

人参炔醇对氧糖剥夺神经细胞损伤的保护作用

段贤春¹, 夏伦祝^{1*}, 汪永忠¹, 程卉², 章俊如¹

(1. 安徽中医学院第一附属医院, 国家中医药管理局中药制剂三级实验室, 合肥 230031;
2. 安徽中医学院科研实验中心, 合肥 230031)

[摘要] 目的: 探讨人参炔醇对氧糖剥夺(OGD)致神经细胞损伤的保护作用。方法: 体外培养 PC12 细胞, 分为正常对照组、OGD 组、人参炔醇组、尼莫地平组, 加入含 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{SO}_4$ 的无糖 Earle's 液建立 OGD 损伤模型, 以人参炔醇 ($10, 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、尼莫地平 ($100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理。采用荧光显微镜观察细胞形态, Hoechst 和 PI 双染流式细胞分析仪检测凋亡率, 测定培养上清液中乳酸脱氢酶(LDH)的活性与细胞 Ca^{2+} 浓度, 观察人参炔醇对 OGD 致 PC12 细胞损伤的保护作用。结果: 人参炔醇能够减少 OGD 损伤 PC12 细胞 LDH 的释放 ($P < 0.05, P < 0.01$), 抑制 Ca^{2+} 的过量产生 ($P < 0.05, P < 0.01$)、显著减少细胞凋亡及坏死 ($P < 0.05, P < 0.01$)。结论: 人参炔醇对 OGD 致神经细胞损伤具有保护作用。

[关键词] 脑缺血; 氧糖剥夺; 人参炔醇; 神经保护

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)16-0180-04

Protective Effects of Panaxynol on Nerve Cells under Oxygen and Glucose Deprivation

DUAN Xian-chun¹, XIA Lun-zhu^{1*}, WANG Yong-zhong¹, CHEN Hui², ZHANG Jun-ru¹

(1. First Affiliated Hospital, Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Grade 3 Laboratory of Traditional Chinese Medicine Preparation, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, China;
2. Experimental Center, Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protective effects of panaxynol against nerve cells injury induced by oxygen glucose deprivation (OGD). **Method:** Cultured PC12 cells, treated with OGD, panaxynol ($10, 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) and nimodipine ($100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), were divided into control group, OGD group, panaxynol group and nimodipine group. Cell morphology was observed by fluorescence microscopy and neuronal apoptosis was detected by Hoechst/PI double-dyed flow cytometry, through to determine the release of LDH and cell $[\text{Ca}^{2+}]_i$, the neuroprotective effect of panaxynol was observed. **Result:** Panaxynol could reduce the LDH release of PC12 cell injury induced by OGD ($P < 0.05, 0.01$), restrain the production of Ca^{2+} ($P < 0.05, 0.01$), decrease neuron apoptosis and necrosis significantly ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion:** Panaxynol can reduce nerve cells injury induced by OGD, has the action for nerve cell protection.

[Key words] cerebral ischemia; oxygen glucose deprivation; panaxynol; neuroprotective effect

[收稿日期] 20110325(003)

[基金项目] 安徽省中医药管理局中医药科研课题(2009ZY01); 安徽中医学院临床科学研究基金项目(2008LC1-008A); 康缘中医药科技创新基金项目(KYCX201011)

[第一作者] 段贤春, 硕士, 药师, 从事药理学研究

[通讯作者] * 夏伦祝, 教授, 从事临床药学研究, Tel: 13865965898, E-mail: dxeflying2008@163.com

人参炔醇(panaxynol)又名镰叶芹醇(falcarinol),是聚乙炔醇类(polyacetylenes)化合物的一种,在植物界中分布甚广,具有抗癌、抗自由基及神经细胞保护作用^[1]。研究表明脑缺血损伤过程中存在着神经细胞凋亡,且神经细胞凋亡在缺血脑损伤中起到至关重要的作用,药物可通过干预神经细胞凋亡过程阻止缺血损伤的进一步发展而发挥对神经细胞损伤的保护作用。细胞内 Ca^{2+} 超载是缺血脑损伤的发病机制之一,在缺血后神经元凋亡发生中也起关键作用,而 Ca^{2+} 抑制剂或药物可抑制细胞内 Ca^{2+} 浓度 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高,阻止凋亡的发生^[2-3]。我们前期从三七超临界萃取物中分离得到人参炔醇,证实了该中药单体具有明显的抗脑缺血及神经细胞保护作用,可透过血脑屏障,是理想的抗脑缺血损伤的候选药物^[4]。然而,迄今为止,人参炔醇对脑损伤保护作用机制研究仍非常有限,本实验通过氧糖剥夺(oxygen and glucose deprivation, OGD)致PC12细胞损伤模型观察人参炔醇对神经细胞凋亡及细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 变化等相关因素的影响,探讨其对神经细胞保护的作用机制。

1 材料

1.1 神经细胞系 大鼠嗜铬细胞瘤细胞(PC12细胞),购自中科院上海生物研究所细胞库。

1.2 药品与试剂 MEM培养基(批号83575417,美国Gibco公司);胎牛血清(批号1386185,HyClone公司);碘化丙啶(PI,批号5981179, Sigma公司);Fluo-3,罗丹明123(Molecular Probes);连二亚硫酸钠(Na_2SO_4 ,批号20101119)及其他试剂为国产分析纯。人参炔醇为本实验室自制(纯度 $\geq 98\%$)。尼莫地平(Nimodipine,批号701323A,美国ICN公司)。

1.3 仪器 MCO-175 CO_2 培养箱为日本SANYO公司;CKX41倒置相差生物显微镜为日本Olympus公司;FACScan型流式细胞仪为美国BD公司产品。

2 方法

2.1 PC12细胞氧糖剥夺模型的制备与实验分组 将PC12细胞株复苏与传代,计数细胞并稀释至 $1 \times 10^8/\text{L}$,接种于96孔培养板中(同一样本平行做8次),随机分为5组。OGD模型组:以无糖Earle's液[(含 NaCl 143.0, KCl 5.4, CaCl_2 21.8, MgSO_4 10.0, Na_2PO_4 1.0, HEPES 2.4) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.4]清洗细胞2次,加入含 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{SO}_4$ 的无糖Earle's

液;正常对照组:PC12细胞未经OGD损伤处理;尼莫地平组: $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尼莫地平于OGD损伤时加入培养液中;人参炔醇组:于OGD损伤时加入人参炔醇(质量终浓度分别为10, 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。各组细胞处理后置(5% $\text{CO}_2 + 95\% \text{N}_2$) 37 $^\circ\text{C}$ CO_2 培养箱中分别培养2, 4, 6, 12 h,收集细胞进行相关实验。

2.2 细胞形态学观察 参照文献^[5]方法,细胞用磷酸缓冲液PBS清洗1次,重悬于PBS中。相差显微镜下观察PC12细胞的形态变化。

2.3 凋亡细胞计数 收集细胞悬液, $2\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min,弃上清液,沉淀用70%乙醇悬浮,4 $^\circ\text{C}$ 冰箱内固定12 h。取固定后的细胞以 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)洗2遍并悬浮,加入质量终浓度为 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 核糖核酸酶A(RNase A),37 $^\circ\text{C}$ 恒浴1 h,再加入PI染液 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,摇匀后4 $^\circ\text{C}$ 避光静置1 h,经滤过后于流式细胞仪上计数10 000个细胞,测定各期细胞DNA含量并计算凋亡细胞所占比例。

2.4 乳酸脱氢酶(LDH)释放的测定 用LDH试剂盒(北京化学试剂公司提供)测定培养液中LDH含量,将相应的培养细胞置于-30 $^\circ\text{C}$ 3 h以上,融解后以同法测定总LDH。神经细胞损伤程度以培养细胞释放LDH占总LDH的百分比表示。

2.5 细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的测定 收集细胞, $1\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min,弃上清液,用新鲜培养基重悬细胞,加入含Fluo-3($50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的无血清MEM,37 $^\circ\text{C}$ 45 min后以PBS清洗细胞3次,取细胞悬液1 mL,经滤过后于流式细胞仪上以LOG软件分析,绘制 Ca^{2+} 的平均荧光值分布图。Fluo-3为新一代细胞膜透性的 Ca^{2+} 特异性荧光染料,可与细胞内游离 Ca^{2+} 结合后发出荧光,直接以荧光强度变化表示细胞内游 Ca^{2+} 变化(激发光波长480 nm,发射光波长530 nm和620 nm)。

2.6 统计学方法 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用SPSS 13.0统计软件,采用单因素方差分析法,组间比较用 t 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞形态学观察 经过人参炔醇保护的OGD损伤PC12细胞,细胞形态学的改变与单纯OGD组PC12细胞比较有明显的改善。在显微镜下见活细胞数明显增加,细胞的脱落率下降,细胞的贴壁率提高,细胞折光性增加,细胞间仍可见比较多的细胞联

系,细胞仍以簇状生长为主,散在单一的细胞较少。

3.2 人参炔醇对 LDH 释放的影响 OGD 损伤后 2 h 细胞释放 LDH 显著增加,并随损伤时间的延长而增加,人参炔醇能够减少 LDH 的释放,并随着剂量的增加而作用增强,见表 1。

3.3 人参炔醇对细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响 正常对照

组细胞在不同时间内 Ca^{2+} 含量及分布均较稳定。OGD 损伤不同时间后,细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 明显增加,并随损伤时间的延长而增加,尼莫地平明显减少 Ca^{2+} 的过量产生,人参炔醇能抑制或减少 Ca^{2+} 的过量产生,随浓度增加作用增强,与模型组相比差异显著 ($P < 0.05, P < 0.01$) 见表 2。

表 1 人参炔醇对培养 PC12 细胞 LDH 释放的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	LDH 释放/%			
		2 h	4 h	6 h	12 h
正常对照	-	11.29 ± 4.32 ²⁾	12.47 ± 3.95 ²⁾	13.48 ± 4.51 ²⁾	14.47 ± 4.23 ²⁾
OGD	-	18.25 ± 2.49	19.29 ± 3.72	30.41 ± 4.18	43.92 ± 3.95
人参炔醇	10	12.77 ± 4.85	13.98 ± 4.01 ²⁾	18.92 ± 4.53 ²⁾	26.86 ± 4.59
	20	11.82 ± 3.03 ²⁾	12.76 ± 4.07 ²⁾	14.95 ± 3.91 ²⁾	23.68 ± 3.79 ²⁾
尼莫地平 ³⁾	100	12.21 ± 4.07 ¹⁾	13.95 ± 3.84 ²⁾	14.59 ± 3.14 ²⁾	17.53 ± 3.77 ²⁾

注:与 OGD 组比较¹⁾ $P < 0.05$ ²⁾ $P < 0.01$; ³⁾ 尼莫地平质量浓度为 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (表 2~4 同)。

表 2 人参炔醇对培养 PC12 细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	$[Ca^{2+}]_i$			
		2 h	4 h	6 h	12 h
正常对照	-	6.47 ± 0.19 ²⁾	6.76 ± 0.17 ²⁾	6.56 ± 0.37 ²⁾	6.65 ± 0.21 ¹⁾
OGD	-	10.11 ± 0.67	11.28 ± 0.29	9.97 ± 0.28	8.58 ± 0.26
人参炔醇	10	9.77 ± 0.72	8.91 ± 0.55 ²⁾	8.42 ± 0.59 ²⁾	7.76 ± 0.57
	20	8.69 ± 0.68 ¹⁾	7.97 ± 0.38 ²⁾	7.74 ± 0.52 ²⁾	7.23 ± 0.56 ²⁾
尼莫地平 ³⁾	100	8.47 ± 0.38 ¹⁾	7.68 ± 0.41 ²⁾	7.59 ± 0.39 ²⁾	7.24 ± 0.46 ¹⁾

3.4 人参炔醇对神经细胞凋亡的影响 OGD 损伤不同时间后,细胞凋亡发生率明显增高,并随损伤时间的延长,凋亡的细胞增多,尼莫地平能够拮抗这种

作用,人参炔醇能抑制细胞凋亡的发生,与模型组相比差异显著,并随剂量的增加抑制作用明显,与尼莫地平组相比差异不显著,见表 3。

表 3 人参炔醇对培养 PC12 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	细胞凋亡/%			
		2 h	4 h	6 h	12 h
正常对照	-	5.67 ± 1.12 ²⁾	5.79 ± 1.57 ²⁾	6.72 ± 1.36 ²⁾	6.58 ± 1.47 ²⁾
OGD	-	20.30 ± 8.72	35.43 ± 7.78	45.38 ± 9.24	47.08 ± 8.78
人参炔醇	10	17.22 ± 5.03 ¹⁾	24.55 ± 6.75 ¹⁾	32.17 ± 8.03 ²⁾	37.50 ± 6.17 ¹⁾
	20	15.42 ± 5.17 ²⁾	18.79 ± 4.27 ²⁾	25.71 ± 8.08 ²⁾	30.13 ± 8.29 ¹⁾
尼莫地平 ³⁾	100	13.26 ± 4.31 ²⁾	15.43 ± 4.91 ²⁾	19.55 ± 5.07 ²⁾	22.19 ± 4.97 ²⁾

3.5 人参炔醇对神经细胞形态及细胞坏死的影响

Hoechst 和 PI 双染色检测时在荧光显微镜下可观察到正常细胞发蓝色荧光,染色质均匀分布,凋亡小体产生,坏死细胞发红色荧光。正常对照组只可见少量的凋亡细胞和极少量的坏死细胞。OGD 损伤

后可见大量的凋亡细胞及少量坏死细胞,并随损伤时间的延长而凋亡细胞及坏死细胞均增加,以凋亡细胞为主,加入人参炔醇及尼莫地平后,凋亡及坏死细胞均明显减少,见表 4。

表 4 人参炔醇对培养 PC12 细胞坏死的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	细胞坏死/%			
		2 h	4 h	6 h	12 h
正常对照	-	1.13 ± 0.36 ²⁾	1.57 ± 0.24 ²⁾	1.79 ± 0.21 ²⁾	1.98 ± 0.55 ²⁾
OGD	-	6.37 ± 1.75	8.42 ± 1.58	9.25 ± 1.04	10.07 ± 1.12
人参炔醇	10	4.55 ± 0.46 ¹⁾	5.72 ± 0.24 ²⁾	6.47 ± 0.65 ²⁾	7.53 ± 0.61 ²⁾
	20	5.88 ± 0.52 ¹⁾	5.97 ± 0.59 ²⁾	6.36 ± 0.48 ²⁾	6.87 ± 0.72 ²⁾
尼莫地平 ³⁾	100	4.36 ± 0.49 ²⁾	5.37 ± 0.56 ²⁾	5.95 ± 0.32 ²⁾	6.79 ± 0.58 ²⁾

4 讨论

脑血管病是威胁人类生命和健康最严重的三大疾病之一,具有高发病率、高致残率和高致死率等特点。在脑血管病中,缺血性脑卒中约占 60% ~ 80%,其致残率居疾病谱之首^[6]。缺血再灌注损伤在脑血管病的发病过程中起着至关重要的作用,但目前临床上应用的药物真正有效的极少。

缺血再灌注性脑损伤所致的神经细胞死亡有坏死和凋亡两种方式,在脑缺血缺氧早期引起的神经元死亡主要以坏死为主,而继发性或迟发性神经元死亡(delayed neuronal death, DND)则以凋亡为主。缺血再灌注脑损伤时神经细胞凋亡和坏死并存,共同参与梗死区的形成,凋亡主要位于半暗区,坏死发生于缺血中心区,抑制半暗区向缺血中心区的发展是缺血性脑血管病治疗的关键,即抑制神经细胞凋亡的发生有利于缺血性脑血管疾病的治疗。

脑缺血再灌注后细胞内钙稳态异常,大量 Ca²⁺蓄积在细胞内产生严重的毒性作用,参与兴奋性神经毒、自由基等因素介导的 DND 的病理级联反应,导致神经细胞功能与结构的障碍。缺血损伤引起了大脑不同区域的细胞内钙集聚,尤其在海马更明显。脑缺血再灌注后神经元钙稳态的维持,是细胞生存的关键。细胞 [Ca²⁺]_i 升高被认为是凋亡的始动因素。研究表明^[7]:各种原因诱导的细胞凋亡出现之前,胞浆内游离 Ca²⁺ 浓度均持续升高,抑制 Ca²⁺ 浓度的升高可阻止细胞凋亡、减轻细胞损伤的程度。

PC12 (pheochromocytoma cells) 细胞系即嗜铬细胞瘤细胞克隆,由于其易稳定培养、易获得性和细胞均一性等优点,已成为神经科学离体研究中的重要细胞,广泛应用于研究神经细胞功能、分化发育与凋亡^[8]。本实验以 PC12 细胞 OGD 损伤为模型,模拟脑缺血状态,诱导 PC12 细胞凋亡。结果发现,随着 OGD 损伤时间的延长,细胞 [Ca²⁺]_i 随之明显增高,细胞凋亡与坏死细胞均增多,反映细胞损伤程度的 LDH 释放亦越来越多。人参炔醇能明显改善这种

情况,使 LDH 的释放、细胞 [Ca²⁺]_i 水平、细胞凋亡及坏死的百分率均显著降低,对缺血性损伤神经细胞具有保护作用。结果提示:人参炔醇对 OGD 损伤后 PC12 细胞的凋亡过程具有抑制作用,这种作用可能与其抑制神经细胞内钙超载有关,但人参炔醇的作用机制是影响细胞外钙的内流,还是调整细胞内钙库的释放,尚需进一步研究。

[参考文献]

- [1] 段贤春,汪永忠,居靖,等. 人参炔醇研究进展[J]. 安徽医药,2008,12(1):1.
- [2] Chen X, Kintner D B, Baba A, et al. Protein aggregation in neurons following OGD: a role for Na⁺ and Ca²⁺ ionic dysregulation[J]. J Neurochem, 2010, 112(1):173.
- [3] Gong Q H, Wang Q, Shi J S, et al. Inhibition of caspases and intracellular free Ca²⁺ concentrations are involved in resveratrol protection against apoptosis in rat primary neuron cultures [J]. Acta Pharma Sin, 2007, 28(11):1724.
- [4] 居靖,朱满洲,汪永忠,等. 三七超临界 CO₂ 萃取物对谷氨酸和一氧化氮引起的 PC12 细胞损伤的保护作用[J]. 中国医院药学杂志,2009,29(2):116.
- [5] 朱陵群,范吉平,黄启福,等. 三七总皂苷抗缺氧缺糖再给氧诱导大鼠海马神经细胞凋亡的研究[J]. 中国中药杂志,2003,28(1):52.
- [6] Mok V C, Lau A Y, Wong A, et al. Long-term prognosis of Chinese patients with a lacunar infarct associated with small vessel disease: a five-year longitudinal study[J]. Int J Stroke, 2009, 4(2):81.
- [7] Xu W, Zha R P, Wang W Y, et al. Effects of scutellarin on PKCγ in PC12 cell injury induced by oxygen and glucose deprivation [J]. Acta Pharmacol Sin, 2007, 28(10):1573.
- [8] 白艳艳,杨吉成,缪竞诚,等. 人 β-NGF 基因在 CHO 细胞中表达的生物学活性及分离纯化[J]. 中国免疫学杂志,2003,19(5):343.

[责任编辑 聂淑琴]