

## 添加VB1后安神补脑液对神经细胞的保护作用

王婷婷, 孙桂波<sup>2</sup>, 孟祥宝<sup>2</sup>, 林文彬<sup>1</sup>, 卢珊<sup>2</sup>, 祖双<sup>3</sup>, 王永宽<sup>3</sup>, 于江波<sup>3\*</sup>, 孙晓波<sup>2\*</sup>

1. 哈尔滨商业大学生命科学与环境科学研究中心(哈尔滨 150076);

2. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所(北京 100193);

3. 吉林敖东延边药业股份有限公司(吉林 延吉 133700)

**摘要 目的:**通过研究含VB1的全方安神补脑液、不含VB1的安神补脑液、VB1液三种药液对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导损伤PC12细胞的保护作用,探讨添加VB1后的全方安神补脑液对神经的保护作用。**方法:**利用H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导损伤PC12神经细胞,通过MTT法检测细胞存活率,试剂盒检测乳酸脱氢酶(LDH)的漏出量、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性、丙二醛(MDA)含量,观察安神补脑液对PC12神经细胞损伤的保护作用。**结果:**三种药液对PC12神经细胞存活率均无显著影响,对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导损伤的PC12细胞均具有保护作用。添加VB1后的全方安神补脑液对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导PC12细胞损伤的保护作用优于不含VB1的安神补脑液及VB1药液。**结论:**添加VB1后的全方安神补脑液能增强其对神经细胞的保护作用。

**关键词:**安神补脑液;VB1;H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;PC12细胞;神经保护

中图分类号:R285

文献标识码:A

文章编号:1006-2882(2015)01-05-03

DOI: 10.14035/j.cnki.hljyy.2015.01.002

## The Protective Effect of Anshenbunao oral liquid Added VB1 on Nerve Cells

Wang Tingting, et al

Center of Research and Development on Life Sciences and Environmental Sciences, Harbin University of Commerce (Harbin 150076, China)

**Abstract objective:** The study observed the protective effect of An shen bu nao oral liquid with all components, An shen bu nao oral liquid excluded VB1 and VB1 oral liquid group against injury induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on PC12 cells and discussed the protective effect of An shen bu nao oral liquid added VB1 on PC12 cells. **Methods:** PC12 cells were cultured in vitro and injury was induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The survival rate of cells was detected by MTT. The contents of MDA, LDH and the level of SOD, CAT in cells were determined by kit respectively. **Results:** There are no obvious differences among the three groups in cell viability induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The protective effect of An shen bu nao oral liquid with all components on PC12 cells damaged by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was better than An shen bu nao oral liquid excluded VB1 and VB1 oral liquid group. **Conclusion:** An shen bunao oral liquid added VB1 has a protective effect on nerve cells which could enhance its neuroprotective effects

**Key words:** An shen bu nao oral liquid; VB1; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; PC12 cells; neuroprotective effects

(内文见下页)

- National Academy of Sciences, 1995, 92: 12466~12469
- [24] Wachinger M, Kleinschmidt A, Winder D, et al. *Journal of General Virology*, 1998, 79: 731-740.
- [25] Belaid A, Aouni M, Khelifa R, et al. *Journal of Medical Virology*, 2002, 00: 229-234.
- [26] Lorina C, Saidib H, Belaid A, et al. *Virology*, 2005, 334: 264~275

- [27] 方超, 张晓帆, 周颖, 等. 抗菌肽开发与应用的研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2010, 35(11): 809-814
- [28] 马艳萍, 刘永生, 张杰. 防御素临床应用现状的研究进展[J]. 江苏农业科学, 2009, 0: 26-28

收稿日期: 2014-11-15

随着社会节奏的加快和生活压力的增大,人们出现头晕失眠,记忆力减退等神经性疾病。文献报道,脑内神经细胞衰竭与氧化代谢异常密切相关<sup>[1]</sup>。安神补脑液由甘草、干姜、制何首乌、淫羊藿、维生素B1等组成<sup>[2]</sup>,具有生精补髓、健脑安神等作用,能有效缓解神经细胞衰竭和脑功能紊乱。本研究利用H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导损伤PC12细胞,通过对全方安神补脑液、不含VB1的安神补脑液、VB1三种药液的神保护作用进行比较研究,探讨添加VB1后的安神补脑液是否增强其对神经细胞的保护作用。

### 1 材料与仪器

#### 1.1 细胞株

PC12细胞,由北京协和医学院基础医学研究所细胞中心提供。

#### 1.2 实验药物与试剂

含VB1的全方安神补脑液、不含VB1的安神补脑液、VB1口服液。DMEM高糖培养基、胎牛血清均购自Gibco公司。乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、丙二醛(MDA)试剂盒均购于南京建成生物工程研究所;H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、胰酶、四氮唑兰(MTT)购自SIGMA公司。

#### 1.3 主要仪器

倒置显微镜(日本Olympus);超净工作台(上海智城分析仪器制造有限公司);酶标仪(美国BioTek);离心机(中国Anke);细胞培养箱(美国Thermo);

### 2 方法

#### 2.1 细胞培养

通过DMEM完全培养基(含10%胎牛血清,5%马血清,100 U/ml青霉素和100μg/ml链霉素)培养PC12细胞。PC12细胞置于37℃,5%CO<sub>2</sub>的培养箱中进行培养。取对数生长期PC12细胞,消化后配成单细胞悬液,将细胞悬液种植于96孔板中,调整细胞密度至1×10<sup>4</sup>/孔,继续培养24 h。

#### 2.2 三种药液对正常PC12细胞活力的影响

将含VB1的全方安神补脑液,不含VB1的安神补脑液、VB1三种药液分别用DMEM稀释为10%组,5%组,2.5%组,1.25%组,0.625%组。细胞以1×10<sup>4</sup>个/孔接种于96孔板,每孔给药100μl,正常组给予100μl无血清培养基,培养24h后,MTT法检测细胞活力。以上试验均重复三次。

#### 2.3 三种药液对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导PC12细胞损伤的保护作用的比较

将含VB1的全方安神补脑液,不含VB1的安神补脑液、VB1三种药液分别用DMEM稀释为10%组,2.5%组,0.625%组。细胞以1×10<sup>4</sup>个/孔接种于96孔板,每孔给药100μl,正常组给予100μl无血清培养基,继续培养24 h后,模

型组和给药组细胞用100μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理6h,MTT法检测细胞活力。以上试验均重复三次。

#### 2.4 三种药液对LDH漏出量、SOD、CAT及MDA的活力检测

将含VB1的全方安神补脑液,不含VB1的安神补脑液、VB1三种药液分别用DMEM稀释为10%组,2.5%组,0.625%组。细胞以5×10<sup>5</sup>个/孔接种于6孔板,每孔给药2 ml,正常组给予2 ml无血清培养基,继续培养24 h后,模型组和给药组细胞用100μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理6 h。收集以上各组培养液并按照试剂盒说明书测定LDH活力。胰酶消化收集以上各组细胞,每组加1 ml PBS,采取反复冻融的方法(-80℃,15 min,室温20 min,如此重复3次)使细胞破碎,3000r/min离心10 min,吸取上清液,利用考马斯亮蓝进行蛋白定量,然后按试剂盒说明书进行SOD、CAT及MDA含量的测定。以上试验均重复三次。

#### 2.5 统计学分析

采用SPSS19.0进行统计,实验数据以 $\bar{x} \pm SD$ 表示,各組间均数比较采用单因素方差分析,组间t检验。以P<0.05为具有显著性差异。

### 3 结果

#### 3.1 三种药液对正常PC12细胞活力的影响

MTT检测结果显示,与正常组相比,含VB1的全方安神补脑液、不含VB1的安神补脑液、VB1药液各剂量组对正常PC12细胞存活率无显著性影响(P>0.05)。证明三种药液对PC12细胞没有毒性影响。见图1。

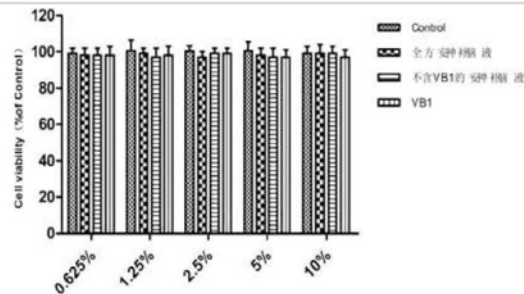


图1 三种药液对正常PC12细胞的影响

注:与正常组相比,\*P<0.05,##P<0.01

#### 3.2 三种药液对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导PC12细胞活力的影响

MTT检测结果显示,与对照组相比,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的模型组细胞存活率明显降低(P<0.05)。与模型组相比,各给药组对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导损伤的PC12细胞均具有明显的保护作用(P<0.05),并且具有剂量依赖性,其中含VB1的全方安神补脑液各剂量组对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导损伤的保护作用均优于不含VB1的安神补脑液组和VB1组。见图2。

基金项目:国家科技重大新药创制课题(NO2012ZX09501001-004)

作者简介:王婷婷(1988-),女,硕士,哈尔滨商业大学生命科学与环境科学研究中心2012级海洋化学专业。

\*通讯作者:于江波(1965-),男,本科,研究员,从事新药开发研究。

孙晓波(1958-),男,博士,研究员,研究方向:心血管药理。

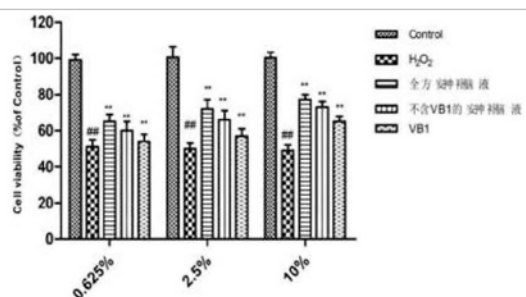


图2 三种药液对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导PC12细胞活力的影响

注:与正常组相比, #:P<0.05, #:P<0.01;与模型组相比, \*:P<0.05, \*\*:P<0.01

### 3.3 三种药液对LDH漏出量、SOD、CAT及MDA活力的影响

生化指标检测结果显示,与正常对照组相比,模型组中的LDH从细胞内漏出量显著增加(P<0.05),内源性抗氧化酶SOD、CAT活性显著降低(P<0.05),MDA含量显著升高(P<0.05)。与模型组相比,各给药组中的LDH漏出量均减少(P<0.05),SOD、CAT活性增加(P<0.05),MDA含量下降(P<0.05)。含VB1的全方安神补脑液各组对细胞的保护作用优于不含VB1的安神补脑液组和VB1组,并且具有剂量依赖性。见图3。

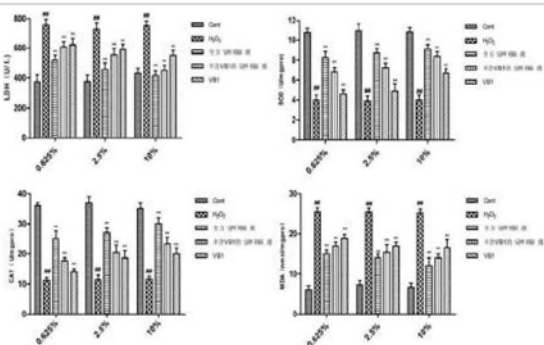


图3 三种药液对LDH漏出量、SOD、CAT、MDA含量的影响

注:与正常组相比, #:P<0.05, #:P<0.01;与模型组相比, \*:P<0.05, \*\*:P<0.01

### 4 讨论

当大脑长期处于情绪紧张和精神压力下,会出现脑力疲劳、睡眠障碍、记忆力减退和头痛等问题。安神补脑液具有抗氧化功能,能有效防止神经细胞衰竭,具有维持大脑生物活性的作用。已有研究表明全方安神补脑液含有的维生素B1作为辅酶参与葡萄糖代谢进而影响脑组织中神经细胞的能量供应<sup>[9]</sup>。维生素B1缺乏还可以影响胆固醇和脂类合成,影响神经细胞膜的完整性<sup>[9]</sup>。本实验通过对含VB1的全方安神补脑液,不含VB1的安神补脑液,VB1三种药液对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤PC12神经细胞的保护作用进行研究,探讨添加VB1后全方安神补脑液对神经的保护作用。

本研究利用采用MTT法测定细胞存活率。结果显示,含VB1的全方安神补脑液、不含VB1的安神补脑液、VB1液

各剂量组对正常PC12细胞存活率无影响。MTT结果显示,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>氧化损伤的细胞存活率显著降低,各给药组剂量依赖性的提高了细胞存活率,说明各给药组对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>氧化损伤的PC12细胞具有保护作用,并且含VB1的全方安神补脑液各剂量组作用均优于不含VB1的安神补脑液组和VB1组。

细胞内含有多种抗氧化酶,具有清除体内自由基的作用。CAT是一种过氧化氢酶,在生物体内清除细胞毒性的过氧化氢<sup>[9]</sup>。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>在体内分解形成氧自由基,氧自由基产生过多,细胞膜发生脂质过氧化反应,产生脂质过氧化产物MDA,细胞膜损伤,细胞内LDH漏出,当氧化程度超出细胞清除氧化物的能力,SOD被大量消耗,细胞氧化损伤。因此可以通过测定LDH漏出量、SOD、CAT、MDA含量等酶的活性来评价药物抵抗细胞氧化损伤的能力。

生化指标显示,与对照组比较,模型组细胞中的LDH漏出量和MDA含量显著增加,内源性抗氧化酶SOD、CAT活性降低,证明H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>造成细胞损伤。与模型组比较,各给药组LDH漏出量和MDA含量均减少,内源性抗氧化酶SOD、CAT活性升高,证明给药组通过抑制氧自由基保护细胞。添加VB1的全方安神补脑液各剂量组对PC12细胞的保护作用均优于不含VB1的安神补脑液组和VB1组。

通过对含VB1的全方安神补脑液,不含VB1的安神补脑液,VB1三种药液对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>氧化PC12神经细胞的保护作用进行研究,证实含VB1的全方安神补脑液,不含VB1的安神补脑液,VB1三种药液对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的PC12细胞损伤均具有明显的保护作用,并且添加VB1的全方安神补脑液保护神经细胞的作用优于不含VB1的安神补脑液和VB1药液。

### 参考文献

- [1] Steel K. Alzheimer's disease[J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(19): 1844-1885.
- [2] 许招懂,吴清和,蒋莉娟.膜滤工艺对安神补脑液药效的影响[J]. *中药新药与临床药理*, 2011, 22(5): 495-497
- [3] 李文霞,柯尊记.维生素B1缺乏与老年性痴呆[J]. *生命科学*, 2013, 25(2): 184-190
- [4] 张婧,熊正英.维生素B1缺乏对运动能力的影响[J]. *安康师专学报*, 2003, 15(6): 76-78
- [5] 张福平,刘燕菁.火龙果过氧化氢酶活性的研究[J]. *食品工业科技*, 2008, 11: 128-132

收稿日期:2014-12-22

### DOI编码修改声明

黑龙江医药2014年第6期全部文章的DOI的前缀进行更正,由“10.13190/j.jbupt.”更改为“10.14035/j.cnki.hljyy.”

黑龙江医药编辑部

2015年1月7日