

小儿安神补脑颗粒对氧化损伤细胞的保护作用及其抗氧化应激损伤机制[※]

● 高厚明* 陈建平 石巧玲

摘要 目的:本研究旨在探讨体外实验中小儿安神补脑颗粒在6-羟基多巴胺(6-OHDA)诱导的PC12细胞氧化损伤中的保护作用及其作用机制。方法:采用6-OHDA损伤PC12细胞制备PC12细胞氧化损伤模型。加入小儿安神补脑颗粒观察各组细胞生长情况。结果:小儿安神补脑颗粒能抑制6-OHDA诱导的细胞凋亡,显著增加细胞超氧化物歧化酶(SOD)和(GSH-Px)的活性,显著减少细胞中的丙二醛(MDA)的含量,同时显著提高PC12细胞核因子E2相关因子2(Nrf2)、血红素加氧酶-1(HO-1)和醌氧化还原酶-1(NQO-1)的mRNA表达。结论:小儿安神补脑颗粒对6-OHDA诱导的PC12细胞氧化损伤具有保护作用,其机制可能与其促进Nrf2基因表达,进而提高抗氧化蛋白表达水平,减轻氧化应激损伤有关。

关键词 小儿安神补脑颗粒 氧化应激 Nrf2 抗氧化蛋白

小儿多发性抽动症是一种儿童行为障碍性疾病。临床以多发性抽动、爆发性发声及猥亵语言、模仿言语伴奇癖生活方式为特征,呈复杂的、慢性神经精神疾病的表现^[1]。小儿多发性抽动症是一种复杂的慢性现代病,因其病因及发病机制尚未明确,故治疗尚未有突破性进展。目前西医治疗该病主要采用神经阻滞剂如氟哌啶醇治疗,但其有效率仅为50%~70%左右。

中医认为,小儿多发性抽动症的主要病因为肝风内动,风痰上蒙,阻滞清窍,心神不宁,治疗以祛风化痰、补脑安神为原则。小儿安神补脑颗粒是课题组成员结合临床体会,针对本病病机研制而成的中药医院制剂。临床研究表明,小儿安神补脑颗粒是治疗小儿多发性抽动症的有效药物,与对照组氟哌啶醇比较有显著差异,远期效果也优于氟哌啶醇,复发率明显低于氟哌啶醇,克服了目前小儿多发性抽

动症西药治疗的缺陷^[2]。但目前该制剂相关的作用机制尚未明确,因而限制了其进一步的应用。在神经系统性疾病中,通常伴随脑内氧化应激损伤、神经再生障碍和神经营养因子缺失等,小儿安神补脑颗粒是否能通过改善神经系统性疾病中常见的病理状态而达到治疗小儿多发性抽动症还未见报道。因此,本研究拟通过建立PC12细胞的氧化应激细胞模型,评价小儿安神补脑颗粒的抗氧化应激作用,并评价小儿安神补脑颗粒是否通过Nrf2-ARE信号通路改善细胞防御体系。

1 材料

1.1 药物和试剂 小儿安神补脑颗粒药物组成:石菖蒲、远志、益智仁、胆南星、陈皮、半夏、羌活、石决明、礞石等。主要功效:涤痰止惊,补脑安神。取小儿安神补脑颗粒用蒸馏水完全溶解,将上清液调整为含生药 $50\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,调pH值为7.4,高压灭菌后放置于4℃冰箱保存备用。SOD、GSH-Px和MDA试剂盒购买自南京建成生物工程研究所。Nrf2、HO-1、NQO-1及内参GAPDH引物均由由上海生工生物技术有限公司合成。

※基金项目 广东省深圳市科技研发资金(No. JCYJ20150401163247216)

* 作者简介 高厚明,男,副主任中药师。主要研究方向:中药鉴定、中药制剂、中药炮制等。

• 作者单位 广东省深圳市中医院(518033)

1.2 细胞株 PC12 细胞购自中国科学院上海细胞库。

2 方法

2.1 PC12 细胞的培养 PC12 细胞置于 DMEM 高糖型培养基进行培养(培养基含 1% L-谷氨酰胺, 1% 青链霉素, 10% 胎牛血清), 低分化 PC12 细胞半贴壁, 3 天换液 1 次。细胞培养至对数生长其可进行传代, 0.05% 的胰酶消化液消化细胞 1-2min, 加入等量含血清的培养基终止消化, 收取含细胞的培养液于 15mL 离心管以 $1500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5min, 弃尽含胰酶的培养液, 细胞以 1:3-1:5 比例进行传代。以细胞密度在 $(1-2) \times 10^5/\text{mL}$ 左右接种于的常规塑料培养瓶中。培养 24 小时后换液, 待细胞状态较好, 进入对数生长期开始后续实验。

2.2 分组 实验分为(1)正常对照组。(2)6-OHDA 应激组: 给予终浓度为 $120 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 6-OHDA, 作用 24 h。(3)6-OHDA + 小儿安神补脑颗粒实验组: 分别给予终浓度为 0.1、0.4、1.6、6.4 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的小儿安神补脑颗粒提取液, 24h 后给予终浓度为 $120 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 6-OHDA, 作用 24h。

2.3 MTT 实验 按上述实验分组作用 24h 后, 每孔加入浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 MTT, 继续培养 4h 后吸去上清液, 每孔加入 100 μL 的二甲基亚砜, 37°C 孵育 1h 后, 酶标仪测定 570nm 处的吸光值。

2.4 SOD 和 MDA 检测 收集细胞后制成细胞悬液, $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 移去上清, PBS 清洗后用含 EDTA 和 TitonX-100 的 PBS 缓冲液进行裂解, $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15min, 收集上清液, 按照 SOD 和 MDA 试剂盒说明书进行测定。

2.5 RT-PCR 检测 采用 Trizol 试剂裂解细胞。吸取裂解液于 1.5mL 离心管中, 室温放置 5-10min。接着加入 0.2mL 三氯甲烷, 剧烈震荡 15s, 室温放置 3min。之后 $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10min。吸取上清水相转移至干净的离心管中, 加入等体积异丙醇, 混匀, 室温放置 20min。 $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10min, 弃上清。底部出现的白色沉淀即 RNA。加入 1mL 75% 乙醇洗涤沉淀。 $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3min, 弃上清。室温干燥 5-10min。加入 30-50 μL

RNase-free ddH₂O, 充分溶解 RNA 后将溶液置于 -80 $^\circ\text{C}$ 保存。按照荧光定量试剂盒测定 Nr1 α 2、HO-1、NQO-1 及内参 GAPDH 表达量。

2.6 统计学方法 所有的数据以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 的形式表示。采用单因素方差分析, 再用 Dunnett's 方法进行分析。以 $P < 0.05$ 表示显著性差异。

3 结果

3.1 小儿安神补脑颗粒对 6-OHDA 诱导 PC12 细胞增殖的影响 6-OHDA 应激组细胞存活率显著低于正常组 ($P < 0.01$)。0.4 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、1.6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、6.4 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 小儿安神补脑颗粒提取液处理后, 细胞存活率较 6-OHDA 应激组显著提高 ($P < 0.05$; $P < 0.01$; $P < 0.01$)。见表 1。

表 1 小儿安神补脑颗粒对 PC12 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	吸光度 (A570)
正常组	0.985 \pm 0.083
6-OHDA 应激组	0.346 \pm 0.053 ^{##}
6-OHDA + 0.1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 小儿安神补脑颗粒	0.402 \pm 0.035
6-OHDA + 0.4 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 小儿安神补脑颗粒	0.637 \pm 0.051 [*]
6-OHDA + 1.6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 小儿安神补脑颗粒	1.035 \pm 0.084 ^{**}
6-OHDA + 6.4 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 小儿安神补脑颗粒	1.106 \pm 0.121 ^{**}

注: 与正常组比较, ^{##} $P < 0.01$; 与 6-OHDA 应激组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。

3.2 小儿安神补脑颗粒对 6-OHDA 诱导 PC12 细胞 SOD、GSH-Px 和 MDA 的影响 6-OHDA 应激组细胞 SOD 和 GSH-Px 活性较正常组显著降低 ($P < 0.01$; $P < 0.01$), MDA 释放较正常组显著增加 ($P < 0.01$)。0.4 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、1.6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、6.4 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 小儿安神补脑颗粒提取液处理后, SOD 和 GSH-Px 活性较 6-OHDA 应激组显著提高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), MDA 释放较 6-OHDA 应激组显著降低 ($P < 0.05$; $P < 0.01$; $P < 0.01$)。见表 2。

表2 小儿安神补脑颗粒对 PC12 细胞 SOD、GSH - Px 和 MDA 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	SOD(U · mg ⁻¹)	GSH - Px(U · mg ⁻¹)	MDA(μmol · L ⁻¹)
正常组	35.23 ± 4.12	72.64 ± 10.57	6.36 ± 0.75
6 - OHDA 应激组	12.13 ± 2.15 ^{##}	27.47 ± 4.68 ^{##}	18.56 ± 2.98 ^{##}
6 - OHDA + 0.1 mg · L ⁻¹ 小儿安神补脑颗粒	21.07 ± 3.57	38.10 ± 5.17	15.96 ± 2.48
6 - OHDA + 0.4 mg · L ⁻¹ 小儿安神补脑颗粒	27.46 ± 3.98 [*]	45.23 ± 3.04 [*]	12.63 ± 2.73 [*]
6 - OHDA + 1.6 mg · L ⁻¹ 小儿安神补脑颗粒	31.94 ± 4.26 ^{**}	49.55 ± 5.25 [*]	10.62 ± 1.06 ^{**}
6 - OHDA + 6.4 mg · L ⁻¹ 小儿安神补脑颗粒	34.43 ± 5.11 ^{**}	67.71 ± 5.84 ^{**}	9.48 ± 0.95 ^{**}

注:与正常组比较,^{##} $P < 0.01$;与 6 - OHDA 应激组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

3.3 小儿安神补脑颗粒对 6 - OHDA 诱导 PC12 细胞 Nrf2、HO - 1 和 NQO - 1 的影响 6 - OHDA 应激组细胞 Nrf2、HO - 1 和 NQO - 1 表达较正常组显著降低(P

< 0.05 ; $P < 0.05$; $P < 0.05$)。小儿安神补脑颗粒提取液处理后,Nrf2、HO - 1 和 NQO - 1 表达较 6 - OHDA 应激组显著提高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 3。

表3 小儿安神补脑颗粒对 PC12 细胞 Nrf2、HO - 1 和 NQO - 1 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	HO - 1	Nrf2	NQO - 1
正常组	1.00 ± 0.15	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.17
6 - OHDA 应激组	0.62 ± 0.08 [#]	0.57 ± 0.07 [#]	0.61 ± 0.09 [#]
6 - OHDA + 0.1 mg · L ⁻¹ 小儿安神补脑颗粒	0.67 ± 0.08	0.68 ± 0.08	0.66 ± 0.09
6 - OHDA + 0.4 mg · L ⁻¹ 小儿安神补脑颗粒	0.74 ± 0.09	0.88 ± 0.12 [*]	0.78 ± 0.10
6 - OHDA + 1.6 mg · L ⁻¹ 小儿安神补脑颗粒	0.81 ± 0.12 [*]	0.93 ± 0.15 [*]	0.83 ± 0.09 [*]
6 - OHDA + 6.4 mg · L ⁻¹ 小儿安神补脑颗粒	0.95 ± 0.11 [*]	1.06 ± 0.10 ^{**}	0.93 ± 0.09 [*]

注:与正常组比较,[#] $P < 0.05$;与 6 - OHDA 应激组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

4 讨论

中医将神经系统疾病定义为“生理性肾虚”,补肾从古至今都被认为是防治神经系统疾病的重要治法^[3]。中医理论认为“肾藏精,主骨生髓,髓通于脑,脑为髓海”。因此脑髓是否充足和肾之盛衰具有紧密的联系。肾旺盛则脑髓充足,肾衰亏虚则脑髓缺乏,从而导致神经元产生病变,诱发神经系统疾病。我院根据中医理论及多年临床实践,以补肾益脑、平抑肝阳、祛风化痰、镇静止惊为治制成以石菖蒲、远志、益智仁、胆南星、陈皮、半夏为主的小儿安神补脑颗粒,对小儿多发性抽动症疗效良好。

氧化应激是指体内氧化与抗氧化作用失衡,倾向于氧化,导致蛋白酶分泌增加,产生大量氧化中间产物^[4]。氧化应激是由自由基在体内产生的一种负面作用,并被认为是导致神经系统疾病的一个重要因素^[5]。氧化应激情况下,SOD 和 GSH - Px 等抗氧化物酶活性下降,导致众多的氧自由基得不到及时清除,形成羟自由基,从而加重了氧化反应:羟自由基继而引发花生四烯酸的过氧化,生成大量的 MDA,引起细胞增殖的下降^[6]。本研究中小儿安神补脑颗粒可

以拮抗 6 - OHDA 诱导 PC12 细胞抗氧化酶 SOD、GSH - Px 活性表达下降,降低 MDA 的释放,维持 PC12 细胞的正常增殖,表明小儿安神补脑颗粒促进细胞增殖的作用可能与其增加抗氧化酶的活性,减少脂质的释放相关。

越来越多的研究表明氧化应激在神经系统疾病的发病机理和进展中发挥重要作用。因此,基于抗氧化应激的神经保护治疗是一种对神经系统疾病常见的治疗方案^[7]。增强抗氧化可以赋予机体保护作用,可以降低神经系统疾病的发病危险。其中,上调依赖于 ARE 信号通路的内源性保护系统是提高机体防御氧化应激的一个重要方法。

Nrf2 是一种基本的亮氨酸拉链转录因子,这种因子可以驱动所涉及的各种基因的转录产物(羟基自由基或 MDA,蛋白质等)以及氧自由基^[8]。因此,转录激活 Nrf2 的细胞可能参与保护应激所致的氧化损伤。此外,Nrf2 是 HO - 1 蛋白的和 ARE 通路激活的重要调节因子^[9]。在正常生理环境下,Nrf2 绑定到 Keap1 上^[10]。当氧化应激时增加时,Nrf2 从 Keap1 处释放并迅速移位到核,它与 ARE 结合导致抗氧化基因的转录的增加,激活诸如 HO - 1 和 NQO - 1 的抗氧化蛋

白^[11]。本实验中小儿安神补脑颗粒对6-OHDA诱导PC12细胞Nrf2、HO-1和NQO-1表达下降的缺陷表现出拮抗作用,表明其作用机制可能与小儿安神补脑颗粒促进Nrf2基因表达,进而提高抗氧化蛋白表达水平,减轻氧化应激损伤有关。

总而言之,我们的研究表明小儿安神补脑颗粒对6-OHDA诱导的PC12细胞发挥抗氧化应激作用与Nrf2-ARE信号通路的激活相关,这可能有助于延伸小儿安神补脑颗粒对氧化应激相关的神经系统疾病的使用。

参考文献

[1] Modafferi S, Stornelli M, Chiarotti F, et al. Sleep, anxiety and psychiatric symptoms in children with Tourette syndrome and tic disorders[J]. Eur J Paediatr Neurol, 2016, 20(5): 696-703.
 [2] 邱静宇, 刘岩. 小儿安神补脑颗粒治疗小儿多发性抽动症60例临床研究[J]. 中医儿科杂志, 2010, 6(1): 33-36.
 [3] 沈自尹. 从肾本质研究到证本质研究的思考与实践——中西医结合研究推动了更高层次的中医与西医互补[J]. 上海中医药杂志, 2000, 34(4): 4-7.
 [4] Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to envi-

ronmental stresses via the Keap1 - Nrf2 - ARE pathway[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2007, 47: 89-116.
 [5] Brown GC, Neher JJ. Inflammatory neurodegeneration and mechanisms of microglial killing of neurons[J]. Mol Neurobiol, 2010, 41(2-3): 242-247.
 [6] Butterfield DA, Reed T, Sultana R. Roles of 3-nitrotyrosine- and 4-hydroxynonenal-modified brain proteins in the progression and pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. Free Radic Res, 2011, 45(1): 59-72.
 [7] Nguyen T, Sherratt PJ, Pickett CB. Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2003, 43: 233-260.
 [8] Li W, Yu SW, Kong AN. Nrf2 possesses a redox-sensitive nuclear exporting signal in the Neh5 transactivation domain[J]. J Biol Chem, 2006, 281(37): 27251-27263.
 [9] van Muiswinkel FL, Kuiperij HB. The Nrf2-ARE signalling pathway: promising drug target to combat oxidative stress in neurodegenerative disorders[J]. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord, 2005, 4(3): 267-281.
 [10] Calkins MJ, Johnson DA, Townsend JA, et al. The Nrf2/ARE pathway as a potential therapeutic target in neurodegenerative disease[J]. Antioxid Redox Signal, 2009, 11(3): 497-508.
 [11] Itoh K, Tong KI, Yamamoto M. Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles[J]. Free Radic Biol Med, 2004, 36(10): 1208-1213

(上接第69页)

[18] 李云峰, 杨明, 赵毅民, 等. 巴戟天寡糖对皮质酮损伤的PC12细胞的保护作用[J]. 中国中药杂志, 2000, 12(9): 39-42.
 [19] Li YF, Liu YQ, Yang M, et al. The cytoprotective effect of inulin-type hexasaccharide extracted from Morinda officinalis on PC12 cells against the lesion induced by corticosterone[J]. Life Sci, 2004, 75(13): 1531-1538.
 [20] DE Comings, Macmurray J P. Maternal age as a potential explanation of the role of the L allele of the serotonin transporter gene in anxiety and depression in Asians[J]. Neuroscience Bulletin, 2014.
 [21] Vidal R, Castro E, Pilar-Cuellar F, et al. Serotonin 5-HT4 receptors: A new strategy for developing fast acting antidepressants[J]. Current Pharmaceutical Design, 2014.
 [22] 蔡兵, 崔承彬, 陈玉华, 等. 巴戟天中菊淀粉型低聚糖类单体成分对小鼠的抗抑郁作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1996, 11(2): 30-33.
 [23] Qiu Z K, Liu C H, Gao Z W, et al. The inulin-type oligosaccharides extract from morinda officinalis, a traditional Chinese herb, ameliorated behavioral deficits in an animal model of post

-traumatic stress disorder[J]. Metab Brain Dis, 2016, 31(5): 1143-1149.
 [24] 陈洁文, 王勇, 谭宝璇, 等. 巴戟素补肾健脑作用的神经活动基础[J]. 广州中医药大学学报, 1999, 10(4): 314-317.
 [25] 张静, 徐汉明, 张昌勇, 等. 一氧化氮合酶活性与抑郁症的相关性(英文)[J]. Neuroscience Bulletin, 2005(6): 404-407.
 [26] 谭宝璇, 陈洁文, 陈朝凤, 等. 巴戟素补肾健脑作用及其机理研究[C]. //国际传统医药大会论文集[A]. 中国北京, 2000.
 [27] 杨黎辉. 巴戟素改善脑缺血再灌注损伤作用的实验研究[D]. 广州中医药大学, 2005.
 [28] 陈地灵. 巴戟天低聚糖巴戟甲素抗老年痴呆药效及作用机制研究[D]. 广州中医药大学, 2012.
 [29] 郭素华, 王和鸣, 黄涛, 等. 南靖巴戟天多糖的含量测定[J]. 福建中医学院学报, 2006(1): 32-33.
 [30] 刘建金. 巴戟天多糖对抑郁症大鼠氧化应激及认知行为的影响[J]. 中国现代医生, 2011, 19(16): 1-2.
 [31] 崔笑梅, 曹建民, 周海涛. 巴戟天对大鼠抗运动性疲劳能力及脑组织自由基的影响

[J]. 卫生职业教育, 2014, 20(19): 100-102.
 [32] 蔡兵, 崔承彬, 陈玉华, 等. 中药巴戟天抗抑郁作用的大小鼠模型三级组合测试评价[J]. 解放军药学学报, 2005, 7(5): 321-325.
 [33] Manev H, Costa E, Wroblewski J T, et al. Abusive stimulation of excitatory amino acid receptors: a strategy to limit neurotoxicity[J]. FASEB J, 1990, 4(10): 2789-2797.
 [34] Sanacora G, Kendell S F, Levin Y, et al. Preliminary evidence of riluzole efficacy in antidepressant-treated patients with residual depressive symptoms[J]. Biol Psychiatry, 2007, 61(6): 822-825.
 [35] 黄珍珍. 巴戟天的化学成分及其生物活性研究[D]. 广州中医药大学, 2013.
 [36] 张中启, 袁莉, 赵楠, 等. 巴戟天醇提取物的抗抑郁作用[J]. 中国药理学杂志, 2000, 35(11): 19-21.
 [37] 王寅, 张巧艳. 巴戟天雌激素样作用的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 14(3): 527-528.
 [38] 杨剑虹, 兰光华. 性激素与抑郁症关系的研究进展[J]. 浙江临床医学, 2008, 10(8): 1132-1133.