

褐藻多糖硫酸酯对 H_2O_2 诱导皮层神经元氧化应激损伤保护作用

郭宏举, 史 宁, 陈 乾, 马天翔, 潘敏翔, 吴久鸿*

解放军第 306 医院药学部, 北京 100101

摘 要: 目的 研究褐藻多糖硫酸酯对 H_2O_2 诱导小鼠皮层神经元氧化损伤的保护作用, 并探讨其作用机制。方法 以含有 B-27 的 Neurobasal 培养基无血清体外原代培养新生小鼠大脑皮层神经元, H_2O_2 (50 $\mu\text{mol/L}$) 诱导氧化应激损伤模型, MTT 法检测不同质量浓度 (0.01、0.1、1 g/L) 褐藻多糖硫酸酯对细胞存活的影响, 生化法测定乳酸脱氢酶 (LDH) 释放量和丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD) 的活性。结果 与 H_2O_2 处理组比较, 0.1、1 g/L 褐藻多糖硫酸酯能显著提高 H_2O_2 诱导损伤皮层神经元的存活率 ($P < 0.05$), 并且降低培养液中 LDH 的漏出量, 抑制细胞内 MDA 的生成, 提高细胞内 SOD 的活性。结论 褐藻多糖硫酸酯对 H_2O_2 损伤皮层神经元具有显著的保护作用, 其机制与抗氧化作用有关。

关键词: 褐藻多糖硫酸酯; 氧化应激; 抗氧化; 神经保护作用; 神经元

中图分类号: R285.51 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)05-0962-03

Neuroprotection of fucoidan against H_2O_2 -induced oxidative stress injury in primary cortical neurons

GUO Hong-ju, SHI Ning, CHEN Qian, MA Tian-xiang, PAN Min-xiang, WU Jiu-hong

Department of Pharmacy, The 306 Hospital of PLA, Beijing 100101, China

Key words: fucoidan; oxidative stress; anti-oxidation; neuroprotection; neurons

褐藻多糖硫酸酯 (fucoidan) 是从海带、昆布等藻类中提取的一类硫酸多糖, 主要由岩藻糖和硫酸基组成。大量研究已证实褐藻多糖硫酸酯具有抗肿瘤、抗病毒、调节免疫等多种生物活性^[1]。在体和离体实验也表明, 褐藻多糖硫酸酯还表现出明显的抗氧化活性^[2], 特别对超氧阴离子具有良好的清除作用; 其在多种模型所致的帕金森病细胞和动物模型中也有明显的神经保护作用^[3]; 对 H_2O_2 刺激 dPC12 细胞模拟的高氧化损伤导致神经元凋亡的 AD 模型^[4]也具有良好的神经保护作用, 提示褐藻多糖硫酸酯可作用于神经系统, 并发挥神经保护作用。但目前关于褐藻多糖硫酸酯对中枢系统皮层神经元保护作用的研究未见报道。本研究采用 H_2O_2 的氧化作用建立体外培养小鼠大脑皮层神经元氧化损伤模型, 观察褐藻多糖硫酸酯对 H_2O_2 所致皮层神经元损伤的保护作用, 并探讨其可能的作用机制。

1 材料

1.1 动物

昆明种仔鼠, 由第四军医大学实验动物中心提供, 合格证号 XCSK (军) 2002-005。

1.2 药品与试剂

褐藻多糖硫酸酯, 购于西安慈缘生物技术有限公司 (批号 CY101118, 质量分数为 98%)。NeurobasalTM Medium、DMEM、B-27 supplement 均购于 Gibco 公司。新生牛血清 (杭州四季青公司); L-多聚赖氨酸 (相对分子质量为 $1.5 \times 10^5 \sim 3.0 \times 10^5$, Gibco 公司); MTT、二甲基亚砜 (DMSO) Amresco 分装; 乳酸脱氢酶 (LDH)、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 试剂盒, 均为南京建成生物工程研究所产品。

1.3 仪器

BIO—RAD (Model 680) 型酶标仪, SW—CJ—IF 型超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司), 倒置相差显微镜 (Olympus CKX41), CO_2 培养箱 (Hera Cell), PHS—3C 精密 pH 计 (上海精密科学仪器有限公司), 三蒸水 (高压灭菌)。

2 方法

2.1 大脑皮层神经元培养

出生 14~16 d 的昆明仔鼠, 无菌条件下分离双侧大脑, 迅速置于预冷的 CMF-HBSS 液中除去大脑

收稿日期: 2011-08-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (3077263)

作者简介: 郭宏举 (1983—), 男, 药师, 研究方向为药理学。Tel: (010)66356172 E-mail: ghj4329502@126.com

*通讯作者 吴久鸿 Tel: (010)66354564 E-mail: jiuhongwu@hotmail.com

髓质、脑膜和血管,将皮层部分剪碎为 $1\sim 2\text{ mm}^3$ 的小组织块。转入含 0.125%胰蛋白酶的 5 mL 离心管中,细口玻璃管轻轻吹打后置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 消化 15 min (每 5 min 振荡 1 次)。将组织块转入等体积含 10% 新生牛血清的 DMEM 培养基中,终止消化 5 min。再吸出组织块置于离心管中,用 3 mL DMEM 的培养液轻轻吹打 15 次左右,静置 3 min 后取上清。重复操作两次,收集上清液,500 r/min 离心 5 min。弃去上清液,200 目金属网滤过,调整细胞数至 $8\times 10^5/\text{mL}$,接种于 0.01% L-多聚赖氨酸包被过的培养板中,置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱中培养,每 3 d 进行 1 次半量换液。每天观察细胞生长情况。采用神经元特异性标志物微管相关蛋白 2 (microtubule-associated protein 2, MAP2) 与细胞核双标记法对培养皮质神经细胞进行了纯度鉴定,结果显示采用此法培养神经细胞纯度较高,纯度在 90%以上;且杂质细胞极少。

2.2 H_2O_2 诱导神经元损伤模型制备

取培养 7 d 的皮层神经元,分为对照组、 H_2O_2 处理组 (0、10、25、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$)、褐藻多糖硫酸酯+ H_2O_2 (50 $\mu\text{mol/L}$) 处理组进行实验。 H_2O_2 处理组吸去原培养液, PBS 洗 2 遍,加入含各种浓度 H_2O_2 的 Neurobasal 培养基,继续培养 6 h 进行实验。对照组不加 H_2O_2 ,其余同 H_2O_2 处理组。给药组在 H_2O_2 处理前 24 h 加入不同浓度的褐藻多糖硫酸酯,终质量浓度为 0.01、0.1、1 g/L。褐藻多糖硫酸酯溶媒为高压灭菌的三蒸水。

2.3 MTT 比色法测定细胞存活率

H_2O_2 作用 6 h 后,每孔内加入 20 μL MTT 液(终质量浓度为 0.5 mg/mL), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 继续培养 4 h,弃上清液,加入 DMSO 150 μL ,室温振荡 10 min。待孔内颗粒完全溶解后,酶标仪上测定 570 nm 处的吸光度 (A_{570}) 值,计算细胞存活率。

细胞存活率 = 实验组 A_{570} / 对照组 A_{570}

2.4 培养液中 LDH 测定

细胞处理后,收集细胞培养上清液,参照试剂盒说明书测定培养液中 LDH 漏出量。

2.5 细胞内 SOD 活性和 MDA 测定

细胞经损伤处理后去除原培养液,细胞用 PBS 洗 2 遍,每孔加入 0.1 mol/L PBS 和 0.05 mmol/L EDTA (pH 8.0) 1 mL,再加入 1% Triton-X100 50 μL ,将培养板置振荡器振荡 1 min 使之溶解,加入 25% H_3PO_4 100 μL 以沉淀蛋白,10 000 $\times$ g 于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 1 h,取上清液按说明书测定 SOD 活性和 MDA 水平。

2.6 统计学处理

所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,应用 SPSS13.0 软件进行统计分析,组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 褐藻多糖硫酸酯对 H_2O_2 损伤皮层神经元存活率的影响

25 $\mu\text{mol/L}$ 以下浓度 H_2O_2 对神经元存活率无影响,从 50 $\mu\text{mol/L}$ 开始细胞存活率明显下降。与对照组相比,50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 诱导神经元不同程度的损伤 ($P<0.01$),细胞存活率呈浓度依赖性的降低。其细胞存活率分别降至 68.96%、35.02%、8.78%。预先 24 h 给予褐藻多糖硫酸酯 (0.01、0.1、1 g/L),可以预防 H_2O_2 对细胞的损伤,明显提高细胞存活率,结果见表 1。

为进一步考察褐藻多糖硫酸酯对 H_2O_2 损伤皮层神经元的保护作用,以培养液中 LDH 漏出量为观察指标进行实验,神经元经 50 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 损伤后,细胞膜通透性增大,LDH 大量漏出。致使培养液中 LDH 的量显著增加。预先 24 h 给予褐藻多糖硫酸酯 (0.01、0.1、1 g/L) 与 H_2O_2 处理组相比,0.1、1 g/L 褐藻多糖硫酸酯可明显降低细胞培养液中 LDH 的漏出量。结果见表 1。

表 1 褐藻多糖硫酸酯对 H_2O_2 损伤原代培养皮层神经元的保护作用 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Protection of fucoidan on primary cortical neurons injured by H_2O_2 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	$\rho/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	细胞存活率/%	LDH/($\text{kU}\cdot\text{L}^{-1}$)
对照	—	98.15 ± 1.78	22.33 ± 1.34
H_2O_2	—	$65.44\pm 3.61^{**}$	$60.95\pm 2.14^{**}$
褐藻多糖硫酸酯	0.01	63.26 ± 3.13	61.13 ± 4.23
	0.1	$75.33\pm 4.57^{\Delta}$	$55.26\pm 3.37^{\Delta}$
	1	$80.76\pm 3.65^{\Delta\Delta}$	$48.35\pm 5.12^{\Delta\Delta}$

与对照组比较: $^{**}P<0.01$; 与 H_2O_2 组比较: $^{\Delta}P<0.05$ $^{\Delta\Delta}P<0.01$

$^{**}P<0.01$ vs control group; $^{\Delta}P<0.05$ $^{\Delta\Delta}P<0.01$ vs H_2O_2 group

3.2 褐藻多糖硫酸酯对细胞 MDA 水平和 SOD 活性的影响

与对照组相比,皮层神经元经 50 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 损伤后培养液中 MDA 水平显著增加, SOD 活性显著降低;预先 24 h 给予褐藻多糖硫酸酯 (0.01、0.1、1 g/L) 与 H_2O_2 处理组相比,0.1、1 g/L 褐藻多糖硫酸酯可明显降低培养液中 MDA 水平并且升高 SOD 活性,结果见表 2。

4 讨论

传统的细胞培养方法以各种血清提供神经营养

表 2 褐藻多糖硫酸酯对 H_2O_2 损伤皮层神经元培养液中 MDA 水平和 SOD 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of fucoidan on MDA level and SOD activity in medium of neurons injured by H_2O_2 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	$\rho / (\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	MDA / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	SOD / ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)
对照	—	0.42 ± 0.04	17.49 ± 1.21
H_2O_2	—	$1.12 \pm 0.11^{**}$	$7.95 \pm 1.14^{**}$
褐藻多糖硫酸酯	0.01	1.03 ± 0.08	8.52 ± 1.23
	0.1	$0.73 \pm 0.09^{\Delta\Delta}$	$10.26 \pm 2.37^{\Delta\Delta}$
	1	$0.62 \pm 0.05^{\Delta\Delta}$	$13.41 \pm 2.17^{\Delta\Delta}$

与对照组比较: $^{**}P < 0.01$; 与 H_2O_2 处理组比较: $^{\Delta\Delta}P < 0.01$; 与褐藻多糖硫酸酯 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较: $^{\Delta}P < 0.05$

$^{**}P < 0.01$ vs control group; $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ vs H_2O_2 group; $^{\Delta}P < 0.05$ vs fucoidan $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ group

因子, 神经元生长良好, 但血清中含有的丰富营养成分也同时促进了神经胶质细胞生长。这类细胞通常占神经元的比例很大, 并且还具有增殖能力。因此需要加入阿糖胞苷等有丝分裂抑制剂抑制胶质细胞的生长^[5]。另外, 血清培养不宜进行长期研究, 而且血清的成分相对比较复杂, 含有一些未知因素可能影响实验结果。采用无血清培养则可以免除血清带来的弊端, 并且能明显改善神经元的生长状态和存活时间^[6]。本研究则以无血清培养基培养新生小鼠的大脑皮层神经元, 细胞生长良好, 皮层神经元典型清楚, 且神经胶质细胞的干扰很少, 培养至第 5 天神经元的纯度即可达 95% 以上。

H_2O_2 是一种较强的氧化剂, 极易进入细胞内, 通过 Haber-Weiss 或 Fenton 反应, 形成高活性的氧自由基或羟基自由基。这些自由基几乎可与细胞内的任何成分发生反应造成细胞损伤^[7]。使神经元发生脂质过氧化反应生成 MDA, SOD 是主要存在于细胞浆和线粒体里的一种金属蛋白酶, 能够清除代谢产生的超氧阴离子, 是体内抗氧化系统的重要组成部分。因此, 测定 MDA、SOD 活性既可以反映细胞损伤程度又可以判断细胞损伤原因^[8-9]。研究表明大脑皮层是中枢神经系统的重要组成部分, 参与多种功能作用。本实验研究结果显示 H_2O_2 ($50 \mu\text{mol/L}$) 诱导皮层神经元 6 h, 与对照组相比细胞内 MDA 水平明显升高而胞内 SOD 活性显著降低, 提示 H_2O_2 ($50 \mu\text{mol/L}$) 所致皮层神经元损伤与脂质过氧化损伤有关, 褐藻多糖硫酸酯可提高皮层神经元内 SOD 活性并显著降低胞内 MDA 的量, 提高皮层神经元存活率, 表明褐藻多糖硫酸酯可明显地减弱 H_2O_2 所造成的皮质神经元氧化应激损伤。研究显示褐藻多糖硫酸酯对 MPP^+ 诱导 MN9D 细胞的损

伤模拟的 PD 模型^[10]、 H_2O_2 刺激 dPC12 细胞模拟氧化损伤导致神经元凋亡的 AD 模型^[11-12]产生良好保护作用。提示褐藻多糖硫酸酯有可能对帕金森病、阿尔茨海默病^[13]等神经性退行疾病产生治疗作用。本实验结果初步显示褐藻多糖硫酸酯具有体外神经保护作用。

参考文献

- [1] 张甘霖, 李 萍, 李玉洁. 褐藻多糖硫酸酯通过溶酶体组织蛋白酶 D 调节过氧化氢诱导的 PC12 细胞凋亡 [J]. 中国中药杂志, 2011(8): 1083-1086.
- [2] 张全斌, 于鹏展, 周革非, 等. 海带褐藻多糖硫酸酯的抗氧化活性研究 [J]. 中草药, 2003, 34(9): 824-826.
- [3] 刘宪丽, 刘东颖, 汪艳秋. 褐藻多糖硫酸酯免疫调节和抗肿瘤活性研究 [J]. 中国微生态学杂志, 2010, 22(12): 1074-1076.
- [4] 赵婷婷, 张全斌, 张忠山. 褐藻多糖硫酸酯对阿尔茨海默病模型小鼠认知功能及脑内胆碱能系统的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(2): 160-163.
- [5] Brewer G J. Isolation and culture of adult rat hippocampal neurons [J]. *J Neurosci Methods*, 1997, 71(2): 143-155.
- [6] Gu Y, Jing Y, Kumar A. *et al.* Isolation of human neuronal cells resistant to toxicity by the prion protein peptide 106-126. [J]. *J Alzheimers Dis*, 2001, 3(2): 169-180.
- [7] Li W G, Miller F J J, Zhang H J. *et al.* H_2O_2 -induced O_2^- production by a non-phagocytic NAD(P)H oxidase causes oxidant injury [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(31): 29251-29256.
- [8] Kinnula V L, Everitt J I, Whorton A R. *et al.* Hydrogen peroxide production by alveolar type II cells, alveolar macrophages, and endothelial cells [J]. *Am J Physiol*, 1991, 261(2Pt1): 84-91.
- [9] Mügge A, Elwell J H, Peterson T E, *et al.* Release of intact endothelium-derived relaxing factor depends on endothelial superoxide dismutase activity [J]. *Am J Physiol*, 1991, 260(2Pt1): 219-225.
- [10] Jhamandas J H, Wie M B, Harris K, *et al.* Fucoidan inhibits cellular and neurotoxic effects of beta-amyloid (A beta) in rat cholinergic basal forebrain neurons [J]. *Eur J Neurosci*, 2005, 21(10): 2649-2659.
- [11] 罗鼎真, 崔艳秋, 王晓民. 褐藻多糖硫酸酯减轻 1-甲基-4-苯基吡啶离子引起的细胞损伤和氧化应激 [J]. 首都医科大学学报, 2009(4): 475-480.
- [12] 陈 颢, 耿美玉, 管华诗. 褐藻多糖 GS201 对脑神经细胞生存的影响 [J]. 中国海洋药物, 2001, 79: 20-22.
- [13] Uttara B, Singh A V, Zamboni P, *et al.* Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2009, 7(1): 65-74.