

丹皮酚拮抗过氧亚硝基阴离子致大鼠成骨细胞凋亡的作用

齐锦生¹, 王 辉¹, 牛 涛², 张秉山², 张晓琳¹

(1. 河北医科大学 生物化学与分子生物学教研室, 河北 石家庄 050017; 2. 石家庄市第二医院 外科, 河北 石家庄 050051)

摘 要:目的 探讨丹皮酚拮抗过氧亚硝基阴离子 (ONOO^-) 对体外培养大鼠成骨细胞凋亡的作用。方法 用改良的组织块法分离培养新生大鼠颅骨成骨细胞, 采用淬灭流动反应方法体外制备 ONOO^- , 以 1 mmol/L 终浓度加入成骨细胞培养体系, 作用 30 min 后弃去, 继续常规培养 12 h, 用 Hoechst33258 染色法及 TUNEL 法检测成骨细胞的凋亡, 并以 0.1 mmol/L 丹皮酚消除 ONOO^- (1 mmol/L) 对大鼠成骨细胞凋亡的影响。结果 1 mmol/L 的 ONOO^- 可导致大鼠成骨细胞凋亡; 0.1 mmol/L 丹皮酚能拮抗 ONOO^- (1 mmol/L) 所引起的大鼠成骨细胞凋亡。结论 丹皮酚 0.1 mmol/L 在体外具有拮抗 ONOO^- (1 mmol/L) 致大鼠成骨细胞凋亡的作用。

关键词:丹皮酚; 过氧亚硝基阴离子; 成骨细胞; 细胞凋亡

中图分类号:R285.5 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2006)05-0731-04

Antagonizing effect of paeonol on peroxynitrite-induced rat osteoblast apoptosis

QI Jin-sheng¹, WANG Hui¹, NIU Tao², ZHANG Bing-shan², ZHANG Xiao-lin¹

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China;

2. Department of Surgery, The Second Hospital of Shijiazhuang City, Shijiazhuang 050051, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of paeonol antagonizing peroxynitrite (ONOO^-) on osteoblast apoptosis of rat *in vitro*. **Methods** Osteoblasts of newly born rat's skull were separated and cultured by tissue mass method. ONOO^- was produced by chemical synthesis with a quenched flow reactor. ONOO^- at 1 mmol/L concentration was added to cultured osteoblast system *in vitro*. After incubated for 30 min, osteoblasts were continued to be cultured for 12 h with routine method. Hoechst33258 stain and TUNEL method were used to detect the osteoblast apoptosis and 0.1 mmol/L concentration of paeonol was used to eliminate the effect of ONOO^- (1 mmol/L) on osteoblast apoptosis of rat. **Results** ONOO^- (1 mmol/L) could lead to rat osteoblast apoptosis. Paeonol of 0.1 mmol/L concentration could antagonize rat osteoblast apoptosis induced by ONOO^- (1 mmol/L). **Conclusion** Paeonol (0.1 mmol/L) has the significant antagonizing effect on ONOO^- of rat osteoblast apoptosis *in vitro*.

Key words: paeonol; peroxynitrite; osteoblast; apoptosis

牡丹皮为毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的粗皮。具有清热凉血、活血行瘀之功效。丹皮酚是牡丹皮及萝藦科植物徐长卿 *Cynanchum paniculatum* (Bunge) Kitag. 的主要活性成分, 具有多方面的药理作用。有研究表明丹皮酚具有较强的抗氧化能力^[1], 而过氧亚硝基阴离子 (ONOO^-) 是已知的氧化作用最强的一类物质^[2], 参与多种严重疾病基本病理过程^[3]。已有文献报道, ONOO^- 能导致成骨细胞凋亡^[4]。目前已寻找到 ebselen、guani-dinoethyldisulfide (GED)、urate 等几种 ONOO^- 清除剂, 用于 ONOO^- 介导的多种疾病的防治研究^[5~7]。但丹皮酚是否能够作为 ONOO^- 清除剂, 拮

抗 ONOO^- 所致成骨细胞凋亡的作用未见报道。本实验从细胞水平探讨丹皮酚拮抗 ONOO^- 致大鼠成骨细胞凋亡的作用, 对深入研究丹皮酚的药理作用具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物: 出生 24 h 内新生 SD 乳鼠, 由同济医科大学实验动物学部提供 (动物合格证书: 动物字第 19-020 号)。

1.2 药物与试剂: 丹皮酚 (中国药品生物制品检定所, 批号 0708-9704), ONOO^- (本室合成), DMEM 培养基 (Gibco), 胰蛋白酶 (Gibco), 胶原酶 II (Gibco), Hoechst33258 (Sigma), TUNEL 试剂盒

收稿日期: 2005-09-20

基金项目: 河北省卫生厅医学科学重点资助项目 (04062); 河北省教育厅博士基金资助项目 (B2004122); 石家庄市科技攻关项目 (04146173A); 河北医科大学博士基金资助项目 (040028)

作者简介: 齐锦生 (1960—), 男, 河北医科大学生物化学与分子生物学教研室副主任, 中西医结合研究所糖尿病室主任, 教授, 博士, 硕士生导师, 中国中西医结合学会青年工作委员会委员, 中华教育艺术研究会理事, 主要从事糖尿病及其并发症的中医药防治。
Tel: (0311) 86265639 E-mail: qijinsheng777@163.com

(华美生物技术有限公司), DAB (中山生物技术有限公司), 其余试剂均为国产分析纯。

1.3 ONOO^- 的合成: ONOO^- 采用淬灭流动反应方法合成^[8]。合成的 ONOO^- 用日本岛津公司产 UV—2201 型紫外分光光度计检测, 可见在 302 nm 处有典型的吸收峰, 煮沸 10 min 后 302 nm 处吸收峰消失, 符合文献报道的 ONOO^- 吸收光谱特征^[9]。

1.4 成骨细胞的培养: 无菌条件下, 取 24 h 内新生 SD 乳鼠颅盖骨, 用平衡盐溶液冲洗数次后, 在 0.25% 胰蛋白酶溶液中消化 15 min, 剔除骨表面被膜及软组织。用 D-Hank's 液冲洗数次, 剪成 1~3 mm³ 大小的骨片。将骨片移到 0.1% 胶原酶 I 中, 室温振荡消化 45 min 后, 弃去消化液, 用 D-Hank's 液冲洗数次。将消化后骨片移入 100 mL 培养瓶中, 按组织块法进行培养^[10]。

1.5 Hoechst33258 染色法检测丹皮酚拮抗 ONOO^- 致成骨细胞凋亡的作用: 细胞传至 5~7 代时, 用胰蛋白酶消化后, 用含 10% FBS 的 DMEM 培养基调细胞浓度为 $3 \times 10^4/\text{mL}$, 在 6 孔板 (每孔内加一盖玻片, 以备细胞攀爬) 中分别加入 3 mL 培养液, 待成骨细胞 70% 融合后, 弃去原培养液, 然后在 6 孔板中, 从左至右每竖排两孔为一组, 分别加入 1 mmol/L ONOO^- 液、丹皮酚 (0.1 mmol/L) + ONOO^- (1 mmol/L) 混合液、10% FBS-DMEM 液 (丹皮酚和 ONOO^- 的溶液浓度根据前期工作^[11,12] 和预试验结果确定, 可较好观察 ONOO^- 致成骨细胞凋亡及丹皮酚的拮抗效果, 且单加丹皮酚对成骨细胞无明显影响), 每孔 3 mL, 作用 30 min 后弃去, 再于每孔中分别加入含 10% FBS 的 DMEM 液 3 mL, 作用 12 h 后, 按 Hoechst33258 染色法常规操作, 进行 Hoechst 荧光染色, 观察 ONOO^- 致成骨细胞凋亡作用及丹皮酚的保护作用, 并与正常组比较。每个培养成骨细胞的盖玻片上, 任选 10 个视野计数固缩核和细胞核总数来计算细胞凋亡率。实验采用双复孔, 共 3 批次。

细胞凋亡率 = 固缩核数 / 细胞核总数 $\times 100\%$

1.6 TUNEL 法检测丹皮酚拮抗 ONOO^- 致成骨细胞凋亡的作用: 细胞培养及影响因素同 1.5 项。取出培养成骨细胞的盖玻片, PBS 洗两次, 4% 多聚甲醛固定 30 min, 其余步骤按照 TUNEL 试剂盒说明书进行操作, 每一样品均设立阴性对照, 即不加关键的 TdT 酶, DAB 显色, 细胞核内出现棕黄色颗粒为染色阳性细胞即凋亡阳性细胞。每张片随机选取 10 个高倍视野 ($\times 400$), 计数凋亡细胞数, 最后取 10

个视野的平均数。记录凋亡细胞数和未凋亡细胞数, 并计算细胞凋亡率, 观察 ONOO^- 对成骨细胞凋亡的影响及丹皮酚的保护作用, 并与正常组比较。实验采用双复孔, 共 3 批次。

1.7 统计学处理: 计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 比较, 组间比较均采用两样本均数 t 检验。所有数据均通过 SAS6.12 统计分析软件进行分析。

2 结果

2.1 Hoechst33258 染色法检测结果: 在荧光显微镜下 (激发光波长 340 nm), 活细胞核呈弥散均匀荧光, 细胞凋亡时, 细胞核或细胞质内可见浓染致密的颗粒块状荧光, 呈现出细胞凋亡的典型变化, 见到 3 个或 3 个以上的 DNA 荧光碎片。 ONOO^- (1 mmol/L) 组和丹皮酚 (0.1 mmol/L) + ONOO^- (1 mmol/L) 组均可见 3 个或 3 个以上的 DNA 荧光碎片, 表明成骨细胞发生凋亡, 但丹皮酚 (0.1 mmol/L) + ONOO^- (1 mmol/L) 组发生的凋亡细胞数显著少于 ONOO^- (1 mmol/L) 组, 正常组偶见 DNA 荧光碎片。提示 ONOO^- (1 mmol/L) 可致细胞凋亡, 丹皮酚 (0.1 mmol/L) 对其致细胞凋亡有较强的抑制作用, 见表 1。

2.2 TUNEL 法分析结果表明, ONOO^- (1 mmol/L) 组细胞着色率明显高于正常对照组, 丹皮酚 (0.1 mmol/L) + ONOO^- (1 mmol/L) 组介于两组之间, 提示 ONOO^- (1 mmol/L) 可致细胞凋亡, 丹皮酚 (0.1 mmol/L) 对其有较强的抑制作用, 见表 1 和图 1。

表 1 各组大鼠成骨细胞凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=30$)

Table 1 Comparison of osteoblast apoptotic rate of rats in every groups ($\bar{x} \pm s$, $n=30$)

组别	剂量/ (mmol · L ⁻¹)	细胞凋亡率/%	
		Hoechst33258 法	TUNEL 法
正常	—	2.22 ± 0.53	1.98 ± 0.45
ONOO^-	1	62.27 ± 5.12 ***	68.87 ± 6.24 ***
丹皮酚 + ONOO^-	0.1+1	15.78 ± 2.97 ***△△△	17.12 ± 2.27 ***△△△

与正常组比较: *** $P < 0.001$

与 ONOO^- 组比较: △△△ $P < 0.001$

*** $P < 0.001$ vs normal group

△△△ $P < 0.001$ vs ONOO^- group

3 讨论

糖尿病骨质疏松是继发性骨质疏松发病率最高的一型。也是糖尿病严重慢性并发症在骨骼上的特征性病变, 其组织学机制主要是由于骨重建负平衡所致。成骨细胞的过度凋亡导致骨形成减少, 可引发骨质疏松^[13]。

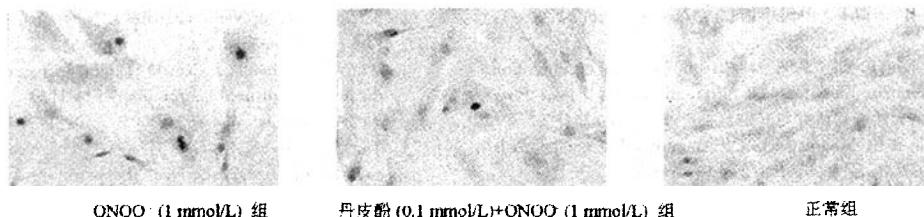


图 1 TUNEL 法对凋亡成骨细胞的分析

Fig. 1 TUNEL Analysis of apoptotic osteoblast

过氧亚硝基阴离子 (ONOO^-) 及其高能态衍生物是目前已知的氧化作用最强的一类物质,构成了氧化应激损伤新机制的物质基础。已有相当多的证据表明:氧化应激在糖尿病慢性并发症发病中起关键作用^[14]。大量的 ONOO^- 造成成骨细胞结构破坏、细胞死亡或功能障碍,可能是导致糖尿病骨质疏松的重要原因之一。迄今为止,在机体内尚未发现有清除 ONOO^- 的特异性酶。应用 ONOO^- 的清除剂 GED 可使糖尿病大鼠的发病率从 80% 降至 17%;发病时间推迟 10 周^[15]。为此从中药中筛选具有强抗氧化能力的中药,尤其是有拮抗 ONOO^- 作用的中药,对防治糖尿病严重慢性并发症有广阔的应用前景。

药物对氧化应激的保护作用通常主要通过直接捕获氧自由基来减轻细胞损伤,或者通过提高应激情况下细胞内抗氧化酶的活性,对抗氧自由基损伤^[16]。已有资料证明,丹皮酚对 Fenton 反应生成的 $\cdot\text{OH}$ 有明显清除作用,其清除活性高于 $\cdot\text{OH}$ 特异性清除剂甘露醇^[17];研究表明丹皮酚对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 有直接清除作用^[18]。以丹皮酚的化学结构分析,因其含有酚性羟基,易与氧原子不对称的单电子相互作用氧化形成醌类物质,使自由基能量下降,因而有效地保护细胞膜和线粒体膜中不饱和脂肪酸的过氧化,维持膜完整性和功能。本课题组已对丹皮酚在成骨细胞增殖与分化方面做过初步探讨^[11,12]。本实验在细胞凋亡水平上加以研究,并应用丹皮酚为干预因素,旨在为中药防治糖尿病严重慢性并发症提供实验依据。

Hoechst33258 是目前最常用的、无毒、水溶性、特异的 DNA 荧光染料,与 A-T 键结合,这种染液对凋亡细胞核呈强亮的蓝色荧光,坏死细胞不被染色,正常细胞仅呈微弱荧光。TUNEL 是分子生物学与形态学相结合的研究方法,也是一种对凋亡晚期检测效果较好方法,能准确地反映细胞凋亡最典型的生物化学和形态学特征及凋亡在组织中的分布情况,并可检测出极少量的凋亡细胞,灵敏度较高。本

实验采用两种方法检测,结果更可靠。

本实验结果显示: ONOO^- (1 mmol/L) 能导致成骨细胞凋亡,丹皮酚 (0.1 mmol/L) 能拮抗 ONOO^- (1 mmol/L) 所引起的大鼠成骨细胞凋亡。丹皮酚作为植物药的一种单体成分,具有很强的抗氧化效果及消除 ONOO^- 作用,在防治糖尿病严重慢性并发症方面,极具应用价值,其作用机制需进一步研究。

References:

- [1] Xie Y F, Long S J. The effects of five Chinese drugs injection on lipid peroxidation and active oxygen radicals [J]. *Strait Pharm J* (海峡药学), 1999, 11(3): 29-30.
- [2] Czapski G, Goldstein S. The role of the reaction of NO with superoxide and oxygen in biological system: A kinetics approach [J]. *Free Radic Biol Med*, 1995, 19(6): 785-794.
- [3] Esberg L B, Ren J. Role of nitric oxide, tetrahydrobiopterin and peroxynitrite in glucose toxicity-associated contractile dysfunction in ventricular myocytes [J]. *Diabetologia*, 2003, 46(10): 1419-1427.
- [4] Kelpke S S, Reiff D, Prince C W, et al. Acidic fibroblast growth factor signaling inhibits peroxynitrite-induced death of osteoblasts and osteoblast precursors [J]. *J Bone Miner Res*, 2001, 16(10): 1917-1925.
- [5] Chander P N, Gealekman O, Brodsky S V, et al. Nephropathy in Zucker diabetic fat rat is associated with oxidative and nitrosative stress: prevention by chronic therapy with a peroxynitrite scavenger ebselen [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15(9): 2391-2403.
- [6] Mabley J G, Southan G J, Salzman A L, et al. The combined inducible nitric oxide synthase inhibitor and free radical scavenger guanidinoethyldisulfide prevents multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes *in vivo* and interleukin-1 β -induced suppression of islet insulin secretion *in vitro*. [J]. *Pancreas*, 2004, 28(2): 39-44.
- [7] Robinson K M, Morre J T, Beckman J S. Triuret: a novel product of peroxynitrite-mediated oxidation of urate [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2004, 423(1): 213-217.
- [8] Beckman J S, Beckman T W, Chen J, et al. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implication for endothelial injury from nitric oxide and superoxide [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(4): 1620-1624.
- [9] Hughes M N, Nicklin H G. The chemistry of pernitrites. Kinetics of decomposition of pernitrous acid [J]. *J Chem Soc (A)*, 1968, 450-452.
- [10] SiTu Z Q, Wu J Z. *Cell Culture* (细胞培养) [M]. Beijing: The World Books Publishing House, 1996.
- [11] Qi J S, Li E, Wang F. Effect of paeonol on inhibition of peroxynitrite on osteoblast proliferation [J]. *Chin J Integr Tra-*

- dit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 2003, 23(2): 132-134.
- [12] Xiao H, Niu T, Qi J S, *et al.* Effect of paeonol on inhibition of peroxynitrite on osteoblast differentiation [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2005, 17(6): 754-757.
- [13] Weinstein R S, Manolagas S C. Apoptosis and osteoporosis [J]. *Am J Med*, 2000, 108(2): 153-164.
- [14] Davi G, Falco A, Patrono C. Lipid peroxidation in diabetes mellitus [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2005, 7(1-2): 256-268.
- [15] Suarez-Pinzon W L, Mabley J G, Strynadka K, *et al.* An inhibitor of inducible nitric oxide synthase and scavenger of peroxynitrite prevents diabetes development in NOD mice [J]. *J Autoimmun*, 2001, 16: 449-455.
- [16] Wang Z J, Chen H Z, Xue Q S, *et al.* Effect of panaxynol on rat primary cultured neuron injured by H₂O₂ [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(1): 72-75.
- [17] Tan Y H, He X L, Gao J, *et al.* The clearance effect of eugenol on oxygen-derived free radicals [J]. *Northwest Pharm J* (西北药学杂志), 1996, 11(1): 30.
- [18] Mong S, Zhang Z N. The experimental study on anti-oxidative effect of effective component of the traditional Chinese medicine [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 1992, 8(5): 326.

萌动激活灵芝孢子促进大鼠受损伤的脊髓运动神经元轴突再生的作用

张 伟¹, 曾园山^{1*}, 陈小君², 陈穗君¹, 钟志强¹

(1. 中山大学中山医学院 组织胚胎学教研室神经科学教研室, 广东 广州 510080;

2. 中山大学 肿瘤防治中心肿瘤研究所, 广东 广州 510089)

摘要:目的 探讨萌动激活灵芝孢子对大鼠坐骨神经切断再吻合后受损伤运动神经元轴突再生的影响。方法 对单侧坐骨神经切断再吻合后的大鼠 ig 给予萌动激活灵芝孢子, 通过电生理、荧光金 (FG) 逆行标记和组织学等方法观察受损伤运动神经元轴突再生情况。结果 坐骨神经切断再吻合 6 周后, 灵芝孢子组坐骨神经再生轴突的动作电位潜伏期及峰峰值的恢复率以及运动神经元胞体的荧光金逆行标记率均明显高于对照组, 灵芝孢子组大鼠腓肠肌萎缩程度也轻于对照组。结论 萌动激活灵芝孢子能够促进大鼠坐骨神经切断再吻合后的脊髓受损伤运动神经元轴突再生。

关键词:萌动激活灵芝孢子; 运动神经元; 轴突再生; 坐骨神经切断再吻合

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2006)05-0734-04

Effect of germination-activated *Ganoderma* spores on axonal regeneration of injured motor neurons in rat spinal cord

ZHANG Wei¹, ZENG Yuan-shan¹, CHEN Xiao-jun², CHEN Sui-jun¹, ZHONG Zhi-qiang¹

(1. Division of Neurosciences, Department of Histology and Embryology, Zhongshan Medical College, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Cancer Research Institute, Center of Cancer Prevention, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510089, China)

Abstract: **Objective** To explore the effects of germination-activated *Ganoderma* spore (GASP) on axonal regeneration of injured motor neuron in rat spinal cord following sciatic nerve cut and anastomosis. **Methods** Rat was ig administered by GASP after the sciatic nerve was cut and anastomosed unilaterally and the axonal regeneration of injured motor neuron was observed by electrophysiology, Fluorogold (FG) retrograde labeling, and histologic techniques. **Results** After six weeks of sciatic nerve cut and anastomosis, the recovery ratio of latency and amplitude of action potential of regenerated axon at sciatic nerve and the ratio of FG-retrograde labeled motor neuronal soma in GASP group were all higher than those in control group. The gastrocnemius atrophy degree in GASP group was also lower than that in control group. **Conclusion** GASP can promote the axonal regeneration of injured motor neuron in rat spinal cord following sciatic nerve cut and anastomosis.

Key words: germination-activated *Ganoderma* spore; motor neuron; axonal regeneration; sciatic nerve cut and anastomosis

祖国传统中药用于周围神经损伤的研究由来已久, 人参、黄芪和当归等均有促进周围神经再生的作