

· 药理学 ·

莪花酚对 H₂O₂ 和兴奋性神经递质诱导的大鼠皮层神经元细胞损伤的保护作用

叶 莉, 祝德秋, 叶显撑(上海市同济医院, 上海 200065)

[摘要] 目的 从中药祖师麻中发现有效的神经保护成分, 阐明其治疗神经退行性疾病的药效物质基础。方法 使用体外培养的大鼠皮层神经元细胞作为筛选系统, 综合运用各种色谱技术进行活性跟踪指导下的分离, 对发现的活性成分在体外细胞水平研究其神经保护机制。结果 我们发现中药祖师麻的甲醇提取物可显著地减轻由谷氨酸(L-glutamate)、海人藻酸(kainic acid, KA)和过氧化氢(H₂O₂)诱导的大鼠皮层神经元细胞损伤。从祖师麻中分离纯化了一系列化合物, 其中活性最强的是莪花酚(wikstromol)。莪花酚在 50 μM 的浓度下可显著地降低 H₂O₂ 诱导的细胞损伤。莪花酚显著地减少了细胞内谷胱甘肽、超氧化物歧化酶等抗氧化物质的下降, 并减轻由兴奋性神经递质(谷氨酸、海人藻酸)诱导的神经毒性损伤, 但不能减轻由 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)诱导的神经毒性损伤。结论 本研究确证了莪花酚可作为一种天然神经细胞保护剂, 推测其神经保护机制可能是通过抗氧化作用实现的。

[关键词] 莪花酚; 皮层神经元细胞; 过氧化氢; 谷氨酸; 海人藻酸; N-甲基-D-天冬氨酸

[中图分类号] R 285.5 [文献标志码] A [文章编号] 1006-0111(2010)03-0189-05

The protective effect of wikstromol on cultured cortical neurons induced by H₂O₂ and excitatory neurotransmitter

YE Li, ZHU De-qiu, YE Xian-cheng (Shanghai Tongji Hospital, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To identify the material basis of the novel neuroprotective compounds from traditional Chinese medicine *Daphne giraldii* in the treatment of neurodegenerative disorders. **Methods** Activity-guided fractionation of several chromatographic techniques were used for the isolation of the neuroprotective compounds. The cultured cortical neurons of rats were used as screening system. **Results** The methanolic extract from dried roots of *Daphne giraldii* significantly mitigated the neurotoxicity induced by L-glutamate, kainic acid and H₂O₂ in this screening system. The neuroprotective compound was identified as wikstromol. At a concentration of 50 μM, wikstromol significantly reduced neurotoxicity induced by H₂O₂. Wikstromol significantly reduced the decrease of glutathione, superoxide dismutase and other enzymes that participate in the cellular defense against oxidative stress. Furthermore, wikstromol alleviated neurotoxicity induced by the excitotoxic neurotransmitter, L-glutamate and kainic acid, but not that mediated by N-methyl-D-aspartate. **Conclusion** Wikstromol was demonstrated to be efficacious in protecting neurons from oxidative stress. The neuroprotective mechanism of wikstromol may due to its antioxidant effect.

[Key words] wikstromol; cortical cells; H₂O₂; glutamate; kainic acid; N-methyl-D-aspartate

在老年痴呆、帕金森病等很多中枢神经系统的神经退行性疾病过程以及脑缺血和老化过程中多伴有氧化损伤发生^[1-4]。大脑易受氧化损害可能与它耗氧率高、出现高水平的脂肪过氧化反应的底物——多不饱和脂肪酸、以及高反应性自由基有关。具有神经毒性的氧的形式包括过氧化氢(H₂O₂)、超氧阴离子(O₂^{·-})和羟基(OH[·])。最近有报告提示, 在老年痴呆中 H₂O₂ 可能介导 β-淀粉样蛋白诱

导的神经毒性^[5]。哺乳动物的大脑中存在细胞内抗氧化成分, 包括还原型谷胱甘肽(GSH)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-px)、过氧化氢酶和超氧化物歧化酶(SOD), 它们发挥抗氧化保护作用, 负责应对 H₂O₂ 蓄积, 减轻反应性氧造成的损伤^[6-7]。

很多中药在民间用于治疗多种神经退行性疾病。但是, 缺乏科学研究对这些中药进行系统的活性成分筛选。为了找到这些药物的活性成分, 我们建立了大鼠皮层神经元体外筛选模型, 用于研究缺血性损伤和由谷氨酸或氧自由基造成的直接损伤。在这一模型中, 神经元同下列物质共同孵育时会导

[作者简介] 叶 莉(1975-), 女, 药学本科, 学士, 药师。Tel (021) 66111239, E-mail ksszhot@yeah.net

致神经元损伤: ① L-谷氨酸; ② NMDA; ③ KA; ④ H₂O₂。

笔者对原代培养的大鼠皮层细胞的初步研究表明, 祖师麻甲醇提取物可以减轻 H₂O₂ 导致的氧化损伤, 然后利用色谱分析技术从祖师麻中分离并鉴定出神经保护成分莨菪酚。在培养的大鼠皮层细胞中, 莨菪酚可以显著降低 H₂O₂ 导致的神经毒性, 且莨菪酚还可以通过显著降低谷胱甘肽、超氧化物歧化酶、与谷胱甘肽通路有关的酶来保护皮层神经元。更令笔者感兴趣的是, 莨菪酚还通过对抗谷氨酸和 KA 介导的神经毒性来保护神经元细胞, 但其具体机制不明。

1 材料

DMEM, 胎牛血清和 Hank's 平衡盐溶液购自上海明睿生物技术有限公司。丙酮酸钠、青霉素、链霉素、胰蛋白酶、MTT、4-乙烯基吡啶购自 Sigma-Aldrich 公司。其它化学试剂购自上海国药集团化学试剂有限公司。

2 方法

2.1 神经保护成分的提取和分离 祖师麻药材用 80% 甲醇提取, 再用石油醚、氯仿、正丁醇依次萃取。氯仿层反复上色谱柱 (用 CHCl₃-MeOH 洗脱) 得到单体化合物, 化合物结构通过高分辨质谱和一维核磁共振 (¹H NMR, ¹³C NMR) 确定为莨菪酚 (wiktstromol)^[8], 结构式见图 1。HPLC 分析显示化合物纯度 > 98%。

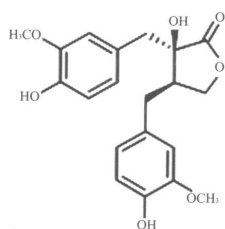


图 1 莨菪酚的结构

2.2 皮层细胞的培养 依据 Kim 报道的方法^[9], 包含神经胶质和神经元的混合皮层细胞取自 17~19 d 龄的胎鼠 (大鼠)。将皮层细胞以 1 × 10⁶ 个细胞 / ml 的密度置于覆盖有胶原蛋白的培养皿内, 培养液为 DMEM、10% 的热灭活的胎牛血清、1 mM 丙酮酸盐、双抗 (100 IU / ml 的青霉素和 100 mg / ml 的链霉素)。培养温度 37 °C, 95% 空气, 5% CO₂。预

实验显示, 皮层细胞培养少于 10 d 谷胱甘肽、超氧化物歧化酶和其他参与抗氧化损伤的酶还不够成熟; 培养超过 14 d 谷氨酸受体不能完全表达。因此, 实验中皮层细胞培养时间确定在 10~14 d。

2.3 神经毒性的评估 将莨菪酚溶解在 DMSO 中 (DMSO 在培养液中的最终浓度为 0.1%)。评估莨菪酚对抗 H₂O₂ 导致的氧化损伤的神经保护活性, 采用培养 10 d 的胎鼠皮层细胞, 将莨菪酚加入皮层细胞培养基, 预处理 1 h 然后暴露在 50 μM H₂O₂ 之下, 再维持 3 h。评估莨菪酚对抗兴奋性毒素 (L-谷氨酸、海人藻酸、NMDA) 导致的损伤, 采用的是培养 14 d 的皮层细胞, 将莨菪酚加入皮层细胞培养基, 预处理 1 h 再暴露于 50 μM L-谷氨酸 3 h 或 50 μM kainate 3 h 或 100 μM NMDA 15 min, 然后洗去兴奋性毒素。再将皮层细胞置于含有化合物的 DMEM 中 24 h。神经元的存活能力用 MTT 法测量, 该方法可反映线粒体酶的功能。化合物活性强度用实验组细胞与对照组细胞存活能力的比值表示。细胞存活能力的计算方法是 $OD(H_2O_2 + \text{莨菪酚处理组}) - OD(H_2O_2 \text{处理组}) / [OD(\text{空白对照组}) - OD(H_2O_2 \text{处理组})] \times 100$ 。

2.4 抗氧化酶的测定 处理结束的皮层细胞用超声裂解, 4 °C 3 000 g 离心 30 min。上清液由细胞质和线粒体组成, 可用于测定抗氧化酶活性。超氧化物歧化酶的活性用黄嘌呤 / 黄嘌呤氧化酶反应测定。在 200 ml 底物溶液 (0.2 mM 羟胺次黄嘌呤) 和蒸馏水中加入 200 ml 上清液, 在 37 °C 条件下, 同黄嘌呤氧化酶共同孵育 30 min, 加入含有 300 mg / ml 对氨基苯磺酸、5 mg / ml N-α-萘二胺和 16.7% 乙酸的试剂终止反应。在 550 nm 下测量吸光率。活性单位依照以人红细胞酶为标准的 SOD 标准曲线测定。

谷胱甘肽过氧化物酶在细胞上清液中的活性测定方法是: 通过氢过氧化异丙基苯计算被氧化的还原型谷胱甘肽 (GSH) 和氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 的比例, 这一反应是由谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-px) 催化的。这一测定方法以测量 340 nm 吸光度的减少量确定 NADPH 转化为 NADP。过氧化氢酶活性的测定根据 Beers 和 Sizet 建立的基于 H₂O₂ 分解的方法, 在装有磷酸盐缓冲液和 H₂O₂ 的试管中加入 200 ml 的上清液。在 240 nm 条件下记录分解率。1 个单位等于消耗 1 μmol H₂O₂ / (min · mg) 蛋白质。GSSG-R 的活性测定在 340 nm 的条件下进行, 以 GSSG-R 和 NADPH 导致的 GSSG 下降为基础。

2.5 GSH 和 MDA 的测定 GSH 的水平通过酶循环的方法用分光光度计测定。测定 GSSG 时, 首先通过与 4-乙烯吡啶反应从上清液中去除 GSH。

MDA 的测定通过改良的硫代巴比土酸法。光谱化学光度吸收的测定条件是 535 nm, MDA 的浓度根据 1, 1, 3, 3 氯化四乙铵标准曲线测定。

2.6 蛋白质测定 蛋白质含量通过 Lowry 报道的方法测定^[10], 以小牛血清白蛋白为标准。

2.7 统计学分析 数据评价采用 SPSS 计算机统计软件包进行, 方法为方差分析。统计学阳性结果的可信水平为 ≤ 0.05 。

3 结果

在浓度为 1~100 μM 时, 茛菪酚可以保护神经元抵抗 H_2O_2 导致的毒性损伤, 且其神经保护作用呈现较好的量效关系(图 2)。在浓度为 50 μM 时, 茛菪酚最为有效。

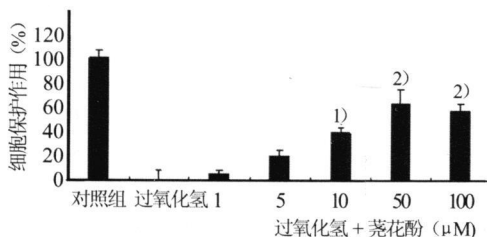


图 2 不同浓度的茛菪酚对 H_2O_2 损伤的原代培养的大鼠皮层神经元细胞存活率的影响

¹⁾ $P < 0.05$ ²⁾ $P < 0.01$

茛菪酚可显著提高 SOD、过氧化氢酶和 GSH-px 的活性。SOD 的结果为 (单位 mU/mL): 对照组 50.2 ± 4.1 ; H_2O_2 处理组: 20.5 ± 3.1 ; H_2O_2 + 茛菪酚组 32.8 ± 3.2 $P < 0.01$; $n = 3$ 。过氧化氢酶的结果为 (单位为 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ consumed / (min \cdot mg) protein): 对照组 39.2 ± 4.2 H_2O_2 处理组 19.1 ± 5.1 ; H_2O_2 + 茛菪酚组 28.5 ± 2.1 ; $P < 0.01$; $n = 3$ 。GSH-px 的结果为 [单位为 $\mu\text{mol NADPH}$ consumed / (min \cdot mg) protein]: 对照组 17.0 ± 2.7 H_2O_2 处理组 7.2 ± 0.9 H_2O_2 + 茛菪酚组 10.3 ± 0.5 $P < 0.05$ $n = 3$ 。但是, 茛菪酚对 GSSG-R 的活性没有保护作用 (数据略)。

另外, 在 50 μM 的浓度下, 茛菪酚可以显著提升 GSH 的水平, 并降低 H_2O_2 损伤的皮层细胞中生成 MDA 的水平。GSH 测定结果为 (单位 mol/mg protein): 对照组 6.7 ± 0.9 ; H_2O_2 处理组 1.9 ± 0.5 ; H_2O_2 + 茛菪酚组 3.4 ± 0.4 $P < 0.05$ $n = 3$ 。MDA 测定结果为 (单位 mol/mg protein): 对照组 70.4 ± 5.4 H_2O_2 处理组 180.4 ± 4.3 ; H_2O_2 + 茛菪酚组: 114.2 ± 11.2 $P < 0.01$; $n = 3$ 。

我们还通过实验测定了茛菪酚化合物本身的抗氧化强度。结果发现茛菪酚在体外可以显著清除过

氧化氢。在没有细胞的培养物中, 将 H_2O_2 (50 μM) 直接与茛菪酚 (50 μM) 反应 1 h, 利用过氧化氢酶测试, 结果 H_2O_2 的浓度下降 40%。

茛菪酚显著保护皮层细胞不受谷氨酸的神经毒性损伤, 实验结果显示茛菪酚可以对抗由海人藻酸诱导的神经元损伤, 但不能应对由 NMDA 导致的神经元损伤(图 3)。

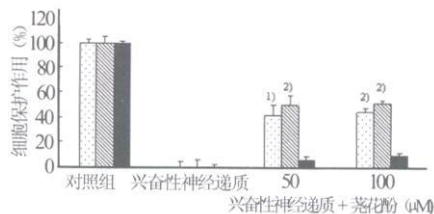


图 3 不同浓度的茛菪酚对谷氨酸、海人藻酸和 NMDA 损伤的原代培养的大鼠皮层神经细胞存活率的影响

¹⁾ $P < 0.05$; ²⁾ $P < 0.01$ 。

□ 谷氨酸 □ 海人藻酸 ■ N-甲基-D-天冬氨酸

4 讨论

笔者以前曾利用原代培养大鼠皮层细胞, 进行体外测定的方法从天然产物中分离具有对抗氧化损伤、发挥神经保护作用的化合物。神经保护活性最初是通过评估经过 H_2O_2 处理后培养的皮层细胞神经元的存活率来确定的。初步研究中通过相差显微镜检查, 笔者观察到在没有神经保护性化合物的情况下, 暴露在 50 μM H_2O_2 3 h 后, 95% 的皮层神经元都已死亡, 而非神经元细胞的存活率则不受影响。预实验表明, 祖师麻的甲醇提取物可以减轻 H_2O_2 导致的氧化损伤。利用色谱分析技术, 进一步对祖师麻的甲醇提取物进行活性指导下的分离, 发现了具有神经保护作用的化合物茛菪酚。本研究显示, 从祖师麻中分离出的茛菪酚可以保护培养的神经元, 降低 H_2O_2 和谷氨酸对其造成的损伤, 提高神经元存活率。

H_2O_2 是著名的细胞毒素, 具有很强的透膜能力。因为大脑的氧利用度很高, 而且神经系统的细胞内含有大量的多不饱和脂肪酸, 所以中枢神经系统神经元特别容易受到氧化损伤。但是, 大脑在细胞内也有对氧化损伤的防御系统。该系统包括几种高活性的抗氧化物质 (例如 GSH) 和抗氧化酶 (例如过氧化氢酶, SOD, GSH-px 和 GSSG-R)。GSH 和 GSH-px 在清除大脑内过多 H_2O_2 中发挥重要作用^[6-11]。有研究表明星型胶质细胞含有高浓度的 GSH 和抗氧化酶, 提示星型胶质细胞可能保护神经元不受氧化损伤^[12-13]。我们的研究显示, 茛菪酚可

以保护皮层神经元,使受 H₂O₂ 损伤的皮层神经元的还原型谷胱甘肽水平和抗氧化酶的活性不会明显下降。因为笔者使用的皮层培养物中既含有神经元,也含有胶质细胞,所以无法确定莪花酚是否直接提高了神经元的抗氧化损伤活性,推测莪花酚的抗氧化损伤作用可能部分是由星形胶质细胞介导的。

脑缺血、癫痫、创伤、痉挛和一些神经退行性疾病中发生神经元凋亡,都有谷氨酸的神经毒性的作用。谷氨酸神经毒性的急性表现形式是由 Na⁺ 和 K⁺ 进入神经元引起细胞肿胀以至死亡。由 NMDA/AMPA 海人藻酸等激动剂导致的迟发性神经元退行性病变是 Ca²⁺ 依赖性的,要求短时暴露在高浓度的 Ca²⁺ 或长时间暴露在低浓度的 Ca²⁺。还有几种信号通路也参与了谷氨酸诱导的神经元凋亡,例如花生四烯酸以及超氧化物阴离子 (O₂^{•-})、羟基 (OH[•]) 和 H₂O₂ 等氧自由基的释放。这为进一步莪花酚抗谷氨酸诱导的神经元损伤作用的机制提供了思路。

现在,莪花酚细胞内和分子水平的作用机制还不完全清楚。但是,结果显示该化合物对培养的皮层神经元具有显著地神经保护作用,该作用至少部分是通过抗氧化作用实现的。天然产物可以减轻 H₂O₂ 或谷氨酸导致的神经毒性,这可能会为治疗氧化损伤导致的神经退行性疾病提供一个有用的治疗方向。

【参考文献】

[1] Choi DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system [J]. *Neuron*, 1988, 1: 623
 [2] Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neuro-

degenerative disorders [J]. *Science*, 1993, 262: 689
 [3] Halliwell B, Gutteridge MC, Cross CE, et al. Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now? [J]. *J Lab Clin Med*, 1992, 119: 598.
 [4] Markesbery WR. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease [J]. *Free Rad Biol Med*, 1997, 23: 134.
 [5] Behl C, Davis JB, Lesly R, et al. Hydrogen peroxide mediates amyloid protein toxicity [J]. *Cell*, 1994, 77: 817.
 [6] Sampath D, Jackson GR, WembaodrPerez K, et al. Effects of nerve growth factor on glutathione peroxidase and catalase in PC12 cells [J]. *J Neurochem*, 1994, 62: 2476
 [7] Spina MS, Squinto SP, Miller J, et al. Brain derived neurotrophic factor protects dopaminergic neurons against 6-hydroxydopamine and N-methyl-4-phenylpyridinium ion toxicity: involvement of the glutathione system [J]. *J Neurochem*, 1992, 59: 99
 [8] Torrance SJ, Hoffmann JJ, Cole JR, Wikstrom ol. Antiumor lignan from *Wikstroem in foetida* var. *oahuensis* gray and *Wikstroem in uvarunsi* gray (thymelaeaceae) [J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2006, 68(5): 664.
 [9] Kim YC, Kim SR, Makebnis GJ, et al. Ginsenosides Rb1 and Rg3 protect cultured rat cortical cells from glutamate induced neurodegeneration [J]. *J Neurosci Res*, 1998, 53: 426.
 [10] Lowry O, Rosebrough H, Farr A, et al. Protein measurement with Folin phenol reagent [J]. *J Biol Chem*, 1951, 193: 265.
 [11] Pan Z, Perez-Pob R. Role of nerve growth factor in oxidant homeostasis: glutathione metabolism [J]. *J Neurochem*, 1993, 61: 1713
 [12] Desagher S, Glowinski J, Premont J. Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity [J]. *J Neurosci*, 1996, 16: 2553
 [13] Raps SP, Lai JCK, Hertz L, et al. Glutathione is present in high concentrations in cultured astrocytes but not in cultured neurons [J]. *Brain Res*, 1989, 493: 398.

[收稿日期] 2009-12-21

[修回日期] 2010-03-15

《药学实践杂志》2010年第 3期继续教育试题答题卡

姓名	科别	职称
邮编	电话	
工作单位		
◀ 试题 1 A ○ B ○ C ○ D ○ E ○	◀ 试题 2 A ○ B ○ C ○ D ○ E ○	
◀ 试题 3 A ○ B ○ C ○ D ○ E ○	◀ 试题 4 A ○ B ○ C ○ D ○ E ○	
◀ 试题 5 A ○ B ○ C ○ D ○ E ○	◀ 试题 6 A ○ B ○ C ○ D ○ E ○	
◀ 试题 7 A ○ B ○ C ○ D ○ E ○	◀ 试题 8 A ○ B ○ C ○ D ○ E ○	
◀ 试题 9 A ○ B ○ C ○ D ○ E ○	◀ 试题 10 A ○ B ○ C ○ D ○ E ○	
◀ 试题 11 A ○ B ○ C ○ D ○ E ○	◀ 试题 12 A ○ B ○ C ○ D ○ E ○	
◀ 试题 13 A ○ B ○ C ○ D ○ E ○	◀ 试题 14 A ○ B ○ C ○ D ○ E ○	
◀ 试题 15 A ○ B ○ C ○ D ○ E ○	◀ 试题 16 A ○ B ○ C ○ D ○ E ○	
◀ 试题 17 A ○ B ○ C ○ D ○ E ○	◀ 试题 18 A ○ B ○ C ○ D ○ E ○	

注: ①请将正确的答案用 2B 铅笔涂黑 ②答题卡复印有效

③回函地址: 上海市国和路 325号药学实践杂志编辑部收 (200433)