

• 药理 •

六味地黄汤及其活性组分含药血清对原代培养海马神经元的保护作用

聂伟, 张永祥, 周金黄

(北京毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要: 目的: 运用血清药理学方法观察六味地黄汤(LW)及其活性组分(CA4、CA4-3)含药血清对原代培养胚胎大鼠海马神经元的保护作用。方法: 首先通过MTT法观察了LW及CA4、CA4-3对海马神经元存活的影响, 进而采用流式细胞术观察LW及CA4、CA4-3对海马神经元线粒体膜电位的影响。结果: LW及CA4、CA4-3含药血清均可不同程度地提高海马神经元的存活率, 并且稳定线粒体膜电位与其神经保护作用具有密切关系。

关键词: 血清药理学; 海马神经元; 线粒体膜电位

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2001)06-0014-04

Neuroprotective Effect of the Serum of Contained Liuwei Dihuang(LW) and its Active Fractions on Primary Cultured Hippocampal Neurons

NIE Wei, ZHANG Yong-xiang, ZHOU Jin-huang

(Beijing Institute of Pharmacology and Toxicology, Beijing 100850)

Abstract: Serum pharmacology was used to observe the effect of the serum with LW and its active fractions (CA4, CA4-3) on primary cultured hippocampal neurons. The effect of the serum with LW and CA4, CA4-3 on the survival of primary cultured hippocampal neurons was firstly observed with MTT assay. Mitochondrial membrane potential (MMP) of hippocampal neurons was further studied with flow cytometry and the serum with LW and CA4, CA4-3. Results indicate the serum with LW and CA4, CA4-3 improved the survival of primary cultured hippocampal neurons, on which the stabilization of MMP plays a key role.

Key words: Serum pharmacology; Liuwei Dihuang (LW) and its active fractions (CA4, CA4-3); hippocampal neurons; mitochondrial membrane potential

祖国传统中医药理论对老年痴呆等中枢神经退行性疾病有独到的认识, 认为“肾主骨, 藏精, 生髓, 通于脑”。衰老的发生、发展及老年性痴呆的发病均与增龄性“肾虚”有密切关系, 因此, “补肾”被认为是预防和治疗老年性痴呆的重要手段之一^[1]。

六味地黄(Liuwei Dihuang, LW)方是中药滋补肾阴的代表名方, 由熟地、山药、山茱萸、茯苓、泽泻、牡丹皮组成。中医临床上广泛地应用于与肾阴虚相关疾病的治疗, 如腰膝酸软、头晕目眩、耳鸣、耳聋、遗精和盗汗等。本室已有研究表明, LW具有益智作用^[2]。长期给予LW可明显改善快速老化模型小鼠

学习记忆能力, 其中调节下丘脑-垂体-肾上腺(Hypothalamus-pituitary-adrenal, HPA)轴平衡、促进海马神经突触功能等与LW益智作用密切相关^[3]。但有关LW益智作用的机理尚不十分清楚。

已有许多研究表明, 保护神经元免受损伤因素的侵害, 提高其生存质量是发挥益智作用的重要途径之一。因此我们采用血清药理学方法观察了LW及其活性组分CA4、CA4-3含药血清对原代培养胚胎大鼠海马神经元的作用。

1 材料与方法

1.1 药物 六味地黄由熟地、山茱萸、山药、泽泻、牡丹皮和茯苓按8:4:4:3:3:3的比例混合, 加入6倍量蒸馏水煎煮3h, 所得药渣同法再煎煮一次, 过滤, 与第一次煎煮滤液混合并浓缩至浓度为1g(生药)/ml, 高压灭菌, 4℃保存备用。

收稿日期: 2001-04-04

基金项目: 国家科技部973项目 No: G1999054401及军队杰出人才基金资助项目

CA4: 六味地黄汤水煎剂经醇沉, 50℃水溶解, 离心得上清液, 沉渣部分同法处理得上清液, 加入活性炭柱中, 依次用水、醇、氨水处理, 冷冻干燥得有效部位CA4。初步化学分析结果表明, CA4 主要含有酸性多糖, 分子量 5 000~ 40 000 之间。

CA4-3: CA4 溶于水中, 过滤, 加入 DEAE-纤维素中, 分别以水、碳酸氢钠 (NaHCO₃) 和氢氧化钠 (NaOH) 处理, 冷冻干燥得有效成分 CA4-3。CA4-3 为 CA4 的主要成分, 其得率最高, 主要成分是酸性多糖, 纯度较高。

1.2 含药血清制备 取 Wistar 大鼠 (200~ 250g) 随机分组, 每组 6 只, 即对照组, 六味地黄汤三个剂量组 (2.5、5、10g/kg), CA4 三个剂量组 (60、120、240mg/g) 及 CA4-3 三个剂量组 (10、20、40mg/g), 每日 1 次连续 3d。于末次给药后 1h 股动脉取血, 2500rpm 离心 25min, 分离血清, 经 56℃, 30min 灭活。真空冷冻干燥后, 用等体积 DMEM 溶解, 一定体积稀释后, 0.22μm 滤膜过滤灭菌, -30℃保存备用。

1.3 胚胎大鼠海马神经细胞培养 戊巴比妥钠 (50mg/kg) 腹腔注射麻醉, 无菌条件下从 Wistar 孕鼠 (北京医科大学动物中心提供, No. 013056) 腹中取出胎鼠 (怀孕 18d)。解剖镜下分离海马并投入冰冷 0.01M PBS (含 10mM 葡萄糖) 中。剪碎海马并用 0.125% 胰蛋白酶 (Gibco, USA) 于 37℃消化 20min。细胞经洗涤后在 DMEM 培养基 (含 2mM 谷氨酰胺, 25mM 葡萄糖, 10% 胎牛血清和 10% 马血清) 中计数。将细胞悬液 (50 万/ml) 加入预先用 50μg/ml 多聚赖氨酸 (sigma, USA) 包被的 96 孔或 35mm 培养板中, 细胞在 37℃ 5% CO₂-95% 空气中培养。24h 后换液 (DMEM 培养液中含 10% 马血清), 每 3d 换液一次。神经细胞于第 4 天加入 3μg/ml 阿糖胞苷以抑制胶质细胞等非神经元的生长, 在培养 7~ 9d 后, 换低糖 (3mM) 无血清 DMEM 培养液, 分别加入正常血清对照, 含药血清对照, 使血清终浓度为 8%, 继续培养 48h, 用于实验。

1.4 原代培养海马神经细胞存活率的测定 细胞存活率测定用 MTT 法。神经细胞经无血清对照、正常血清对照及含药血清处理 48h 后 (血清添加量为 8%), 反映体系的总体积为 100μl, 细胞浓度为 50000 个/孔, 加入 MTT 磷酸盐缓冲液 (终浓度 0.5mg/ml), 继续培养 1.5~ 2.5h, 吸出培养液, 加入 100μl/孔 100% 二甲基亚砜, 轻轻振荡, 待孔内蓝色颗粒完全溶解后, 在酶联免疫检测仪 (Multiscan Mcc340, Titer-

tek, USA) 上读取光密度 OD 值 (波长 570nm)。每组设 6 个平行样。LW 及其 CA4、CA4-3 含药血清对原代培养海马神经细胞存活率的计算方法为:

$$\text{细胞存活率} \% = \frac{\text{OD}_{\text{无血清对照}} (\text{或 } \text{OD}_{\text{含药血清}})}{\text{OD}_{\text{无血清对照平均值}}} \times 100\%$$

1.5 原代培养海马神经细胞线粒体膜电位的测定

神经细胞经无血清对照、正常无药有血清对照及含药血清处理 48h 后, 倾去培养液, 用 0.125% 胰酶消化, 制备成细胞悬液, 800rpm 离心 10min, 重悬于 PBS 中, 加入 Rhodamine 123 (Rho-123) 至终浓度 5μg/ml, 在培养箱中负载 40~ 45min, 同前离心, 并将负载细胞用 PBS 洗两次, 每次室温避光放置 10~ 15min 以洗去胞浆负载。负载细胞重悬于 PBS 中, 上机检测前 10min 加入 PI 至终浓度 10μg/ml, 检测细胞活性。激发波长 488nm 和 568nm, 发射波长 527nm 和 675nm, 检测神经细胞线粒体膜电位, 分别记录散点图及荧光强度图^[5]。

1.6 统计学处理 所有数据均以均值 ± 标准差表示, 采用 *t* 检验, *P* < 0.05 时差别有统计学意义。

2 结果

2.1 六味地黄汤 (LW) 及其活性组分 (CA4、CA4-3) 含药血清对原代培养海马神经细胞存活率的影响 海马神经细胞与无血清对照、无药血清对照或 LW 含药血清共孵育 48h 后, LW 含药血清组可明显提高海马神经细胞的存活率 (*P* < 0.01), 并且有一定的量效关系 (Fig1)。同样, CA4-3 含药血清组亦可明显增加海马神经细胞存活率 (Fig2)。

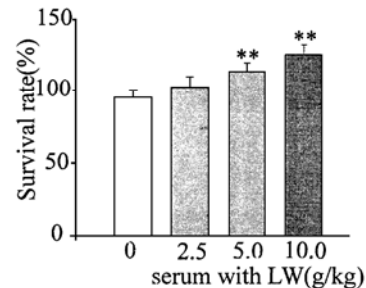


Fig1. LW 含药血清对原代培养海马神经存活的影响

0: control, 含正常血清对照组; 其它组为 LW 不同剂量含药血清组。
n = 6, *means* ± *SD*. ** *P* < 0.01, compared with 0.

2.2 六味地黄汤 (LW) 及其活性组分 (CA4、CA4-3) 含药血清对原代培养海马神经细胞线粒体膜电位的影响 线粒体膜电位下降是细胞死亡早期发生的一个决定性变化。Rho-123 作为荧光探针, 可特异性标记线粒体。标记后神经细胞的荧光强度可以反映线粒体膜电位高低。当海马神经细胞与含药血清共孵育 48h 后, 无血清对照组与无药血清对照组相比, 线

粒体膜电位无明显变化。但 LW 含药血清(10g/kg)、CA4(120mg/g)或 CA4-3(40mg/kg)可明显使荧光分析图右移(与正常无药有血清对照组相比),表明其可明显提高海马神经细胞线粒体膜电位,其中以 LW 含药血清组(10g/kg)作用最强(Fig3)。

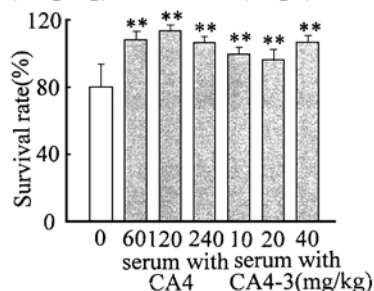


Fig2. CA4 .CA4-3 含药血清对原代海马神经元存活的影响
0: 为含正常大鼠血清对照组;其它组为 LW 不同剂量含药血清组。
n = 6, means ±SD. ** P < 0.01, compared with 0.

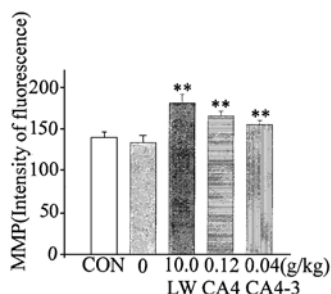


Fig3. LW, CA4 及 CA4-3 含药血清对原代海马神经细胞线粒体膜电位的影响
MMP: 线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP); CON: 无血清对照组; 0: 含正常血清对照组。n = 6, means ±SD. ** P < 0.01, compared with 0.

3 讨论

离体培养细胞是从细胞水平研究药物机制较为理想的体外模型^[4]。但由于中药多属粗制剂,如果直接加入细胞培养体系,其中的杂质、电解质及酸碱度等都会对细胞产生影响,从而干扰实验结果。因此,近年来,有学者提出应用血清药理学^[5],即中药粗制剂经口服吸收后采用其含药血清进行体外实验。此研究方法首先由日本学者 Hiriko Iwama^[6]于1987年在日本召开的第一届和汉医药学会上首先采用并提出。它在某种程度上克服了中药制剂本身的理化性质等不确定因素的干扰,不仅反映药物可吸收部分的直接作用,也可反映药物在机体作用下形成的代谢物诱生的机体内源性物质的影响,不仅排除了各种影响因素的干扰,而且更接近药物在体内环境中产生药理效应的真实过程,从而提高结果的可信度^[7]。

ATP 是神经细胞能量来源的直接提供者,线粒

体是机体体内进行能量转变的主要细胞器,其通过氧化磷酸化过程将底物氧化产生的能量转变成细胞可利用的形式- ATP,以提供各种生命活动所需。因此,线粒体是细胞功能正常发挥的调控和实施者,而线粒体膜电位又是线粒体发挥功能所必需的。线粒体膜电位受损将影响线粒体的功能,最终导致细胞死亡。已有文献报道,老年痴呆患者脑内不仅有大量神经元丢失,而且此时中枢能量水平低下(表现为 ATP 和 ADP 水平下降),能量储备降低^[8-9]。给老年痴呆患者脑组织进行检查时发现,神经细胞线粒体氧化磷酸化部分去耦联,即 ADP 转换为 ATP 功能受损^[10-11]。提示,老年痴呆患者中枢能量缺乏、神经元数目减少与其线粒体功能障碍密切相关。

我室已有研究表明,长期给予 LW 及其活性组分 CA4 可明显提高快速老化模型小鼠(SAM)学习记忆功能,提高海马脑区 ATP、ADP 和 AMP 水平,其中对 ADP 和 AMP 水平升高作用最显著^[3],表明 LW 提高 SAMP8 学习记忆功能障碍与其改善 SAMP8 中枢海马能量代谢密切相关。在此基础上,本研究应用血清药理学方法进一步从细胞水平观察了 LW 及其活性组分 CA4、CA4-3 含药血清对海马神经细胞的保护作用。MTT 法结果表明, LW 及 CA4、CA4-3 含药血清可明显提高原代培养海马神经细胞存活率。而在同样培养条件下, CA4、CA4-3 对海马神经细胞作用不明显(结果未附)。Rh_o-123 为带正电荷的亲脂性荧光染料,要特异性标记线粒体,进入线粒体内膜(内膜带负电荷)。线粒体内 Rh_o-123 的荧光强度可以反映 MMP 的高低。凡能引起线粒体去极化,破坏能量代谢的物质(如 protonophores 或 antimycin A)均可使荧光强度减弱,线粒体膜通透性升高^[12-13]。应用流式细胞术研究发现 LW 及 CA4、CA4-3 含药血清均可明显提高线粒体膜电位,稳定线粒体功能。揭示, LW 及 CA4、CA4-3 的神经保护作用与其稳定线粒体膜电位密切相关。有关其作用机制有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 周金黄,刘干中,王建华,等.老年性痴呆的研究进展[M].中药药理与临床.第四册.北京军事医学科学出版社,1996.219-225.
- [2] 周建政,张永祥,周金黄.六味地黄汤对快速老化模型小鼠(SAM)学习记忆能力的改善作用[J].中国实验方剂学杂志.1999,5(4):29-33.

- [3] 周建政,张永祥,周金黄. 糖皮质激素对海马学习记忆相关机能的影响及六味地黄汤益智作用的初步研究 [J]. 中国人民解放军军事医学科学院(博士)研究生论文, 1995. 8-1998. 7.
- [4] Peruche B, Kriegelstein J. Neuroblastoma cells for testing neuroprotective effects [J]. *J Pharmacol Meth*, 1991, 23: 63-65.
- [5] Sureda FX, Escubedo E, Gabriel C, et al. Mitochondrial membrane potential [J]. measurement in rat cerebellar neurons by flow cytometry. 1997, 28: 74-80.
- [6] Hiriko Iwama, Sakae Amagaya, Yukio Ogihara, et al. Effect of Shassaikoto. A Japanese and Chinese herbal medical mixture, on the mitogenic activating of lipopolysaccharide a new pharmacological testing model [J]. *J Ethnopharmacol*, 1987, 211: 45.
- [7] Amagaya S, Kazumichi, Miyake A, et al. A new pharmacological testing method Different effects of levamisole and the serum of orally treated with levamisole on mitogenic activity of lipopolysaccharide [J]. *J Chem Pharm Bull*, 1989, 37(4), 1117.
- [8] Beal MF. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neuronal neurodegenerative illness? [J]. *Ann Neurol*, 1992, 31: 119-130.
- [9] Pettegrew JW, Panchalingam K, Klunk WE, McClure RJ and Muenz LR. Alterations of cerebral metabolism in probable Alzheimer's disease; A preliminary study [J]. *Neurobiol Aging*, 1994, 15: 117-32.
- [10] Brown GG, Levine SR, Gorell JM, et al. In vivo 31P NMR profiles of Alzheimer's disease and multiple subcortical infarct dementia [J]. *Neurology*, 1989, 39: 1423-1427.
- [11] Kumar A, Schapiro MB, Grady C, et al. High resolution PET studies in Alzheimer's disease [J]. *Neuropsychopharmacology*, 1984, 4: 35-46.
- [12] Marzo I, Susin SA, Petit PX and Kroemer G. Caspase disrupt mitochondrial membrane barrier function [J]. *FEBS Lett*. 1998, 427(20): 198-202.
- [13] Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Petit PX and Kroemer G. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo [J]. *J Exp Med*. 1995, 181(5): 1661-72.