

人参皂苷 Re 体外抗氧化能力及其对血清剥夺神经细胞作用的研究

宋志斌, 朱成琳, 师方园, 薛贵平, 张丹参*
(河北北方学院药理学系, 河北 张家口 075000)

[摘要] 目的:探讨三七中人参皂苷 Re 体外抗氧化能力和对血清剥夺损伤神经细胞的作用。方法:通过体外清除二苯代苦味酰肼(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical 2,2-Diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazyl, DPPH) 自由基法、还原能力测定法测定人参皂苷 Re 体外抗氧化能力;通过细胞计数试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)测定人参皂苷 Re 对神经细胞血清剥夺损伤的保护作用。结果:人参皂苷 Re 体外自由基清除率不足 10%,还原能力不足 12%,低于阳性对照维生素 E,但对血清剥夺损伤的神经细胞保护作用非常显著(细胞存活率最高 78%),活性高于同浓度下的维生素 E。结论:人参皂苷 Re 体外抗氧化能力微弱,不是通过提供电子来达到抗氧化作用,但可保护血清剥夺损伤的神经细胞,提高神经细胞成活率,抑制其损伤、凋亡的作用。

[关键词] 人参皂苷 Re; 自由基; 邻二氮菲; 血清剥夺; 神经细胞

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)07-0225-04

The Study on Antioxidant Capacity of Ginsenoside Re *in vitro* and It's Effect for Serum Deprived Nerve Cell

SONG Zhi-bin, ZHU Cheng-lin, SHI Fang-yuan, XUE Gui-ping, ZHANG Dan-shen*
(Department of Pharmacy, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the antioxidant capacity of ginsenoside Re *in vitro* as well as the effect of nerve cells by serum deprivation. **Method:** The antioxidant effect *in vitro* of ginsenoside Re was assayed by eliminating 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical 2, 2-Diphenyl-1-(2, 4, 6-trinitrophenyl) hydrazyl (DPPH) free radical and determination of reducing power. Protection on nerve cells serum deprivation was assayed by cells counting kit-8 (CCK-8). **Result:** Ginsenoside Re which clearance rate of free radical was less than 10% and the ability of reduction was less than 12%, potency was lower than vitamin E. But the protection on nerve cells serum deprivation was remarkable (the highest cell survival rate was 78%), and its potency was higher than the same concentration of vitamin E. **Conclusion:** The antioxidant effect *in vitro* of ginsenoside Re is weak and not acted by providing electron, but by providing nutrition support to serum deprivation damaged nerve cells to improve the survival rate of nerve cell, and then to achieve the inhibitory action to the trauma and apoptosis of nerve cells.

[Key words] ginsenoside Re; free radical; phenanthroline; serum deprivation; nerve cell

三七是我国传统名贵中药材,中医传统用于体

内外各种出血之证及跌打损伤、瘀滞肿痛的要药。现代药理研究发现三七具有抗氧化、保护心肌细胞、保护脑组织、降血脂、抗血栓等作用^[1]。人参皂苷 Re 是三七有效单体成分之一,近期研究表明人参皂苷 Re 具有抗氧化、抗衰老作用^[2-3],但其药效作用机制尚不明确,故本课题以人参皂苷 Re 为研究对象,研究其抗氧化、衰老相关药效作用机制,为人参皂苷 Re 临床应用提供理论依据。

[收稿日期] 20111207010

[基金项目] 河北省自然科学基金项目(C2009001026)

[第一作者] 宋志斌,研究生,从事中药有效成分的药理研究,
Tel: 15369317880, E-mail: zhibinsong1107@163.com

[通讯作者] *张丹参, Tel: 86-313-4029556, E-mail: zhangdanshen2011@126.com

1 材料

1.1 动物 昆明种小鼠乳鼠, 出生 24 h 内, 雌雄不限, 中国医学科学院药物研究所提供, 许可证号 SCXK(京)2004-0001。

1.2 试剂 人参皂苷 Re(批号 110745-200822, 购自中国药品生物制品检定所), 细胞计数试剂盒(Cell Counting Kit-8, CCK-8, 日本 Dojindo 公司), 马血清(批号 16050-122, Hyclone 公司), 二苯代苦味酰肼[1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical 2, 2-Diphenyl-1-(2, 4, 6-trinitrophenyl)hydrazyl, DPPH, 批号 281689, Sigma 公司], DMEM 培养基(批号 12800-017, Gibco 公司), 阿糖胞苷(批号 C1768, Sigma 公司), F12 培养基(批号 21700-075, Gibco 公司)。

1.3 仪器 Tecan Safire2 多功能分子检测仪(Magellan V6.5_SP1 软件, Tecan 公司), CO₂ 培养箱(Thermo 公司), 倒置式生物显微镜(Nikon 公司), 解剖显微镜(森源公司), 生物显微镜(Olympus 公司), Costar 25 mL 培养瓶(批号 430168, Corning 公司), Costar 96 孔板(批号 3599, Corning 公司)。

2 方法

2.1 清除 DPPH 自由基实验^[4-5]

2.1.1 阳性药物维生素 E 清除 DPPH 作用考察 取 96 孔酶标板, 分别向各孔加入 150 μmol·L⁻¹ 的 DPPH 溶液 180 μL, 维生素 E 溶液 20 μL 终浓度为 (5, 10, 20, 40, 80, 160 μmol·L⁻¹), 对照孔加 20 μL 三蒸水。加样、振荡混匀、封板胶封板, 室温下避光静置 30 min, 于 517 nm 处测定各孔吸光度(吸光度, A)。维生素 E 清除 DPPH 量效关系方程: $C(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}) = 0.0004 A - 0.148, r^2 = 0.9947$ 。

2.1.2 人参皂苷 Re 清除 DPPH 作用考察 取 96 孔酶标板, 分别向各孔加入 150 μmol·L⁻¹ 的 DPPH 溶液 180 μL, 取人参皂苷 Re $1 \times 10^{-3}, 1 \times 10^{-4}, 1 \times 10^{-5}, 1 \times 10^{-6}, 1 \times 10^{-7}, 1 \times 10^{-8}, 1 \times 10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 7 个浓度各 20 μL 分别加入各孔, 对照孔加 20 μL 三蒸水。加样后, 振荡混匀、封板胶封板后, 室温下避光静置 30 min, 于 517 nm 处测定各孔 A 值。计算方法:

$$\text{DPPH 清除率} = [(A_{\text{溶剂}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{溶剂}}] \times 100\%$$

$A_{\text{溶剂}}$ 为对照组的吸光度, $A_{\text{样品}}$ 为各样品的 A。

2.2 还原能力测定^[6]

2.2.1 还原能力试剂配制 将邻二氮菲(2 mmol·L⁻¹):FeCl₃(2 mmol·L⁻¹)溶液按照 1:1 混合为测定应用液, 将邻二氮菲(2 mmol·L⁻¹):FeCl₂(2 mmol·L⁻¹)溶液按照 1:1 混合为对照应用液。

2.2.2 阳性药物维生素 E 还原能力考察 取 96 孔酶标板, 分别向各孔加入测定应用液 180 μL(对照孔加对照应用液 180 μL), 维生素 E 溶液 20 μL(终浓度为 10 ~ 160 μmol·L⁻¹), 对照孔加 20 μL 三蒸水。加样后, 振荡混匀、封板胶封板后, 室温下避光静置 30 min, 于 510 nm 处测定各孔 A 值。

维生素 E 还原能力量效关系方程: $C(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}) = 0.0005 A + 0.064, r^2 = 0.993$ 。

2.2.3 人参皂苷 Re 还原能力测定 取 96 孔酶标板, 分别向各孔加入测定应用液 180 μL(对照孔加对照应用液), 取人参皂苷 Re $1 \times 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 7 个浓度各 20 μL 分别加入各孔, 对照孔加 20 μL 三蒸水。加样后, 振荡混匀、封板胶封板后, 室温下避光静置 30 min, 于 510 nm 处测定各孔 A 值。计算方法:

$$\text{还原能力} = A_{\text{样品}} / A_{\text{溶剂}} \times 100\%$$

2.3 神经细胞损伤保护模型^[7-10]

2.3.1 小鼠小脑神经细胞的原代培养 取出生 24 h 内的乳鼠, 于 75% 乙醇中浸泡 1 min。无菌条件下, 冰上开颅取出大脑, 脑组织移入 DF12 培养基中, 解剖镜下选取小脑, 并剔除软脑膜和血管, 剪成直径 1 ~ 2 mm² 的小块。胰酶消化 15 min, 吹打分散细胞, 悬液过 200 目滤网。1 500 r·min⁻¹ 离心 5 min, 弃上清并加入培养液终止胰酶反应。细胞悬液计数, 调细胞密度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 接种于多聚赖氨酸铺板的培养板中。将培养板放入条件为 37 °C 5% CO₂ 及饱和湿度的培养箱中培养。培养 24 h, 加入终浓度为 10 μmol·L⁻¹ 阿糖胞苷培养 24 h, 以抑制非神经细胞过度增殖。待细胞贴壁后换液 1 次, 去除死细胞。以后每 2 d 半量换液 1 次。细胞培养至 7 ~ 8 d 开始试验。

2.3.2 血清剥夺模型^[11] 培养的细胞经胰酶消化, 细胞悬液计数, 调细胞密度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 接种于多聚赖氨酸铺板的 96 孔细胞培养板中。添加不含血清的 DF12 培养基, 置于 37 °C 5% CO₂ 及饱和湿度的培养箱, 培养 48 h。

2.3.3 实验分组 ①正常对照组: 正常细胞, 加溶剂。②空白模型组: 血清剥夺模型, 加溶剂。③药物处理组: 血清剥夺模型, 加人参皂苷 Re 各浓度梯度溶液(浓度为 $1 \times 10^{-4}, 1 \times 10^{-5}, 1 \times 10^{-6}, 1 \times 10^{-7}, 1 \times 10^{-8}, 1 \times 10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。

2.3.4 CCK-8 法测定细胞活力^[12-13] 神经细胞血清剥夺分组处理 48 h 后, 每孔加入 20 μL CCK-8 溶液, 置于 37 °C 5% CO₂ 及饱和湿度的培养箱继续孵

育 2 h,多功能分子检测仪检测各孔在 450 nm 处的 A 值。计算方法:

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{样品}} / A_{\text{正常}} \times 100\%$$

2.4 统计学处理 数据资料采用 SPSS 17.0 统计软件 One-way ANOVA 处理,对组间均值差异进行分析,结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 人参皂苷 Re 清除 DPPH 自由基作用考察 维生素 E 体外清除 DPPH 作用显著,最高可达 87%,浓度与药效活性呈线性相关,相比之下人参皂苷 Re 各浓度梯度溶液清除 DPPH 作用微弱,其最大浓度的 DPPH 清除率不足 10%,远远低于阳性对照维生素 E(图 1)。

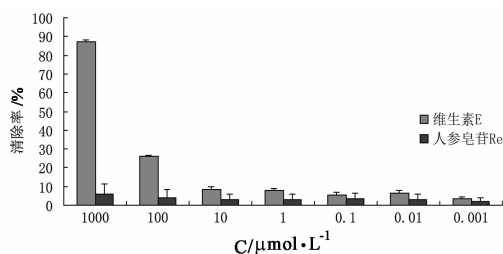


图 1 人参皂苷 Re、维生素 E 清除 DPPH 作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.2 人参皂苷 Re 还原能力测定 维生素 E 还原能力最高可达 94%,且浓度与还原能力呈线性相关。而人参皂苷 Re 各浓度梯度溶液还原能力低下,最高浓度的还原能力仅为 12%(图 2)。

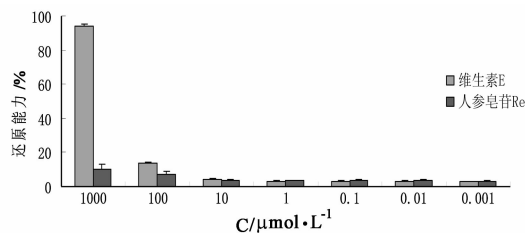


图 2 人参皂苷 Re 还原能力测定 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.3 原代培养的小脑神经细胞 培养至第 7~8 d,视野中细胞核大而圆,位于中央或偏一侧,核仁清晰可见,胞体饱满,呈圆形、三角形、多边形或梭形,大量突起胞体伸出并相互连接成神经网络丛,此时神经细胞已经发育成熟(图 3)。

3.4 CCK-8 法测定细胞活力 人参皂苷 Re 对血清剥夺损伤的神经细胞保护作用显著,人参皂苷 Re 浓度为 1×10^{-4} , $\bar{x} \pm s 10^{-5}$, $\bar{x} \pm s 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对神经细胞的保护作用较强,浓度 10 倍稀释后保护作用稍有下降,其在 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度时药效最强,细胞存活率高达 78%(表 1)。

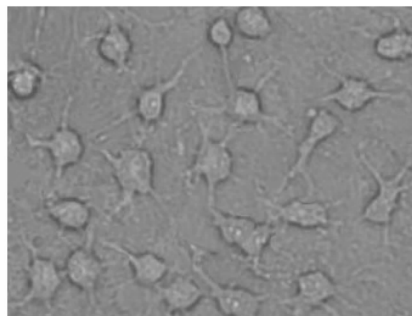


图 3 镜下原代培养的小脑神经细胞(200 ×)

表 1 人参皂苷 Re 对血清剥夺损伤神经细胞的存活率 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度/ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	存活率/%
血清剥夺模型	0	66.8 ± 1.4
人参皂苷 Re	1×10^{-4}	78.0 ± 2.4 ¹⁾
	1×10^{-5}	73.4 ± 2.1 ¹⁾
	1×10^{-6}	71.1 ± 2.6 ¹⁾
	1×10^{-7}	70.0 ± 2.6 ¹⁾
	1×10^{-8}	65.4 ± 1.8
	1×10^{-9}	64.6 ± 1.9
维生素 E	1×10^{-4}	77.0 ± 2.2 ¹⁾
	1×10^{-5}	72.6 ± 2.1 ¹⁾
	1×10^{-6}	70.5 ± 1.7 ¹⁾
	1×10^{-7}	67.3 ± 2.0
	1×10^{-8}	66.9 ± 1.8
	1×10^{-9}	65.6 ± 2.1

注:与血清剥夺模型组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

本试验从体外水平观察研究人参皂苷 Re 抗氧化能力,通过试验结果发现人参皂苷 Re 各浓度梯度溶液体外清除 DPPH 自由基作用不明显,而且还原能力低下,远低于阳性对照维生素 E 的活性,表明人参皂苷 Re 不是依靠传递电子而达到抗氧化作用,其抗氧化机制需进一步探究。

血清剥夺损伤模型常用来研究神经营养因子剥夺性损伤,其效果明显且稳定,因此,常作为损伤的病理模型。细胞在血清剥夺后,诱发的凋亡与神经系统退变性疾病的凋亡有很多共同之处,并且细胞凋亡的形态特征也极为相似。因此可以通过体外神经细胞的凋亡模型研究在体的一些情况。本实验建立的血清剥夺模型明显诱导神经细胞凋亡,试验结果显示,人参皂苷 Re 对血清剥夺损伤的细胞具有较强的保护作用,CCK-8 检测其细胞成活率接近于正常培养的细胞,暗示人参皂苷 Re 可能具有类似

神经营养因子性质的功能,可为神经细胞提供营养支持,以抑制其凋亡,维持细胞的正常生命活动。

综上所述,人参皂苷 Re 并非依靠提供电子还原氧化性物质来达到其抗氧化的功效,而可能是为神经细胞提供某种营养支持,从而保护血清剥夺损伤神经细胞、抑制细胞凋亡,其具体机制有待进一步研究。目前科研人员对三七的研究越来越深入,但其药效的开发利用远未及其自身价值水平,尤其是三七皂苷类有效单体成分的研究,有必要加强三七的基础研究和新药开发力度,使其更好的造福于人类。

[参考文献]

[1] 冯陆冰,潘西芬,孙泽玲.三七的药理作用研究进展[M].中国药师,2008,11(10):1185.

[2] 赵莹,刘金平,卢丹,等.人参皂苷 Re 促进自然衰老大鼠学习记忆作用及其机理的研究[J].中药新药与临床药理,2007,18(1):20.

[3] 苏涛,孙宏晨,马旭东.人参皂苷 Rg₃ 抑制腺样囊性癌细胞 SACC-83 增殖作用研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(23):195.

[4] 张丹参,张天泰,杜冠华.均匀设计-高通量筛选技术在中药丹参多成分配比研究中的应用[J].中国药学杂志,2009,44(14):1048.

[5] 刘平怀,汪春牛,陈德力,等. DPPH 法测定青皮加速溶剂萃取提取物的抗氧化活性[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(21):69.

[6] 张丹参.几种适合药物筛选的抗氧化实验微孔板测定方法及其稳定性研究[J].神经药理学报,2011,1(1):45.

[7] Yan G M, Lin S Z, Irwin R P, et al. Activation of G proteins bidirectionally affects apoptosis of cultured cerebellar granule neurons [J]. Neurochem, 1995, 65(6):2425.

[8] 陈志刚,朱陵群,王席玲,等.三七总皂苷对大鼠海马神经细胞缺氧缺糖再给氧损伤的保护作用[J].中国实验方剂学杂志,2008,14(5):55.

[9] Tabata T, Sawada S, Araki K, et al. A reliable method for culture of dissociated mouse cerebellar cells enriched for Purkinje neurons [J]. J Neurosci Methods, 2000, 104(1):45.

[10] 郝军荣,张丽,秦正红.神经干细胞球和单层贴壁神经干细胞的培养及鉴定[J].神经药理学,2011,1(1):51.

[11] 胡金凤,宁娜,薛薇,等.左旋黄皮酰胺抑制去血清所致神经细胞凋亡及其相关机制的研究[J].中药新药与临床药理,2009,20(1):1.

[12] 熊建文,肖化,张镇西. MTT 法和 CCK-8 法检测细胞活性之测试条件比较[J].激光生物学报,2007,16(5):559.

[13] 李涛,洪光祥,李进,等.骨髓源性神经样细胞体外存活、增殖的特性[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(15):2846.

[责任编辑 聂淑琴]