中国中药杂志
China Journal of Chinese Materia Medica

黄连解毒汤有效部位对神经细胞内钙超载的作用及机制分析

吴彦[2], 孙建宁[1*], 石任兵[1], 张爱林[1]
(1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100102;
2. 广西中烟工业有限责任公司技术中心, 广西 南宁 530001)

[摘要] **目的**:研究黄连解毒汤有效部位(HLJDTAF)对神经细胞内钙超载的影响及相关机制。**方法**:低糖低氧损伤胎鼠皮层神经细胞模拟脑缺血,双波长荧光分光光度法测定神经细胞内钙含量,观察 HLJDTAF 对细胞内钙超载的抑制作用。并分别采用谷氨酸(Glu),KCl,A23187,乙酰甲胆碱(MCh)和咖啡因(CAF)处理神经细胞,以分析药物的作用环节。**结果**: HLJDTAF 对低糖低氧处理所致神经细胞钙超载有明显的抑制作用($P<0.05$);对 200 μmol·L^{-1}谷氨酸,50 mmol·L^{-1}剂量的 K^+,0.05 μmol·L^{-1}钙离子载体 A23187 处理细胞引起神经细胞内钙超载有明显的抑制作用 ($P<0.05$, $P<0.01$);正常外钙情况下和零外钙情况下,HLJDTAF 对 5 mmol·L^{-1}CAF 和 Mch 诱导神经细胞内钙超载有明显的抑制作用($P<0.01$, $P<0.05$)。**结论**:HLJDTAF 可显著抑制神经细胞拟缺血损伤后的钙超载,其机制可能是通过多途径抑制缺血缺氧后神经细胞内钙超载,从而拮抗脑缺血损伤。

[关键词] 黄连解毒汤有效部位;脑缺血;钙超载;神经细胞

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[1-2],提示本方治疗缺血性脑血管病有良好前景。作者运用复方有效部位研究模式与方法[3],利用大孔树脂分离得到了黄连解毒汤有效部位,并对该有效部位的药效药理进行了研究。研究发现黄连解毒汤有效部位(HLJDTAF)对局灶性脑梗塞,多发性脑梗塞以及急慢性脑缺血缺氧动物都有良好的保护作用[4-5],可以减轻拟缺血损伤大鼠神经细胞损伤[6],对 NO,兴奋性氨基酸以及自由基损伤大鼠皮层神经元均具有保护作用[7-9],表明 HLJDTAF 可减轻实验性脑缺血损伤并具有明显神经元保护作用。

钙离子是各种细胞内具有重要生理作用的离子之一,细胞内钙离子浓度($[Ca^{2+}]_i$)的变化是细胞实现生理功能的重要物质基础。在脑缺血等脑性疾病状态下,细胞内$[Ca^{2+}]_i$均可发生明显变化,严重者还可以导致钙超载[10]。钙超载是多种脑性疾病所具有的共同特性,也是神经元死亡的最后共同通路[11],它通过触发多种有害过程如自由基形成,膜降解,线粒体功能失调,炎症,DNA 损伤和凋亡等介导不可逆性细胞损伤[12]。因此,研究药物对细胞内游离钙离子浓度的影响,对于解释其抗脑缺血的作用机制,开发药物用途具有重要意义。本研究采用低糖低氧处理胎鼠神经细胞模拟脑缺血损伤观察药物对神经细胞内钙超载的影响,同时借助兴奋性氨基酸(谷氨酸)、高 K^+、钙离子载体 A23187 及三磷酸肌醇(inositol tranphosphate, IP_3)敏感的钙库激活剂乙酰甲胆碱(methacholine, Mch)和非 IP_3 敏感钙库激活剂咖啡因(caffein, CAF)等多种途径诱导神经细胞内钙升高,进一步分析了药物作用环节。

1 材料

1.1 动物 雄性 Wistar 大鼠,体重 190 ~ 210 g, Wistar 孕鼠,孕期 16 ~ 18 d,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号 SCXK(京)2002-0003。

1.2 药品与试剂 黄连解毒汤有效部位(HLJDTAF)由北京中医药大学中药学院中药化学系提供;尼莫地平注射液(天津金耀氨基酸有限公司);

[稿件编号] 20091211006

[通信作者] *孙建宁,教授,博士生导师,Tel:(010)84738626,E-mail:jn_sun@sina.com

[作者简介] 吴彦,副研究员,主要从事心脑血管及神经疾病药理学,卷烟减害增香研究,Tel:(0771)2093141,E-mail:wu_yan2003@hotmail.com

DMSO, Fura-2/AM, Triton-X-100, EGTA, CAF, A23187, BSA, MCh, Glu 均为 Sigma 公司产品; Tris 高糖和低糖 DMEM 培养基(GIBCO); HEPES(华美生物工程公司)。

诱导剂储备液配制: KCl 用双蒸水配制成 5 mol·L^{-1}; CAF 和 MCh 用双蒸水配制成 50 mol·L^{-1}; A23187 用 DMSO 配制成 5 μmol·L^{-1}; Glu 溶于高糖 DMEM 成 20 mmol·L^{-1}溶液, pH 7.2。

其他储备液配制: MK-801 溶于 DMSO 配成 1 mmol·L^{-1}; EGTA 溶于 3 mol·L^{-1}Tris 中, 配成 0.2 mol·L^{-1}溶液。Fura-2/AM 以 DMSO 分装为 1.0 mmol·L^{-1}的储存液。Triton-X-100 用纯水制成 10% 溶液。

1.3 仪器 400R 低温离心机(德国 Heraeus); SHZ-82 型水浴恒温振荡器(江苏省太仓医疗器械厂); MF-4 单波长荧光分光光度计(日本 Hitachi 公司)。

2 方法

2.1 药物血清的制备方法 正常 Wistar 大鼠 30 只, 随机分为 3 组: 正常对照组、黄连解毒汤有效部位 0.3, 0.15 g·kg^{-1}组, 每组 10 只。药物按剂量, 每日分上午、下午 2 次给药, 正常组灌服 0.5% CMC, 10 mL·kg^{-1}, 第 5 次全量给药后 2 h 颈总动脉取血, 4 ℃保存 4 h 后 3 000 r·min^{-1}离心 20 min, 取上清, 混匀, 56 ℃灭活 30 min, 过滤除菌, 分装, -20 ℃贮存。

2.2 胎鼠皮层神经细胞悬液的制备及工具药损伤 Wistar 孕鼠以 10% 水合氯醛(360 mg·kg^{-1})腹腔注射麻醉后, 无菌手术, 取出胎鼠, 沿脑人字缝开一"T"型口, 取出胎鼠完整大脑半球, 置高糖 DMEM 中, 仔细分离出皮层, 揭去软脑膜, 在适量高糖 DMEM 中以无缺口吸管反复轻轻吹打, 使组织完全分散, 制成细胞悬液, 经 200 目细胞筛过滤 3 次, 除去组织块和大的细胞团。过滤后的细胞悬液 1 000 r·min^{-1}离心 5 min, 小心倾去上清液。

损伤细胞: ①低糖低氧处理组: 所得细胞悬浮于低糖 DMEM 中, 调节细胞数在 5×10^6个/mL, 细胞分别充 N_2以排出管内空气(完全排除 O_2), 加盖后以封口膜密闭, 37 ℃, 5% CO_2继续培养 1 h。②需要 KCl, Glu, CAF, Mch, A23187 各组, 所得细胞悬浮于高糖 DMEM 中, 调整细胞浓度同前。之后按所需浓度加入诱导剂[13-14], 同时加入阳性对照药 MK-801 或尼莫地平注射液等, 对照组加入等体积溶媒, 最后将所有试验管置 37 ℃, 5% CO_2环境中处理不同时间。

10% 的浓度药物血清在各组损伤之前加入, 空白对照组和模型对照组加入等体积大鼠空白血清, 37 ℃, 5% CO_2环境中孵育 30 min 后处理。

2.3 Fura-2/AM 孵育 处理过后的样本经 1 000 r·min^{-1}离心 5 min, 倾去上清, 所得细胞除加 Mch 和 CAF 组重悬于无钙镁 Hanks 液中外, 其余重新悬浮于 Hanks 液中(含$[Ca^{2+}]_i$ 1.3 mmol·L^{-1}), 调节细胞约 5×10^6个/mL, 每组各取 2.0 mL, 加入 0.1% BSA 和 3 μmol·L^{-1} Fura-2/AM(空白对照管加入等体积的 DMSO)。置 37 ℃水浴振荡器中振荡孵育 40 min, 所得细胞洗涤离心, 去上清后将细胞重新悬浮于缓冲液中, 37 ℃复温。之后每次吸取 1 mL 加入样品池测定。以上操作过程中, 对照组和模型组加入空白血清。

2.4 测定方法 取适量样品液, 以 Ex 300 ~ 400 nm, Em 500 nm 进行激发光波长扫描, 观察荧光峰值的激发波长, 判断细胞负载情况, 以峰值在 340 nm 左右为最佳负载状态, 该实验条件下, 峰值在 351 nm, 说明负载状态良好。将测定方式转换为时间扫描, 按以上参数执行双波长测定, 观察静息状态时荧光强度(F_{340}, F_{380}), 加入破膜剂 Triton X-100 (终浓度 0.1%) 20 μL 破膜, 使 Fura-2 被钙离子饱和, 测得最大荧光强度(F_{max340}, F_{max380}), 稳定后加入钙离子螯合剂 EGTA 40 μL(终浓度 0.2 mol·L^{-1}), 测得最小荧光强度(F_{min340}, F_{min380})。所测得数据均减去细胞自发荧光值(空白对照管荧光值)后, 按公式计算突触体内游离钙浓度$[Ca^{2+}]_i$。$[Ca^{2+}]_i$ (nmol·L^{-1}) $= K_d \times (R - R_{min}) F_{min380}/(R_{max} - R) F_{max380}$, 其中, $K_d = 224$, 为 Fura-2 与 Ca^{2+} 的解离常数。$R = F_{340}/F_{380}$, $R_{min} = F_{min340}/F_{min380}$, $R_{max} = F_{max340}/F_{max380}$。

测定条件: (37 ± 1) ℃恒温测定, 激发光波长 A 340 nm, B 380 nm, 发射光波长 A 500 nm, B 500 nm, 激发光光栅 5 nm, 发射光光栅 10 nm。

2.5 统计学处理 所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计学处理采用 SPSS 11.0 软件包进行单因素方差分析并进行多组组间比较。

3 结果

3.1 HLJDTAF 对低糖低氧引起神经细胞内

$[Ca^{2+}]_i$ 水平升高的影响　正常神经细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 水平较低，低糖合并低氧处理细胞 1 h 导致 $[Ca^{2+}]_i$ 明显升高，尼莫地平 10 μmol·L^{-1} 对低糖低氧处理 1 h 所致神经细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高有明显的抑制作用（$P<0.05$），HLJDTAF 0.3，0.15 g·kg^{-1} 含药血清以 10% 的浓度加入培养液中对低糖低氧处理所致神经细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高也有明显的抑制作用（$P<0.05$），表明其对拟缺血损伤所致钙超载有较好的保护作用，见表 1。

表 1　HLJDTAF 对低糖低氧引起神经细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 水平升高的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=4$）

组别	剂量/g·kg^{-1}	$[Ca^{2+}]_i$/nmol·L^{-1}
对照	–	132.01±7.58
模型	–	264.88±29.39$^{4)}$
尼莫地平	10	205.04±31.04$^{1)}$
HLJDTAF	0.3	188.80±26.19$^{1)}$
	0.15	189.83±21.71$^{2)}$

注：与模型组比较$^{1)}$ $P<0.05$，$^{2)}$ $P<0.01$；与对照组比较$^{3)}$ $P<0.05$，$^{4)}$ $P<0.01$；尼莫地平剂量单位为 μmol·L^{-1}（表 2～4 同）。

3.2　HLJDTAF 对 Glu 引起神经细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 水平升高的影响　正常神经细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 水平较低。200 μmol·L^{-1} 处理 30 min 后的细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 则明显升高（$P<0.01$）。Glu 受体阻滞剂 MK-801 可以几乎完全阻断 Glu 处理后神经细胞内钙的升高（$P<0.01$）。HLJDTAF 0.3，0.15 g·kg^{-1} 含药血清以 10% 的浓度加入培养液中对神经细胞内游离钙离子的升高有明显的抑制作用（$P<0.05$），但不能完全阻断 Glu 处理后神经细胞内钙的升高，见表 2。

表 2　HLJDTAF 对 Glu 引起神经细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 水平升高的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	剂量/g·kg^{-1}	$[Ca^{2+}]_i$/nmol·L^{-1}
对照	–	141.43±16.94$^{2)}$
模型	–	343.28±80.79$^{4)}$
MK-801	10	152.68±52.99$^{2)}$
HLJDTAF	0.3	187.62±20.30$^{2)}$
	0.15	234.92±19.83$^{1)}$

注：MK-801 剂量单位为 μmol·L^{-1}。

3.3　HLJDTAF 对高 K^+，A23187 引起神经细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 水平升高的影响　细胞外液含有 1.3 mmol·L^{-1} $[Ca^{2+}]_i$ 时，50 mmol·L^{-1} 剂量的 K^+ 可迅速引起细胞膜去极化，开放电压依赖型 Ca^{2+} 通道，0.05 μmol·L^{-1} 剂量的 A23187 可负载胞外钙入胞从而引起大量细胞外钙内流，造成 $[Ca^{2+}]_i$ 水平升高。尼莫地平 10 μmol·L^{-1} 几乎完全抑制 K^+ 所致神经细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高（$P<0.01$），对载体负载造成的 $[Ca^{2+}]_i$ 水平升高也有一定抑制作用（$P<0.05$）。HLJDTAF 0.3，0.15 g·kg^{-1} 含药血清以 10% 的浓度加入培养液中可显著抑制 2 种因素引起的神经细胞内游离钙离子的升高（$P<0.05$，$P<0.01$），见表 3。

表 3　HLJDTAF 对高 K^+，A23187 引起神经细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 水平升高的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=4$）

组别	剂量/g·kg^{-1}	$[Ca^{2+}]_i$/nmol·L^{-1}	
		KCl	A23187
对照	–	145.89±24.49	166.58±23.58
模型	–	337.94±41.84$^{4)}$	522.30±36.87$^{4)}$
尼莫地平	10	164.20±15.57$^{2)}$	407.74±26.51$^{1)}$
HLJDTAF	0.3	180.33±24.33$^{2)}$	215.98±51.97$^{2)}$
	0.15	252.02±40.87$^{1)}$	253.44±53.77$^{2)}$

3.4　HLJDTAF 对 CAF 和 Mch 引起神经细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 水平升高的影响　正常外钙情况下（1.3 mmol·L^{-1}），内钙释放剂 CAF 和 Mch 在 5 mmol·L^{-1} 浓度时可迅速引起内质网钙库释放，造成神经细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 水平的明显升高，形成严重的钙超载，HLJDTAF 0.3，0.15 g·kg^{-1} 含药血清以 10% 的浓度加入培养液中对 2 种因素诱导神经细胞内游离钙离子的升高有明显的抑制作用（$P<0.01$，$P<0.05$），但不能完全阻断处理后神经细胞内钙的升高。零外钙情况下，CAF 和 Mch 在 5 mmol·L^{-1} 浓度时也可迅速引起神经细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 水平的明显升高，增幅略低于正常外钙情况下，HLJDTAF 0.3，0.15 g·kg^{-1} 含药血清以 10% 的浓度加入培养液中对 CAF 诱导神经细胞内游离钙离子的升高有明显的抑制作用（$P<0.01$，$P<0.05$），0.3 g·kg^{-1} 对 Mch 诱导神经细胞内游离钙离子的升高也有明显的抑制作用（$P<0.05$），但不能完全阻断处理后神经细胞内钙的升高，见表 4。

4　讨论

本试验用低糖低氧处理胎鼠神经细胞以模拟整体动物脑缺血时的病理症状，造成细胞内钙升高。

表 4　HLJDTAF 对 CAF 和 Mch 引起神经细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 水平升高的影响($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量 /g·kg^{-1}	$[Ca^{2+}]_i$/nmol·L^{-1}			
		CAF		Mch	
		正常外钙	零外钙	正常外钙	零外钙
对照	-	133.66 ± 29.52	156.82 ± 36.16	112.66 ± 7.36	97.87 ± 4.18
模型	-	429.19 ± 59.24$^{4)}$	378.46 ± 38.38$^{4)}$	482.31 ± 47.50$^{4)}$	306.67 ± 27.56$^{4)}$
HLJDTAF	0.3	285.65 ± 25.84$^{2)}$	268.56 ± 56.47$^{1)}$	176.92 ± 11.32$^{2)}$	182.20 ± 60.22$^{2)}$
	0.15	324.69 ± 35.49$^{2)}$	313.31 ± 28.52$^{1)}$	300.99 ± 50.57$^{2)}$	239.06 ± 82.94

实验结果表明，HLJDTAF 对低糖低氧引发的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高表现出抑制作用，表明 HLJDTAF 可以一定程度上拮抗脑缺血后神经细胞内钙超载。

分别采用 Glu，高 K^+ 和 A23187 等诱导神经细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 升高，发现 HLJDTAF 对 3 种因素引起的神经细胞内钙超载均有拮抗作用，表明 HLJDTAF 对 NMDA 受体门控型 Ca^{2+} 通道开放，电压依赖性钙通道开放和钙离子载体负载等多途径诱发的细胞外钙内流均有抑制作用，从而可以通过减少钙内流拮抗细胞内钙超载。

脑缺血引起的细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高中，有很大一部分来源于细胞内钙库的释放。以往的研究表明细胞内游离 Ca^{2+} 主要储存在内质网内，内质网含 IP3 敏感和非 IP3 敏感的 2 种钙库成分，它们各自受 IP3 受体系统和 Ryaodine 受体系统的调控，MCh 和 CAF 是各自的激动剂，IP3 敏感和非 IP3 敏感的 2 种钙库相对独立，一种钙库的耗竭并不影响另一种钙库的功能，各自保持固定时空特征[14]。实验结果表明，HLJDTAF 在正常外钙情况下和零外钙情况下对钙库释放剂 CAF 和 Mch 引起的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高均有不同程度的拮抗作用，表明 HLJDTAF 对 IP3 敏感和非 IP3 敏感的 2 种钙库释放剂作用于 ER 钙库引起的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高均有一定的抑制作用。

综合以上分析，HLJDTAF 能通过抑制脑缺血后神经细胞钙超载，从而减轻脑缺血造成的损伤，发挥脑保护作用。机制探讨表明，HLJDTAF 对 NMDA 受体依赖型钙通道开放，电压操纵性钙通道开放，钙离子载体负载引起的外钙内流，IP3 受体系统和 Ryaodine 受体系统的调控的钙库释放均有一定拮抗作用。可见 HLJDTAF 拮抗脑缺血后神经细胞钙超载并不是只通过某一条途径来实现的，而是通过多条途径综合作用的结果。

[参考文献]

[1] 陈光亮，张秀荣，王钦茂. 黄连解毒汤药理研究进展[J]. 安徽中医学院学报，2001，20(5)：67.
[2] 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.
[3] 梁吉春，石任兵，刘斌，等. 银翘散研究方法的新探讨[J]. 北京中医药大学学报，1999，22(1)：37.
[4] 吴彦，孙建宁，张爱林，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，2004，27(5)：357.
[5] 吴彦，孙建宁，于绍坤，等. 黄连解毒汤有效部位对动物脑缺血缺氧的保护作用[J]. 中国现代应用药学，2004，21(6)：151.
[6] 吴彦，孙建宁，于绍坤. 黄连解毒汤有效部位对培养大鼠皮层神经元缺糖缺氧损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报，2004，20(8)：936.
[7] 吴彦，孙建宁，于绍坤，等. 黄连解毒汤有效部位对培养大鼠皮层神经元谷氨酸损伤的保护作用[J]. 北京中医药大学学报，2004，27(3)：50.
[8] 吴彦，孙建宁，石任兵. 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[J]. 中国药科大学学报，2005，36(1)：59.
[9] 吴彦，孙建宁，于绍坤. 黄连解毒汤有效部位对过氧化氢诱导大鼠皮层神经元损伤的保护作用[J]. 中国医院药学杂志，2005，25(2)：142.
[10] Silver I A, Jeans J, Erecinska M. Ion homeostasis in brain cells: Differences in intracellular ion responses to energy limitation between cultured neurons and glial cells[J]. Neuroscience, 1997, 78：589.
[11] Vannucci R C, Brucklacher R M, Vannucci S J. Intracellular calcium accumulation during the evolution of Hypoxic-ischemia brain damage in the immature rat[J]. Brain Res Dev Brain Res, 2001, 126(1)：117.
[12] Prass K, Dimagl U. Glutamate antagonists in therapy of stroke [J]. Restor Neurol Neurosci, 1998, 13(1/2)：3.
[13] 冯亦璞，胡盾，张丽英. 丁基苯酞对小鼠全脑缺血的保护作用[J]. 药学学报，1995，30：741.
[14] 胡波，孙圣刚，何立铭，等. 大鼠星型胶质细胞的 IP3 和非 IP3 敏感钙库的特征和相关性[J]. 中华物理医学与康复杂志，2002，24(5)：272.

中国中药杂志
China Journal of Chinese Materia Medica

Effect of Huanglian Jiedu Tang active fraction on calcium overloading in neurons and related mechanism analysis

WU Yan[2], SUN Jianning[1*], SHI Renbing[1], ZHANG Ailin[1]

(1. *School of Chinese Pharmacy*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 100102, *China*;
2. *Technical Center of China Tobacco Guangxi Industrial Co.*, *Ltd.*, *Nanning* 530001, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To investigate the effect and mechanism of Huanglian Jiedu Tang active fraction (HLJDTAF) on calcium overloading in neurons. **Method**: Cerebral ischemia was imitated by hypoxia/hypoglycemia damage on fetal rat neurons. Double wavelength fluorospectrophotometry was used to assay the content of calcium in neurons in order to evaluate the effect of HLJDTAF on calcium overloading. Neurons were treated with glutamic acid, potassium chloride (KCl), A23187, caffeine(CAF) and methacholine (Mch) to analysis the related mechanism of HLJDTAF on calcium overloading in neurons. **Result**: HLJDTAF 0.3, 0.15 g·k^{-1} could remarkably inhibit the calcium overloading in neurons caused by hypoxia/hypoglycemia, glutamic acid, KCl and A23187. HLJDTAF 0.3 g·kg^{-1} could inhibit the increasing of calcium caused by CAF and Mch in the presence of and in the absence of extra-calcium. **Conclusion**: HLJDTAF could remarkably inhibit the calcium overloading in neurons after cerebral ischemia injury, it probably plays the function via several pathways.

[**Key words**] Huanglian Jiedu Tang active fraction (HLJDTAF); cerebral ischemia; intracellular calcium; neuron

doi: 10.4268/cjcmm20101629

[责任编辑　张宁宁]