

黄连解毒汤有效部位对一氧化氮诱导大鼠皮层神经元损伤的保护作用

吴彦^{1*}, 孙建宁², 石任兵²

(¹北京维健生生物科技有限公司, 北京 100039; ²北京中医药大学中药药理系, 北京 100102)

【摘要】 目的: 观察黄连解毒汤有效部位(HJDAF)对培养皮层神经细胞一氧化氮损伤的保护作用。方法: 体外培养新生大鼠皮层神经细胞, 加入硝普钠观察其对神经细胞的损伤及HJDAF的保护作用。结果: HJDAF(153 mg/kg)可减少受损细胞的乳酸脱氢酶(LDH)漏出率; 610, 305, 153 mg/kg可提高受损细胞的活性, 减少丙二醛(MDA)生成($P < 0.05$; $P < 0.01$); 610 mg/kg可提高受损细胞超氧化物歧化酶(SOD)的活性。结论: HJDAF对培养神经细胞NO损伤具有一定的保护作用, 其机制可能与抗脂质过氧化作用有关。

【关键词】 黄连解毒汤有效部位; 一氧化氮; 皮层神经元; 损伤; 细胞培养

【中图分类号】 R965 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-5048(2005)01-0059-04

黄连解毒汤源于唐代王焘《外台秘要》, 由黄连、黄芩、黄柏和栀子组成, 为清热解毒代表方。近年中日两国对黄连解毒汤及其提取物用于脑血管病的基础研究与临床报道较多^[1-3], 提示本方治疗缺血性脑血管病有良好前景。本文运用复方有效部位研究模式与方法^[4], 利用大孔树脂分离得到了黄连解毒汤有效部位(HJDAF), 并对该有效部位的药效药理进行了研究。实验表明, HJDAF能显著改善多种脑缺血造成的损伤, 其机理与减轻脑组织脂质过氧化损伤等有关^[3]。本实验采用NO损伤大鼠皮层神经细胞的方法, 观察HJDAF对此损伤的影响, 探讨其对神经细胞的保护作用, 以阐明HJDAF治疗脑缺血的机理。

1 材料

1.1 仪器

DMIL HC 倒置显微镜(德国徕卡公司); CO₂培养箱(美国N.C公司); MK3型自动酶标仪(芬兰雷勃公司); 722型分光光度计(上海第三分析仪器厂)。

1.2 药品和试剂

黄连解毒汤有效部位(HJDAF), 由北京中医药大学中药学院中药化学系提供。组方: 黄连9 g、栀子9 g、黄柏6 g、黄芩6 g。

黄连解毒汤流浸膏(HLJDTD), 组方同上, 制备成每毫升相当于原药材1 g的流浸膏; 牛黄清心丸(NHQXW, 同仁堂集团公司产品); 乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(南京建成生物工程研究所提供); 马血清(Hyclone公司); DMEM高糖培养基、胎牛血清、胰蛋白酶(Gibco公司); Hepes(德国B.M公司); 胰岛素(上海生物化学制药厂); 盐酸阿糖胞苷(cytarabine hydrochloride, 北京医科大学实验药厂); 牛血清白蛋白、台盼蓝(美国Sigma公司); 青霉素、链霉素(华北制药股份有限公司); 硝普钠(SNP, 北京制药工业研究所实验药厂); 其他试剂均为国产分析纯。

1.3 动物

新生Wistar大鼠(24 h以内); 成年Wistar大鼠, 雄性, 体重200~220 g, 均由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 批号: SCXK(京)2002-0003。

2 方法

2.1 有效部位的分离与鉴定

按处方配伍的生药粉碎后用水进行提取, 提取液过滤, 滤液静置, 高速离心得到沉淀(I); 滤液上大孔吸附树脂, 稀醇洗脱部分, 真空浓缩干燥, 得到固体(II)。将I与II进行均匀混合, 即得有效部位,

整体收率 7.6%。将所得有效部位的化学成分进行分离分析,其主要由生物碱类、黄酮类、环烯醚萜类成分所组成。利用分光光度法分别测定生物碱类、黄酮类和环烯醚萜类成分的含量;用 HPLC 法测定其指标性成分小檗碱、黄芩苷、栀子苷的含量。有效部位(群)的总含量高于 55%,指标性成分(群)的总含量高于 25%。

2.2 药物血清的制备

Wistar 大鼠,随机分为 6 组。正常对照组、HJDCAF 610, 305, 158 mg/kg 组(提取物量,分别相当于生药量 8 g, 4 g, 2 g/kg)、HLJDTD 4 g/kg 组(生药量)和 NHQXW 1.6 g/kg 组。药物按剂量,每日分上、下午两次灌胃给药,正常组给 0.5% CMC, 1 ml/100 g, 第 5 次全量给药 2 h 后颈总动脉取血,4 °C 保存 4 h, 3 000 r/min 离心 20 min, 取上清,混匀, 56 °C 灭活 30 min, 过滤除菌, 分装, -20 °C 贮存。

2.3 大鼠大脑皮层神经细胞的原代培养

无菌条件下分离出生仅 24 h 的乳大鼠大脑皮层,迅速放入解剖液中,剔除软脑膜和血管,将分离出的皮层组织置于盛有解剖液的平皿内,用眼科剪剪成约 300~500 μm 的脑片,用终浓度为 0.125% 胰酶 37 °C 消化 30 min。接种培养液中止消化两次,吹打分散细胞,将细胞悬液经 200 目金属网过滤,调整细胞数至 $1.0 \times 10^6 \text{ cells/ml}$, 0.4% 台盼蓝镜检,存活率大于 95%。将制备好的神经细胞悬液接种到 0.001% 多聚赖氨酸处理过的培养板中或培养瓶中,置 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养,24 h 待细胞贴壁后换培养液(全换),去除死细胞,以后每 3 d 换液 1 次,细胞培养至第 4 天,加入阿糖胞苷(终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$)培养 48 h,以抑制非神经细胞过度增殖,48 h 后换新鲜的培养液继续培养。

2.4 皮层神经细胞 NO 损伤模型的建立

取培养 10 d 的神经细胞去除原培养液后,损伤组用无糖 Earle's 液洗 2 遍,加入无血清培养液 DMEM,加入终浓度为 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 mmol/L 硝普钠培养 15 min, DMEM 洗两次,换上无血清的 DMEM 培养基,并置于 37 °C, 5% CO₂ 孵箱中继续培养 24 h。

乳酸脱氢酶活性测定:选用 24 孔板培养细胞,每孔加培养液 500 μl ,每个损伤剂量组 6 孔,造模 24 h 后收集培养液上清液 100 μl ,剩余培养液 -20 °C 冰箱冻存 5 h。化冻后,按试剂盒说明书分

别测定原上清液乳酸脱氢酶(LDH)的活性和培养板中剩余培养液冻融后的 LDH 活性,计算 LDH 漏出率。漏出率 = 上清液 LDH 活性/冻融后细胞培养液中 LDH 活性 × 100%。

2.5 HJDCAF 对 NO 诱导原代培养神经细胞拟缺糖缺氧损伤的保护作用

用 24 孔板培养细胞,细胞培养与造模方法均同前,硝普钠终浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 。在硝普钠损伤前,给药各组各孔分别加入 HJDCAF 610, 305, 153 mg/kg; HLJDTD 4 g/kg 和 NHQXW 1.6 g/kg 的含药血清占总体积 10%。培养 30 min 后,再加入硝普钠损伤。对照组和模型组分别加入正常对照组血清 10%。

MTT 法测定细胞活性:用 96 孔板培养细胞,每孔加入培养液 100 μl ,细胞培养与造模方法均同前,每组 6 孔,实验结束前 4 h 加入 MTT(终浓度为 0.5 g/L),吸去培养液,每孔加入 DMSO 200 μl ,待孔内颗粒完全溶解后,用酶联免疫检测仪测定 570 nm 处的吸收值。

用 24 孔板培养细胞,每组 6 孔,细胞培养与造模方法均同前,LDH 漏出率测定方法同上;MDA 含量及 SOD 活性的测定:细胞用 PBS 洗 2 遍,每孔加入 0.1 mol/L PBS,加入 1% Triton X-100 0.1 ml 裂解细胞,培养板振荡使之溶解,3 000 r/min 离心后,测定裂解液 MDA 和 SOD。

2.6 统计方法

计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,用统计软件 SPSS 10.0 进行单因素方差分析。

3 结果

3.1 不同浓度硝普钠对神经细胞损伤的比较

由表 1 可见,硝普钠 50~1 000 $\mu\text{mol/L}$ 均可引起细胞损伤,表现为 LDH 漏出率明显增加。

表 1 不同浓度硝普钠对神经细胞损伤的比较
Tab 1. Effect of different concentration of sodium nitroprusside(SNP) on cerebral cortical neuron injury (n=6)

Group	Concentration($\mu\text{mol/L}$)	Leakage rate of LDH(%)
Control	—	25.32 ± 4.62
SNP	0.05	27.37 ± 3.92
	0.1	30.10 ± 4.14 *
	0.2	40.17 ± 4.26 **
	0.5	46.34 ± 4.51 **
	1.0	52.64 ± 4.51 **

*P < 0.05; **P < 0.01 vs control

3.2 HJDAF 对 NO 诱导原代培养神经细胞拟缺糖缺氧损伤的保护作用

由表 2 和表 3 可见, 造模后细胞活性降低, LDH 漏出率增高, MDA 含量增加, SOD 活性降低 (与对照组比较 $P < 0.05$; $P < 0.01$)。HJDAF 610, 305, 153 mg/kg 可提高模型细胞活性 ($P < 0.05$; $P < 0.01$), 153 mg/kg 可减少模型 LDH 漏出率。同时 HJDAF 各剂量均可减少 MDA 生成, 610 mg/kg 可升高模型 SOD 活性。

Tab 2. Protective effect of HJDAF on neuron activity and leakage rate of LDH in cerebral cortical neuron injury induced by NO ($n=6$)

Group	Dose (mg/kg)	MTT (A_{570})	Leakage rate of LDH (%)
Control	—	0.67±0.08 **	24.41±8.69 **
Vehicle	—	0.50±0.05	47.80±8.92
HJDAF	610	0.59±0.07 *	39.71±6.67
	305	0.58±0.07 *	39.18±13.69
	153	0.60±0.08 *	24.06±9.04 **
HLJDTD	4 000	0.64±0.08 **	21.09±4.64 **
NHQXW	1 600	0.75±0.11 **	46.06±8.20

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs vehicle

Tab 3. Protective effect of HJDAF on MDA content and SOD activity in cerebral cortical neuron injury induced by NO ($n=6$)

Group	Dose (mg/kg)	MDA (nmol/mgpr)	SOD (U/mgpr)
Control	—	5.90±1.66 *	66.77±3.35 *
Vehicle	—	8.04±1.50	59.35±6.31
HJDAF	610	5.70±1.03 *	66.51±3.61 *
	305	4.71±1.35 **	59.07±4.10
	153	4.76±0.96 **	57.15±8.20
HLJDTD	4 000	4.28±1.46 **	55.77±5.74
NHQXW	1 600	5.24±2.10 *	73.51±9.21 *

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs vehicle

4 讨论

硝普钠在水溶液中能够分解释放出 NO, 因此其常作为 NO 的体外供体用以研究 NO 对各种培养细胞的作用。以往的研究证明, 硝普钠对体外培养的神经细胞具有剂量依赖性损伤作用^[6], 本研究结果与其相似。

许多研究证实, NO 在缺血缺氧性脑损伤中起着关键作用^[7]。缺血性脑损伤发生过程中, 谷氨酸和天冬氨酸大量释放, 这些兴奋性氨基酸与 NMDA 受体结合而引起钙通道大量开放, Ca^{2+} 大量内流,

进而激活依赖 Ca^{2+} 和钙调蛋白的 NOS, 合成过量的 NO, 最终引起 CNS 神经细胞的损伤, 即认为 NO 介导了兴奋性氨基酸的神经毒作用。NO 产生神经毒作用的可能机理是: NO 与 O_2^- 结合产生过氧化亚硝基 $ONOO^-$, 这是一种强氧化剂, 能氧化蛋白质的巯基, 使多种酶失活, 并且可使脂质过氧化, 其速率是 H_2O_2 使脂质过氧化的 1 000 倍, 从而严重影响生物膜的功能。因此, 目前普遍认为 NO 的神经损伤作用可能是由其自由基性质造成的^[8]。本文的实验结果表明: 硝普钠损伤神经细胞后, 神经细胞裂解液中 MDA 的含量明显增加, SOD 活性明显下降, 这说明在 NO 体外损伤神经细胞过程中脂质过氧化作用增强, 而脂质过氧化可能是 NO 发挥其体外神经损伤作用的机制之一。

本研究结果显示: HJDAF 对 NO 造成的培养皮层神经细胞损伤有一定的保护作用, 表现为细胞活性升高, LDH 漏出率降低; 同时裂解液中 SOD 活性升高, MDA 生成减少, 表明其拮抗 NO 损伤的作用可能与其抗脂质过氧化作用有关。至于本研究中 HJDAF 对细胞损伤的作用未显示明显的量效关系, 这可能与口服药物浓度较大时吸收不好有关。

【参考文献】

- 陈光亮(Chen GL), 张秀荣(Zhang XR), 王钦茂(Wang QM). 黄连解毒汤药理研究进展[J]. 安徽医学院学报, 2001, 20(5): 67-69.
- 泉山隆男. 黄连解毒汤胶囊治疗脑中风后遗症的效果[J]. 日本医学介绍, 1997, 18(2): 90.
- 温跃才(Wen YC). 加味黄连解毒汤治疗脑梗塞 100 例[J]. 吉林中医药(*J Tradit Chin Med Chin Mater Med Jilin*), 1998, 18(1): 26-27.
- 梁吉春(Liang JC), 石任兵(Shi RB), 刘斌(Liu B), 等. 银翘散研究方法的新探讨[J]. 北京中医药大学学报(*J Beijing Univ Tradit Chin Med*), 1999, 22(1): 37-38.
- 吴彦(Wu Y), 孙建宁(Sun JN), 张爱林(Zhang AL), 等. 黄连解毒汤有效部位对实验性脑缺血的保护作用[J]. 中药材(*J Chin Med Mater*), 2004, 27(5): 361-364.
- 许丽艳(Xu LY), 吕晓红(Liu XH), 李恩民(Li EM), 等. 一氧化氮对体外培养大鼠大脑神经细胞的神经毒作用的初探[J]. 中风与神经疾病杂志(*J Apoplexy Nerv Dis*), 1994, 11(6): 339-341.
- Kader A, Frazzini VI, Solomon RA. Nitric oxide production during focal cerebral ischemia in rats[J]. *Stroke*, 1993, 24(11): 1709-1716.
- Dawson VL, Dawson TM, London ED, et al. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 6 368-6 373.

Protective Effect of Huanglian Jiedu Decoction Active Fraction on NO-induced Cerebral Cortical Neuron Injury

WU Yan¹, SUN Jian-Ning², SHI Ren-Bing²

(¹Beijing Vital Care Biothe Inc., Beijing 100039;

²Department of TCM Pharmacology, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

【ABSTRACT】 AIM: To investigate protective effects of Huanglian Jiedu Decoction active fraction (HJDAF) on NO-induced cerebral cortical neuron injury. METHOD: Cortical neuron cells of newly born rat were prepared cultured *in vitro*. The model of NO-induced cerebral cortical neuron injury was constructed. RESULT: HJDAF(153 mg/kg) reduced the leakage rate of lactic dehydrogenase (LDH); 610, 305, 153 mg/kg increased the activity of neuron and reduced the production of maleic dialdehyde; 610 mg/kg increased the activity of SOD. CONCLUSION: HJDAF protects NO-induced cerebral cortical neuron injury by suppressing the generation of lipid peroxide.

【KEY WORDS】 Huanglian Jiedu Decoction active fraction (HJDAF); Nitrogen monoxide; Cortical neuron; Injury; Cell culture

·新趋势·

2005年医药市场预测

据专家预计 2004~2006 年国内药品市场年增长率介于 13%~17% 之间, 高于“十五”计划和 IMS 的预测。国内医药制造业一般分为化学药、中药和生物制药, 其中化学药包括原料药与制剂, 中药包括饮片和成药。

· 化学药制剂业增长稳定

在 2001~2010 年间, 国际上市场价值超千亿美元的专利药的专利保护期将满, 抓住机会快速仿制这些药能够带来额外的市场增长。关键在于快速和高标准。快速是指抢在专利到期前完成研发投入, 高标准是为了通过欧美监管当局的认证而打入欧美市场。

· 化学原料药业增长趋缓

未来大宗原料药的投资机会在部分企业可能形成对某些品种的市场垄断。特色原料药技术附加值较高, 且随着大量专利药到期后特色原料药市场的份额将扩大, 增长速度将高于原料药行业, 发展的关键在快速和高标准。

· 中药业正处于发展阶段

目前我国中成药年销售额 578 亿元, 占医药制造业的 21%。中药的双重市场属性及国际需求赋予中药企业成长空间, 目前中药行业正处于与现代技术结合的新发展阶段, 中药行业具有品牌、技术、资源优势的企业将分享这一成长。

· 生物医药业正向研发转变

目前我国生物制药工业处于成长初期, 年销售额 223 亿元, 占医药制造业 8%。目前上市公司的生物制药治疗用新药产出能力较弱。国内基因诊断行业有快速发展前景且技术成熟, 中国疫苗市场年用量增长率达 15%且治疗性乙肝疫苗和口服菌苗技术走向成熟。