

沙棘总黄酮对改善神经细胞损伤的作用

王 华¹, 徐志州², 高向东¹, 钱云飞¹, 姚文兵¹

(1. 中国药科大学 生命科学与技术学院, 江苏 南京 210009; 2. 山东省药品检验所, 山东 济南 250012)

摘要:目的 探讨沙棘总黄酮(TFH)对神经细胞的保护作用及其机制。方法 采用培养 PC12 细胞 NaCN 及缺糖引起的细胞损伤模型,以及 Na₂S₂O₄、KCl 分别诱导 PC12 细胞缺氧损伤和 Ca²⁺ 超载损伤模型,研究 TFH 对神经细胞损伤的保护作用。结果 TFH 对 PC12 细胞损伤有明显的保护作用。**结论** TFH 具有保护神经细胞的作用。

关键词: 沙棘总黄酮; PC12 细胞; 神经细胞; 钙拮抗

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1005-1678(2007)03-0158-03

Efficacy of total flavonoids of *Hippophae rhamnoides* L. on injured neurons

WANG Hua¹, XU Zhi-zhou², GAO Xiang-dong¹, QIAN Yun-fei¹, YAO Wen-bing¹

(1. School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;
2. Shandong Institute for Drug Control, Jinan 250012, China)

Abstract: **Purpose** To investigate the neuroprotective effect and its mechanism of total flavonoids of *Hippophae Rhamnoides* (TFH). **Methods** Models of neuronal impairment by PC12 cells with NaCN, glucose deprivation, Na₂S₂O₄ and KCl were used to induce hypoxia and Ca²⁺ overload injury and to assay the neuroprotective effect of the drug in cultured PC12 cells. **Results** The cells were protected by using TFH through MTT activity in a dose-dependent manner. **Conclusion** TFH has protection effects on neurons.

Key words: total flavonoids of *Hippophae rhamnoides* L.; PC12; Neuron; Ca²⁺ overloading

阿尔茨海默病 (Alzheimer's diseases, AD) 在老年人群中已成为继心脏病、恶性肿瘤和中风后的第四位死亡原因。目前认为,多种因素参与发病过程,如能量代谢障碍、自由基损伤、细胞死亡的最后通路钙超载 (Ca²⁺ overload) 以及神经细胞凋亡等。应用组织培养技术具有节省用药量,且简便易行,易于分析药物的作用机制等优点。沙棘 (*Hippophae rhamnoides* L.) 又名沙枣、酸柳果,是蒙古族和藏族的常用中药材,具有利肺、升阳、健脾、养胃、活血化瘀、消炎生肌等功效,其主要成分为沙棘总黄酮 (flavonoids of *Hippophae rhamnoides*, TFH),能够缓解心绞痛、心

肌缺血,并有增进心肌等功能。但是关于 TFH 对中枢神经系统的作用研究较少。本文用 3 种培养细胞的神经元损伤模型研究了 TFH 对神经元损伤的保护作用。

1 材料

沙棘为胡颓子科植物沙棘 (*Hippophae rhamnoides* L.) 新鲜果实,采自内蒙古赤峰市,按文献 [1] 的提取工艺稍加改进提取,TFH 纯度为 58.2%。

PC12 (pheochromocytoma) 细胞,来源于大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤克隆化的细胞株,中国药科大学余伯阳教授惠赠;DMEM 培养基 (Dulbecco's modified eagle's medium) 和新生小牛血清, Gibco 公司;四甲基偶氮唑盐 (MTT)、多聚赖氨酸和 *N,N*-二甲基甲酰胺, Sigma 公司;尼莫地平 (批号:040409), 山西亚宝药业集团股份有限公司;胰蛋白酶, Serva 公司进口分装;神经生长因子 (NGF, 批号:20030403), 厦门北大之路生物工程有限公司。

2 方法

2.1 PC12 细胞的复苏和培养

收稿日期: 2006-08-30; 修回日期: 2006-12-14

基金项目: 国家中医药管理局“中医药科学技术研究基金”(No. 04-05ZP33) 及教育部“高等学校优秀青年教师教学和科研奖励基金”(No. 2002-383)

作者简介: 王华(1978-),男,江苏吴江人,在读博士研究生,主要从事中药抗老年性痴呆研究;姚文兵,通信作者, Tel: 025-83271225, E-mail: wbyao@cpu.edu.cn.

PC12 细胞冻存在液氮中,用时进行复苏,接种于培养瓶中,所用 DMEM 完全培养基内含青霉素 60 U/L,链霉素 100 mg/L,10% 新生小牛血清,37 °C,5% CO₂ 静置培养。待细胞 80% 汇合或接近汇合成片后,0.25% 胰蛋白酶消化传代。传代 PC12 细胞按 1×10^5 个/mL 的密度接种于预铺灭过菌的多聚赖氨酸的 24 孔细胞培养板,每孔 500 μ L,待 PC12 细胞生长至对数生长期且覆盖 80% 培养孔底面积,即可用于实验。

2.2 NaCN 及缺糖引起的 PC12 细胞损伤模型

参照文献[2]方法,PC12 细胞生长至对数生长期且覆盖 80% 培养孔底面积,弃去原培养基,加入无糖 Earle's 溶液洗 2 次,再加入不同药物浓度的无糖 Earle's 溶液 500 μ L,于 37 °C,5% CO₂ 培养 15 min,加入 NaCN(终浓度 10 mmol/L)继续培养 15 min,吸去含 NaCN 培养液,用 D-Hank's 溶液洗 2 次,加入含不同药物浓度的 DMEM 培养基 500 μ L 培养 24 h,MTT 法检测细胞活力。NaCN 经磷酸盐缓冲液(PBS)溶解后加入至培养液中,以 NGF 作为阳性药物。

2.3 MTT 法检测细胞活力

参照 Abe 和 Matsuki 的方法^[3],略做改动。培养板中加入 MTT,终浓度为 0.5 mg/mL,继续培养 4 h,加入 N,N'-二甲基甲酰胺 100 μ L 终止反应。于 37 °C,5% CO₂ 培养箱中放置过夜,用酶标仪测定在波长 570 nm 的吸光度,630 nm 作参比波长,并以吸光度代表细胞活力。

2.4 低亚硫酸钠诱导 PC12 细胞缺氧损伤模型

参照文献[4]方法,待 PC12 细胞生长至对数生长期,且覆盖 24 孔培养板的 80% 培养孔底面积,弃去原培养液,用 D-Hank's 液洗 2 次,加入 D-Hank's 液配制的 2 mmol/L Na₂S₂O₄ 溶液 500 μ L,与细胞作用 50 min,造成细胞缺氧损伤。用 D-Hank's 液洗 2 次,加入 DMEM 完全培养基 450 μ L 和由 PBS 配制的药物溶液 50 μ L 与细胞共同温育,终浓度为 100,10,和 1 μ g/mL,阳性药组加入终浓度为 2 μ mol/L 的尼莫地平,对照与模型组加入等量的 PBS 溶液,其余步骤与给药组相同。37 °C,5% CO₂ 继续培养 16 h,按 2.3 项用 MTT 法检测细胞活力。

2.5 KCl 引起的 PC12 细胞钙超载损伤模型

参照文献[5,6]方法,待 PC12 细胞生长至对数生长期,且覆盖 80% 培养孔底面积,弃去原培养液,用 D-Hank's 液洗 2 次,依次加入 DMEM 培养液 90 和 10 μ L 由 PBS 配制的 KCl-PEG400 溶液,终浓度分

别为 200 mmol/L 和 2%。作用细胞 10 min,造成细胞钙超载损伤。细胞损伤的同时,按终体积 1/10 比例加入由 PBS 配制的药物溶液与细胞共同温育,终浓度为 100,10 和 1 μ g/mL,阳性药组加入终浓度为 2 μ mol/L 的尼莫地平,对照与模型组按终体积 1/10 比例加 PBS,其余步骤与给药组相同。细胞损伤后用 D-Hank's 液洗涤细胞 1 次,加入 DMEM 完全培养基 500 μ L,37 °C,5% CO₂ 继续培养 16 h,按 2.3 项用 MTT 法检测细胞活力。

3 结果

3.1 TFH 对由 NaCN 及缺糖引起的细胞损伤的抑制作用

首先,我们选择 NaCN 及缺糖引起的 PC12 细胞损伤模型来检测 TFH 的药理活性,TFH 在 100,10 和 1 μ g/mL 浓度时显示的对损伤细胞的保护指数分别为 66.9%、52.3% 和 32.7%。而 NGF(50 ng/mL)的保护指数则为 40.6% (见表 1)。

表 1 TFH 对由 NaCN 及缺糖引起的细胞损伤的抑制作用

($n=6, \bar{x} \pm s$)

Tab 1 Inhibitory effect of TFH on NaCN and glucose deprivation induced injury ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	A _{570-630nm}	保护指数/ %
正常组	0.255 \pm 0.003	-
模型组	-0.026 \pm 0.001 ¹	-
NGF 组	0.088 \pm 0.002 ²	40.6
TFH 100 μ g/mL 组	0.162 \pm 0.002 ²	66.9
TFH 10 μ g/mL 组	0.121 \pm 0.001 ²	52.3
TFH 1 μ g/mL 组	0.066 \pm 0.002 ²	32.7

与正常组相比:¹ $P < 0.01$;与模型组相比:² $P < 0.01$,³ $P < 0.05$

¹ $P < 0.01$ vs control; ² $P < 0.01$, ³ $P < 0.05$ vs model

3.2 TFH 对缺氧损伤的抑制作用

在 Na₂S₂O₄ 诱导 PC12 细胞产生的缺氧损伤模型中,TFH 对细胞损伤同样显示了显著的抑制作用,在 100,10 和 1 μ g/mL 3 个浓度时显示的对损伤细胞的保护指数分别为 86.8%、62.1% 和 26.5%。而尼莫地平(2 μ mol/L)的保护指数则为 50.2% (见表 2)。

3.3 TFH 对细胞钙超载损伤的抑制作用

在 KCl 诱导的 PC12 细胞钙超载损伤模型中,浓度依次为 100,10 和 1 μ g/mL 时,TFH 对细胞损伤的保护指数相对于模型组分别为 37.7%、19.5% 和 1.2%。而尼莫地平(2 μ mol/L)的保护指数则为 24.3% (见表 2)。

4 讨论

TFH 能抑制分别由 Na₂S₂O₄、KCl 诱导 PC12 细胞产生的缺氧损伤和钙超载损伤,改善经 NaCN 及缺糖损伤后的 PC12 细胞状态,提示 TFH 可能通过

表 2 TFH 分别对 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 和 KCl 诱导的细胞损伤的抑制作用 ($n=6, \bar{x} \pm s$)Tab 2 Inhibitory effect of TFH on $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ and KCl induced injury ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	缺氧损伤模型		钙超载损伤模型	
	$A_{570-630\text{nm}}$	保护指数/ %	$A_{570-630\text{nm}}$	保护指数/ %
正常组	0.178 \pm 0.001	-	0.299 \pm 0.002	-
模型组	-0.041 \pm 0.003 ¹	-	-0.035 \pm 0.004 ¹	-
NGF 组	0.069 \pm 0.002 ²	50.2	0.046 \pm 0.003 ²	24.3
TFH 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组	0.149 \pm 0.002 ²	86.8	0.091 \pm 0.002 ²	37.7
TFH 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组	0.095 \pm 0.007 ²	62.1	0.03 \pm 0.002 ²	19.5
TFH 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组	0.017 \pm 0.003 ²	26.5	-0.031 \pm 0.003	1.2

与正常组相比:¹ $P < 0.01$; 与模型组相比:² $P < 0.01$, ³ $P < 0.05$

¹ $P < 0.01$ vs control; ² $P < 0.01$, ³ $P < 0.05$ vs model

多种机制保护神经细胞。

氰化物是 1 种神经毒性物质,而且某些神经细胞对其毒性特别敏感。有研究提出某些中枢神经退行性疾病也与氰化物有关。氰化物能够通过细胞凋亡或者坏死导致神经元死亡^[7]。Mills^[8]和 Kanthasamy^[9]研究证实氰化物作用 PC12 细胞导致过氧化物聚集和抗氧化酶被抑制。另一方面,由于神经细胞的能量来源主要来自糖代谢,当培养液中缺糖,糖供应不足,能量代谢耗竭,并最终导致钙超载,是促进细胞死亡的 1 个环节。

在实验中我们采用大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤克隆化的细胞株 PC12 代替神经细胞,原因在于 PC12 细胞能传代,培养方便,而且在很多方面具有和神经细胞相似的特征。

NaCN 及缺糖引起的 PC12 细胞损伤模型是常用的检测药物对神经细胞保护作用的模型之一。给药组细胞活力显著上升提示 TFH 具有神经保护活性。其作用机制尚需进一步研究。

缺氧能导致钙离子内流进入细胞,并使受伤的细胞器内储存的钙大量释放。钙离子浓度的上升导致细胞内钙超载,继而引起氧自由基损伤和因细胞死亡而释放的兴奋性氨基酸损伤。当细胞处于缺氧状态下, NMDA 刺激一氧化氮合酶(NOS)产生 NO,这反过来加剧细胞毒作用。因此由 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 诱导 PC12 细胞产生的缺氧损伤模型是进一步研究 TFH 对神经细胞损伤保护作用的理想模型。

在实验中,我们发现 TFH 对由 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 诱导 PC12 细胞产生的细胞缺氧损伤显示了显著的抑制作用,在 100、10 和 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度时对损伤细胞的保护指数分别为 86.8%、62.1% 和 26.5%。而钙通道阻滞剂尼莫地平(2 $\mu\text{mol}/\text{L}$)的保护指数为 50.2%。这提示 TFH 除了可能具有抑制钙超载的作用,还具有其它的机制抑制缺氧损伤。为了进一

步研究 TFH 是否具有抑制钙超载的活性,实验又采用了 KCl 诱导 PC12 细胞产生的钙超载损伤模型。

钙离子是 1 种广泛存在的胞内信使分子,它参与或控制了许多细胞的功能过程,包括细胞的生长、膜的兴奋性、突触的活动和细胞的死亡。它的细胞内浓度与它是否能有效控制信号传导密切相关。钙超载可以进一步在细胞内产生钙依赖性或由钙激活的酶,如磷脂酶 A_2 、NOS 和黄嘌呤氧化酶,并产生大量 NO 和氧自由基,直接损伤神经细胞并最终启动细胞凋亡。大部分的谷氨酸受体亚基被发现参与神经毒性过程,而这一机制是钙依赖性的^[10]。伴随着钙稳态的失衡,线粒体发生损伤。细胞内氧化应激的提升也一直被认为参与兴奋性毒性。线粒体内钙离子浓度的上升促进活性氧(ROS)的产生,在神经退行性疾病如帕金森病和 AD 等中 ROS 能介导细胞的死亡^[11]。

TFH 对 KCl 诱导的 PC12 细胞 Ca^{2+} 超载损伤显示明显的保护活性,并在高浓度情况下对细胞的保护作用强于尼莫地平。有报道 TFH 具有抗氧化、清除自由基的活性^[12]。因此我们推测 TFH 除了抑制钙超载,还能够通过多种不同机制保护神经细胞。

参考文献:

- [1] 宋萍. 沙棘中主要药效成分黄酮的提取研究. 青海医学院学报, 2004, 25(3): 174-176.
- [2] Gao X D, Ye W C, Yu A C, et al. Pulsatilloside A and anemoside A3 protect PC12 cells from apoptosis induced by sodium cyanide and glucose deprivation[J]. Planta Medica, 2003, 69(2): 171-174.
- [3] Abe K, Matsuki N. Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT[J]. Neurosci Res, 2000, 38(4): 325-329.
- [4] Kondo Y, Takano F, Hojo H. Inhibitory effect of bisbenzylisoquinolone alkaloids on nitric oxide production in activated macrophages[J]. Biochem Pharmacol, 1993, 46(11): 1887-1892.

(下转第 163 页)

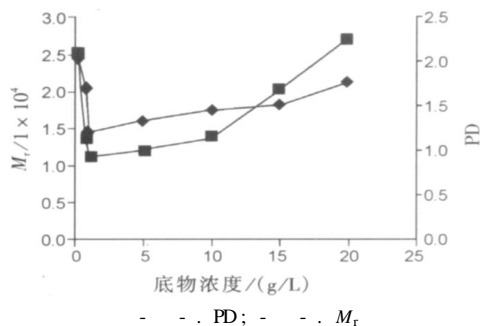


图 4 底物浓度对酶解反应的影响

Fig 4 Effect of HA concentration on hyaluronic acid hydrolysis catalyzed by HAase

于反应的进行。因此浓度应控制在 1~10 g/L,底物浓度选择 10 g/L。

3.1.5 酶解时间的影响 设定酶解温度为 50 ,酶用量为 150 000 /L,底物浓度为 1 g/L,反应液 pH 为 5.0,反应时间为 2,3,6,9,12,15 h 时产物 M_r 以及 PD 值见图 5。图 5 表明在酶解反应开始时, M_r 快速降低,随着酶解时间的增长降解速度减缓。由图 5 还可看出,控制反应时间可制得不同 M_r 的 HA。在该条件下反应 3 h 可制得 M_r 为 1×10^4 的 HA。

3.2 正交实验

在以上实验结果的基础上,以酶解温度、反应液的 pH 值、酶的用量、底物浓度和反应时间为正交因素进行实验设计,以所得产品的 M_r 大小为标准,从极差大小分析证实并确定,以上因素对 HAase 酶解 HA 的影响大小依次为:温度、pH 值、时间、底物浓度、

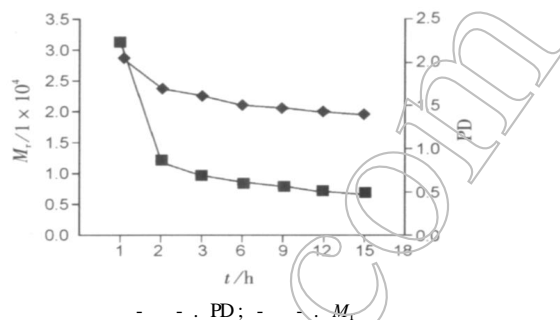


图 5 时间对酶解反应的影响

Fig 5 Effect of time on hyaluronic acid hydrolysis catalyzed by HAase

酶浓度。即采用这种方法制备 LMWHA 和 σ -HA 时,控制温度是十分重要的,pH 值、时间、底物浓度的影响次之,而酶的用量对降解效果影响更小些。

4 结论

温度、pH 值、时间、底物浓度、酶浓度等条件均影响 HAase 酶解 HA 所得产物的 M_r 和 PD 值,其中温度为主要影响因素,其他依次为 pH 值、时间、底物浓度、酶浓度。综合反应速率、生产成本等因素,合适的反应条件是:底物浓度为 10 g/L,酶浓度为 150 000 U/L,pH 为 5.0,反应温度为 50 ;如需制得 M_r 为 1×10^4 的 HA,酶解时间为 3 h。控制反应时间,可制得不同 M_r 的 HA。

参考文献:

- [1] 王彦厚,王凤山,郭学平.测定低分子量透明质酸相对分子质量的 3 种方法比较[J].中国生化药物杂志,2007,28(3):182-184.
- [9] Kanthasamy AG,Ardelt B,Malave A,et al. Reactive oxygen species generated by cyanide mediate toxicity in rat pheochromocytoma cells [J]. Toxicol Lett,1997,93(1):47-54.
- [10] Arundine M,Tymianski M. Molecular mechanisms of calcium dependent neurodegeneration in excitotoxicity [J]. Cell Calcium,2003,34(4-5):325-337.
- [11] Rego A C,Oliveira C R. Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in excitotoxicity and apoptosis: implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases [J]. Neurochem Res,2003,28(10):1563-1574.
- [12] 句海松,李小洁.沙棘总黄酮对活性氧自由基的清除作用[J].中国药理学通报,1990,6(2):97-100.

(上接第 160 页)

- [5] 杨军,何丽娜,何素冰.芍药苷对氯化钾及 N-甲基-D-门冬氨酸诱导的 PC12 细胞钙超载损伤的保护作用[J].中国新药杂志,2001,10(6):426-428.
- [6] 何丽娜,何素冰,杨军.丹参酮对氯化钾及 N-甲基-D-门冬氨酸诱导 PC12 细胞钙超载损伤的保护作用[J].中国现代应用药学杂志,2001,18(3):179-181.
- [7] Prabhakaran K,Li L,Borowitz J,et al. Cyanide induces different modes of death in cortical and mesencephalon cells [J]. J Pharmacol Exp Ther,2002,303(2):510-519.
- [8] Mills E M,Gunasekar P G,Pavlovic G,et al. Cyanide-induced apoptosis and oxidative stress in differentiated PC12 cells[J].J Neurochem,1996,67(3):1039-1046.