

灯盏细辛与赤芍配伍组方对 H₂O₂
致 PC12 细胞损伤的保护作用

刘宗炎^{1,2},董莉^{1,2},董永喜¹,李黎²,兰燕宇²,王爱民²,王永林^{1,2*}

(1. 贵阳医学院药学院,民族药与中药开发应用教育部工程研究中心,贵阳 550004;
2. 贵州省药物制剂重点实验室,贵阳 550004)

[摘要] **目的:**探讨灯盏细辛与赤芍配伍组方对 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞氧化损伤的影响及其作用机制。**方法:**用 H₂O₂ (850 μmol·L⁻¹) 处理 PC12 细胞 6 h 建立体外氧化应激模型,以不同质量浓度的灯盏细辛与赤芍配伍组方(6.25,12.5,25,50,100 mg·L⁻¹) 预处理 PC12 细胞(3×10⁴~4×10⁴ 个/mL)24 h,采用 MTT 法检测细胞活力,比色法测定细胞培养液中乳酸脱氢酶(LDH)活性、细胞裂解液中超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)水平,利用荧光探针 DCFH-DA 和罗丹明 123 流式细胞术分别检测细胞内活性氧(ROS)和线粒体膜电位(Δψ_m)。**结果:**与正常对照组比较,模型组的细胞存活率下降至 52.78%,细胞上清液中 LDH 释放量上升 110.13 U·L⁻¹,细胞内 MDA 和 ROS 水平显著增高,细胞内 SOD 和 Δψ_m 水平显下降(*P*<0.01);与模型组比较,灯盏细辛与赤芍配伍组方可明显增加细胞存活率,降低 LDH 活性,降低 MDA 水平,抑制细胞内活性氧的生成,增加 SOD 活性和使线粒体膜电位升高(*P*<0.05,*P*<0.01),且在一定范围呈剂量依赖性。**结论:**灯盏细辛与赤芍配伍组方对 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞氧化损伤具有保护作用,其机制可能与其降低细胞脂质过氧化水平,提高抗氧化酶活力,抑制 ROS 生成和稳定线粒体膜电位有关。

[关键词] 灯盏细辛;赤芍;配伍组方;H₂O₂;PC12 细胞;活性氧

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)05-0180-04

[doi] 10.11653/syfj2014050180

Protective Effects of Formula of Erigerontis Herba and Paeoniae Radix
Rubra on Injury Induced by H₂O₂ of PC12 Cells

LIU Zong-yan^{1,2}, DONG Li^{1,2}, DONG Yong-xi¹, LI Li², LAN Yan-yu², WANG Ai-min², WANG Yong-lin^{1,2*}

(1. School of Pharmacy, Guiyang Medical College, Engineering Research Center of Minority Nationality Medicine and Traditional Chinese Medicine (TCM) Development and Application, Ministry of Education, Guiyang 550004, China; 2. Guizhou Provincial Key Lab of Pharmaceutical Preparation, Guiyang 550004, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effect of the formula of Herba Erigerontis and Radix Paeoniae Rubra on H₂O₂-induced oxidative stress damage of PC12 cells and its possible mechanism. **Method:** The in vitro model of oxidative stress damage based on PC12 cells was established by treating with H₂O₂ (850 μmol·L⁻¹) for 6 h. The formula of Herba Erigerontis and Radix Paeoniae Rubra with different concentrations (6.25, 12.5, 25, 50, 100 mg·L⁻¹) pretreatment of PC12 cells (3×10⁴~4×10⁴ cells/mL) for 24 h. The MTT assay was used to determine the survival rate of PC12 cells. The activity of LDH in culture medium, the level of malondialdehyde (MDA) and the activity of superoxide dismutase (SOD) in cell lysis solution were detected by colorimetric method. The fluorescent probe DCFH-DA and Rhodamine 123 reagent were employed to determine the level of

[收稿日期] 20131022(014)

[基金项目] 国家自然科学基金(81060335);国家自然科学基金(81260636);贵州省社会发展攻关计划(黔科合 SY 字[2011]3033 号);贵州省科学技术基金(黔科合 J 字[2012]2029 号)

[第一作者] 刘宗炎,硕士研究生,从事中药药理与安全性再评价研究,Tel:18285188829,E-mail:liuzong_yan_1988@sina.com

[通讯作者] *王永林,教授,博士生导师,从事中药新药的开发研究,Tel:0851-6908899,E-mail:gywyl@gmc.edu.cn

intracellular reactive oxygen species (ROS) and the changes of mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) by flow cytometry, respectively. **Result:** Compared with the controls, the H_2O_2 model showed decreased to 52.78% in survival. The LDH release in culture supernatants increased $110.13 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$. In addition, the level of MDA and intracellular ROS were significantly increased, the activity of SOD and the $\Delta\psi_m$ were significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with model group, the survival rate of injured cells was increased, and the activity of LDH, the level of MDA and intracellular ROS were decreased in the formula group. In addition, the activity of SOD and the $\Delta\psi_m$ were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in a certain range. **Conclusion:** The formula of Herba Erigerontis and Radix Paeoniae Rubra has the significant protective effects on the PC12 cells injured by H_2O_2 , which may be associated with the inhibited of lipid peroxidation, the increased of antioxidase activity, the decrease of ROS and the increased stability of mitochondrial membrane potential.

[Key words] Herba Erigerontis; Radix Paeoniae Rubra; formula; H_2O_2 ; PC12 cell; reactive oxygen species

源于民间验方的贵州地产草药灯盏细辛和赤芍配伍组方(以下简称辛芍组方),在民间以汤剂煎服用于治疗偏瘫,有较好的临床应用基础。研究表明,灯盏细辛有效部位具有显著的体外抗氧化活性^[1-2],灯盏细辛和赤芍提取物对神经细胞损伤均有不同程度的保护作用^[3-4]。本课题组在前期工作中已对辛芍组方进行了含量测定^[5]及指纹图谱^[6]和抗全脑缺血、缺氧^[7]、抗缺血再灌注损伤^[8]等研究。为了进一步探讨灯盏细辛和赤芍配伍组方对氧化应激损伤的保护作用及其可能的作用机制,本研究以 H_2O_2 诱导的体外神经细胞氧化损伤为模型,考察辛芍配伍组方对氧化损伤 PC12 细胞的保护作用,并探讨其可能的作用机制。

1 材料

1.1 药品与试液 灯盏细辛,经贵阳医学院生药学教研室龙庆德教授鉴定为菊科飞蓬属植物短葶飞蓬 *Erigeron breviscapus* (Vaniot) Hand. -Mazz. 的干燥全草。灯盏细辛提取物的制备工艺为药材经水提(每次 10 倍量水,共 3 次,每次 1 h,合并滤液,浓缩至比重 1.09 ~ 1.11),醇沉(含醇量达 60%,静置 12 h),滤液浓缩至比重 1.10 ~ 1.12,调 pH 2 ~ 3,过滤,沉淀水洗至 pH 3 ~ 4,收集沉淀物;滤液过聚酰胺柱,水洗,弃去水洗液,90% 乙醇洗脱,收集洗脱液,浓缩;合并上述沉淀物和浓缩液,干燥,得提取物(每 1 g 含生药 21.3 g)。采用高效液相色谱法测定其中含野黄芩苷 64.28%,3,5-二咖啡酰基奎宁酸 8.36%。

赤芍,经贵阳医学院生药学教研室龙庆德教授鉴定为毛茛科植物川赤芍 *Paenia veitchii* Lynch 的干燥根。赤芍提取物制备工艺为药材经水提(第 1 次 10 倍量水,第 2,3 次 8 倍量水,每次 1 h,合并滤

液,浓缩至比重 1.06 ~ 1.08),醇沉(含醇量达 60%,静置 12 h),滤液浓缩,饱和正丁醇提取 4 次,合并,减压回收正丁醇,残留物用 45% 乙醇溶解,上聚酰胺柱,45% 乙醇洗脱,收集洗脱液,浓缩干燥,得赤芍提取物(每 1 g 含生药 28.9 g)。采用高效液相色谱法测定其中含芍药苷 65.04%,芍药内酯苷 3.35%。

以上 2 味药材的提取物由贵州省民族药与中药开发应用教育部工程研究中心提供。辛芍组方由灯盏细辛与赤芍按 2:3 质量比组成,以灭菌超纯水为溶剂配制成分总质量浓度为 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的母液,10% DMSO 助溶,备用。ROS 工作液::用无血清培养液按 1 000:1 配制 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酯(DCFH-DA)溶液。 $\Delta\psi_m$ 工作液:20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 罗丹明 123 的 PBS 溶液。

1.2 细胞株 PC12(高分化),购自中科院上海细胞所。

1.3 试剂 DMEM 高糖培养基(Gibco 公司,批号 1206525);胎牛血清(Biochrom 公司,批号 0859T);DCFH-DA(Beyotime 公司,批号 0503141306);过氧化氢(市售优级纯,国药集团化学试剂有限公司,批号 20130309);MTT(批号 M8180)和胰酶(批号 227B042),购自 Solarbio 公司;多聚-L-赖氨酸(批号 RNBC6518),维生素 E(VE,批号 059K1623)和罗丹明 123(批号 MKBC2653V),购自 Sigma 公司;SOD(批号 20130621),MDA(批号 20130502)和 LDH(批号 2013 0625)测定试剂盒,购自南京建成生物工程研究所。

1.4 仪器 CO_2 培养箱(美国 Thermo 公司),酶标仪(上海伯乐生命医学产品有限公司),UV 紫外分光光度计(UV-2401,日本岛津公司),流式细胞仪

(BD FACS Aria, 美国 BD 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养及传代 PC12 细胞培养于含 10% 胎牛血清, 5% 马血清, 96 mg·L⁻¹ 青霉素和 160 mg·L⁻¹ 链霉素的 DMEM 完全培养基中, 置 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养, 当细胞融合至 80% 时, 用 0. 25% 胰酶消化传代。

2.2 细胞存活率试验 取对数生长期的细胞以 3 × 10⁴ ~ 4 × 10⁴ 个/mL 密度接种于 96 孔细胞培养板, 孵育 24 h 后, 设阴性组 (无细胞)、对照组、模型组、阳性药组以及不同浓度药物组, 每组设 6 个复孔, 分别加入空白培养液和含药培养液, 孵育 24 h 后, 吸弃培养液, 阴性组和对照组正常培养, 模型组和各药物组加入含 H₂O₂ 的培养液培养 6 h, 各孔加入终质量浓度为 0. 5 g·L⁻¹ MTT 试剂孵育 4 h, 吸弃培养液, 每孔加入 100 μL 二甲基亚砷, 待溶解充分后, 置于酶标仪上测定 490nm 处吸光度 (A), 计算细胞存活率。

细胞存活率 = (实验组 A - 阴性组 A) / (对照组 A - 阴性组 A) × 100%

2.3 上清液中 LDH 活性测定 方法同 2.2 项下, 造模 6 h 后, 取上清液, 按照试剂盒说明书检测细胞上清液中 LDH 的含量。每组设 3 个复孔。

2.4 细胞内 SOD 与 MDA 水平测定 方法同 2.2 项下, 取对数生长期的细胞以 6 × 10⁴ ~ 8 × 10⁴ 个/mL 密度接种于 6 孔细胞培养板, 设对照组、模型组、阳性药组以及不同浓度药物组, 分别加入空白培养液和含药培养液预培养 24 h 后, 造模 6 h, 弃培养液, 每孔加入 600 μL 1% 的裂解液 (400 μL 用于 MDA 含量检测, 100 μL 用于 SOD 活性检测)。按照试剂盒说明书检测细胞裂解液中 SOD, MDA 的含量。每组设 3 个复孔。

2.5 细胞内 ROS 与 Δψm 水平测定 方法同 2.2 项下分组、给药、造模, 造模 6 h 后, 消化收集细胞, PBS 洗 1 遍, 每个样本用 1 mL 工作液重悬, 37℃, 5% CO₂ 细胞培养箱孵育 30 min, 离心收集细胞, PBS 洗 3 遍, 1 mL PBS 重悬, 用流式细胞仪检测荧光强度, 激发光波长 488 nm, 发射光波长 530 nm, 每个样品测定 10 000 个活细胞。每组设 3 个复孔。

2.6 数据统计分析 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 11.5 统计软件进行单因素方差分析, 检验水平为 α = 0. 05。

3 结果

3.1 细胞存活率试验 用药物预处理后, 与 H₂O₂

(850 μmol·L⁻¹) 模型组比较, 细胞存活率除辛芍组方低剂量组 (6. 25 mg·L⁻¹) 无显著增高外, 其他剂量组 (12. 5 ~ 100 mg·L⁻¹) 均显著增高 ($P < 0. 05$, $P < 0. 01$), 并且呈剂量依赖性, 均弱于阳性药 VE (4. 3 mg·L⁻¹, 即 10 μmol·L⁻¹, 71. 52%, $P < 0. 01$), 根据此结果选定 12. 5, 25, 50 mg·L⁻¹ 为后续试验药物剂量。如表 1 所示。

表 1 辛芍组方对 H₂O₂ 所致 PC12 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量 / mg·L ⁻¹	细胞存活率 / %
对照	-	100. 00 ± 2. 36
H ₂ O ₂ 模型	-	52. 78 ± 2. 24 ¹⁾
VE 阳性药	4. 3	71. 52 ± 0. 91 ³⁾
辛芍组方	6. 25	54. 50 ± 1. 55
	12. 5	58. 05 ± 1. 82 ²⁾
	25	59. 74 ± 0. 53 ³⁾
	50	62. 53 ± 1. 49 ³⁾
	100	68. 07 ± 0. 59 ³⁾

注: 与对照组比较¹⁾ $P < 0. 01$; 与 H₂O₂ 模型组比较²⁾ $P < 0. 05$, ³⁾ $P < 0. 01$ (表 2 同)。

3.2 上清液中 LDH 活性测定 用药物预处理后, 与 H₂O₂ (850 μmol·L⁻¹) 模型组比较, 辛芍组方高、中剂量组 (25 ~ 50 mg·L⁻¹) 显著降低上清液中 LDH 的活性 ($P < 0. 05$, $P < 0. 01$), 低剂量组 (12. 5 mg·L⁻¹) 无显著差异, 均弱于阳性药 VE ($P < 0. 01$)。如表 2 所示。

3.3 细胞内 SOD, MDA, ROS 和 Δψm 水平测定 用药物预处理后, 与 H₂O₂ (850 μmol·L⁻¹) 模型组比较, 辛芍组方高剂量组 (50 mg·L⁻¹) 能明显升高细胞内 SOD 活性 ($P < 0. 05$), 显著降低细胞内 MDA 和 ROS 水平 ($P < 0. 05$, $P < 0. 01$), 辛芍组方高、中剂量组 (25 ~ 50 mg·L⁻¹) 能显著升高细胞内 Δψm 水平 ($P < 0. 01$), 其他剂量组与模型组比较无显著差异, 均弱于阳性药。如表 2。

4 讨论

PC12 细胞株源于大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤, 它在形态、结构和功能上与神经细胞有许多相似之处, 被广泛用于神经药理学方面的研究^[9], H₂O₂ 诱导 PC12 细胞损伤是经典的细胞氧化损伤模型。预实验结果显示, 850 μmol·L⁻¹ H₂O₂ 作用 6 h, PC12 细胞存活率下降至 50. 7%, 因此本实验采用的造模条件为 850 μmol·L⁻¹ H₂O₂ 作用 PC12 细胞 6 h。

本课题组前期实验考察了不同配比辛芍组方对

表 2 辛芍组方对 PC12 细胞 H₂O₂ 损伤的 LDH,SOD,MDA,ROS 和 Δψm 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量 /mg·L ⁻¹	LDH /U·L ⁻¹	SOD /U·mL ⁻¹	MDA /μmol·L ⁻¹	荧光强度	
					ROS	Δψm
对照	—	55.27 ± 4.47	35.20 ± 1.71	0.83 ± 0.08	513 ± 142	4 838 ± 456
H ₂ O ₂ 模型	—	165.40 ± 2.78 ¹⁾	23.05 ± 1.10 ¹⁾	1.28 ± 0.06 ¹⁾	3 3424 ± 4 289 ¹⁾	3 017 ± 547 ¹⁾
VE	4.3	122.53 ± 6.20 ³⁾	29.93 ± 2.11 ³⁾	0.95 ± 0.05 ³⁾	13 321 ± 4 000 ³⁾	4 694 ± 449 ³⁾
辛芍组方	12.5	157.83 ± 5.42	23.59 ± 2.28	1.34 ± 0.14	26 720 ± 4 101	3 421 ± 560
	25	148.73 ± 1.57 ²⁾	26.65 ± 1.43	1.17 ± 0.12	21 899 ± 3 722	4 223 ± 342 ³⁾
	50	141.47 ± 4.10 ³⁾	28.37 ± 1.58 ²⁾	1.03 ± 0.07 ²⁾	15 629 ± 3 747 ³⁾	4 623 ± 435 ³⁾

PC12 细胞的增殖的影响实验,结果表明部分配伍组方浓度在 200 mg·L⁻¹时以及 2:3 配伍组质量浓度在 300 mg·L⁻¹时,细胞存活率明显下降,与正常对照相比有显著性差异($P < 0.05$)。进一步考察不同配比辛芍组方对 H₂O₂ 致 PC12 细胞损伤的保护作用研究时,结果表明灯盏细辛与赤芍的不同配比中以灯盏细辛与赤芍之比为 2:3 对 H₂O₂ 导致的氧化损伤细胞保护作用最佳。因此,本研究选择灯盏细辛与赤芍之比为 2:3 的辛芍配伍组方进行实验。

MTT 测试通过测定活细胞线粒体脱氢酶活性借以判断细胞存活率,即吸光度值越大,表示存活的细胞越多;LDH 是细胞内标志酶,受损的细胞膜通透性发生改变,LDH 漏出量明显增大,其累计释放量与细胞受损的程度呈正相关^[10]。因此,细胞存活率和 LDH 活性常常作为评价细胞氧化损伤的指标之一。本实验结果表明,与模型组比较,辛芍组方可增加 PC12 细胞存活率,减少 LDH 释放量,提示辛芍组方对 H₂O₂ 诱导的细胞损伤具有保护作用,并且在一定范围内呈浓度依赖性。

SOD 是超氧阴离子自由基的清除剂,可抑制自由基启动的脂质过氧化反应,对机体的氧化与抗氧化平衡起着至关重要的作用。外源性 H₂O₂ 诱发 PC12 细胞内源性 ROS 生成增加,导致神经细胞膜损伤,线粒体膜电位下降,线粒体肿胀甚至崩解,导致细胞能量代谢障碍,细胞存活率下降^[9,11]。实验结果显示,与模型组比较,辛芍组方高剂量组可显著增加细胞内 SOD 活性和 Δψm 水平,显著降低细胞内的 MDA 和 ROS 水平。提示辛芍组方对 PC12 细胞的保护作用机制可能是通过增加 SOD 的活性,抑制 ROS 的生成及对细胞膜的脂质过氧化,稳定线粒体膜电位,维持线粒体功能,从而减少 PC12 细胞的损伤,但其更加深入的机制尚有待于进一步的研究。

综上所述,辛芍组方可提高细胞内 SOD 活性,减少 LDH 释放,抑制脂质过氧化以及 ROS 生成,稳

定线粒体膜电位,从而减轻细胞氧化损伤而发挥细胞保护作用。这为辛芍组方的抗氧化应激应用和进一步研究提供实验依据。

[参考文献]

[1] 孟凡振,鲁晓燕. 灯盏细辛的药理学研究进展[J]. 医药导报,2003,22(9):636.

[2] 党翠芝,黄小燕,杨庆雄,等. 灯盏细辛的抗氧化活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(17):100.

[3] 何丽娜,杨军,何素冰,等. 赤芍总苷对原代培养大鼠神经细胞损伤模型的保护作用[J]. 中国临床药理学与治疗学,2000,5(1):28.

[4] 黄勇,齐晓岚,官志忠,等. 灯盏细辛组分对脑神经细胞损伤保护作用的谱效关系研究[J]. 中国中药杂志,2010,35(8):1038.

[5] 王永林,郑林,王爱民,等. 高效液相色谱法测定注射用辛芍中野黄芩苷含量[J]. 贵阳医学院学报,2008,33(1):32.

[6] 苏红,王爱民,王永林,等. 注射用辛芍(冻干粉针)指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志,2007,32(15):1515.

[7] 王永林,黄勇,郑林,等. 注射用辛芍冻干粉针药味配伍作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(7):38.

[8] 黄勇,王永林,兰燕宇,等. 注射用辛芍对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用和对脑微循环血流量的影响[J]. 中国新药杂志,2008,17(2):119.

[9] 张秋芳,汪选斌,耿艳琼,等. 二氢石蒜碱对过氧化氢损伤的 PC12 细胞的保护作用[J]. 中国新药杂志,2012,21(11):1288.

[10] 王斌,王学美. 加味五子衍宗方及其有效部位对 H₂O₂ 损伤 PC12 细胞的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(8):57.

[11] 武风娟,杜磊,徐杰,等. 海参脑苷脂对 H₂O₂ 致 PC12 细胞氧化损伤的保护作用[J]. 卫生研究,2012,41(4):6112.

[责任编辑 聂淑琴]