· 论著 ·

麝香酮对 SH-SY5Y 神经细胞缺氧/缺糖和再给氧损伤的保护作用

张 壮¹, 闫彦芳², 赵可星¹, 孙塑伦², 王硕仁¹, 朱陵群², 牛福苓¹

(1. 北京中医药大学中医内科学教育部重点实验室, 北京 100700;

2. 北京中医药大学东直门医院中医脑病实验室, 北京 100700)

【摘要】 目的: 研究麝香酮对神经细胞缺氧/缺糖和再给氧损伤的保护作用。方法: 培养 SH-SY5Y 神经细胞。采用含连二亚硫酸钠的无糖 Earle 液模拟造成缺氧/缺糖和再给氧损伤; 用苔盼蓝染色计数法测定细胞死亡率, 用四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法测定细胞存活率, 用 Hoechst 33342 和碘化丙啶(PI)原位双染法荧光显微镜检测细胞坏死率和细胞凋亡率, 用比色法测定乳酸脱氢酶(LDH)漏出率; 并评价药效。结果: 与正常对照组比较, 缺氧/缺糖和再给氧损伤模型组细胞存活率显著下降[(100.0±4.4)%比(25.6±3.7)%], 细胞死亡率[(5.0±2.2)%比(71.2±9.2)%]、坏死率[(2.6±1.2)%比(46.8±10.4)%]、凋亡率[(3.1±0.8)%比(16.0±4.9)%]、LDH 漏出率[(20.1±5.8)%比(66.4±7.6)%]均显著升高(P 均<0.01)。麝香酮各终浓度组的细胞存活率显著提高[(42.7±1.2)%~(47.8±1.7)%], P 均<0.01, 细胞死亡率[(22.7±5.2)%~(36.1±5.9)%]、坏死率[(24.3±8.3)%~(28.9±8.7)%]、凋亡率[(7.8±3.1)%~(10.4±4.9)%]、LDH 漏出率[(37.6±4.1)%~(40.6±2.4)%]均显著下降(P <0.05 或 P <0.01)。结论: 麝香酮对 SH-SY5Y 神经细胞缺氧/缺糖和再给氧损伤具有显著的保护作用, 提示麝香酮可能应用于中风病急性期的治疗。

【关键词】 麝香酮; 神经细胞; 缺氧/缺糖; 凋亡; 细胞培养

中图分类号: Q255; R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1008-9691(2007)06-0340-04

Protective effects of muscone (麝香酮) on the hypoxia/hypoglycemia and reoxygenation induced damage of SH-SY5Y nerve cell cultured in vitro ZHANG Zhuang¹, YAN Yan-fang², ZHAO Ke-xing¹, SUN Su-lun², WANG Shuo-ren¹, ZHU Ling-qun², NIU Fu-ling¹. 1. Key Laboratory of Chinese Internal Medicine, Ministry of Education, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China; 2. Department of Neurology, the Affiliated Dongzhimen Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China

【Abstract】 Objective: To study the protective effects of muscone (麝香酮) on the hypoxia/hypoglycemia and reoxygenation induced damage of cultured nerve cells. **Methods:** The model of hypoxia/hypoglycemia induced damage was set up in vitro by sodium dithionite. The mortality and survival rate were detected by trypan blue stain and 3-(4,5-dimethylthiazolyl) 2,5-diphenyltrazolium bromide (MTT) assay respectively, lactate dehydrogenase (LDH) release was detected by chromometry, necrosis rate and apoptosis rate were observed by double stain of Hoechst 33342 and propidium iodide (PI) with fluorescence microscope. **Results:** Compared with the normal control group, mortality rate [(5.0±2.2)% vs. (71.2±9.2)%], necrosis rate [(2.6±1.2)% vs. (46.8±10.4)%], apoptosis rate [(3.1±0.8)% vs. (16.0±4.9)%], LDH release [(20.1±5.8)% vs. (66.4±7.6)%] in damaged group of the hypoxia/hypoglycemia and reoxygenation increased significantly, while survival rate [(100.0±4.4)% vs. (25.6±3.7)%] decreased significantly (all P <0.01). The mortality rate [(22.7±5.2)%~(36.1±5.9)%], necrosis rate [(24.3±8.3)%~(28.9±8.7)%], apoptosis rate [(7.8±3.1)%~(10.4±4.9)%] and LDH release [(37.6±4.1)%~(40.6±2.4)%] decreased significantly (P <0.05 or P <0.01), while the cell survival rate [(42.7±1.2)%~(47.8±1.7)%] increased significantly (all P <0.01) in the muscone treated groups of different concentrations. **Conclusion:** Muscone can significantly protect the nerve cell against the hypoxia/hypoglycemia and reoxygenation induced damage, and it is suggested that muscone might be applied to the treatment of acute stroke.

【Key words】 muscone; nerve cell; hypoxia/hypoglycemia; apoptosis; cell culture

基金项目: 北京市科技新星计划 A 类项目(2004A36); 中国博士后科学基金资助项目(1999-25)

作者简介: 张 壮(1970-), 男(汉族), 黑龙江人, 医学博士, 博士后, 硕士生导师, 副研究员, 副主任医师(Email: liyuebj@sohu.com)。

传统医学认为麝香是许多名贵急救中成药如安宫牛黄丸、局方至宝丹等发挥药效所不可或缺的主要药味,麝香酮是天然麝香和人工麝香的主要药效成分。以往的研究已证实,麝香对多种低氧、无氧和缺血性脑损伤均有明显保护作用^[1-4],本研究拟观察麝香酮对脑缺血/再灌注所涉及的神经细胞损伤的保护作用,初步揭示麝香对脑缺血/再灌注损伤保护作用的细胞机制,并为其单独应用于中风病急性期的临床治疗提供初步实验依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料:①细胞:人神经母细胞瘤细胞株 SH-SY5Y 由首都医科大学宣武医院药理研究室赠送,本研究各次实验所用细胞为 11~30 代。②药物:麝香酮购自中国药品生物制品检定所(批号:0719-9905),三七总皂苷为北京中医药大学中医内科学教育部重点实验室提取,含量以人参皂苷 Rb1 计为 83.2%。③主要试剂:Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM)培养液为美国 Gibco 公司产品,新生小牛血清为美国 HyClone 公司产品,胎牛血清为美国 HyClone 公司产品,胰酶、L-谷氨酰胺为美国 Sigma 公司产品,青霉素、链霉素为华北制药股份有限公司产品,四甲基偶氮唑盐(MTT)、碘化丙啶(PI)均为美国 Sigma 公司产品,Hoechst 33342 购自美国 Molecular Probe 公司,乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒为北京中生生物工程高技术公司产品(批号:010101);分析纯二甲基亚砜(DMSO)为天津市天河化学试剂厂产品,连二亚硫酸钠、苒盼蓝等其他试剂均为国产分析纯,水为三蒸水。④仪器:日本奥林巴斯 MIT-2 倒置相差显微镜;德国 Heraeus cell 型 CO₂ 培养箱;日本奥林巴斯 BX60 显微镜,配备美国 Diagnostic Spot 2e 显微图像分析系统;GDV 公司 DV 990BV4 型酶标仪。

1.2 实验方 法

1.2.1 SH-SY5Y 神经细胞复苏、传代及种板^[5]:血球计数板计数,调至 1×10^8 /L 浓度,分别接种于 96 孔培养板,每孔 100 μ l;24 孔培养板,每孔 1 ml;6 孔培养板,每孔 3 ml;体积分数为 5%的 CO₂ 培养箱 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后用于实验。

1.2.2 麝香酮实验用水溶液母液的制备:称取麝香酮 100.0 mg,置于 100 ml 容量瓶中,加入优级无水乙醇 3 ml,加三蒸水至刻度,配置成麝香酮浓度 1.0 g/L 及含体积分数为 3%的乙醇水溶液,即成麝香酮实验用水溶液母液,实验时用培养液稀释至乙醇体积分数为 0.094 0%~0.002 3%。

1.2.3 细胞缺氧/缺糖和再给氧损伤制模法:采用氧清除剂连二亚硫酸钠造成缺氧,以含连二亚硫酸钠不同终浓度的无糖 Earle 液制模,MTT 比色法测定细胞存活率,摸索制模所用的连二亚硫酸钠终浓度,最终选定制模损伤较重、较稳定的连二亚硫酸钠终浓度为 1.0 mmol/L。制模实验操作如下:种板培养 24 h 后,各孔弃去培养液,用无糖 Earle 液轻洗 2 次,正常对照孔加入无血清的 DMEM 培养液;模型孔加入含连二亚硫酸钠终浓度为 1.0 mmol/L 的无糖 Earle 液,5% CO₂ 培养箱 37 $^{\circ}$ C 孵育 6 h,取出培养板,吸弃各孔液体,各孔用无糖 Earle 液洗细胞 2 次,换无血清 DMEM 培养液,继续培养 12 h,造成细胞缺氧/缺糖和再给氧损伤模型。

1.2.4 药效实验给药方法与分组:根据药物的细胞毒性实验和药效预实验结果,确定抗神经细胞缺氧/缺糖和再给氧损伤实验所用麝香酮终浓度分别为 1.563 mg/L(高浓度组)、0.781 mg/L(中浓度组)、0.391 mg/L(低浓度组),阳性对照药物三七总皂苷终浓度为 3.125 mg/L。药物于缺氧/缺糖和再给氧处理时加入到含连二亚硫酸钠 1.0 mmol/L 的无糖 Earle 液和含血清 DMEM 培养液中。

1.2.5 细胞形态观察:倒置相差显微镜下观察正常、缺氧/缺糖和再给氧损伤模型以及给药干预后神经细胞形态的变化。

1.2.6 MTT 比色法测定细胞存活率:将 MTT 试剂配制成 5 g/L 的工作液,现用现配,过滤。吸弃各孔液体,加入无血清的 DMEM 培养液 100 μ l,再加入 MTT 工作液 20 μ l,混匀,37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h,用翻板法弃去孔内培养液,每孔加入 100 μ l DMSO,振荡 10 min。在酶标仪 492 nm 波长处测量各孔吸光度(A)值,以不加细胞孔调零,正常对照组 A 值均数为 100%,计算细胞存活率。细胞存活率(%)=各孔 A 值/正常对照组 A 值均数 $\times$ 100%。

1.2.7 苒盼蓝染色计数法测定细胞死亡率:苒盼蓝配制成体积分数为 4%的母液,4 $^{\circ}$ C 保存,使用时稀释成 0.4%工作液。采用 24 孔培养板实验,制模实验后,取出培养板,各孔吸上清液加到对应编号的试管中,细胞层用质量分数为 0.25%的胰酶消化,用新生小牛血清终止反应,每孔加 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)1 ml,pH7.4,收集细胞悬液于对应编号的试管中,以 800 r/min(离心半径 15 cm)离心 5 min,吸弃上清液,留 0.3 ml,轻轻吸吹细胞悬液,取细胞悬液 9 滴移入小试管中,加一滴 0.4%苒盼蓝溶液混匀,在 3 min 内用血球计数板计数蓝染的

死细胞数和拒染的活细胞数共 200 个。细胞死亡率(%)=死细胞数/(活细胞数+死细胞数)×100%。

1.2.8 LDH 漏出率的测定:收集 24 孔培养板上清液于对应编号的试管中,培养板加入无血清 DMEM 培养液 1 ml,分别置于-86℃低温冰箱冷存。测定前取出,孔内细胞反复冻融 2 次,使细胞破裂,混匀,3 000 r/min(离心半径 15 cm)离心 5 min,按照 LDH 试剂盒说明书操作,分光光度计 340 nm 处测定每分钟的平均 A 变化值,计算上清液和相应胞浆中的 LDH 活性。LDH 漏出率(%)=上清液 LDH 活性/(上清液 LDH 活性+胞浆 LDH 活性)×100%。

1.2.9 细胞坏死率和凋亡率的测定:参照文献方法^[6],盖玻片置于 6 孔培养板内,加入 1×10⁸/L 神经细胞悬液 3.0 ml,置 5% CO₂ 培养箱中 37℃ 孵育 24 h,经缺氧/缺糖和再给氧处理后,以 0.01 mol/L PBS(pH7.4)漂洗,用含 10 mg/L Hoechst 33342 蒸馏水溶液和含 50 mg/L PI 的 0.01 mol/L PBS 双染(pH7.4),5%CO₂ 培养箱中 37℃ 孵育 30 min,用蒸馏水和 0.01 mol/L PBS(pH7.4)轻轻漂洗 1 次,10.0 g/L 多聚甲醛固定 10 min,0.01 mol/L PBS(pH7.4)漂洗 1 次,取出盖玻片,封片剂封于载玻片上,用荧光显微镜观察,同时,用图像处理系统计算凋亡细胞的百分率。

1.3 数据处理:应用 SPSS8.0 软件包进行统计学分析,多组间比较采用单因素方差分析,组间比较采用 q 检验,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 麝香酮对 SH-SY5Y 神经细胞缺氧/缺糖和再给氧损伤时细胞存活率、细胞死亡率和 LDH 漏出率的影响(表 1):模型组细胞存活率较正常对照组明显降低,细胞死亡率和 LDH 漏出率明显升高(P 均<0.01);麝香酮各浓度组和三七总皂苷组均能提高细胞存活率,降低细胞死亡率和 LDH 漏出率(P 均<0.01)。

2.2 麝香酮对 SH-SY5Y 神经细胞缺氧/缺糖和再给氧损伤时细胞坏死率、凋亡率的影响(表 2):Hoechst 33342 和 PI 原位双染色法检测时,在荧光显微镜下可以观察到正常细胞发蓝色荧光,染色质均匀分布;凋亡细胞也发蓝色荧光,但染色质凝集,核皱缩、碎裂,细胞皱缩出芽,凋亡小体产生;坏死细胞发红色荧光。正常对照组只可见极少量的坏死细胞和凋亡细胞;模型组可见大量的坏死细胞及凋亡细胞(P 均<0.01);麝香酮各浓度组和三七总皂苷组均能显著降低细胞坏死率和凋亡率(P<0.05 或

P<0.01)。

表 1 麝香酮对神经细胞缺氧/缺糖和再给氧损伤细胞存活率、死亡率和 LDH 漏出率的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 1 Effect of muscone on the nerve cell survival rate, mortality rate and LDH release induced by hypoxia/hypoglycemia and reoxygenation($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	细胞存活率(%)	细胞死亡率(%)	LDH 漏出率(%)
正常对照组	100.0±4.4	5.0±2.2	20.1±5.8
模型组	25.6±3.7*	71.2±9.2*	66.4±7.6*
三七总皂苷组	45.6±4.7 [△]	25.6±6.7 [△]	46.8±3.7 [△]
麝香酮 1.563 mg/L 组	42.5±2.1 [△]	35.0±5.4 [△]	37.6±4.1 [△]
麝香酮 0.781 mg/L 组	47.8±1.7 [△]	36.1±5.9 [△]	39.4±4.2 [△]
麝香酮 0.391 mg/L 组	42.7±1.2 [△]	22.7±5.2 [△]	40.6±2.4 [△]

注:与正常对照组比较:*P<0.01;与模型组比较:[△]P<0.01

表 2 麝香酮对神经细胞缺氧/缺糖和再给氧损伤细胞坏死率、凋亡率的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 2 Effect of muscone on the nerve cell necrosis rate and apoptosis rate induced by hypoxia/hypoglycemia and reoxygenation($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	细胞坏死率(%)	细胞凋亡率(%)
正常对照组	2.6±1.2	3.1±0.8
模型组	46.8±10.4*	16.0±4.9*
三七总皂苷组	22.6±7.3 [△]	8.1±3.4 [#]
麝香酮 1.563 mg/L 组	24.3±8.3 [△]	8.6±3.8 [#]
麝香酮 0.781 mg/L 组	26.4±5.8 [△]	7.8±3.1 [#]
麝香酮 0.391 mg/L 组	28.9±8.7 [△]	10.4±4.9

注:与正常对照组比较:*P<0.01;与模型组比较:[#]P<0.05,[△]P<0.01

3 讨论

中风病急性期的脑损害主要为单纯缺血损伤和缺血/再灌注损伤,保护由缺血和缺血/再灌注所造成的神经元损伤,延长细胞存活,促进修复,是降低中风病病死率和致残率的关键。中风病急性期的积极治疗主要为干预神经元的死亡(坏死和凋亡)。

麝香的功效有开窍醒神、活血通经、消肿止痛,为中医脑病的常用重要急救中药,现已能人工合成,麝香酮是天然麝香和人工麝香的主要药效成分。麝香对多种低氧、无氧和缺血性脑损伤均有明显的保护作用,其作用可能与改善脑血流有关^[1,7]。另有动物实验文献报道,麝香无明显的中枢兴奋或抑制作用,天然麝香具有显著增强中枢神经系统耐缺氧能力的作用,而麝香酮不具有此作用,故认为麝香抗中枢缺氧作用的效应成分可能为其他组分^[2]。但人工麝香研制组报道人工麝香(主要药效成分为麝香酮)与天然麝香在缺血、冰冻和缺氧所致脑水肿的保护作用,以及抗惊厥、改善脑膜急性微循环障碍等方面药效接近^[3-4,8]。故有必要研究确定麝香酮的脑保护

作用,并应首先确定麝香酮对神经细胞是否有直接的保护作用;有文献报道麝香对正常原代培养大鼠大脑神经细胞的生长分化有双向作用,第一周有促进作用,第二周以后出现抑制作用^[9]。本实验结果表明,人工麝香的主要药效成分麝香酮对神经细胞缺氧/缺糖和再给氧损伤具有显著的保护作用,提示麝香的脑保护作用与麝香酮对神经细胞的直接保护作用有关,人工麝香可能是一种极有发展前途的脑保护药物。

参考文献:

- [1]李仪奎,胡月娟,徐军,等.麝香对中枢耐缺氧能力的影响[J].中草药,1985,16(3):19-21.
[2]李保英.麝香对小鼠脑损伤的影响[J].国外医学·中医中药分册,1996,18(5):33.

- [3]朱秀媛,高益民,李世芬.人工麝香的研制[J].中成药,1996,18(7):38-41.
[4]朱秀媛.麝香的药理研究[J].中国药理学会通讯,1997,14(1):9.
[5]司徒镇强,吴军正.细胞培养[M].西安:世界图书出版公司,1996:73-84.
[6]Fang M, Zhang H Q, Xue S B, et al. Apoptosis resistance and its reversal in harringtonine resistant cell line[J]. Acta Pharm Sin, 1994, 29(12):891-898.
[7]陈燕启,刘德红,杨光田.葛根素在大鼠全脑缺血/再灌注时对核因子- κ B 表达的影响[J].中国中西医结合急救杂志,2004,11(1):21-24.
[8]李建生,任小巧,刘轲,等.老龄大鼠脑缺血/再灌注神经细胞凋亡变化规律研究[J].中国危重病急救医学,2004,16(3):151-154.
[9]姜秋颖,张萱,张朝颖,等.麝香对体外培养大鼠大脑神经细胞的影响[J].哈尔滨医科大学学报,1998,32(1):247-249.

(收稿日期:2007-01-12 修回日期:2007-07-16)

(本文编辑:李银平)

• 经验交流 •

中西医结合治疗尿路结石疗效观察

张芳兰

(山西省稷山县中医院,山西 稷山 043200)

【关键词】 尿路结石;中药排石饮;中西医结合疗法

中图分类号:R242 文献标识码:B 文章编号:1008-9691(2007)06-0343-01

1990年2月—2007年3月,采用中西医结合方法治疗尿路结石86例,取得了满意疗效,报告如下。

1 临床资料

1.1 一般资料:86例患者中男62例,女24例;年龄21~67岁,平均(40±5)岁,发病时间0.5h~1年,临床表现为腰痛、腰酸、下腹部疼痛及尿痛、血尿等症状。均经B超和腹部X线片确诊,其中肾结石26例,输尿管结石55例,膀胱结石5例;合并肾积水56例;结石最大1.6cm×0.6cm。

1.2 治疗方法

1.2.1 肾绞痛:轻度用阿托品或平痛新肌肉注射(肌注),重度用阿托品加杜冷丁肌注。

1.2.2 尿路结石:生理盐水200ml+青霉素 4×10^6 U,每日2次静脉滴注(静滴),过敏者选用左氧氟沙星等;质量分数为10%的葡萄糖500ml+25%硫酸镁10ml+10%氯化钾10ml;维生素K3 20mg入壶,并给速尿20mg静脉注射

作者简介:张芳兰(1964-),女(汉族),山西省人,主治医师。

(静注);黄体酮20mg,每日1次肌注。液体量开始2000~2500ml,随着疼痛减轻或缓解可减量或停用,继续口服中药。每日饮水或饮磁化水至少1500~3000ml,并适当进行跳跃或跑步运动。自拟排石饮:金钱草60g,海金沙30g,鸡内金15g,车前子15g,泽泻15g,石韦15g,冬葵子15g,瞿麦15g,滑石12g,丹参30g,桃仁10g,红花10g,川牛膝15g,枳壳10g,木通6g,大黄10g,甘草10g。每日1剂,水煎服取汁500ml,分两次早晚分服,半个月为1个疗程。随证加减:气虚者加黄芪、太子参;肾虚者加山芋肉、兔丝子;肾绞痛明显者加白芍、地龙、元胡、蜈蚣;尿中带血者加生地、藕节、白茅根、大小蓟;结石大者加穿山甲、皂角刺。

1.3 疗效判定标准:①痊愈:症状全部消失,B超或X线检查结石消失。②好转:症状消失或减轻,B超或X线检查结石部分排出,或缩小,或位置下移。③无效:症状无改善,B超或X线检查结石无变化。

1.4 治疗结果:经过1~2个疗程,治愈

62例,好转21例,无效3例,总有效率为96.4%;结石排出时间3~32d,平均(12±7)d。

2 讨论

尿路结石好发于青壮年,男性多于女性,是引起肾绞痛的常见原因之一。采用西药止痛效果迅速,常给予阿托品加杜冷丁肌注,并给予硫酸镁、黄体酮、维生素K3缓解平滑肌、松持输尿管,有利于排石。祖国医学认为石淋的发病是由于肾虚,膀胱气化失调,湿热蕴结下焦,尿液煎熬,形成沙石所致。自拟排石饮以金钱草、海金沙、滑石、石韦、瞿麦、木通、车前子清热利湿、利尿通淋;丹参、桃仁、红花、川牛膝、大黄活血化瘀;鸡内金化石;枳壳行气导滞;泽泻加强利水渗湿作用。诸药合用共奏利水通淋、清热利湿、活血化瘀、行气导滞之功效。临床治疗结果表明本方法对小于1cm的结石排石效果良好,较大结石可进行碎石或外科手术治疗。此方法疗程短、费用低、不良反应少、安全有效,值得推广。

(收稿日期:2007-07-14)

(本文编辑:李银平)