摘要:** 目的: 研究中药补肾益智方拆方亚组的含药血清对 AD 细胞模型生长、分化等方面的影响, 探讨该方药物的配伍规律。方法: 将补肾益智方拆分为补肾组、益气养血组和去冰片组(即补肾组+ 益气养血组)等 3 个亚组, 连同原方组共 4 组对大鼠灌胃给药分离药物血清。在含各组血清的培养液中, 加入 A $\beta$ 25-35, 观察 NG108-15 细胞的生长状态、细胞增殖数、存活率、突起率及突起平均长度。结果: 与 AD 细胞模型组相比, 补肾益智方及各亚组含药血清都能在一定程度上抑制 A $\beta$ 25-35 对细胞的损伤作用, 但各组情况有所不同。各组含药血清对细胞的保护作用由强至弱依次是去冰片组> 补肾益智方组> 补肾组> 益气养血组。结论: 补肾药配伍益气养血药可增强对 A $\beta$ 25-35 损伤 NG108-15 细胞的保护作用, 其中以补肾药的作用为主, 方中冰片的功效有待进一步研究。

**关键词:** 阿尔茨海默病;  $\beta$  淀粉样蛋白; 补肾益智方; NG108-15 细胞

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2002)05-0027-04

## Protective Effect of the BSYZF-Contained Serum and its Subgroups on A $\beta$ 25-35 Induced NG108-15 Cells Injure

CHEN Yun-bo, LAI Shi-long, HU Jing-qing, WANG Qi, CHENG Shu-yi

(DME Center, Guang Zhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, 510405 China)

**Abstract:** To study the effects of the BuShenYiZiFang-contained serum (BSYZF) and its subgroups on the differentiation and growth of NG108-15 cells injured with A $\beta$ 25-35, and to investigate compatible effects of BSYZF. BSYZF was divided into three subgroups: BUSHEN group, YIQIYAANGXUE group, QUBINGPIAN group (BUSHEN plus YIQIYANGXUE, i. e. deleted borneol BSYXF). Four groups (BSYXF and its three subgroups) serum containing correspondent drugs were collected from rats, respectively, and used to culture cells. NG108-15 cells were cultured with A $\beta$ 25-35 for establishing cell model of Alzheimer's disease (AD). The cell morphology, cell viability and proliferation, and neurite outgrowth were observed. The results showed that all the herbage-contained serum could protect NG108-15 cells from A $\beta$ 25-35 neurotoxicity and the QUBINGPIAN was likely to have the best protective effect. The protective effects of the four groups were in the order: QUBINGPIAN> BSYZF> BUSHEN> YIQIYANGXUE.

**Key words:** Alzheimer's disease;  $\beta$ -Amyloid protein; Bashen Yizhi Fang Drugserum; NG108-15 cell

以往的研究表明, 补肾益智方能对 Alzheimer (AD) 模型大鼠学习记忆能力有一定的保护作用<sup>[1]</sup>; 该方含药血清也能增加被  $\beta$  淀粉样蛋白(A $\beta$ ) 25-35 损伤的 NG108-15 细胞的存活率和细胞突起, 减轻细胞对 A $\beta$  的神经毒性反应<sup>[2]</sup>。为了进一步了解该方改善 AD 模型大鼠学习记忆能力的作用机制及其配伍规律, 我们从中医理论出发, 按不同功效进行拆方, 然后在体外实验中, 用血清药理学的方法初步观

察了拆方后不同亚组血清对 AD 细胞模型的影响。

### 1 材料

**1.1 动物** SD 雄性健康大鼠, 体重 150~200g, 由广州中医药大学实验动物中心提供。

**1.2 细胞** NG108-15 细胞株由日本金泽大学神经物性部门提供。

**1.3 主要试剂** DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)、次黄嘌呤/胸腺嘧啶核苷(Hypoxanthine/Thymidine, H/T)、氨基喋呤(Aminopterin, A) 购自 Gibco 公司,  $\beta$  淀粉样蛋白 25-35 片段(A $\beta$ 25-35)、环磷酸腺苷(cAMP) 购自 Sigma 公司, 噻唑蓝(MTT, 进口分装)、二甲基甲酰

胺(DMF,进口分装)购自上海生工生物工程公司,其余试剂均为国产分析纯。

**1.4 药物** 补肾益智方由蛇床子(*Cnidium monnieri* (L.) Cuss.)、枸杞子(*Lycium barbarum* L.)、人参(*Panax ginseng* C. A. Mey.)、何首乌(*Polygonum multiflorum* Thunb.)、丹皮(*Paeonia suffruticosa* Andr.)、冰片等中药按一定的比例组成,均由广东省中医院药剂科提供。按功效的不同分为三个亚组:补肾组(蛇床子、枸杞等)、益气养血组(人参、制首乌等)、去冰片组(即补肾组+益气养血组)。由广东省中医院制剂室制成补肾益智方及各亚组浓缩液,主要制备过程为,先在适量沸水中加入丹皮提取10min,滤液冷藏备用;将人参切成薄片水提2次,合并滤液,浓缩冷藏备用;接着取上述经沸水提取10min后的丹皮药渣与蛇床子、枸杞子、何首乌等其它中药混合后水提3次,合并滤液,浓缩冷藏24h,再与人参提取液合并,同时,把用少量乙醇溶解的冰片和丹皮提取液加入其中混匀,最后用蒸馏水将提取液配成浓度为0.6g生药/ml,置4℃冷藏备用。

## 2 方法

**2.1 药物血清的制备** 将SD大鼠随机分为对照组、补肾益智方组(原方组)、补肾组、益气养血组、去冰片组,每组8只。将各组中药浓缩液按成人治疗剂量换算成大鼠用量,每次按1ml/100g大鼠体重(相当于每kg体重6g生药)分别进行灌胃,连续1个月,对照组灌等量生理盐水。各组大鼠最后1次灌胃2h后,20%乌来糖麻醉,心脏采血,1500r/min,20min,4℃离心分离血清。将每组8只大鼠血清混合,56℃灭活30min,除菌过滤后置4℃冰箱保存备用。

**2.2 细胞增殖培养** 根据我们课题组已报道的实验结果<sup>[2]</sup>,选择5%含药血清作为细胞培养用血清。将在液氮贮藏罐内保存的NG108-15细胞解冻后,离心去上清,用细胞增殖液(含5%胎牛血清、1% HAT即H/T加A的DMEM培养液)悬浮洗涤后,分装至25cm<sup>2</sup>细胞培养瓶(NUNC),在10%CO<sub>2</sub>、37℃的培养箱内静置培养。待基本长满后,用细胞增殖液将细胞数稀释至3万/ml,传到96孔培养板(NUNC),每孔100μl。48h后,用含5%大鼠血清的各组增殖培养液分别更换原培养液(共设6组,每组12孔),其中,对照组、模型组孔中的增殖培养液含正常大鼠血清,其余4组分别为补肾益智方及三个亚组的大鼠含药血清;同时每个孔加Aβ<sub>25-35</sub>至终浓度5μM(对照组除外),继续培养48h。

**2.3 细胞分化培养** 将上述在25cm<sup>2</sup>细胞培养瓶中长满的NG108-15细胞用细胞分化液(含5%胎牛血清、1% HT、1μM cAMP的DMEM培养液)稀释至3万/ml,按每孔100μl传到96孔培养板上,用含5%大鼠血清的各组分化培养液换液(分组同上),同上加Aβ<sub>25-35</sub>至终浓度5μM(对照组除外),继续培养48h。

## 2.4 观察指标及其方法

**2.4.1 细胞形态学观察** 每天用徕卡(Leica)公司DM倒置显微镜对96孔培养板上的各组细胞进行观察及拍照。

**2.4.2 细胞增殖数和存活率的检测** 用MTT法<sup>[3]</sup>对大鼠血清作用下增殖或分化培养48h后的细胞进行检测,可分别得到与以上两类细胞的增殖数和存活率相对应的OD值。吸弃每孔100μl培养液,加入不含血清的DMEM培养液,同时加20μl MTT,4h后加100μl的20% SDS-50% DMF液,37℃过夜。第二天用DG3022A型酶联免疫检测仪(华东电子管厂)在波长570nm处检测OD值。

**2.4.3 分化突起细胞占总细胞数的比率及突起平均长度** 对大鼠血清作用下分化培养48h后的细胞进行显微摄影,每组随机选4孔,每孔上、下、左、右、中各拍摄一张(取景范围基本覆盖整个孔)。底片冲洗后,用徕卡公司DMR图像分析仪对每张图片进行分析,得到分化突起细胞占总细胞数的比率及突起平均长度。

**2.5 统计学处理** 各组数据用( $\bar{x} \pm s$ )表示,用SPSS10.0软件对各组数据进行方差分析,显著性水平 $\alpha=0.05$ 。

## 3 结果

**3.1 各组细胞形态学观察** NG108-15细胞为神经瘤细胞,由小鼠的神经胚胎母细胞瘤与大鼠神经胶质细胞瘤细胞杂交而成,能无限地继代繁殖,具有神经细胞突起,在含与不含cAMP分化剂的培养液中分别呈增殖相和分化相<sup>[4]</sup>。各组血清作用48h后,增殖相细胞的突起较分化相短,细胞数量则比处于分化状态的多。增殖相细胞的形态学观察结果初步表明,模型组(即含正常大鼠血清的培养液中加Aβ<sub>25-35</sub>)细胞数量明显减少,部分细胞变黑、聚集及死亡;各含药血清组都能在不同程度上对Aβ损伤的体外培养神经细胞起到一定的保护作用,其中去冰片组的作用较好。分化培养的细胞形态学观察显示,与对照组相比,含Aβ各组都有较多的细胞变黑死亡,但各含药血清组仍有些带长轴突细胞存在,尤

其以复方组和去冰片组的数量较多。

**3.2 各组增殖培养细胞数的比较(表 1)** 经方差分析表明, 各组 OD 值间的差异具有非常显著性意义 ( $F= 19.38, P < 0.01$ )。与不含 A $\beta$  的对照组相比, 除去冰片组外 ( $P > 0.05$ ), 其余各组数量均显著减少 ( $P < 0.01$ ); 与含 A $\beta$  的模型组相比, 4 种含药血清组的细胞数都明显增加 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。4 种含药血清组之间两两比较则显示, 去冰片组的细胞数明显多于其余 3 组 ( $P < 0.01$ )。

表 1 补肾益智方拆方含药血清对 NG108-15 细胞增殖的影响 ( $n= 12$ )

组别	OD
对照组	0.665 $\pm$ 0.037
模型组	0.520 $\pm$ 0.022* *
原方组	0.568 $\pm$ 0.057* * # # $\Delta$ $\Delta$
补肾组	0.558 $\pm$ 0.042* * # $\Delta$ $\Delta$
益气养血组	0.560 $\pm$ 0.054* * # $\Delta$ $\Delta$
去冰片组	0.636 $\pm$ 0.035* #

注: 与对照组比较: \* \*  $P < 0.01$ ; 与模型组比较: #  $P < 0.05$ , # #  $P < 0.01$ ; 与去冰片组比较:  $\Delta$   $P < 0.05$ ;  $\Delta$   $\Delta$   $P < 0.01$ 。

**3.3 各组分化培养细胞存活率的比较(表 2)** 在分化剂 cAMP 的作用下, NG108-15 细胞将停止增殖而成为分化细胞, 不含 A $\beta$  的对照组细胞数与原传代播种时的数量基本相同, 可设定其存活率为 100%, 实验结果显示含 A $\beta$  的其余各组细胞数均低于对照组, 各组存活率见表 2。经方差分析表明, 各组 OD 值间的差异具有非常显著性意义 ( $F= 33.25, P < 0.01$ )。与对照组相比, 含 A $\beta$  各组细胞存活率均明显降低 ( $P < 0.01$ ); 而与含模型组相比, 4 种含药血清组的细胞存活率均都明显增加 ( $P < 0.01$ )。4 种含药血清组之间两两比较则显示它们的细胞数差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ )。

表 2 补肾益智方拆方含药血清对 NG108-51 分化细胞存活率的影响 ( $n= 12$ )

组别	OD	存活率%
对照组	0.380 $\pm$ 0.037	100.0
模型组	0.222 $\pm$ 0.025* *	58.4
原方组	0.275 $\pm$ 0.032* * # #	72.4
补肾组	0.260 $\pm$ 0.025* * # #	68.4
益气养血组	0.268 $\pm$ 0.022* * # #	70.5
去冰片组	0.288 $\pm$ 0.044* * # #	75.8

**3.4 各组分化突起细胞占总细胞数的比率及突起平均长度(表 3)** 经方差分析表明, 各组细胞突起

率间的差异具有非常显著性意义 ( $F= 7.32, P < 0.01$ )。与不含 A $\beta$  的对照组相比, 除去冰片组外 ( $P > 0.05$ ), 其余各组细胞突起率均显著降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); 与含 A $\beta$  的模型组相比, 原方组和去冰片组的细胞突起率均有明显提高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); 4 种含药血清组之间两两比较则显示, 去冰片组的细胞突起率明显多于其余 3 组 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 原方组的细胞突起率与补肾组及益气养血组相比虽有增加, 但差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ )。各组突起细胞突起平均长度间的差异也具有非常显著性意义 ( $F= 6.77, P < 0.01$ )。模型组的细胞突起平均长度明显短于对照组 ( $P < 0.05$ ), 4 种含药血清组的细胞突起平均长度与对照组相比虽有减少, 但差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ ); 与含 A $\beta$  的模型组相比, 4 种含药血清组的细胞突起平均长度均有明显增加 ( $P > 0.05, P < 0.01$ ), 它们之间两两比较则显示, 去冰片组、原方组的细胞突起平均长度与补肾组及益气养血组相比虽有增加, 但无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。

表 3 各组分化突起细胞占总细胞数的比率及突起平均长度比较 ( $n= 20$ )

组别	细胞突起率%	突起平均长度( $\mu$ m)
对照组	58.75 $\pm$ 12.84	493.8 $\pm$ 133.0
模型组	42.95 $\pm$ 11.42* *	356.0 $\pm$ 109.0*
原方组	50.00 $\pm$ 10.00* # $\Delta$	488.3 $\pm$ 65.8#
补肾组	45.58 $\pm$ 14.33* * $\Delta$ $\Delta$	461.7 $\pm$ 46.7# #
益气养血组	45.40 $\pm$ 7.70* * $\Delta$ $\Delta$	466.6 $\pm$ 74.4#
去冰片组	58.20 $\pm$ 8.40* #	486.8 $\pm$ 79.2# #

#### 4 讨论

补肾益智方针对老年性痴呆的中医病因病机设计组方, 主要由蛇床子、枸杞、人参、何首乌、丹皮、冰片等中药组成。方中用蛇床子、枸杞平补肾阴肾阳, 益髓填精, 人参、何首乌益气养血, 丹皮凉血活血, 冰片开窍醒神, 并为使药之用, 使药力直达病所, 兼取其开窍之功。全方针对痴呆的病因病机, 标本同治。本实验按补肾益智方具有的补肾、益气养血、开窍等功效的不同, 将其拆成补肾、益气养血和去冰片三个亚组, 观察各组含药血清对 A $\beta$ 25-35 损伤 NG108-15 细胞可能的保护作用, 探讨该方的配伍规律。

A $\beta$  是 Alzheimer 病患者大脑组织中老年斑的主要成分, 它的活性部位在第 25 到第 35 个的 11 个氨基酸片段, 将 A $\beta$ 25-35 的稀释液置 37  $^{\circ}$ C 培养箱进行“老化”, 其可产生有毒性的聚集物<sup>[5]</sup>。在本试验进

行之前,我们先观察了含不同浓度(5%、10%、20%)大鼠血清培养的NG108-15细胞的增殖率,然后进一步观察不同老化天数(1d、4d、7d、10d)、不同浓度(5 $\mu$ M、10 $\mu$ M、20 $\mu$ M)及不同作用时间(24h、48h、72h)的A $\beta$ 对细胞的影响,从中筛选出了在5%大鼠血清DMEM培养液中,用5 $\mu$ M、老化4d的A $\beta$ 作用48h后的最适宜的观察含药血清作用的条件(以上实验结果将在另文详细报道)。本研究中,经5 $\mu$ M A $\beta$ 25-35作用48h后,NG108-15细胞形态结构及生长分化情况较正常培养的细胞发生了明显的变化。无论是增殖相还是分化相,细胞数量都明显减少,部分细胞变黑、聚集及死亡;分化突起细胞占总细胞数的比率降低,细胞突起平均长度也明显减少。以上情况表明“老化”的A $\beta$ 25-35片段可损伤体外培养的NG108-15细胞,抑制细胞生长和细胞分化,并进一步诱导细胞死亡,该细胞损伤模型可在一定程度上模拟AD患者脑内神经元的损伤情况。

本实验结果表明,与上述AD细胞模型的状况相比,补肾益智方及各亚组含药血清都能在一定程度上抑制A $\beta$ 25-35对细胞的损伤作用,但各组情况有所不同。当NG108-15细胞处于增殖相时,去冰片组的细胞数量明显多于其他含药血清组,与正常对照组基本相同。当NG108-15细胞处于分化相时,由于细胞停止增殖的缘故,加上A $\beta$ 25-35的损伤,各含药血清组细胞数量都有不同程度的下降,它们之间的存活率基本一致,但仍高于模型组。进一步分析各含药血清组分化细胞突起突起率及突起平均长度,则可以看出各含药血清作用的差异。与模型组比较,只有原方组和去冰片组的细胞突起率有明显提高;含药血清各组间相比,去冰片组的细胞突起率明显多于其余3组,原方组比补肾组及益气养血组也略有增加。从各含药血清组突起细胞突起平均长度来看,4种含药血清组都比模型组长,且与对照组相接近,同时,去冰片组、原方组都略长于补肾组及益气养血组。各含药血清组培养细胞的图片显示,去冰片组的细胞的生长状态较佳,其次是原方组和补肾组,益气养血组较差。综上所述,可以看出补肾益智方及拆方含药血清保护A $\beta$ 25-35损伤NG108-15

细胞的作用依次为,去冰片组> 补肾益智方组> 补肾组> 益气养血组。

补肾益智方组及去冰片组作用优于拆方亚组补肾组和益气养血组,即补肾和益气养血亚组各味中药之间具有一定的协同作用,这从体外实验初步证实了该方配伍的合理性;拆方亚组补肾组优于益气养血组,说明相对益气养血组而言,该亚组含药血清中的有效成分在保护A $\beta$ 25-35损伤NG108-15细胞的作用中可能起主要作用。在本实验中,还发现去冰片组的作用强于补肾益智方原方组。近来的研究表明,冰片能促进药物穿过血脑屏障<sup>[6]</sup>,就补肾益智方对AD整体动物模型治疗作用及临床用药来说,冰片应能促进药物的有效成分对大脑神经元的保护作用。我们推测,本实验中含冰片的补肾益智方,可能因冰片促进药物有效成分透过血脑屏障而降低了其在血液中的浓度,导致去冰片组和补肾益智方组血清保护A $\beta$ 25-35损伤NG108-15细胞的作用有所不同。当然,这有待于进一步的体外实验(如灌药动物脑脊液对体外培养细胞的影响)验证。

#### 参考文献:

- [1] 赖世隆,饶燕,高洁,等. 补肾益智方改善 Alzheimer 病模型大鼠的学习记忆能力[J]. 中药新药和临床药理, 2000, 11(6): 337.
- [2] 钟振国,刘茂才,赖世隆,等. 补肾益智方对由A $\beta$ 片段神经毒性诱导NG108-15细胞老年性痴呆模型神经递质释放影响的研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2002, 22(1): 50.
- [3] 郑永唐,贲昆龙. 测定细胞存活和增殖的MTT方法的建立[J]. 免疫学杂志, 1992, 8(4): 266.
- [4] Nelson P, Christian C Nirenberg M. Synapse formation between clonal neuroblastoma  $\times$  glioma hybrid cells and striated muscle cells[J]. Proc Nat Acad Sci, 1976, 73:123.
- [5] Pike CJ, Walencewicz AJ, Glabe LG, et al. *In vitro* aging of  $\beta$ -amyloid protein causes peptides aggregation and neurotoxicity [J]. Brain Res, 1991, 563: 311.
- [6] 刘启德,梁美蓉,陈芝喜,等. 冰片对庆大霉素透血脑屏障的作用[J]. 广州中医学院学报, 1994, 11(1): 37.