

灯盏花素对谷氨酸体外诱导大鼠皮质神经元损伤的保护作用

熊哲¹, 张丽², 李彩莲³

(1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院 药理学部, 湖北 武汉 430030; 2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院 血液内科, 湖北 武汉 430030; 3. 河南省中医学院附属医院 药剂科, 河南 郑州 450008)

摘要:目的 探讨灯盏花素对谷氨酸 (Glu) 体外诱导原代培养大鼠皮质神经元损伤的作用及机制。方法 通过 MTT 法观察灯盏花素对 Glu 诱导神经元损伤的细胞存活率的影响, 并结合超氧化物歧化酶 (SOD) 和丙二醛 (MDA) 生化测试及细胞钙影像方法探讨相关作用机制。结果 灯盏花素呈质量浓度依赖性提高 Glu 诱导神经元损伤细胞的存活率, 并拮抗由 Glu 诱导的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高、MDA 生成, 提高 SOD 活性。结论 灯盏花素对 Glu 体外诱导大鼠皮质神经细胞损伤具有保护作用, 可能与减轻胞内 Ca^{2+} 超载、提高神经细胞抗氧化能力有关。

关键词: 灯盏花素; 谷氨酸; 皮质神经元; $[Ca^{2+}]_i$

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)06-0893-03

灯盏花又名灯盏细辛, 是云南特产中药菊科植物短葶飞蓬 *Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand.-Mazz. 的干燥全草, 灯盏花素是从灯盏花中精炼提取出来的有效成分, 其注射液已在缺血性脑血管疾病的治疗中取得显著疗效^[1]。除了基于其明确的血管扩张机制之外, 灯盏花素是否同时存在对神经元的保护作用, 相关文献较为少见。谷氨酸 (glutamate, Glu) 的过度释放是脑缺血等多种病理情况下神经元兴奋毒损伤的关键环节, 因而, 本实验建立 Glu 体外诱导大鼠皮质神经元损伤模型, 从细胞水平观察灯盏花素对 Glu 致原代培养大鼠皮质神经元兴奋性毒性的影响并对其机制进行初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料: 灯盏花素注射液 (云南昆明龙津药业有限公司); 超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 试剂盒均购于南京建成生物工程研究所; 谷氨酸 (L-Glu)、MTT、二甲亚砜 (DMSO)、荧光染料 Fura-2/AM、多聚赖氨酸、EDTA 均购于 Sigma 公司; DMEM/12 完全培养基购于 Gibco 公司; 胎牛血清购于 Hyclone 公司; CO₂ 培养箱 (Shellab 2306, 美国); ELX800 型酶标仪 (Bio-Tek Instruments INC, Cole-parmar, 美国); CCD 成像系统和 Tillvision 软件 (Till Photonics, 德国); 其他试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 取新生 3 d 内的 Wistar 大鼠 (华

中科技大学同济医学院实验动物中心, 合格证号: 湖北省医动字 19-021), 在超净工作台内, 4 ℃ 的 PBS 平衡液 (mmol/L: NaCl 136.89, KCl 2.68, Na₂HPO₄ 9.75, KH₂PO₄ 1.15, pH 7.2) 中, 小心分离出大脑皮质。用眼科剪将皮质剪碎, 转移入含有 0.125% 胰蛋白酶的 PBS 液中, 37 ℃ 水浴消化 28 min。消化完毕, 加入等体积 DMEM/12 完全培养基 (含有 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素), 吹打终止消化。加入 DMEM/12 完全培养基, 吹打呈混悬液接种于多聚赖氨酸预处理的 35 mm 塑料培养皿、96 孔板、24 孔板中, 置于 5% CO₂、37 ℃ 的培养箱。第 2 天加入阿糖胞苷, 抑制胶质细胞的增殖。第 3 天用 DMEM/F12 完全培养基换液, 培养至第 7 天, 加药处理。

1.2.2 细胞存活率测定: 采用 MTT 法测定细胞存活率。第 8 天, 用 DMEM/F12 完全培养基 (含有 5% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素) 培养 24 h, 加入 Glu (50~800 μmol/L), 培养 30 min。灯盏花素组, 在加入半数抑制细胞存活率浓度 (IC₅₀) 的 Glu 前, 预处理加入不同质量浓度灯盏花素 (6.25~100 μg/L), 同样含 5% 胎牛血清的 DMEM/F12 完全培养基培养 24 h, 再加入 IC₅₀ 剂量的 Glu, 培养 30 min。然后均加入 0.5 mg/mL MTT, 培养 4 h, 再加入 DMSO, 振荡 10 min。在 490 nm 处, 采用 ELX800 型酶标仪进行吸光度测定。将含有 5% 胎牛血清的 DMEM/12 完全培养基为对照组, 对照组的细胞存活率为 100%。

收稿日期: 2007-09-11

作者简介: 熊哲 (1979—), 男, 湖南岳阳人, 药师, 硕士, 从事神经药理研究。

Tel: (027) 63599052 E-mail: 200003390173@sina.com.cn

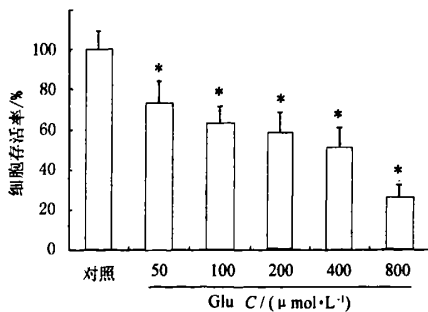
1.2.3 SOD、MDA 测定:经 IC_{50} 的 Glu 处理后,去除原培养液,用 PBS 洗 2 遍,24 孔板每孔加入 0.1 mol/L PBS 和 0.05 mol/L EDTA (pH=8.0) 1 mL,再加入 50 μ L 1% Triton-X100,将 24 孔培养板振荡 1 min,使细胞溶解,加入 100 μ L 25% H_3PO_4 以沉淀蛋白,10 000 $\times g$ 于 4 $^{\circ}C$ 离心 1 h,取上清液,按试剂盒说明书测定 SOD 活性和 MDA 水平。蛋白定量用 Folin 法测定。

1.2.4 $[Ca^{2+}]_i$ 测定:依据 Lee 等^[2]的研究,采用 10 mmol/L Glu 诱导 $[Ca^{2+}]_i$ 变化。将接种皮质神经元的玻片置于含有 1 μ mol/L Fura-2/AM 的细胞外液 (mmol/L: NaCl 145, KCl 5.0, $MgCl_2$ 1.0, $CaCl_2$ 、葡萄糖 10, HEPES 10, pH 7.2) 中,37 $^{\circ}C$ 下避光水浴 25 min。Fura-2- Ca^{2+} 复合物和 Fura-2 分别在 340 和 380 nm 激发,经 CCD 成像系统和 Tillvision 软件采集和分析,即得到 $Ratio = F_{340}/F_{380}$ 的荧光比值。此 Ratio 值间接反映皮质神经元 $[Ca^{2+}]_i$ 。

1.2.5 统计分析:各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SAS 8.1 统计软件进行方差分析的 Dunnett-t 检验。

2 结果

2.1 灯盏花素提高 Glu 诱导皮质神经元损伤的细胞存活率:图1 表明,Glu (50~800 μ mol/L) 浓度依赖性降低培养皮质神经元的存活率,与对照组比较差异显著 ($n=24$, $P<0.05$),其 IC_{50} 约为 400 μ mol/L,此时细胞存活率为 (51.20 $\pm$ 9.71)%。6.25~50 μ g/L 灯盏花素预处理 24 h,灯盏花素呈质量浓度依赖性提高 400 μ mol/L Glu 诱导损伤后细胞的存活率,其中 50 μ g/L 灯盏花素作用最明显,使细胞存活率由 (52.72 $\pm$ 7.93)% 上升为 (69.54 $\pm$ 7.98)% ($n=24$, $P<0.05$),见图 2。

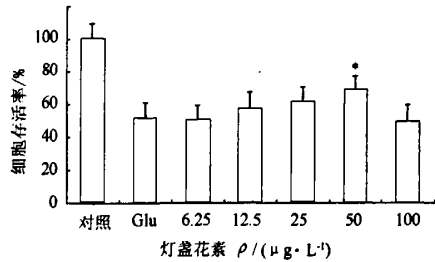


与对照组比较: * $P<0.05$

* $P<0.05$ vs control group

图1 Glu 对皮质神经元细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=24$)

Fig. 1 Effect of Glu on cell viability of cortical neurons ($\bar{x} \pm s$, $n=24$)



与 Glu (400 μ mol $\cdot$ L $^{-1}$) 组比较: * $P<0.05$

* $P<0.05$ vs Glu (400 μ mol $\cdot$ L $^{-1}$) group

图2 灯盏花素对 Glu 诱导皮质神经元细胞损伤的细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=24$)

Fig. 2 Effect of breviscapine on cell viability of cortical neurons injured by Glu ($\bar{x} \pm s$, $n=24$)

2.2 灯盏花素对 SOD 活性和 MDA 水平的影响:神经细胞经 400 μ mol/L Glu 损伤后,细胞内 MDA 水平增高,SOD 活性降低。经各质量浓度的灯盏花素预处理 24 h,灯盏花素组较 Glu 组,MDA 水平明显降低,而 SOD 活性明显增高,均有显著性差异 ($n=24$, $P<0.05$),并且灯盏花素的神经保护作用呈质量浓度依赖关系,见表 1。

表1 灯盏花素对皮质神经元 SOD 活性和 MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Table 1 Effects of breviscapine on level of MDA and activity of SOD in cortical neurons ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

组别	浓度	MDA/(μ mol $\cdot$ g $^{-1}$)	SOD/(kU $\cdot$ g $^{-1}$)
对照	—	2.96 $\pm$ 0.81	1.93 $\pm$ 0.18
Glu	400 μ mol $\cdot$ L $^{-1}$	15.39 $\pm$ 1.66	0.73 $\pm$ 0.14
灯盏花素	12.5 μ g $\cdot$ L $^{-1}$	11.32 $\pm$ 2.14	0.84 $\pm$ 0.13
	25 μ g $\cdot$ L $^{-1}$	9.75 $\pm$ 0.94 *	0.94 $\pm$ 0.16
	50 μ g $\cdot$ L $^{-1}$	7.69 $\pm$ 0.78 *	1.15 $\pm$ 0.22 *

与 Glu 组比较: * $P<0.05$

* $P<0.05$ vs Glu group

2.3 灯盏花素降低 Glu 诱导的 $[Ca^{2+}]_i$ 增高,如图 3 所示,10 mmol/L Glu 明显增高 $[Ca^{2+}]_i$,而给予 50 μ g/L 灯盏花素预处理 24 h,Glu 诱导 $[Ca^{2+}]_i$ 增高的幅度降低 (11.10 $\pm$ 0.06)%,后经细胞外液冲洗,Ratio 曲线峰值均出现回落,表明 Glu 诱导 $[Ca^{2+}]_i$ 增高呈可逆性作用。灯盏花素组与 Glu 组比较,差异显著 ($P<0.05$, $n=5$),见图 4。

3 讨论

灯盏花素是自灯盏细辛中提取的灯盏花甲素、乙素混合物,近年来发现该药对脑血管疾病,如脑血栓形成、脑栓塞、脑溢血等有显著疗效,其作用机制以扩张脑血管及抗血小板聚集从而改善脑部微循环

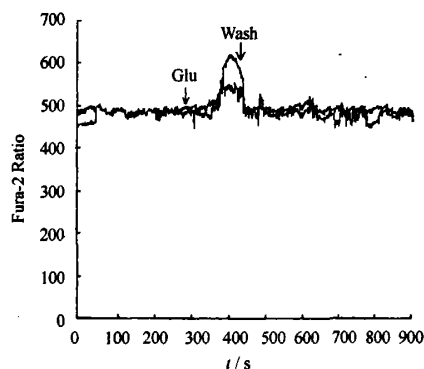
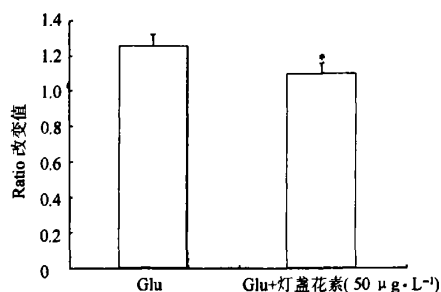


图3 Glu 诱导皮质神经元 $[Ca^{2+}]_i$ 升高

Fig. 3 Increase of $[Ca^{2+}]_i$ in cortical neurons induced by Glu



与 Glu 组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs Glu group

图4 灯盏花素抑制 Glu 诱导皮质神经元 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高 ($\bar{x} \pm s$, $n=15$)

Fig. 4 Inhibition of breviscapine on increase of $[Ca^{2+}]_i$ in cortical neurons induced by Glu ($\bar{x} \pm s$, $n=15$)

研究最为广泛^[1,3],然而,是否同时存在灯盏花素对脑部神经元保护作用的参与,迄今为止,报道尚不多见。内源性 Glu 参与多种生理功能调控,是脑内重要的兴奋性神经递质,但 Glu 过量释放则导致神经元兴奋毒性的产生。研究者认为,神经元兴奋毒性是在脑缺氧缺血、脑外伤、癫痫等病理情况下参与发病的重要因素^[4]。因此,本研究建立了 Glu 体外诱导大鼠皮质神经元损伤的实验模型,结果表明通过灯盏花素保护性预处理后的神经细胞,细胞存活

率呈浓度依赖性增加,提示灯盏花素对 Glu 引起的脑神经细胞损伤具有一定的保护作用。

突触后膜的 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸 (*N*-methyl-*D*-aspartate, NMDA) 受体门控通道是 Glu 引起的 Ca^{2+} 内流的主要途径,病理性 Glu 过度释放会导致 NMDA 受体门控通道开放,胞外大量 Na^+ 、 Ca^{2+} 内流,胞内 K^+ 外流,引起细胞内 Ca^{2+} 超载,继而激活一系列钙依赖性酶,促使大量的氧自由基的生成,导致脂质过氧化反应,MDA 生成增加,SOD 活性降低,加速细胞损伤^[5]。目前越来越多的研究者提出中药对神经元损伤的保护机制可能与降低胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 有关,但未做相应的 $[Ca^{2+}]_i$ 动态监测^[6]。本研究采用双波长荧光测定法对 $[Ca^{2+}]_i$ 进行动态检测,结果表明,10 mmol/L Glu 导致 $[Ca^{2+}]_i$ 明显增加,而预先给予灯盏花素 24 h 保护,可显著降低由 Glu 诱导的 $[Ca^{2+}]_i$ 增高。同时在 SOD 和 MDA 生化测试中,由 Glu 诱导 $[Ca^{2+}]_i$ 增高所产生的 MDA 增高和 SOD 活性降低也得到相应拮抗,提示灯盏花素对 Glu 致神经元损伤的保护,可能与减轻胞内 Ca^{2+} 超载、抗过氧化损伤有关,但该机制是否通过抑制 NMDA 受体而发挥作用以及是否存在其他的保护机制,还有待进一步研究。

致谢:同济医学院基础部药理系各老师及顾军同学给予的实验指导和帮助。

参考文献:

- [1] Zhong H, Deng Y, Wang X, et al. Multivesicular liposome formulation for the sustained delivery of breviscapine [J]. *Int J Pharm*, 2005, 301: 15-24.
- [2] Lee K H, Park J Y, Kim K. NMDA Receptor-mediated calcium influx plays an essential role in myoblast fusion [J]. *FEBS Lett*, 2004, 578(1-2): 47-52.
- [3] 石森林,徐莲英.灯盏花制剂的临床应用[J].中国临床药理学杂志,2004,13(6):379-382.
- [4] 梅和珊,王永利.脑缺血时谷氨酸释放机制[J].中国药理学通报,2005,21(4):393-396.
- [5] Jiang S X, Lertvorachon J, Hou S T, et al. Chlortetracycline and demeclocycline inhibit calpains and protect mouse neurons against glutamate toxicity and cerebral ischemia [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(40): 33811-33818.
- [6] 姬汴生,高远,刘红,等.苯海索对培养神经细胞谷氨酸兴奋毒性的保护作用[J].中国药理学杂志,2002,37(9):667-669.

灯盏花素对谷氨酸体外诱导大鼠皮质神经元损伤的保护作用

作者：[熊哲](#)，[张丽](#)，[李彩莲](#)
作者单位：[熊哲\(华中科技大学同济医学院附属同济医院, 药学部, 湖北, 武汉, 430030\)](#)，[张丽\(华中科技大学同济医学院附属同济医院血液内科, 湖北, 武汉, 430030\)](#)，[李彩莲\(河南省中医学院附属中医院, 药剂科, 河南, 郑州, 450008\)](#)
刊名：[中草药](#) **ISTIC** **PKU**
英文刊名：[CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS](#)
年，卷(期)：2008, 39(6)
被引用次数：1次

参考文献(6条)

1. [Zhong H;Deng Y;Wang X](#) [Multivesicular liposome formulation for the sustained delivery of breviscapine](#)[外文期刊] 2005(1/2)
2. [Lee K H;Park J Y;Kim K](#) [NMDA Receptor-mediated calcium influx plays all essential role in myoblast fusion](#) 2004(1-2)
3. [石森林;徐莲英](#) [灯盏花制剂的临床应用](#)[期刊论文]-[中国临床药学杂志](#) 2004(06)
4. [梅和珊;王永利](#) [脑缺血时谷氨酸释放机制](#)[期刊论文]-[中国药理学通报](#) 2005(04)
5. [Jiang S X;Lertvorachon J;Hou S T](#) [Chlortetracycline and demeclocycline inhibit calpains and protect mouse neurons against glutamate toxicity and cerebral ischemia](#)[外文期刊] 2005(40)
6. [姬汴生;高远;刘红](#) [苯海索对培养神经细胞谷氨酸兴奋毒性的保护作用](#)[期刊论文]-[中国药学杂志](#) 2002(09)

本文读者也读过(6条)

1. [张文生](#). [朱陵群](#). [牛福玲](#) [丹参素对缺糖-缺氧损伤神经细胞的保护作用](#)[期刊论文]-[中草药](#)2004, 35(8)
2. [乐乐乐](#). [董志](#). [YUE Le-Le](#). [DONG Zhi](#) [利莫那班对局灶性脑缺血/再灌注损伤大鼠的保护作用](#)[期刊论文]-[中国老年学杂志](#)2011, 31(12)
3. [黄明学](#). [富路](#). [孔为兰](#). [姜阳](#). [赵继义](#) [鞣酐对脂多糖损伤的血管内皮细胞功能的影响](#)[期刊论文]-[中华老年心脑血管病杂志](#)2009, 11(3)
4. [潘娅](#). [戴桃李](#). [杨琼](#). [陈桀](#). [张敏](#) [针刺耳穴对全脑缺血大鼠学习记忆能力和海马源性神经营养因子表达的影响](#)[期刊论文]-[中华老年心脑血管病杂志](#)2009, 11(4)
5. [陈立敏](#). [吕秋军](#). [温利青](#). [陈媛媛](#). [陈振花](#). [谢洁琼](#). [张敏](#). [曹颖林](#). [CHEN Li-min](#). [LU Qiu-jun](#). [WEN Li-qing](#). [CHEN Yuan-yuan](#). [CHEN Zhen-hua](#). [XIE Jie-qiong](#). [ZHANG Min](#). [CAO Ying-lin](#) [葛根素对谷氨酸所致大鼠原代神经细胞损伤的保护作用](#)[期刊论文]-[中国药理学通报](#)2006, 22(5)
6. [谢羽佳](#). [陶华英](#). [XIE Yu-jia](#). [TAO Hua-ying](#) [抗氧化剂及非甾体抗炎药物对大鼠阿尔茨海默病的预保护研究](#)[期刊论文]-[中华老年心脑血管病杂志](#)2009, 11(3)

引证文献(1条)

1. [韩俊江](#) [灯盏花素的器官保护功能研究进展](#)[期刊论文]-[天津药学](#) 2011(5)

本文链接：http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200806032.aspx