

# 水蛭提取物对大鼠大脑皮层神经细胞毒性的实验研究

刘丹 林明宝 张进

(江西省中医药研究院 南昌 330077)

关键词:水蛭提取物;神经细胞;细胞毒性

中图分类号:R 965.3

文献标识码:B

文献编号: 1671-4040(2007)06-0090-01

水蛭为我国传统中药,始载于《神农本草经》,其味咸、苦,性平,有毒,归肝经,具有破血逐瘀、通经消癥之功效<sup>[1]</sup>。作者采用水蛭提取物对体外培养大鼠大脑皮层神经细胞的细胞毒性进行了研究,现将结果报道如下:

## 1 实验材料

1.1 实验动物及试剂 出生 24h 内的 SD 大鼠,清洁级,购自江西省动物中心。DMEM 培养基:GIBCOBRL 产品(批号:1024265,货号:12100-038)。B<sub>27</sub> Supplement: GIBCOBRL 产品(批号:1153623)。Neurobasal Medium: Gibcobl 产品(批号 1027887,货号:21103-049)。小牛血清:杭州四季青生物工程材料有限公司(批号:060209)。胰蛋白酶:Sigma 产品(批号:4977,效价为 1:250)。Hoechst 33342 荧光染料:Sigma 产品(批号:021206,货号:A9918)。

1.2 实验仪器 超净台:SW-CJ-IF 型,苏州净化设备厂;二氧化碳培养箱:3164 型,美国 Forma scientific 公司;倒置显微镜:808434 型,日本 Nikon 公司。

1.3 实验药物 水蛭提取物:取水蛭药材 50 g,10 倍量水煎煮提取 2 次,1h/次,合并提取液,滤过,浓缩至约 100mL,加入乙醇配制成含乙醇浓度为 50%的药液,常温静置 24h 后,取上清液浓缩至 500 mg/mL,用饱和 NaOH 调节 pH 值至 7.2~7.4,离心,上清液过 0.45μm 微孔滤膜除菌,滤液作为贮备液,置冰箱保存备用(所用药物浓度均以生药量计算)。

## 2 方法

2.1 新生大鼠大脑皮层神经细胞原代培养 参照文献<sup>[2]</sup>,将出生 24h 内的 SD 大鼠用眼科剪取出全脑,并在放大镜下剪取出大脑皮质,将其剪成 1~2 mm<sup>3</sup> 的小块,37℃消化 25min,然后用含 10%小牛血清 DMEM 终止反应,用培养基洗两次,然后加完全培养基轻轻吹打,并静置 5min 吸取上清的细胞悬液。吸取细胞悬液过 70 μm 尼龙网筛,用血球计数板计数细胞,以 5×10<sup>5</sup>/mL 密度接种在涂布有多聚赖氨酸的 96 孔、24 孔培养板,每孔分别加入 0.1 或 0.3mL,培养板置 37℃,5%CO<sub>2</sub>,饱和湿度的培养箱中培养 4 h 后,吸去 10%小牛血清培养基,加入 2%B<sub>27</sub> Neurobasal 培养液继续培养,3d 后半量换液。

2.2 Trypan blue 染色细胞直接计数法 Trypan blue(台盼

兰)是一种具有阳离子特性的染料,活细胞拒染,死细胞被染成蓝色。神经细胞培养 4d 后,每组(设 4 个复孔)加入水蛭提取物使终浓度分别为 50、35、25、20、15、10、5、2.5、1mg/mL,再继续培养 48h 后,以 1:9 的比例加入 0.4%台盼兰使其终浓度为 0.04%,染色 1min 后将长有神经细胞的盖玻片反盖在载玻片上,5min 之内在光学显微镜下计数死细胞及活细胞数。随机计数 200 个细胞,计算死亡率(%)=[1-活细胞数/(活细胞数+死细胞数)]×100%。

## 3 结果

实验结果显示,水蛭提取物在 1~10mg/mL 浓度范围内与正常对照组相比 P>0.05,而当水蛭提取物浓度达到 15~50mg/mL 时毒性作用表现出来,与正常对照组比较 P<0.05 或 P<0.01。见表 1。

表 1 水蛭提取物对神经细胞的毒性作用(n=4) ( $\bar{X} \pm S$ ) %

组别	死亡率
正常对照组	7.81± 0.78
水蛭提取物(1mg/mL)	7.74± 0.97
水蛭提取物(2.5mg/mL)	8.09± 1.05
水蛭提取物(5mg/mL)	8.19± 1.08
水蛭提取物(10mg/mL)	8.71± 1.96
水蛭提取物(15mg/mL)	14.91± 1.87 <sup>▲</sup>
水蛭提取物(20mg/mL)	21.55± 3.00 <sup>▲▲</sup>
水蛭提取物(25mg/mL)	29.64± 5.22 <sup>▲▲</sup>
水蛭提取物(35mg/mL)	39.46± 4.78 <sup>▲▲</sup>
水蛭提取物(50mg/mL)	49.78± 5.92 <sup>▲▲</sup>

注:与正常对照组比较,▲P<0.05,▲▲P<0.01。

## 4 讨论

药物浓度过高本身对体外培养神经细胞也具有毒性作用,所以选择合适的体外实验浓度范围对实验的成败至关重要。我们对水蛭提取物的细胞毒进行了研究,实验研究结果显示,水蛭提取物在 1~10mg/mL 浓度范围内神经细胞坏死率与正常对照组相比 P>0.05,而当浓度达到 15~50mg/mL 时毒性作用表现出来,与正常对照组比较 P<0.05 或 P<0.01,故本研究所用保护浓度应在无毒性或低毒性的范围内。本试验为水蛭提取物的药效学研究提供剂量选择依据。

### 参考文献

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草[M].上海:上海科学技术出版社,1998.2 352

[2] 聂荣庆,李扣华,胡国柱,等.黄芩抗新生大鼠大脑皮层神经细胞缺血性凋亡研究[J].中国中医基础医学杂志,2004,10(11):34~37

(收稿日期:2007-07-11)

“内虚”,正气不足而后邪气踞之,加之已是一类全身消耗性疾病,常可因病致虚。故治宜清热解毒,益气扶正,而补虚扶正是治疗肿瘤患者的重要法则之一。半枝莲辛苦性寒,具有较强的清热解毒、散瘀止血之功,文中应用不同浓度的乙醇提取,测定提取物中野黄芩苷含量,结果显示其含量与乙醇浓度成正比关系。同时以不同提取物进行抗肿瘤活性试验,统计得其抗肿瘤活性与乙醇浓度及野黄芩苷含量成正相关

关系。本研究结果提示半枝莲抗肿瘤活性与野黄芩苷有一定的相关性,为临床应用半枝莲抗肿瘤治疗及其应用方法提供依据。

### 参考文献

[1] 刘建文.药理实验方法学新技术与新方法[M].北京:化学工业出版社,2003.25~27

(收稿日期:2007-06-26)