

dismutase (SOD), the contents malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) were determined by spectrophotometry in brain homogenate of mice. **Results:** JNLWE significantly prolonged the survival time of mice, enhanced the activity of SOD, degraded the contents of MDA and raised the contents of GSH in the brain induced by ischemia-reperfusion. **Conclusion:** JNLWE has protective effect against cerebral ischemia-reperfusion injury via its antioxidant activity.

Key words Jasminum nudiflorum Lindl; ischemia-reperfusion; antioxidant activity

灯盏细辛注射液对大鼠大脑皮层神经元细胞存活率的影响

张 静¹, 盛艳梅², 张 艺¹

(¹成都中医药大学, 成都 611137; ²成都医学院, 成都 610083)

摘 要 目的: 探讨灯盏细辛注射液外对大鼠皮层神经细胞存活率的影响。方法: 利用细胞培养技术, MTT 法检测灯盏细辛注射液对细胞生长的影响。结果: 与空白对照组比较, 灯盏细辛含量在 75~37.5 mg/ml 时, 其吸收值均明显增加, 且有一定的量效关系。结论: 灯盏细辛注射液体外能够促进大鼠皮层神经细胞存活。

关键词 灯盏细辛注射液; 大鼠皮层神经元; 细胞培养

药理研究表明, 灯盏细辛注射液具有舒张脑血管, 增加脑血流量, 改善微循环, 抑制血小板聚集, 降低血黏度, 促进纤溶活性, 拮抗脂质过氧化, 清除自由基等作用, 临床用其治疗缺血性脑血管病具有良好效果。目前, 对于其治疗脑血管疾病的神经保护作用研究较少。本文对灯盏细辛注射液对大鼠皮层神经细胞保护作用进行研究。

1 材料与方法

1.1 试验药物 灯盏细辛注射液, 由云南生物谷灯盏花药业有限公司提供, 批号: 20050203, 浓度相当于 0.3g 生药/ml。

1.2 动物 SD 乳鼠(出生 1 d 内), 由成都中医药大学实验动物中心提供, 合格证号: 川实动管第 11 号。

1.3 试剂和仪器 胰蛋白酶, II 型胶原酶, 胎牛血清 (Gibco 公司), 多聚赖氨酸, DMEM 高糖培养基, 四甲基偶氮唑盐 (Sigma 公司), 其余试剂均为国产分析纯。超纯水仪 (Millipore); 二氧化碳培养箱 (Thermo 3111); 超净工作台 (苏净集团安泰公司); 倒置显微镜 (日本 Olympus Optical 公司); ZS-2 型酶联免疫检测仪 (北京新风机电技术公司)

1.4 方法

1.4.1 大鼠大脑皮层神经细胞培养^[1,2]

铺板: 取 96 孔板, 每孔加入 0.1 mg/mL 多聚赖氨酸 50 μ l, 振荡均匀, 室温静置过夜, 备用。

制备细胞悬液: 将乳鼠断颈处死, 75% 酒精消毒, 无菌条件分离大脑皮层组织, 尽量除去脑血管膜, 置入冰 Hanks 液中漂洗 2~3 次。将所获组织剪成 1 mm³ 组织块, 用 0.125% 的胰蛋白酶 + 0.05% II 型胶原酶 37 $^{\circ}$ C 下消化, 35 min 后加入培养液终止消化, 用 70 μ m 细胞筛网滤过。将滤液 1 000 rpm 离心 10 min, 弃上清液。加入完全培养液 (900 ml/L DMEM 高糖培养基, 100 ml/L 胎牛血清, L-谷氨酰胺 0.45 g/L, NaHCO₃ 3 g/L, HEPES 5 g/L, 青霉素 1 \times 10⁵ U/L, 链霉素 1 \times 10⁵ U/L), 吸管吹打使之分散均匀制成单细胞悬液。计数并调整培养液量使每 mL 含 1 \times 10⁶ 个细胞。

1.4.2 接种培养和药物加入 将细胞悬液接种于经包被的 96 孔板中, 每孔 100 μ l 培养 24 h 后加入阿糖胞苷以抑制非神经细胞生长, 以后每 2d 半量换液, 第 6d 全量换液, 每孔加入培养液 150 μ l, 同时分别加入培养液 (空白对照组) 和浓度梯度的受试药物 (均设 5 个剂量组, 成倍稀释, 起始浓度为母液) 各 50 μ l, 继续培养。

1.4.3 MTT 法检测灯盏细辛注射液对细胞存活的影响 加入药物培养 1 d 后, 每孔加入 MTT 液 (四甲基偶氮唑盐, 5 mg/ml) 50 μ l, 继续培养 4 h 后, 去上清液, PBS 液漂洗 2 次, 每孔加入二甲基亚砷 (DMSO) 150 μ l, 充分振荡, 室温静置 10 min, 用酶标仪于 492 nm 波长处测定吸收值。

2 结果

2.1 形态学观察 倒置相差显微镜下观察, 大鼠皮层神经细胞培养约 4 h 开始贴壁, 贴壁后的细胞呈圆形。24~48 h 细胞开始伸出长短不等的细小突起, 加入阿糖胞苷后见少量细胞溶解坏死。72 h 后部分细胞伸出典型突起且少数突起相互连接, 细胞呈圆形或多边形生长。6 d 后细胞胞体明显增大, 四周光晕明显, 突起多而粗大。

2.2 NSE 免疫组化染色检查 胞膜完整的细胞中大部分为神经元特异性烯醇化酶阳性染色细胞, 表明存活细胞中大部分为神经细胞。

2.3 大鼠皮层神经细胞活性测量 MTT 法测定结果见表 1。

表 1 灯盏细辛注射液对大鼠皮层神经细胞存活率影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	浓度 (mg/ml)	吸收值 / 存活率
空白对照		0.084 \pm 0.010
灯盏细辛注射液	75.000	0.237 \pm 0.034 **
灯盏细辛注射液	37.500	0.227 \pm 0.065 *
灯盏细辛注射液	18.750	0.178 \pm 0.0396 *
灯盏细辛注射液	9.375	0.094 \pm 0.015
灯盏细辛注射液	4.688	0.084 \pm 0.008

与对照组比较 * P < 0.05, ** P < 0.01

3 讨论

已有文献报道灯盏细辛具有视神经保护作用,但其对大脑皮层神经元的保护作用尚未明确。本次实验研究发现,灯盏细辛注射液多个浓度均具有促进大脑皮层神经细胞存活的作用,其具体作用机制有待进一步探讨。

参考文献

- 1 Dildy J E, Leslie SW. Ethanol inhibits MDA-induced increases in free intracellular Ca^{2+} in dissociated brain cells. *Brain Res*, 1989; 499 (4): 383-387
- 2 Wu J unfang, Zhang J untian. Antagonistic effect of nerve growth factor on neuronal injury induced by hypoxia in cultured cerebral cortical neurons of rats. *Acta Pharmacologia Sinica*, 1999; 20 (2): 47-51

田基黄对人肝癌细胞 HepG2 增殖的影响*

林久茂^{1,2}, 王瑞国³, 陈旭征^{1,2}, 赵锦燕^{1,2}

(¹福建中医学院中西医结合研究院,福州 350108; ²福建中西医结合研究院,福州 350108; ³福建中医学院药理学系,福州 350108)

摘要 目的:探讨田基黄对人肝癌细胞增殖的影响。方法:体外培养人肝癌细胞株 HepG2,用 MTT 法和流式细胞术(FCM)检测田基黄提取物及其含药血清作用于 HepG2 24h 后的细胞增殖情况。结果:MTT 法结果表明,田基黄对 HepG2 增殖有抑制作用;FCM 检测表明,田基黄阻止增殖中的 HepG2 进入 S 期。结论:田基黄能有效地抑制 HepG2 细胞增殖,提示阻滞细胞周期、抑制细胞增殖可能是田基黄治疗肝癌的一个机制。

关键词 田基黄;肝癌;HepG2;细胞增殖;细胞周期

田基黄具有清热利湿,散瘀止痛,消肿解毒的功效。现代临床用于治疗原发性肝癌,其作用机理不详。本文研究了田基黄对人肝癌细胞株 HepG2 增殖的影响,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 试验药物 田基黄购自福建中医学院国医堂医院,批号:060410,经福建中医学院中药鉴定教研室鉴定为藤黄科金丝桃属植物地耳草 *Hypericum japonicum* Thumb 的干燥全草。田基黄制成含生药 2g/ml 的提取物,提取物经微孔滤膜过滤除菌,于 4℃ 保存待用;含药血清的制备:SD 大鼠 12 只,体重 140~180g,雌雄各半,随机分为 2 组(即含药血清组、空白血清组),按 1ml/100g 体重灌胃给药,连续 7d,第 7d 给药后 1h 采用安定:氟胺酮(1:1)按 0.1ml/100g 体重腹腔注射麻醉,腹主动脉采血,于 4℃ 3000rpm 离心 10min,分离血清。合并同组血清,56℃ 灭活 30min,于 -20℃ 保存待用。

1.2 动物与细胞株 清洁级 SD 大鼠,上海斯莱克实验动物有限公司,许可证号: SCK(沪)2003-0003。肝癌细胞株(HepG2),购自南京凯基生物科技发展有限公司。

1.3 试剂与仪器 RPMI1640 培养基干粉, GIBCO 公司;胰蛋白酶(trypsin), Hyclone 公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS), 杭州四季青生物工程材料有限公司;四甲基偶氮唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 干粉, Sigma 公司;细胞周期(DNA)检测试剂盒, BD 公司。ELX800 酶标仪, BioTek 公司;流式细胞仪: Becton Dickison 公司;二氧化碳培养箱: 德国 Heraeus;

IX70 荧光倒置相差显微镜: 日本 OLYMPUS。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养 将人肝癌细胞 HepG2 置于含 10% 热灭活胎牛血清(FBS)的 RPMI-1640 培养液中,于 37℃ 5% CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱中培养。

1.4.2 MTT 法测定细胞增殖 取对数生长期的人肝癌细胞 HepG2,用 0.25% 胰酶消化并收集细胞。以 RPMI 1640 培养液(含 10% FBS)制成细胞悬液,进行细胞计数,调整细胞密度为 1×10^5 个/ml,接种于 96 孔培养板中,每孔 100 μ l,常规培养 24h,使细胞同步化。设田基黄提取物组(终浓度分别为 80、40、20、10、5、2.5mg/ml),田基黄含药血清组(终浓度分别为:20、15、10、5、1%),空白血清对照组(终浓度分别为:20、15、10、5、1%)和对照组(直接加等体积的培养液)并加药。以上各组均设 8 个复孔。继续培养 24h,吸弃各孔中的液体,每孔加入 0.5mg/ml 的 MTT 溶液 100 μ l,37℃ 孵育 4h,然后吸弃各孔中的液体,加入 DMSO 100 μ l/孔,振荡混匀,室温放置 10min,使结晶充分溶解并混匀,于全自动酶标仪 570nm 测定各组吸光度值(即 OD 值),并按下列公式计算增殖抑制率:抑制率(%) = (对照组平均吸光度值 - 实验组吸光度值) / 对照组平均吸光度值 \times 100%。

1.4.3 流式细胞仪进行细胞周期(DNA)分析 将 1×10^5 个/ml 的人肝癌细胞 HepG2 接种于 25ml 的培养瓶中常规培养 24h。设田基黄提取物组(终浓度分别为 80、40、20、10mg/ml),田基黄含药血清组(终浓度为 10%),空白血清对照组(终浓度为 10%)和对照组(直接加等体积的培养液)并加药。以上各组

* 基金项目:福建中医学院科研基金(X20040019)