

● 中 西 药 苑 ●

地龙提取物对神经母细胞 SH-SY5Y 细胞增殖的影响 *

王玉¹ 伍凤云² 刘丹¹ 林芬³

(1 江西省中医药研究院 南昌 330046; 2 南昌大学医学院 2008 级研究生 江西南昌 330006;
3 南昌大学医学院 2009 级研究生 江西南昌 330006)

摘要:目的:探讨地龙提取物对神经母细胞 SH-SY5Y 细胞增殖情况的影响。方法:采用 MTT 实验方法,检测不同浓度的地龙提取物对体外培养的 SH-SY5Y 神经母细胞细胞活性的影响,计算其抑制率。结果:地龙提取物在 2~10mg/mL 浓度范围内,对细胞生长无明显的影响,其 OD 值与正常对照组相比无统计学差异, $P>0.05$;当浓度达到 20mg/mL 以上时,表现出明显的细胞生长抑制现象,OD 值显著低于正常对照组, $P<0.01$ 。结论:地龙提取物浓度在 2~10mg/mL 时,未表现细胞毒性作用,该浓度范围可用作给药剂量的选择参考。

关键词:地龙提取物;SH-SY5Y 细胞;细胞增殖

中图分类号:R 285.5

文献标识码:B

doi:10.3969/j.issn.1671-4040.2010.03.071

地龙为环节动物门钜蚓科动物参环毛蚓、通俗毛蚓、威廉环毛蚓或栉盲毛蚓的干燥体,其性咸寒,是我国重要且历史悠久的中药材之一,具有多方面的药理作用,如抑制血小板聚集^[1]、降压^[2]、平喘^[3]等。本文对地龙提取物对体外神经细胞细胞增殖情况的影响进行研究,旨在寻找合适的体外药物浓度为临床给药剂量提供参考。现将结果报道如下:

1 实验材料

1.1 实验细胞 神经母细胞株 SH-SY5Y: 江西省中医药研究院中心实验室冻存。

1.2 试剂 DMEM 培养基 GIBCOBRL 产品(批号:1024265,货号:12100-038);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);MTT: Sigma 产品(货号:M2128)。

1.3 主要仪器 超净工作台(SW-CJ-IF 型,苏州净化设备厂);二氧化碳培养箱(3164 型,美国 Formascientific 公司);倒置显微镜(808434 型,日本 Nikon 公司);酶联免疫检测仪(KHB-ST360,上海科华公司)。

1.4 实验药物 地龙提取物:取地龙药材 50g,10 倍水量煎煮提取 2 次,1h/次,合并提取液,滤过,浓缩至 100mL,加入乙醇配制成含乙醇终浓度为 50% 的药液,常温静置 24h,取上清液浓缩至 500mg/mL,用饱和 NaOH 调节 pH 至 7.2~7.4,离心,上清液过 0.45 μ m 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 实验方法

2.1 神经母细胞 SH-SY5Y 传代培养 倒置显微镜下观察细胞生长情况,将长满细胞的培养瓶中原来的培养液弃掉,用无血清 DMEM 液洗一遍,加 0.25%胰蛋白酶消化,当细胞变成圆形时小心弃去培养瓶中的液体,加适量 DMEM 完全培养液终止

消化,弃去 DMEM 完全培养液,再加适量 DMEM 完全培养液并吹打细胞制成细胞悬液,置含 5%CO₂ 的二氧化碳培养箱内 37℃培养。

2.2 MTT 比色法 将培养对数生长期的神经母细胞株 SH-SY5Y 配成单个细胞悬液,调整悬液浓度并接种到 96 孔板中,5%CO₂、37℃培养 24h,分别给予实验各组含不同浓度地龙提取物的 DMEM 完全培养液,使药物终浓度分别为 2、5、10、20、30、40、50、80、100 mg/mL,对照组给予等体积的 DMEM 完全培养液,每组 8 个复孔,5%CO₂、37℃培养 48h,每孔加 20 μ L 5mg/mL MTT,继续培养 4h,终止培养,每孔加 150 μ L DMSO,振荡 10min,用酶联免疫检测仪在 490nm 波长处测 OD 值。

3 实验结果

地龙提取物在 2~10mg/mL 浓度范围内,其 OD 值与正常对照组相比无统计学差异, $P>0.05$,表明在此浓度范围内地龙提取物对神经母细胞株 SH-SY5Y 增殖无显著影响,且药物浓度在 2mg/mL 时对其生长有一定的保护作用。当浓度达到 20mg/mL 以上时,随着剂量增大 OD 值逐渐降低,与正常对照组比差别均有统计学意义, $P<0.01$,并且抑制率也随着剂量的增大而增大,表明地龙提取物浓度达到 20mg/mL 以上时明显抑制神经母细胞株 SH-SY5Y 的增殖;并且当浓度达 100mg/mL 时,OD 值为 0,表明此时 100%抑制。见表 1。

表 1 地龙提取物对神经细胞 SH-SY5Y 细胞增殖的影响 ($\bar{X} \pm S$)			
组别	n	OD 值	抑制率(%)
正常对照组	8	0.5893 $\pm$ 0.0481	-
地龙提取物(2 mg/mL)	8	0.5980 $\pm$ 0.0414	-1.48
地龙提取物(5 mg/mL)	8	0.5490 $\pm$ 0.0788	6.84
地龙提取物(10 mg/mL)	8	0.5250 $\pm$ 0.0538	10.91
地龙提取物(20 mg/mL)	8	0.2551 $\pm$ 0.0604*	56.71
地龙提取物(30 mg/mL)	8	0.1966 $\pm$ 0.0381*	66.64
地龙提取物(40 mg/mL)	8	0.1429 $\pm$ 0.0336*	75.75
地龙提取物(50 mg/mL)	8	0.0818 $\pm$ 0.0170*	86.12
地龙提取物(80 mg/mL)	8	0.0180 $\pm$ 0.0058*	96.94
地龙提取物(100 mg/mL)	8	0.0000 $\pm$ 0.0000*	100.00

注:与正常对照组比较,* $P<0.01$ 。

*江西省卫生厅中医管理局课题(编号:2007A13)

婴儿健脾分散片主要药效学研究

周娟妮¹ 赵诗云²

(1 江西中医学院附属医院 南昌 330006; 2 江西省中医药研究院 南昌 330046)

摘要:目的:研究婴儿健脾分散片的主要药效学。方法:采用对脾虚小鼠的肠蠕动、胃排空、体重、游泳时间及对大鼠胃液分泌的观察。结果:婴儿健脾分散片能加快脾虚小鼠胃排空和小肠推进运动,提高脾虚小鼠血清淀粉酶活力、胸腺系数和体重增重,延长冰浴中小鼠游泳时间,对大鼠胃液分泌量和胃酸排出量无明显作用。结论:婴儿健脾分散片具有健脾消食作用。

关键词:腹泻;婴儿健脾分散片;药效学

中图分类号:R 285.5 文献标识码:B doi:10.3969/j.issn.1671-4040.2010.03.072

婴儿健脾分散片由白扁豆、山药、鸡内金等 8 味药组成,具有健脾、消食、止泻之功效,用于婴儿非感染性腹泻属虚滞证候者。我们对其药效学进行了初步研究,现将结果报告如下:

1 材料

1.1 动物 小鼠:昆明种,18.0~22.0g,雌雄各半,由江西中医学院实验动物部供应,合格证号:JZDWN0:2005-029。大鼠:SD,200~240g,上海西普尔-必凯实验动物责任有限公司,动物合格证号:SCXK(沪)2003-0002。

1.2 药品及试剂 婴儿健脾分散片 0.222 g (生药/片,由江中药业股份有限公司提供,批号 051118。血清(尿)淀粉酶试剂盒,上海科华生物工程股份有限公司提供,批号 051011。

1.3 仪器 紫外分光光度计,岛津,UV-120-02;全自动生化分析仪,日立,7170A。

1.4 统计 本项目数据统计采用 SPSS 统计软件,表中数据以均数和方差($\bar{X} \pm S$)表示。

4 讨论

地龙为我国传统中药,具有较为广泛的药理学作用,中医临床用于治疗多种疾病。常规认为在常用剂量及传统给药剂量下本品无毒。但有研究发现蚯蚓应激分泌液的蛋白组分有剧毒性^[4]。因此,应用地龙提取物时必须选择合适的剂量,既保证良好的临床效果,又降低对人体毒性。

MTT 法是一种检测细胞存活和增殖的方法。其检测原理为活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性 MTT 还原为水不溶性的蓝紫色结晶甲瓞,结晶的产量与活细胞数成正相关。MTT 比色法因灵敏度高、操作简便、经济、快速而被广泛应用。

本文研究结果显示,地龙提取物在 2~10mg/mL 浓度范围内对神经母细胞株 SH-SY5Y 的存活无明显抑制作用,而且在 2mg/mL 时表现出保护作用,这意味着在临床上小剂量使用地龙提取物对神经系统具有康复保健、预防疾病发生的作用,这给地龙

2 方法

2.1 对大黄致脾虚小鼠肠蠕动及免疫器官的影响 参考文献^[1],取昆明小鼠按表 1 随机分组,称量体重,以 0.5g(生药)/mL 的生大黄混悬液 40mL/kg 体重灌胃给药,每日 1 次,连续 10d,造成脾虚模型。按表 1 所示剂量灌服婴儿健脾分散片,每日 1 次,连续 7d,第 7 天以印度墨汁与药物混合灌胃给药,20min 后处死动物,称量体重,取胸腺、脾脏称重,计算胸腺、脾脏系数;取出小肠段,量取幽门至墨汁前沿的距离作为“墨汁在小肠内推进距离”,从幽门至回盲部的总长度作为“小肠总长度”,计算出墨汁推进率。

2.2 对大黄致脾虚小鼠胃排空的影响 取昆明小鼠按表 2 随机分组,同 2.1 造成脾虚模型。按表 2 所示剂量灌服婴儿健脾分散片,每日 1 次,连续 7d,第 7 天动物禁食不禁水,给药 2h 后按 0.2mL/只灌服 0.1%甲基橙溶液,15min 后脱臼处死,剖腹摘取胃,置于小烧杯内,加蒸馏水 10mL,剖开胃后将胃内容物充分洗于蒸馏水中,用 5%碳酸氢钠调 pH 至保健品的开发提供了实验依据。当浓度达到 20mg/mL 及以上时,细胞毒性呈跳跃式加强,随着剂量的增大神经细胞的抑制率也增大;当浓度达 100mg/mL 时,呈现 100%抑制。提示:(1)地龙在小剂量使用时,对神经细胞体无毒性并且有一定的保护作用,这对预防脑中风的发病用药以及保健药品的开发具有指导意义;(2)地龙在大剂量使用时,不仅没有保护作用,而且对神经细胞有抑制生长的毒性作用,提示地龙在临床上的使用剂量不能过大,以免副作用的发生。

参考文献

[1]韩正雪,赖光强,张维,等.地龙水煎剂对血小板聚集的影响[J].中外健康文摘·临床医药版,2008,5(4):27
[2]冯敏超,康白,毛淑梅,等.地龙耐热蛋白对自发性高血压大鼠心肌血管紧张素Ⅱ水平及血管紧张素Ⅱ-1 型受体表达的影响[J].现代中西医结合杂志,2007,16(26):3 794-3 796
[3]张德新.五味地龙汤对哮喘豚鼠作用机制的试验研究[D].武汉:湖北中医学院,2007.78
[4]张租,何俐明,于培烂,等.蚯蚓毒素及其去除方法的初步研究[J].中国生化药物杂志,2001,22(3):112-113

(收稿日期:2010-01-24)