

尼莫地平含药脑脊液对体外 PC12 细胞损伤的保护作用

张启春^a, 寇俊萍^{a*}, 朱丹妮^a, 严永清^a, 王秋娟^b (中国药科大学, a. 中药复方研究室; b. 生理教研室, 南京 210009)

摘要: 目的 观察尼莫地平含药脑脊液对多种 PC12 细胞损伤模型的保护作用, 对脑脊液药理实验条件的规范化及其应用进行探讨。方法 采用噻唑蓝 (MTT) 法, 观察不同取样时间、不同添加量、不同灭活方法处理的尼莫地平大鼠含药脑脊液对氯化钾损伤的 PC12 细胞存活力的影响, 确定尼莫地平大鼠含药脑脊液的制备条件。并进一步考察该条件制备的尼莫地平大鼠含药脑脊液对过氧化氢、连二亚硫酸钠及谷氨酸钠等因素引起的 PC12 细胞损伤的保护作用。结果 尼莫地平含药脑脊液对氯化钾致 PC12 细胞损伤的保护率随添加量的增加而提高; 相同添加量多次给药 (2 次·d⁻¹ × 3.5 d) 含药脑脊液的保护率均高于单次给药的含药脑脊液; 热灭活、乙醇灭活及丙酮灭活含药脑脊液对 PC12 细胞均有显著保护作用, 其保护率与未灭活含药脑脊液无显著性差异; 根据确定条件制备的尼莫地平大鼠含药脑脊液对过氧化氢、连二亚硫酸钠及谷氨酸钠等因素损伤的 PC12 细胞均具有显著的保护作用。结论 尼莫地平含药脑脊液的制备以连续多次给药方案, 无需灭活处理, 体外添加终体积的 10% 为宜; 对氯化钾等多种原因引起的 PC12 细胞损伤均具有明显保护作用。

关键词: 脑脊液药理; 尼莫地平; 条件规范化; 神经保护

中图分类号: R965.2; R972.4

文献标识码: A

文章编号: 1007-7693 (2009) 05-0345-04

Neuroprotective Effect of Cerebrospinal Fluid of Nimodipine on Various PC12 Cell Injuries *in Vitro*

ZHANG Qichun^a, KOU Junping^{a*}, ZHU Danni^a, YAN Yongqing^a, WANG Qiujuan^b (China Pharmaceutical University, a. Department of Complex Prescription of TCM; b. Department of Physiology, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the standard conditions and application of the cerebrospinal fluid (CSF) pharmacological method, by investigating the neuroprotective effect of CSF with nimodipine on PC12 cells injured by various factors. **METHODS** The effect of rat CSF with nimodipine on injured PC12 cells induced by potassium chloride (KCl) was observed by 3-(4,5-dimethyl-2-thiazol)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay under various experimental conditions (dosage regiment, addition level and treatment process), then its neuroprotective effect under certain conditions on PC12 cells injured by hydrogen peroxide (H₂O₂), sodium dithionite (Na₂S₂O₄) and L-glutamate sodium were determined as well. **RESULTS** The viability of PC12 cells injured by KCl increased with the addition level of CSF with nimodipine, and at the same addition level, CSF of rat administrating nimodipine repetitiously (twice ·d⁻¹ × 3.5d) exerted higher protective efficacy on PC12 cells than that of single administration. The raw CSF with nimodipine and the CSF with nimodipine treated by heat (56 °C), ethanol or acetone had notable protective effects on injured PC12 cells (*P* < 0.01), and there was no obvious statistical difference among them. The similar distinct protective effects of CSF with nimodipine under certain conditions on PC12 cells injured by H₂O₂, Na₂S₂O₄ and L-glutamate sodium were also observed. **CONCLUSION** It is proposed that the CSF with nimodipine having significant protective effects on PC12 cells injuries caused by multi-factors such as KCl, Na₂S₂O₄ and H₂O₂ etc may be prepared by 10% rat CSF without treating after administrating drugs repetitiously.

KEY WORDS: cerebrospinal fluid pharmacology; nimodipine; method standardization; neuroprotective effect

近年来以含药脑脊液评价药物效应的实验方法已逐渐被研究者所应用^[1-5]。作用于中枢的药物研究, 尤其是中药复方, 含药脑脊液可排除药物及血液中的干扰成分, 真正体现有效成分、活性代谢物及药物作用所产生的活性物质的药理效应。但作为新方法, 其实验条件尚需进一步完善。本课题组前期以防治血管性痴呆的当归芍药散精简方 FBD 为

研究对象, 初步探讨了含药脑脊液制备的规范化条件^[6], 该条件是否可作为一种通用方案亦适用于其他实验对象呢? 尼莫地平是二氢吡啶类钙通道阻滞剂, 在临床上广泛用于治疗心脑血管疾病, 对于血管性痴呆也有很好的疗效, 其脂溶性高, 可直接通过血脑屏障^[7-8]。因此, 本研究拟在前期实验基础上, 继续考察不同实验条件制备的尼莫地平含药脑

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30271604)

作者简介: 张启春, 男, 硕士, 助理研究员 Tel: (025)86798398
员, 硕士生导师 Tel: (025) 85391042 E-mail: junpinkou@163.com

E-mail: zsg761128@163.com *通信作者: 寇俊萍, 博士, 副研究

脊液对氯化钾等多因素致损伤 PC12 细胞的保护作用,以期进一步验证含药脑脊液制备的规范化条件,为脑脊液药理实验方法的广泛应用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

尼莫地平,购于山东新华制药有限公司,批号:030124;氯化钾、过氧化氢,购自南京化学试剂一厂;谷氨酸钠,购自江苏生兴生物工程有限公司;高糖 DMEM 培养基,购自 Gibco 公司;小牛血清(NCS),购自杭州四季青生物工程公司;多聚赖氨酸 (Poly-L-Lys)、MTT [溴化-(4,5-二甲基-2-噻唑基)-2, 5-二苯基四氮唑],购自 Sigma 公司。

1.2 动物

雄性清洁级 SD 大鼠,体重 (250 ± 20) g,购于南京医科大学实验动物中心,合格证号:(苏)SCXK 2001-0015。

1.3 细胞

PC12 细胞株(大鼠肾上腺嗜铬肿瘤细胞株),中国科学院上海生物化学与细胞研究所提供,以高糖 DMEM 培养液,内含 10%小牛血清,100 u·L⁻¹青霉素,100 mg·L⁻¹链霉素, pH7.2 培养。

1.4 给药方案与脑脊液的制备及灭活处理

大鼠单次和多次灌胃给予尼莫地平 5 mg·kg⁻¹(2 次·d⁻¹×3.5 d)后,参照文献^[6,9] 制备和处理脑脊液。

1.5 氯化钾等多因素致 PC12 细胞损伤模型

1.5.1 氯化钾损伤模型 将复苏的 PC12 细胞接种于 25 cm² 培养瓶,培养液为含 10%小牛血清的 DMEM,待 37℃、5%CO₂ 饱和湿度下长成单层后,加入 0.25%胰蛋白酶于 37℃消化,接种于多聚赖氨酸包备的 96 孔培养板,细胞密度为 1×10⁵·mL⁻¹, 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。用 PBS 洗涤 PC12

细胞 2 次 (100 μL·孔⁻¹)。加入含 524 mmol·L⁻¹ KCl 的无血清 DMEM 培养基 100 μL·孔⁻¹,正常对照组加入不含 KCl 的无血清 DMEM 培养基, 37℃、5%CO₂ 培养箱中作用 15 min,期间加入相应浓度的脑脊液,随后参照文献^[10],采用 MTT 法测定 OD₅₇₀ 值,以正常组 OD₅₇₀ 平均值为 100%,计算各组细胞活力,并参照公式计算保护率=(给药组细胞活力-空白组细胞活力)/(正常组细胞活力-模型组细胞活力)×100%。

1.5.2 过氧化氢损伤模型 操作大致同“1.5.1”项下方法,以每孔加入终浓度 200 μmol·L⁻¹的 H₂O₂, 37℃, 5%CO₂ 培养箱作用 3 h 进行损伤处理。

1.5.3 连二亚硫酸钠损伤模型 操作大致同“1.5.1”项下方法,以每孔加入终浓度 8 mmol·L⁻¹的连二亚硫酸钠, 37℃, 5% CO₂ 培养箱作用 4 h 进行损伤处理。

1.5.4 谷氨酸损伤模型 操作大致同“1.5.1”项下方法,以每孔加入终浓度 20 mmol·L⁻¹的谷氨酸, 37℃, 5%CO₂ 培养箱作用 4 h 进行损伤处理。

1.6 数据处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS 软件进行 *t* 检验,并进行单因素方差分析(ANOVA)。

2 结果

2.1 不同取样时间尼莫地平含药脑脊液对 KCl 致 PC12 损伤的影响

多次给予尼莫地平后 0.5, 1, 1.5, 2 h 的大鼠含药脑脊液,均可明显升高 KCl 损伤的 PC12 活力 (*P*<0.01, 见表 1);多次给药后各时间点含药脑脊液的保护率均高于单次给药后相应各时间点含药脑脊液的保护率,同时亦可观察到,多次给药后 1.0 h 的大鼠含药脑脊液对此高钙模型的保护率最高。

表 1 不同取样时间尼莫地平含药脑脊液对 KCl 致 PC12 损伤的影响(*n*=8, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effects of rat CSF samples of different time points from 0.5 h to 2.0 h after single or multiple oral administration of nimodipine on viability of PC12 cells injured by KCl(*n*=8, $\bar{x} \pm s$)

组 别	单次给药		多次给药	
	细胞活力/%	保护率/%	细胞活力/%	保护率/%
正常对照	100.0±5.6		100.0±10.8	
模型对照	41.8±7.2 ¹⁾		48.0±5.5 ¹⁾	
空白脑脊液	49.7±5.8		52.5±4.6	
给药 0.5 h 尼莫地平含药脑脊液	54.6±8.6	8.44	70.4±4.5 ²⁾	34.41
给药 1.0 h 尼莫地平含药脑脊液	56.7±10.1	12.08	76.4±9.3 ²⁾	45.85
给药 1.5 h 尼莫地平含药脑脊液	58.3±6.4	14.72	72.3±4.5 ²⁾	38.00
给药 2.0 h 尼莫地平含药脑脊液	55.6±4.5	10.19	63.7±3.5 ²⁾	21.40

注:与正常组比较,¹⁾*P*<0.01;与空白脑脊液组比较,²⁾*P*<0.01

Note:Compared with normal group,¹⁾*P*<0.01;Compared with blank CSF group,²⁾*P*<0.01

2.2 不同浓度的尼莫地平含药脑脊液对 KCl 致 PC12 损伤的影响

单次或多次给予尼莫地平后的各浓度大鼠含药脑脊液对 PC12 细胞损伤,均有不同程度的保护作用,经统计,其中 20% 添加量单次给药的含药脑脊

液组的细胞活力与相应空白脑脊液模型组比较,有显著差异($P<0.05$); 10%、15% 及 20% 添加量的尼莫地平大鼠含药脑脊液组的细胞活力与相应空白脑脊液模型组比较,均有非常显著差异($P<0.01$, 见表 2)。

表 2 不同浓度尼莫地平含药脑脊液对 KCl 致 PC12 损伤的影响($n=8, \bar{x} \pm s$)

Tab 2 Effect of various concentration of rat CSF sample of 1 h after single or multiple oral administration of nimodipine on viability of PC12 cell injured by KCl($n=8, \bar{x} \pm s$)

组 别	单次给药		多次给药	
	细胞活力/%	保护率/%	细胞活力/%	保护率/%
正常对照	100.0±11.7		100.0±7.2	
模型对照	48.4±5.2 ¹⁾		51.1±7.1 ¹⁾	
5%空白脑脊液	48.7±9.4		52.7±4.4	
5%尼莫地平含药脑脊液	54.7±5.7	11.63	57.8±6.8	10.49
10%空白脑脊液	51.4±7.0		53.7±4.7	
10%尼莫地平含药脑脊液	59.8±11.6	16.28	71.8±4.3 ³⁾	37.08
15%空白脑脊液	51.9±11.2		52.6±3.1	
15%尼莫地平含药脑脊液	61.6±13.7	18.80	78.9±4.9 ³⁾	53.66
20%空白脑脊液	51.4±9.4		53.3±5.0	
20%尼莫地平含药脑脊液	63.2±7.3 ²⁾	22.87	84.1±3.3 ³⁾	62.99

注:与正常组比较,¹⁾ $P<0.01$;与相应空白脑脊液组比较,²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$
Note:Compared with normal group,¹⁾ $P<0.01$;Compared with blank CSF group,²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$

2.3 不同方法处理的尼莫地平含药脑脊液对 KCl 致 PC12 损伤的影响

未灭活、热灭活、乙醇灭活及丙酮灭活处理的多次给予尼莫地平后 1 h 大鼠含药脑脊液(10%),均可明显升高 KCl 损伤的 PC12 活力($P<0.01$, 见表 3)。对未灭活和各处理组的大鼠含药脑脊液对氯化钾所造成的 PC12 细胞的高钙损伤模型保护率进行单因素方差分析,可得 $P=0.968\ 5(>0.05)$,说明不同方法处理的样品之间,对该模型细胞的保护作用不存在显著性差异。

2.4 尼莫地平含药脑脊液对过氧化氢、连二亚硫酸钠及谷氨酸钠致 PC12 细胞损伤的影响

多次给药后 1 h 大鼠含药脑脊液(10%)对 PC12 细胞过氧化氢、连二亚硫酸钠及谷氨酸钠损伤模型均有显著的保护作用($P<0.01$, 见表 4)。表明该制备

脑脊液的实验条件同样适用于此 3 种因素所致的细胞损伤模型。

表 3 不同方法处理的尼莫地平含药脑脊液对 KCl 致 PC12 损伤的影响 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

Tab 3 Effects of rat CSF samples of nimodipine 1 h after multiple oral administration with various treatment on viability of PC12 cell injured by KCl($n=8, \bar{x} \pm s$)

组 别	细胞活力/%	保护率/%
正常对照	100.0±7.2	
模型对照	51.1±7.1 ¹⁾	
空白脑脊液	53.7±4.7	
未灭活尼莫地平含药脑脊液	69.9±3.6 ²⁾	33.06
56℃灭活处理尼莫地平含药脑脊液	69.7±4.8 ²⁾	32.60
乙醇灭活处理尼莫地平含药脑脊液	70.0±2.9 ²⁾	33.23
丙酮灭活处理尼莫地平含药脑脊液	69.4±6.3 ²⁾	31.97

注:与正常组比较,¹⁾ $P<0.01$;与空白脑脊液组比较,²⁾ $P<0.01$
Note:Compared with normal group,¹⁾ $P<0.01$;Compared with blank CSF group,²⁾ $P<0.01$

表 4 尼莫地平含药脑脊液对过氧化氢、连二亚硫酸钠及谷氨酸钠致 PC12 损伤的影响($n=8, \bar{x} \pm s$)

Tab 4 Effect of rat CSF sample of 1.0 h after multiple oral administration of nimodipine on viability of PC12 cell injured by H₂O₂, Na₂S₂O₄ and L-glutamate Sodium($n=8, \bar{x} \pm s$)

组 别	过氧化氢损伤		连二亚硫酸钠损伤		谷氨酸钠损伤	
	细胞活力/%	保护率/%	细胞活力/%	保护率/%	细胞活力/%	保护率/%
正常对照	100.0±7.9		100.0±5.9		100.0±8.6	
模型对照	34.9±4.0 ¹⁾		64.7±10.8 ¹⁾		60.7±9.7 ¹⁾	
空白脑脊液	32.5±3.0		69.6±10.6		66.7±12.9	
尼莫地平含药脑脊液	58.6±7.5 ²⁾	40.11	85.9±9.5 ²⁾	46.07	86.0±14.4 ²⁾	49.00

注:与正常组比较,¹⁾ $P<0.01$;与空白脑脊液组比较,²⁾ $P<0.01$
Note:Compared with normal group,¹⁾ $P<0.01$;Compared with blank CSF group,²⁾ $P<0.01$

3 讨论

笔者在前期研究基础上,借鉴中药血清药理学实验方法的研究^[11-12],观察了不同实验条件下尼莫地平含药脑脊液的神经保护作用,以期继续为规范化含药脑脊液制备条件,探讨脑脊液药理学实验方法的应用提供进一步参考依据。

对比研究单次与连续多次给予尼莫地平含药脑脊液对氯化钾诱导 PC12 细胞损伤的影响,结果发现,多次给药的含药脑脊液比单次给药更能够体现药物的作用,可能与多次给药可增加脑脊液中有效成分的含量有关。此与血清药理学的通用采血方案的给药方案较为一致^[11]。建议含药脑脊液的制备,采用多次给药方案为宜。

关于样品添加量,5%、10%、15%、20%浓度的尼莫地平含药脑脊液对 PC12 细胞氯化钾损伤模型的保护率,存在一定的浓度依赖性。多次给药 10%、15%、20%浓度的尼莫地平含药脑脊液均有显著的细胞保护作用,未观察到上述浓度的含药脑脊液及空白脑脊液对 PC12 细胞有抑制作用,而有研究发现含药血清对星形胶质神经细胞的生长有抑制作用^[13],此可能与血清中含有大量复杂的成分有关。考虑到实际应用,建议体外药理实验,采用终体积 10%的添加量为宜。

对于脑脊液的灭活处理,笔者发现未经灭活的尼莫地平含药脑脊液与几种灭活处理的含药脑脊液对 PC12 氯化钾损伤模型均呈保护作用,组间无统计学上的显著差异,可能是因为脑脊液中成分简单,蛋白质含量低,其中蛋白质不足以对细胞活性产生影响,而血清中成分可影响血清药理学的实验结果^[12],提示含药血清多经灭活处理,含药脑脊液则无需灭活处理。

笔者还观察到此条件下制备的尼莫地平含药脑脊液对过氧化氢、连二亚硫酸钠及谷氨酸等因素所致的 PC12 细胞损伤模型亦存在显著的保护作用,进一步验证了根据氯化钾损伤模型所确定的尼莫地平含药脑脊液制备条件的可靠性,也验证了前期实验结果^[9]。

综上所述,采用连续多次给药方案,无需灭活处理,添加终体积的 10%的尼莫地平含药脑脊液对氯化钾等多种因素致 PC12 细胞损伤均具有明显保护作用,为脑脊液药理学实验方法的含药脑脊液制备的通用方案及应用提供了一定参考依据。相信结合现

代的分析技术及分子生物学手段,脑脊液药理学实验方法将不断完善与发展,并在探讨神经系统药物药理效应、作用特点与机制方面得到更广泛应用。

REFERENCES

- [1] MEI J X, ZHANG B L. A Preliminary Attempt to Develop the New "Cerebrospinal Fluid Pharmacology of Chinese Materia Medica on Neurotrophic Effects of Astrocytes[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2000, 31 (7): 523- 526.
- [2] TENG H, GAO D Y, ZHU X F. Effects of the ischemic cerebrospinal fluid on survival and differentiation of hippocampal neural stem cells in rats[J]. Heilongjiang Med Pharm(黑龙江医药科学), 2003, 26(5): 10 - 12.
- [3] XIE N, ZOU C P, NIU Y C, et al. Effect of decoction of rehmanniae on the expression of apoptosis of hippocampal neurons model of alzheimer disease [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2004, 10(4): 29 - 32.
- [4] GUO J W, HE Y C, CHEN S H, et al. The protection effect of beagle dog cerebrospinal fluid on the neuron [J]. Chin J Integr Med Cardio-/Cerebrovasc Dis(中西医结合心脑血管病杂志), 2005, 3(10): 884 - 886.
- [5] ZHANG Q C, WANG Q J, KOU J P, et al. Protective effect of cerebrospinal fluids containing optimized dan gui shao yao san(FBD) on injured PC12 cells[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2005, 11(5): 55 - 58.
- [6] VAN DEN BERG MP, ROMEIJN S G, VERHOEF J C. Serial cerebrospinal fluid sampling in a rat model to study drug uptake from the nasal cavity [J]. J Neurosci Methods, 2002, 116(1): 99 - 107.
- [7] XU Y, ZHANG J J, YANG S Q. The influence of nimodipine on cognitive impairment after TIA [J]. J Clin Med(临床内科杂志), 2007, 24(5): 331-332.
- [8] HE L C, WANG S C. Studies on differences of pharmacokinetic behavior and tissue distribution of nimodipine and its two enantiomers in rats using achiral and chiral liquid chromatography [J]. Acta Pharm Sin(药学报), 2003, 38(8): 603-608.
- [9] ZHANG Q C, KOU J P, ZHUN D N, et al. Preliminary studies on the standardization of cerebrospinal fluid pharmacological experimental methods [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2007, 13(8): 10-13.
- [10] YANG L Q, WU J J, WANG J D, et al. Effect of Pergolide and L-dopa on PC12 Cells Induced by MPP⁺ [J]. Chin J Clin Neurosci(中国临床神经科学), 2006, 14(5): 464-474.
- [11] LI Y K, WU J Y. The discussion of "ordinary method" of obtaining serum in serum pharmacology method. [J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 1999, 15(6): 569-570.
- [12] ZOU C P, XIE N, SONG C Z, et al. Study on influence of decoction of rehmanniae on releasing of LDH and live activity of cell on cultured hippocampal neurons injury [J]. J Harbin Univ Commerce(Nat Sci)(哈尔滨商业大学学报 自然科学版), 2004, 20(1): 1-3.
- [13] MEI J X, ZHANG B L. A Chinese herbal compound induces neurotrophin in astrocyte by a new study method called "Cerebrospinal fluid pharmacology in Chinese materia medica" [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2000, 23(8): 467- 469.

收稿日期: 2008-04-30