· 论著 ·

双黄连对乌头碱所致 PC12 细胞损伤的干预作用

王磊，赵光举，洪广亮，李萌芳，邱俏檬，卢中秋

（温州医科大学附属第一医院急诊医学中心，浙江 温州 325000）

【摘要】 **目的** 观察乌头碱对 PC12 细胞释放谷氨酸（Glu）及 γ-氨基丁酸（GABA）的影响，并探讨双黄连的干预作用。**方法** 采用细胞增殖试剂（CCK-8）检测乌头碱对 PC12 细胞的毒性，建立乌头碱损伤模型，将处于对数生长期的 PC12 细胞按随机数字表法分为空白对照组（加入含 0.1% 二甲亚砜的完全培养基）、双黄连对照组（加入 50 μg/mL 的双黄连）、黄芩苷对照组（加入 20 μmol/L 的黄芩苷）、乌头碱中毒组（加入 100 μmol/L 的乌头碱）、双黄连干预组（加入 100 μmol/L 的乌头碱和 50 μg/mL 的双黄连）、黄芩苷干预组（加入 100 μmol/L 的乌头碱和 20 μmol/L 的黄芩苷），各组均培养 PC12 细胞 24 h。采用 CCK-8 法检测双黄连及黄芩苷干预前后 PC12 细胞吸光度（*A*）值的变化；用流式细胞仪检测 PC12 细胞凋亡情况；采用化学比色法及酶联免疫吸附试验（ELISA）检测细胞培养液中 Glu、GABA 含量的变化。**结果** 与空白对照组比较，100 μmol/L 乌头碱处理 PC12 细胞 24 h 后细胞活性明显降低（*A* 值：1.003±0.042 比 1.685±0.030，$P<0.05$），所以本实验将 100 μmol/L 乌头碱与 PC12 细胞孵育 24 h 作为后续实验的干预浓度。空白对照组的正常 PC12 细胞为 95.89%；而乌头碱中毒组损伤的 PC12 细胞达到 64.27%，其中早期凋亡率达 45.46%；双黄连干预组和黄芩苷干预组早期细胞凋亡率分别降低至 33.24% 和 28.22%。与空白对照比较，双黄连和黄芩苷单独作用对照组细胞活性及 PC12 细胞释放的 Glu 和 GABA 含量差异均无统计学意义（均 $P>0.05$）；乌头碱中毒组细胞活性明显降低（*A* 值：1.056±0.039 比 1.722±0.083），PC12 细胞释放的 Glu 和 GABA 含量显著升高〔Glu（μmol/L）：5.295±0.137 比 3.433±0.138，GABA（μmol/L）：0.769±0.020 比 0.528±0.012，均 $P<0.05$〕；与乌头碱中毒组比较，双黄连干预组和黄芩苷干预组 PC12 细胞活性明显增加（1.202±0.059 和 1.180±0.032），Glu 含量显著减少（4.055±0.086 和 3.984±0.057），GABA 含量显著增加（0.809±0.016 和 0.930±0.021），差异均有统计学意义（均 $P<0.05$），且双黄连干预组细胞活性增加程度较黄芩苷干预组更显著；双黄连干预组与黄芩苷干预组 Glu 和 GABA 含量比较差异无统计学意义（均 $P>0.05$）。**结论** Glu 和 GABA 的改变可能是乌头碱所致神经毒性机制之一；双黄连可能通过其主要成分黄芩苷降低 Glu 含量、升高 GABA 含量，从而拮抗乌头碱的神经毒性。

【关键词】 乌头碱；　神经损伤；　黄芩苷；　神经递质

The intervention effect of Shuanghuanglian on PC12 cell injury induced by aconitine

Wang Lei, Zhao Guangju, Hong Guangliang, Li Mengfang, Qiu Qiaomeng, Lu Zhongqiu. Department of Emergency, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, Zhejiang, China

Corresponding author: Lu Zhongqiu, Email: lzq640815@163.com

【**Abstract**】 **Objective** To observe the release of glutamate (Glu) and γ-amino butyric acid (GABA) from PC 12 cells induced by aconitine, and to study the intervention of Shuanghuanglian on the injury of these cells. **Methods** The cell proliferation test agent in cell counting kit (CCK-8) was applied to assay the aconitine toxicity to PC12 cells and to establish the PC12 cell injury model induced by aconitine. The PC12 cells during logarithmic growing phase were randomly divided into the following groups: blank control group (complete medium containing 0.1% dimethyl sulfoxide was added), Shuanghuanglian control group (complete medium containing 50 μg/mL Shuanghuanglian), baicalin control group (complete medium containing 20 μmol/L baicalin), aconitine toxic group (complete medium containing 100 μmol/L aconitine), Shuanghuanglian intervention group (complete medium containing 100 μmol/L aconitine and 50 μg/mL Shuanghuanglian) and baicalin intervention group (complete medium containing 100 μmol/L aconitine and 20 μmol/L baicalin). The cells in all groups were incubated for 24 hours respectively. The changes of PC12 cell absorbance (*A*) values were detected by CCK-8 assay before and after intervention by Shuanghuanglian and baicalin. The PC12 cell apoptosis was determined by flow cytometry. Glu and GABA contents in cell culture medium were determined by chromatometry and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Compared with blank control group, after the PC12 cells treated with 100 μmol/L aconitine for 24 hours, their cytoactivity was decreased markedly (*A* value: 1.003±0.042 vs. 1.685±0.030, $P<0.05$), then afterwards in the experiment, the incubation of 100 μmol/L aconitine with PC12 cells for 24 hours was considered as the intervention concentration. In blank control group, the normal PC12 cells accounted for 95.89%, while in the aconitine toxic group, the rate of injured PC12 cells reached 64.27% and early apoptosis rate reached 45.46%, and in Shuanghuanglian intervention group and baicalin intervention group, the early apoptosis rate was decreased to 33.24% and 28.22% respectively. Compared with blank control group, there were no significant differences in cytoactivities and the contents of Glu and GABA released by PC12 cells in Shuanghuanglian control group and baicalin

doi: 10.3969/j.issn.1008-9691.2014.06.003

基金项目：浙江省中医药科技计划项目（2011ZA074）；浙江省中医药重点学科计划（2012-XK-A28）；浙江省“十二五”重点学科建设项目（2012-207）；浙江省医学创新学科建设项目（11-CX26）

通信作者：卢中秋，Email: lzq640815@163.com

control group (all $P<0.05$), while in the aconitine toxic group, the cytoactivity was significantly decreased (A value: 1.056±0.039 vs. 1.722±0.083), and the contents of Glu and GABA were significantly increased [Glu (μmol/L): 5.295±0.137 vs. 3.433±0.138; GABA (μmol/L): 0.769±0.020 vs. 0.528±0.012, both $P<0.05$]. Compared with aconitine toxic group, the cytoactivities of PC12 were significantly elevated (1.202±0.059 and 1.180±0.032), the levels of Glu were significantly reduced (4.055±0.086 and 3.984±0.057), and the contents of GABA were obviously increased (0.809±0.016 and 0.930±0.021) in the cell culture medium of the Shuanghuanglian intervention group and baicalin intervention group (all $P<0.05$). The increase of cytoactivity in Shuanghuanglian intervention group was more marked than that of baicalin intervention group ($P<0.05$). There were no statistical significant differences in contents of Glu and GABA between Shuanghuanglian intervention group and baicalin intervention group (both $P>0.05$). **Conclusions** The changes of Glu and GABA may be one of the mechanisms of neural toxic effect of aconitine. Shuanghuanglian possibly can decrease Glu level and increase GABA content by way of its main component baicalin to antagonize the aconitine neurotoxicity.

【Key words】 Aconitine; Nerve injury; Baicalin; Neurotransmitter

乌头碱为雪上一枝蒿、草乌川乌等乌头属植物属的二萜类生物碱，乌头类植物可入药，首载于《神农本草经》，记载其性微辛、大热有毒，归心、脾、肾经，被列为下品，具有回阳救逆、祛风逐湿、温经止痛等功效[1]。乌头碱具有较强的神经毒性且治疗窗狭窄[2-3]。现有研究表明，双黄连的有效成分黄芩苷具有神经保护作用，有助于改善乌头碱中毒神经症状，但机制仍需进一步探讨[4-5]。本实验采用乌头碱作用于 PC12 细胞，构建细胞损伤模型，观察双黄连及其主要成分黄芩苷对乌头碱损伤 PC12 细胞释放谷氨酸（Glu）和 γ-氨基丁酸（GABA）含量的影响，探讨其潜在的作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器：乌头碱、黄芩苷（美国 Sigma 公司），双黄连（国药准字号 Z10940044），胰蛋白酶、Dulbecco 改良 Eagle 培养基（DMEM 培养基）、胎牛血清、胰蛋白酶、双克隆抗体（双抗，上海碧云天科技有限公司），GABA、Glu 试剂盒（南京建成生物有限公司），细胞增殖试剂（CCK-8）试剂盒（日本 Dojindo 公司）。酶标仪、CO_2 培养箱、超净工作台、倒置显微镜。

1.2 实验方法：PC12 细胞（购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心）用含有 10% 胎牛血清以及 0.5% 双抗的 DMEM 培养，并置于 37 ℃，5% CO_2 培养箱中孵育，待细胞生长至足够数量且进入对数生长期后即可进行后续实验。将细胞以 5×10^4 个 /mL 接种于 96 孔板中，每孔 200 μL。实验分为：乌头碱 0、25、50、100 μmol/L 组，培养 8 h 后弃去培养基，按上述分组，加入终浓度为 0、25、50、100 μmol/L 的乌头碱于培养箱中孵育 24 h，然后向每孔中加入 10 μL CCK-8 继续孵育 1 h，用酶标仪在波长 450 nm 处测定吸光度（A）值，根据实验结果确定适合的损伤浓度，实验重复测定 3 次。

1.3 实验分组：将处于对数生长期的 PC12 细胞按随机数字表法分为空白对照组〔加入含有 0.1% 二甲亚砜（DMSO）的完全培养基〕、双黄连对照组（加入含 50 μg/mL 的双黄连完全培养基处理 PC12 细胞）、黄芩苷对照组（加入含 20 μmol/L 的黄芩苷完全培养基处理 PC12 细胞）、乌头碱中毒组（加入含 100 μmol/L 的乌头碱完全培养基处理 PC12 细胞）、双黄连干预组（加入含 100 μmol/L 的乌头碱和 50 μg/mL 的双黄连完全培养基处理 PC12 细胞）和黄芩苷干预组（加入含 100 μmol/L 的乌头碱和 20 μmol/L 的黄芩苷完全培养基处理 PC12 细胞），各组均培养 24 h。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 CCK-8 测定各组 PC12 细胞活性：根据上述分组方法将细胞以 5×10^4 个 /mL 接种于 96 孔板中，每组设 10 个副孔。每孔取 100 μL 细胞悬液，将培养板置于培养箱中孵育 24 h，向每孔中加入 10 μL CCK-8 溶液孵育 1 h 后，用酶标仪在波长 450 nm 处测定 A 值。实验重复测定 3 次。

1.4.2 流式细胞仪检测 PC12 细胞凋亡：用磷酸盐缓冲液（PBS）洗涤 PC12 细胞 2 次，离心收集各组 PC12 细胞，加入 500 μL 的结合缓冲液（Binding Buffer）悬浮细胞，加入 5 μL 膜联蛋白 V- 异硫氰酸荧光素（Annexin V-FITC）混匀后，加入 5 μL 碘化丙啶（PI），室温避光孵育 15 min，用流式细胞仪检测在激发波长 488 nm、发射波长 530 nm 处的细胞凋亡情况。

1.4.3 Glu 和 GABA 含量测定：将细胞以每孔 Glu 2×10^5 个 /mL 和每孔 GABA 2×10^4 个 /mL 接种于 24 孔板中，每孔 500 μL，在培养箱中孵育 24 h，吸去旧培养基，按照实验分组，加入上述不同干预因素，37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。吸取上清液 200 μL 加入 600 μL 试剂混匀，离心 10 min。采用酶

联免疫吸附试验（ELISA）检测细胞培养液中 GABA 水平，用化学比色法测定 Glu 水平，操作严格按照试剂盒说明书进行。

1.5 统计学方法：采用 SPSS 16.0 软件处理数据，计量数据以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，用方差分析比较多个样本间均数的差异，$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 CCK-8 法检测乌头碱对 PC12 细胞毒性，确定损伤条件（表 1）：用浓度为 0、25、50 和 100 μmol/L 的乌头碱孵育 PC12 细胞 24 h 后显示，乌头碱浓度越大，*A* 值越小，根据乌头碱对 PC12 细胞损伤特点，实验将 100 μmol/L 乌头碱与 PC12 细胞孵育 24 h 作为后续实验干预浓度。

表 1　不同浓度乌头碱对 PC12 细胞活性的影响（$\bar{x}\pm s$）

组别	样本数（孔）	细胞活性（*A* 值）
乌头碱 0 μmol/L 组	10	1.685±0.030
乌头碱 25 μmol/L 组	10	1.331±0.006[a]
乌头碱 50 μmol/L 组	10	1.146±0.020[a]
乌头碱 100 μmol/L 组	10	1.003±0.042[a]

注：与乌头碱 0 μmol/L 组比较，[a]$P<0.05$

2.2 双黄连和黄芩苷对乌头碱暴露后 PC12 细胞的干预作用（表 2）：空白对照组、双黄连对照组、黄芩苷对照组 PC12 细胞活性比较差异均无统计学意义（$P>0.05$），而乌头碱中毒组 PC12 细胞活性则较空白对照组明显降低（$P<0.05$）；与乌头碱中毒组比较，双黄连干预组及黄芩苷干预组 PC12 细胞活性均升高（$P<0.05$）；双黄连干预组 PC12 细胞活性显著高于黄芩苷干预组（$P<0.05$）。

2.3 双黄连及黄芩苷对乌头碱所致 PC12 细胞凋亡的影响（图 1）：各组 PC12 细胞经不同处理后，通过 Annexin V-FITC/PI 双染进行荧光标记，用流式细胞仪区分各组坏死细胞、早期 / 晚期凋亡以及活细胞，在双变量流式细胞仪散点图上，左下象限表示正常活细胞，右下象限表示早期凋亡细胞，右上象限表示坏死细胞。空白对照组有 95.89% 为正常 PC12 细胞，而乌头碱处理可使损伤 PC12 细胞达到 64.27%，其中早期凋亡率达 45.46%；当予以双黄连和黄芩苷干预后早期凋亡率降低至 33.24% 和 28.22%。

2.4 各组 Glu、GABA 含量变化比较（表 2）：与空白对照组比较，乌头碱中毒组 PC12 细胞释放 Glu 和 GABA 含量均显著升高（均 $P<0.05$），而双黄连干预组和黄芩苷干预组 Glu、GABA 含量比较差异均无统计学意义（均 $P>0.05$）；与乌头碱中毒组比较，双黄连干预组和黄芩苷干预组 Glu 含量显著减少，GABA 含量显著增加（均 $P<0.05$）；黄芩苷干预组和双黄连干预组比较差异无统计学意义（均 $P>0.05$）。

表 2　双黄连及黄芩苷对乌头碱暴露后 PC12 细胞活性及 Glu、GABA 含量的影响（$\bar{x}\pm s$）

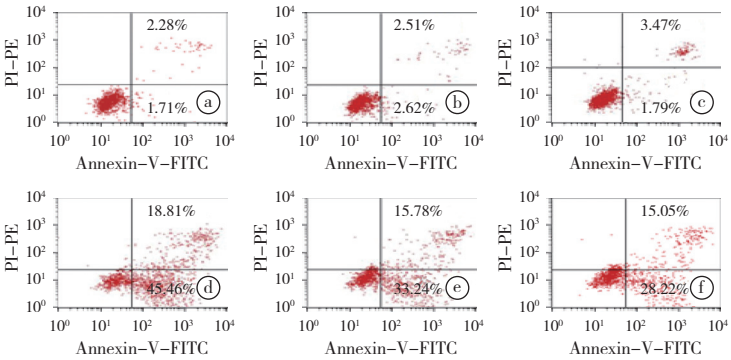
组别	样本数（孔）	细胞活性（*A* 值）	Glu（μmol/L）	GABA（μmol/L）
空白对照组	10	1.722±0.083	3.433±0.138	0.528±0.012
双黄连对照组	10	1.648±0.049	3.442±0.115	0.532±0.019
黄芩苷对照组	10	1.685±0.027	3.417±0.093	0.532±0.013
乌头碱中毒组	10	1.056±0.039[a]	5.295±0.137[a]	0.769±0.020[a]
双黄连干预组	10	1.202±0.059[b]	4.055±0.086[b]	0.809±0.016[b]
黄芩苷干预组	10	1.180±0.032[bc]	3.984±0.057[b]	0.930±0.021[b]

注：与空白对照组比较，[a]$P<0.05$；与乌头碱中毒组比较，[b]$P<0.05$；与双黄连干预组比较，[c]$P<0.05$

3 讨 论

乌头碱类植物的有毒成分为乌头碱，0.2 mg 的口服量即能使人中毒，致死量约 3～5 mg[6]。临床上常因对乌头碱生药的炮制或水煎不当服用而引起中毒。急性乌头碱中毒后因其中毒症状重、病情发展快、顽固性心律失常及难以纠正的低血压休克，临床病死率高[7-8]。

PC12 细胞株来自大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤，其在细胞形态、结构和功能上与神经元具有相似性，且具有易于培养的优点，被广泛用于神经药物开发及神经元损伤机制的研究[9]。乌头碱的治疗窗狭窄、体内代谢快且神经毒性强[10-12]。本结果显示，25 μmol/L 乌头碱中毒 PC12 活性即显著降低，且随



ⓐ：空白对照组；ⓑ：双黄连对照组；ⓒ：黄芩苷对照组；ⓓ：乌头碱中毒组；ⓔ：双黄连干预组；ⓕ：黄芩苷干预组

图 1　各组流式细胞凋亡图

着乌头碱浓度升高 PC12 细胞活性降低，因此我们选择 100 μmol/L 乌头碱诱导的神经元损伤模型。

乌头碱诱导神经元毒性机制仍不明确，目前认为乌头碱可通过激活电压门控 Na^+ 通道诱导突触前神经元去极化和 Ca^{2+} 内流的增加[13]。神经细胞内 Ca^{2+} 水平的升高不仅可引发“钙超载”现象，导致神经细胞损害的发生，还可引起 Glu 及 GABA 等神经递质的异常分泌[14]。Glu 是神经系统内重要的兴奋性递质，广泛参与神经元的生长发育调节等，但细胞内 Glu 浓度过高则使 Glu 从兴奋性神经递质转变为兴奋性神经毒素，兴奋性递质 Glu 的增高可通与 N- 甲基 -D- 天冬氨酸受体相结合等多重机制进一步引起细胞内 Ca^{2+} 浓度的失衡，引发细胞内 Ca^{2+} 浓度升高，继而引起细胞凋亡[15]。本研究结果显示，乌头碱作用于 PC12 细胞 24 h 后，细胞活性显著降低，Glu、GABA 水平明显升高，提示 Glu、GABA 水平失衡在乌头碱所致 PC12 细胞损伤中发挥着重要作用。GABA 水平的增高是神经元膜电位超极化抑制动作电位的传导，减少了兴奋性膜依赖电位的谷氨酸的释放。缺血、缺氧海马脑片 GABA 与 Glu 水平呈显著相关，当 Glu 含量显著升高时，GABA 水平也随之升高，可认为是对低氧引起 Glu 损伤的一种拮抗作用[16]。

双黄连的主要成分黄芩苷，可以和 $GABA_A$ 受体上的 α_2、α_3 亚基结合从而发挥药理学作用，可促使神经元对 Cl^- 的通透性增加，进而使突触后膜超极化，抑制电压依赖性钠通道的开放，使 Na^+ 内流减少，降低神经元的兴奋性氨基酸含量，从而起到神经保护和减轻脑损伤的效应[17-18]。另据研究表明，黄芩苷作用于大鼠神经元，可抑制细胞内 Ca^{2+} 释放和胞外 Ca^{2+} 的内流，对抗兴奋性氨基酸所致的钙浓度升高，从而使神经元免受兴奋性氨基酸的毒性损伤[5]。研究黄芩苷对实验性大鼠脑出血的干预作用时显示，黄芩苷可通过增加抑制性氨基酸 GABA 的含量对抗兴奋性氨基酸对神经元的损伤[19]。此外，黄芩苷对谷氨酸受体激动剂（海人酸）导致的神经毒性有拮抗作用，表明黄芩苷可通过降低 Glu 的神经毒性起抗凋亡的作用[20]。但对于乌头碱所致 PC12 细胞损伤是否存在一定的拮抗作用仍不清楚。本研究结果显示，与乌头碱中毒组比较，双黄连干预组和黄芩苷干预组 Glu 显著降低，GABA 含量水平显著升高，细胞凋亡率降低，提示双黄连以及其主要成分黄芩苷能通过降低 Glu 含量，升高 GABA 含量从而拮抗乌头碱对 PC12 细胞造成的损伤。

综上所述，Glu 和 GABA 失衡可能是导致乌头碱所致 PC12 细胞损伤机制之一。双黄连可能通过其主要成分黄芩苷下调 Glu 含量、提高 GABA，从而发挥拮抗乌头碱所致 PC12 细胞损伤的作用。

参考文献

[1] 符华林. 我国乌头属药用植物的研究概况[J]. 中药材，2004，27（2）：149-152.

[2] Hikino H, Yamada C, Nakamura K, et al. Change of alkaloid composition and acute toxicity of Aconitum roots during processing [J]. Yakugaku Zasshi, 1977, 97（4）：359-366.

[3] 卢中秋，胡国新. 乌头碱急性中毒及诊治研究现状[J]. 中国中西医结合急救杂志，2005，12（2）：119-121.

[4] 肖桂林，刘国栋，刘发益，等. 双黄连注射液治疗乌头碱中毒所致心律失常的临床研究[J]. 中国急救医学，2004，24（2）：140-141.

[5] Srinivas NR. Baicalin, an emerging multi-therapeutic agent: pharmacodynamics, pharmacokinetics, and considerations from drug development perspectives [J]. Xenobiotica, 2010, 40（5）：357-367.

[6] 马利川，韩启定. 急性乌头碱中毒致心脏损害 60 例[J]. 中国危重病急救医学，2010，22（2）：108.

[7] 谢媛，杨亚非，许宗明. 成功救治重度乌头碱中毒的病例分析[J]. 中国危重病急救医学，2012，24（6）：369.

[8] 武明东，都广礼. 乌头碱中毒致室性心律失常 1 例救治体会[J]. 中国危重病急救医学，2012，24（6）：377.

[9] Fang M, Wang J, Han S, et al. Protective effects of ω-conotoxin on amyloid-β-induced damage in PC12 cells [J]. Toxicol Lett, 2011, 206（3）：325-338.

[10] 邱俏檬，刘刚，梁欢，等. 高效液相色谱-质谱法同时检测兔血浆中 3 种草乌成分[J]. 中国中西医结合急救杂志，2009，16（2）：106-108.

[11] 刘刚，邱俏檬，卢中秋，等. 急性草乌中毒兔血浆毒性成分及组织病理学改变的研究[J]. 中国中西医结合急救杂志，2008，15（4）：198-200.

[12] 邱俏檬，刘刚，卢中秋，等. 血液灌流对急性草乌中毒兔血浆毒性成分及组织病理学的影响[J]. 中华急诊医学杂志，2009，18（3）：247-251.

[13] Fu M, Wu M, Qiao Y, et al. Toxicological mechanisms of Aconitum alkaloids [J]. Pharmazie, 2006, 61（9）：735-741.

[14] Yamanaka H, Doi A, Ishibashi H, et al. Aconitine facilitates spontaneous transmitter release at rat ventromedial hypothalamic neurons [J]. Br J Pharmacol, 2002, 135（3）：816-822.

[15] Patil NA, Somashekar HS, Narendranath S, et al. NMDA-Agonists and Antagonists [J]. J Pharm Res, 2012, 5（1）：632-640.

[16] Schousboe A, Madsen KK, White HS. GABA transport inhibitors and seizure protection: the past and future [J]. Future Med Chem, 2011, 3（2）：183-187.

[17] Wang F, Xu Z, Ren L, et al. $GABA_A$ receptor subtype selectivity underlying selective anxiolytic effect of baicalin [J]. Neuropharmacology, 2008, 55（7）：1231-1237.

[18] 王磊，赵光举，李萌芳，等. 急性乌头碱中毒脑损伤机制及黄芩苷的干预作用[J]. 中国中西医结合急救杂志，2014，21（4）：289-293.

[19] 周乾坤，余嗣明，刘平，等. 黄芩苷对脑出血大鼠脑内氨基酸递质含量的影响[J]. 中国中医药信息杂志，2009，16（4）：35-37.

[20] 张喜平，田华，程琪辉. 黄芩苷的药理作用研究现状[J]. 中国药理学通报，2003，19（11）：1212-1215.

（收稿日期：2014-10-08）
（本文编辑：李银平）