

- [3] 张野, 陈志武. 瑞芬太尼预处理对大鼠心肌缺血-再灌注损伤的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2005, 25(5): 449 - 452.
- [4] SEHULTZ J E, GROSS G J. Opioids and cardioprotection. *Pharmacol* [J]. *Ther*, 2001, 89: 123 - 137.
- [5] GROSS G J. Role of opioids in acute and delayed preconditioning[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2003, 35: 709 - 718.
- [6] PEART J N, GROSS E R, GROSS G J. Opioid-induced preconditioning: recent advances and future perspectives [J]. *Vascul Pharmacol*, 2005, 42: 211 - 218.
- [7] WANG G Y, WU S, PEI J M, *et al*. Kappa · but not delta · opioid receptors mediate effects of ischemic preconditioning on both infarct and arrhythmia in rats [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, 28: 384 - 391.
- [8] 张野, 陈志武. 阿片受体在瑞芬太尼预适应对大鼠缺血后心脏保护中的角色[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(2): 220 - 223.
- [9] PUGSLEY M K. The diverse molecular mechanisms responsible for the actions of opioids on the cardiovascular system [J]. *Pharmacol Ther*, 2002, 93: 51 - 75.
- [10] SEHULTZ J E, ROSE E, YAO Z, *et al*. Evidence for involvement of opioid receptors in ischemic preconditioning in rat hearts [J]. *Am J Physiol*, 1995, 268: 2157 - 2161.

复方丹参滴丸对过氧化氢损伤 PC12 细胞的保护作用

冯洁, 裴保香

(解放军总医院医学保障部药品保障中心药库, 北京 100853)

[摘要] 目的 研究复方丹参滴丸对过氧化氢(H_2O_2)损伤 PC12 细胞的保护作用, 探讨复方丹参滴丸治疗缺血性脑血管病的作用机制。方法 采用细胞培养和 H_2O_2 诱导细胞损伤的方法, 观察复方丹参滴丸对 PC12 细胞的保护作用。结果 复方丹参滴丸 6.25, 12.50, 25.00 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 均可明显对抗 100 和 500 $\mu mol \cdot L^{-1}$ H_2O_2 引起的 PC12 细胞凋亡 ($P < 0.01$)。结论 复方丹参滴丸可以促进 PC12 细胞的营养和增殖作用, 并有抗 H_2O_2 诱导细胞凋亡作用。

[关键词] 丹参滴丸, 复方; 过氧化氢; 细胞凋亡; 细胞增殖

[中图分类号] R286; R965 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1004-0781(2008)02-0159-03

Protection of *Fufang Danshen Diwan* on Injured PC12 Cells by H_2O_2

FENG Jie, PEI Bao-xiang (Medical Supply Store, Drugs Supply Center, Medicine Safeguard Department of People's Liberation Army General Hospital, Beijing 100853, China)

ABSTRACT Objective To study the protection of *fufang danshen diwan* on injured PC12 cells by H_2O_2 and mechanisms of which treating ischemic cerebrovascular disease. **Methods** Protection of *fufang danshen diwan* on injured PC12 cells caused by H_2O_2 was observed. **Results** 6.25, 12.50 and 25.00 $\mu g \cdot mL^{-1}$ of *fufang danshen diwan* significantly suppressed PC12 cells apoptosis induced by 100 and 500 $\mu mol \cdot L^{-1}$ H_2O_2 ($P < 0.01$). **Conclusion** The results show that *fufang danshen diwan* can simulate the proliferation of PC12 cells and protect cell apoptosis induced by H_2O_2 .

KEY WORDS *Fufang danshen diwan*; H_2O_2 ; Apoptosis; Proliferation

活性氧(ROS)参与缺血再灌注及一些神经退行性病引起的脑细胞损伤过程^[1,2]。超氧阴离子、过氧化氢(H_2O_2)及羟自由基等活性氧的形成可引起膜脂质过氧化, 蛋白质氧化及 DNA 损伤, 而最终导致细胞受损乃至死亡^[3,4]。 H_2O_2 是一种氧自由基, 除具有广泛的生理作用外, 还有复杂的病理作用, 是脑缺血引起脑损伤和水肿的原因之一^[5-7]。PC12 细胞是大鼠嗜铬细胞瘤细胞, 体外培养具有类似神经细胞的特性, 除

了生长特性(如聚集成堆、纤维突起等)外, 还有分泌儿茶酚胺、多巴胺和去甲肾上腺素等特性, 常用做神经细胞替代模型。有文献报道, 低浓度的 H_2O_2 可以诱导 PC12 细胞增殖, 高浓度时通过使细胞膜通透性增强, 引起细胞破裂死亡^[8,9]。笔者观察了复方丹参滴丸对高浓度 H_2O_2 损伤 PC12 细胞的保护作用, 以进一步探讨其保护机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料 25 mL 细胞培养瓶, 50 mL 细胞培养瓶, 96 孔平底细胞培养板, 细胞计数板, 载玻片, 大鼠嗜铬细胞瘤细胞(PC12 细胞), 1640 培养基, 标准胎牛血清, 标准马血清, 四甲基氮唑蓝(MTT), 30% 过氧化

[收稿日期] 2007-03-25

[作者简介] 冯洁(1977-), 女, 河南郑州人, 主管药师, 学士, 主要研究方向: 医院药学。电话: 010-66937266, E-mail: xyf112@sina.com。

氢,氨苄西林、链霉素,其他试剂均为国产分析纯,复方丹参滴丸(天津天士力制药股份有限公司,批号:20030908)。WELLSCAN MK3 型酶标仪; Adventurer 万分之一电子天平; Olympus IX70 倒置显微镜; 3K18 小型台式冷冻离心机; ASV-3023 樱花高压蒸汽灭菌器; 二氧化碳(CO₂)培养箱; 超净台; 倒置显微镜; MMM 烘箱; 移液器; BI50001 冷藏冰冻箱; 温湿度表; 液氮生物容器; LHS30-A 免接触自动控制手消毒器。

1.2 实验方法 细胞培养用含 15% 马血清和 5% 胎牛血清的 1640 培养基。复方丹参滴丸药物浓度按照对倍稀释的原则用 1640 培养基配成 200.00, 100.00, 50.00, 25.00, 12.50 和 6.25 μg · mL⁻¹, 使药物终浓度达到 50.00, 25.00, 12.50, 6.25, 3.18 和 1.56 μg · mL⁻¹。采用同样的方法用 1640 培养基配制 H₂O₂ 浓度为 2 000, 400 和 80 μmol · L⁻¹, 使其终浓度达到 500, 100 和 20 μmol · L⁻¹。

将 96 孔板分成空白对照组、低浓度 H₂O₂ 组、中浓度 H₂O₂ 组和高浓度 H₂O₂ 组; 各组又分成空白组和由低到高 6 个浓度的复方丹参滴丸组。以 2 × 10⁴ 个 · mL⁻¹ 的 PC12 细胞接种于 96 孔板, 每孔 100 μL。每孔再分别加入 3 个浓度的 H₂O₂ 和 6 个浓度的复方丹参滴丸溶液各 50 μL, 使 H₂O₂ 和复方丹参滴丸都达到设定的终浓度; 空白组加入等体积 1640 培养基。加好药物后, 在 37 °C、5% CO₂ 孵育箱中培养 96 h 后, 倒掉各孔的培养液, 各孔均加入 100 μL 配制好的 MTT 溶液(0.1%)。在 37 °C、5% CO₂ 孵育箱中放置 4 h 后, 用 WELLSCAN MK3 型全自动酶标仪测定 570 nm 波长处吸光度(A)值, 以 450 nm 为参考波长。然后按下列公式计算抑制率: 抑制率(%) = (正常对照组 A 值 - 给药组 A 值) / 正常对照组 A 值 × 100%。

2 结果

2.1 形态学观察 倒置显微镜下 PC12 细胞形状呈圆形, 为贴壁细胞, 折光性较强, 生长速度较快, 培养 3 d 后细胞生长成簇。PC12 细胞在 H₂O₂ 作用下有明

显的损伤, 镜下可见细胞肿胀固缩, 折光率下降, 贴壁功能下降, 部分细胞裂解成碎片。给予复方丹参滴丸后均能明显减轻 H₂O₂ 对 PC12 细胞形态学变化的影响, 表现为细胞折光性较好, 细胞碎片形成减少。

2.2 复方丹参滴丸对 PC12 细胞 H₂O₂ 损伤的影响 MTT 法测定结果见表 1。经 H₂O₂ 处理过的 PC12 细胞对 MTT 的还原能力下降, A₅₇₀ 值明显低于正常对照组 (P < 0.01)。表明细胞因受损伤或死亡而导致细胞活力明显下降。加入复方丹参滴丸后, 随着药物剂量的升高, A₅₇₀ 值依次升高, 抑制率依次降低, 见表 2。显示其保护作用呈现剂量依赖关系。当 H₂O₂ 的浓度为 100 和 500 μmol · L⁻¹ 时, 给予复方丹参滴丸 6.25, 12.50, 25.00 μg · mL⁻¹ 组的 A₅₇₀ 值显著高于损伤组 (P < 0.01)。表明复方丹参滴丸可以显著改善细胞活力, 对 H₂O₂ 引起的 PC12 细胞损伤的抑制率分别为 20.60%, 14.00%, 11.70% (100 μmol · L⁻¹ H₂O₂); 31.59%, 26.98%, 14.20% (500 μmol · L⁻¹ H₂O₂)。

3 讨论

正常情况下, 机体存在一个完整的抗氧化防御系统, 包括酶系和非酶系抗氧化体系。在脑缺血过程中, 氧供中断导致自由基从正常线粒体电子传递链中漏出^[10,11]。但是, 自由基所介导的脑损伤不仅发生在缺血期间, 而且在随后的血流再灌注过程中仍是导致损伤的主要因素^[12]。H₂O₂ 是脑缺血引起脑损伤和水肿的原因之一; 在铁离子(Fe³⁺)和超氧负离子自由基的存在下, H₂O₂ 可以转化成毒性更强的羟基自由基^[7,13]。因此, 外源性抗氧化药和自由基清除药的应用, 以及降低神经细胞内活性氧的增加是保护脑组织免受缺血-再灌注损伤的有效方法^[14,15]。

笔者在本研究中采用外源性 H₂O₂ 致 PC12 细胞氧应激损伤模型, 以考察复方丹参滴丸对 H₂O₂ 所致神经毒性的影响。实验结果表明, 缺血损伤后的 PC12 细胞活力下降, 6.25, 12.50, 25.00 μg · mL⁻¹ 复方丹参滴丸可

表 1 给药后不同浓度各组 A₅₇₀ 值测定结果

$\bar{x} \pm s$

组别与浓度/ (μg · mL ⁻¹)	正常对照	20 μmol · L ⁻¹ H ₂ O ₂	100 μmol · L ⁻¹ H ₂ O ₂	500 μmol · L ⁻¹ H ₂ O ₂
复方丹参滴丸 1.56 组	1.184 ± 0.037	1.063 ± 0.010	0.889 ± 0.018	0.626 ± 0.073
复方丹参滴丸 3.18 组	1.150 ± 0.025	1.045 ± 0.106	0.906 ± 0.064	0.696 ± 0.064
复方丹参滴丸 6.25 组	1.161 ± 0.213	1.086 ± 0.111	0.954 ± 0.021 ^{*1}	0.822 ± 0.030 ^{*1}
复方丹参滴丸 12.50 组	1.191 ± 0.106	1.089 ± 0.055	1.034 ± 0.023 ^{*1}	0.878 ± 0.008 ^{*1}
复方丹参滴丸 25.00 组	1.293 ± 0.168	1.123 ± 0.054	1.061 ± 0.078 ^{*1}	1.031 ± 0.042 ^{*1}
复方丹参滴丸 50.00 组	1.294 ± 0.116	1.090 ± 0.113	0.997 ± 0.095	0.965 ± 0.078 ^{*1}
正常对照组	1.202 ± 0.082	1.007 ± 0.106	0.894 ± 0.063	0.633 ± 0.086

与正常对照组比较, ^{*1} P < 0.05

表 2 给药后不同浓度各组抑制率 %

浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	$\text{H}_2\text{O}_2 / (\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$			
	0	20	100	500
0.00	0.00	16.25	25.62	47.32
1.56	1.50	11.54	26.01	47.95
3.13	4.37	13.03	24.60	42.12
6.25	3.38	9.65	20.60	31.59
12.50	0.94	9.37	14.00	26.98
25.00	0.42	6.57	11.70	14.20
50.00	-2.45	9.35	17.03	19.74

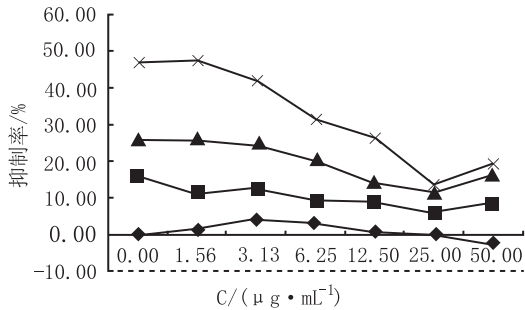


图 1 加入不同 H_2O_2 后各组细胞抑制率曲线图

—◆— H_2O_2 $0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; —■— H_2O_2 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; —▲— H_2O_2 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; —×— H_2O_2 $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

使活力显著增强。表明复方丹参滴丸能保护细胞,明显改善细胞活力。复方丹参滴丸对缺氧引起的 PC12 细胞损伤的抑制率呈现剂量依赖关系。形态学观察也证实,给予复方丹参滴丸能明显减轻缺氧环境下的 PC12 细胞形态学的变化,表现为细胞折光率较好,细胞碎片形成减少。

以上结果提示复方丹参滴丸可能影响正常生理条件下神经细胞内过氧化氢的生成和(或)神经细胞的氧化代谢过程,复方丹参滴丸通过与缺血-再灌注后脑损伤密切相关的氧自由基反应而发挥其对脑缺血损伤的保护作用。

[参考文献]

[1] 冯亦璞. 缺血性脑卒中的病理生理及药物治疗现状[J]. 药理学报, 1999, 34(1): 72-78.
 [2] EVANS P H. Free radicals in brain metabolism and pathology [J]. *British Medical Bulletin*, 1993, 49: 577-587.
 [3] MAK I T, BOEHME P, WEGLIICKI W B. Antioxidant effects of calcium channel blockers against free radical injury

in endothelial cells: correlation of protection with preservation of glutathione levels [J]. *Circ Res*, 1992, 70: 1099-1103.

[4] 唐小卿, 冯鉴强, 李平阳, 等. H_2O_2 预处理对 PC12 细胞氧化应激损伤的适应性细胞保护作用[J]. 中国药理学通报, 2003, 19(10): 1115-1118.
 [5] 超秀梅, 刘育英, 姜 澜. 脑缺血再灌注过程中沙土鼠脑组织和血浆 SOD、MDA 含量的变化[J]. 微循环学杂志, 1999, 9(1): 15-16.
 [6] 徐 运, 徐 艳, 李传文. 脑缺血和再灌注鼠亚细胞水平 MDA、SOD 变化及中药的影响[J]. 临床神经病学杂志, 1997, 10(2): 73-75.
 [7] 张 洪, 慕容慎行, 刘友尧, 等. 大鼠脑缺血再灌注脑区一氧化氮变化的研究[J]. 临床神经病学杂志, 1999, 12(1): 18-20.
 [8] 帅 杰, 董为伟. 不同脑缺血和再灌注过程中大鼠脑组织 NO 含量的动态变化[J]. 临床神经病学杂志, 1997, 10(6): 326-329.
 [9] ZHANG F Y, LADECOLA C. Reduction of focal cerebral ischemic damage by delayed treatment with nitric oxide donors [J]. *J Cere Blood Flow Metab*, 1994, 14: 574.
 [10] HAMADA J, GREENBERG J H, CROUL S, et al. Effect of central inhibition of nitric oxide synthase on focal cerebral ischemia in rats [J]. *J Cere Blood Flow Metab*, 1995, 15: 779.
 [11] CHEN L Y, MEHTA J L. Further evidence of the presence of constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in human platelets [J]. *J Cardiovascul Pharmacol*, 1996, 27: 154.
 [12] MUYRDOCH J, HALL R. Brain protection: physiological and pharmacological consideration. Part I. The physiology of brain injury [J]. *Cen J Anesth*, 1990, 37: 663.
 [13] 王 蕾, 徐建兴, 唐朝枢, 等. 脑缺血再灌注大鼠脑线粒体 NO 的生成及 NOS 活性的改变[J]. 中国病理生理杂志, 2000, 16(4): 289-292.
 [14] 邓常青, 刘志龙, 葛金文, 等. 补阳还五汤抗脑缺血再灌注损伤作用机理的研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 1998, 4(8): 32-35.
 [15] 周颖奇. 沙土鼠脑缺血后自由基损害作用[J]. 第二军医大学学报, 1990, 11(1): 49-52.