

# 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

陈志刚<sup>1\*</sup>, 朱陵群<sup>2</sup>, 王席玲<sup>2</sup>, 张 壮<sup>2</sup>, 闫彦芳<sup>2</sup>, 牛福玲<sup>2</sup>

(1. 北京中医药大学东方医院神经内科, 北京 100078;

2. 北京中医药大学东直门医院中医内科学教育部重点实验室和脑病研究室, 北京 100700)

[摘要] 目的: 观察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。方法: 建立缺氧/缺糖再给氧模型, 模拟缺血再灌注损伤。流式细胞术检测凋亡细胞百分率, 荧光显微镜观察细胞形态学变化和坏死细胞百分率, 同时, 测定细胞乳酸脱氢酶(LDH)的漏出和一氧化氮(NO)的产生量。结果: 神经细胞缺氧/缺糖 5 h 后再给氧可诱导神经细胞凋亡和细胞坏死, 并显著增加 LDH 的漏出和 NO 的产生, 并随再给氧时间的延长而增加。三七总皂苷能降低神经细胞凋亡及坏死的百分率, 减少 LDH 的漏出和 NO 的过量产生, 三七总皂苷的作用随剂量增加而增加。结论: 三七总皂苷具有拮抗海马神经细胞凋亡的作用, 这种作用可能与降低或抑制一氧化氮合酶(NOS)活性, 减少 NO 的过量产生有关。

[关键词] 三七总皂苷; 神经细胞; 凋亡; 一氧化氮; 缺氧/缺糖

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)05-0055-04

## Protective Effects of Panax Notoginseng Saponins on Rat Hippocampal Neuron Injury Induced by Hypoxia/Hypoglycemia and Reoxygenation

CHEN Zhi-gang<sup>1\*</sup>, ZHU Ling-qun<sup>2</sup>, WANG Xi-ling<sup>2</sup>, ZHANG Zhuang<sup>2</sup>, YAN Yan-fang<sup>2</sup>, NIU Fu-ling<sup>2</sup>

(1. Department of Neurology, Dong Fang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China;

2. The Key Laboratory of Chinese Internal Medicine of Ministry of Education, Department of Neurology, Dong Zhi Men Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the protective effects of Panax Notoginseng Saponins (PNS) on hypoxia / hypoglycemia and reoxygenation injury of rat hippocampal neurons. **Methods:** The damaging models of hypoxia / hypoglycemia and reoxygenation were established on cultured rat hippocampal neurons. Apoptosis were measured by flow cytometry. Morphological changes and neuronal necrosis were observed with fluorescence microscope. Nitric oxide (NO) contents and the leakage of lactic dehydrogenase(LDH) were measured. **Results:** hypoxia/hypoglycemia cultures for 5 hours with reoxvgenation afterwards induced neuronal apoptosis and necrosis, significantly increased NO contents and the leakage of LDH. The effect were increased with the extending time of reoxygenation. PNS showed significant decrease in the percentage of neuronal apoptosis and necrosis, and reduced NO contents and the leakage of LDH. **Conclusion:** PNS may play protectvie role on neuron injury induced by hypoxia /hypoglycemia and reoxygenation by decreasing neuron apoptosis and necrosis, and inhibiting the release of NO and LDH.

[收稿日期] 2007-07-25

[基金项目] 国家人事部留学回国人员基金资助(1999037A)

[通讯作者] \* 陈志刚, Tel: (010) 67689776; E-mail: zgchen01@yahoo.com.cn

[ **Key words** ] panax notoginseng saponins; neuron; apoptosis; nitric oxide; hypoxia/hypoglycemia

三七总皂苷是三七的主要活性组成成分,能改善沙土鼠急性脑缺血再灌注的卒中指数,降低死亡率,清除氧自由基,抗自由基损害作用,对神经细胞的缺血性损伤有保护作用<sup>[1]</sup>。本实验是通过培养大鼠胎鼠海马神经细胞的缺氧/缺糖损伤模型,观察三七总皂苷对神经细胞凋亡及细胞 NO 漏出量变化的影响,并探讨其对神经细胞的保护作用。

## 1 材料

**1.1 药物和试剂** 三七总皂苷(Panax notoginseng saponins, PNS),为本实验室提取,含量以人参皂苷 Rb1 计为 83.2%;多聚-L-赖氨酸、阿糖胞苷、左旋硝基精氨酸甲酯(nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME)及碘化丙啶(propidium iodide, PI)均购自 Sigma 公司;Hoechst33342 购自 Molecular Probe 公司。

**1.2 动物** Wistar 大鼠,孕 18 d 的胎鼠,由中国医学科学院实验动物繁育场提供,动物许可证编号:SCXK11-00-0006。

**1.3 仪器** 128C-400 型 Clinibio 全自动酶标仪(奥地利 ASYS Hitech GmbH 公司),FACS Calibur 型流式细胞仪(美国 BD 公司),BX60 型 OLYMPUS 显微镜(日本 OLYMPUS 公司),722 分光光度计(上海第三分析仪器厂)。

## 2 方法

**2.1 培养神经元缺氧/缺糖损伤模型及分组** 无菌条件下取出胎鼠置于培养皿中,断头取脑后,解剖显微镜下分离出双侧海马,置含有 0.125% 的胰蛋白酶的 D-Hanks 液中,37 °C 消化 20 min,加入含 100 mL·L<sup>-1</sup> 胎牛血清的 DMEM 培养液中终止胰蛋白酶的作用,轻轻吹打使组织分散成单细胞悬液,并经 200 目不锈钢筛过滤,以 1 × 10<sup>9</sup>·L<sup>-1</sup> 的密度接种于 0.01% 多聚-L-赖氨酸过夜处理的培养板中,置 37 °C,5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养,于接种的第 3 天加入阿糖胞苷(终浓度为 10 μmol·L<sup>-1</sup>)处理 24 h 以抑制胶质细胞的增殖。取培养第 10 天的神经细胞用于实验,随机分为:A. 缺氧/缺糖组:取培养 10 d 的神经细胞用无糖 Earle's 液置换,然后置于缺氧罐内充以 95% N<sub>2</sub> 和 5% CO<sub>2</sub>,罐内氧气含量低于 1%,37 °C 培养 5 h,然后从缺氧罐中取出,将 Earle's 液换为无血清的 DMEM 培养液,置培养箱中继续培养。B. 对照组:不经缺氧/缺糖处理。C. L-NAME 组:100 μmol·L<sup>-1</sup> 于

缺氧/缺糖损伤时加入培养液中。D. 三七总皂苷 I 和 II 组:终浓度分别为 25 mg·L<sup>-1</sup>(I 组)和 50 mg·L<sup>-1</sup>(II 组)三七总皂苷于实验前 12 h 加入培养液中,其余同缺氧/缺糖组。

**2.2 凋亡细胞计数** 收集细胞悬液,1 000 × g 离心 5 min,弃上清,沉淀用 70% 乙醇悬浮,4 °C 冰箱内固定 12 h 以上,取固定后的细胞用 0.1 mmol·L<sup>-1</sup> 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)洗 2 遍并悬浮之,加入终浓度为 20 mg·L<sup>-1</sup> RNase A,37 °C 恒浴 1 h,再加入 PI 染液至终浓度 50 mg·L<sup>-1</sup>,摇匀后 4 °C 避光静置 1 h,经尼龙网过滤,在 FACS Calibur 型流式细胞仪上计数 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。

**2.3 细胞形态学观察** 参照文献方法<sup>[1]</sup>:细胞用 Hoechst33342 和 PI 双染色 15 min,用磷酸缓冲液洗 1 次,重悬于磷酸缓冲液中,然后涂片,用荧光显微镜观察,同时,用图像处理系统(SPOT-2,美国 Diagnostic Instrument Inc.)计算坏死细胞的百分率。

**2.4 乳酸脱氢酶(LDH)的测定** 用试剂盒(北京化学试剂公司提供)测定培养液中的 LDH 含量,并将相应的培养细胞置于 -30 °C,3 h 以上,融冻后以同法测定总 LDH。神经细胞损伤程度以培养细胞漏出的 LDH 占总 LDH 的百分比表示。

**2.5 神经细胞 NO 含量测定** 利用硝酸还原酶特异性将 NO<sub>3</sub> 还原成 NO<sub>2</sub>,用 722 分光光度计比色,计算 NO 的含量,按试剂盒说明书测定。

**2.6 统计方法** 结果以均值 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS 8.0 统计分析软件进行单因素方差分析。

## 3 结果

**3.1 三七总皂苷对 LDH 漏出的影响** 缺氧/缺糖组与对照组比,LDH 的漏出明显增加( $P < 0.01$ ),并随再给氧时间的延长而增加,PNS 能够减少 LDH 的漏出,并随着剂量的增加而作用增强见表 1。

表 1 三七总皂苷对 LDH 漏出率的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量 (mg·L <sup>-1</sup> )	LDH 漏出率(%)		
		3 h	12 h	24 h
对照组	—	8.84 ± 3.91 <sup>2)</sup>	9.16 ± 3.00 <sup>2)</sup>	14.81 ± 4.27 <sup>2)</sup>
缺氧/缺糖组	—	27.63 ± 6.54	45.41 ± 8.02	60.35 ± 7.32
三七总皂苷 I 组	25	18.98 ± 3.75 <sup>1)</sup>	30.14 ± 9.81 <sup>1)</sup>	39.09 ± 8.25 <sup>2)</sup>
三七总皂苷 II 组	100	15.16 ± 5.97 <sup>1)</sup>	24.01 ± 4.69 <sup>2)</sup>	35.19 ± 8.03 <sup>2)</sup>
L-NAME 组	100 μmol·L <sup>-1</sup>	13.57 ± 4.38 <sup>1)</sup>	19.92 ± 5.11 <sup>2)</sup>	28.40 ± 8.59 <sup>2)</sup>

注:与缺氧/缺糖组相比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ (下同)

**3.2 三七总皂苷对 NO 含量的影响** 缺氧/缺糖组神经细胞 NO 的产生明显增加, 并随再给氧时间的延长而有所增加; L-NAME 明显减少 NO 的过量产生; 三七总皂苷能抑制或减少 NO 的过量产生, 浓度增加, 作用增强, 与缺氧/缺糖组相比有显著性差异见表 2。

表 2 三七总皂苷对 NO 含量的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量 ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	NO 含量 ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )		
		3 h	12 h	24 h
对照组	—	6.22 $\pm$ 0.64 <sup>2)</sup>	6.43 $\pm$ 0.61 <sup>2)</sup>	6.41 $\pm$ 0.75 <sup>2)</sup>
缺氧/缺糖组	—	11.71 $\pm$ 1.90	21.27 $\pm$ 2.53	39.75 $\pm$ 3.73
三七总皂苷组	25	10.96 $\pm$ 1.81	14.91 $\pm$ 2.38 <sup>2)</sup>	25.81 $\pm$ 2.94 <sup>2)</sup>
三七总皂苷阻	100	9.17 $\pm$ 1.75 <sup>1)</sup>	12.05 $\pm$ 2.91 <sup>2)</sup>	18.78 $\pm$ 3.01 <sup>2)</sup>
L-NAME 组	100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	7.97 $\pm$ 1.58 <sup>2)</sup>	10.02 $\pm$ 1.83 <sup>2)</sup>	12.52 $\pm$ 2.07 <sup>2)</sup>

**3.3 三七总皂苷对神经细胞凋亡的影响** 缺氧/缺糖组神经细胞凋亡发生率明显增高, 并随给氧时间延长凋亡的细胞也越多; L-NAME 能够拮抗这种作用; 三七总皂苷能抑制神经细胞凋亡的发生, 与缺氧/缺糖组相比有显著性差异, 并随剂量的增加其抑制作用更加明显见表 3。

表 3 三七总皂苷对神经细胞凋亡的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	终浓度 ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	细胞凋亡百分率 (%)		
		3 h	12 h	24 h
对照组	—	4.27 $\pm$ 1.39 <sup>1)</sup>	5.89 $\pm$ 1.25 <sup>2)</sup>	5.17 $\pm$ 1.86 <sup>2)</sup>
缺氧/缺糖组	—	19.06 $\pm$ 5.01	45.73 $\pm$ 11.57	49.85 $\pm$ 10.19
三七总皂苷组	25	12.49 $\pm$ 3.57 <sup>1)</sup>	29.11 $\pm$ 4.73 <sup>1)</sup>	20.63 $\pm$ 5.01 <sup>2)</sup>
三七总皂苷阻	100	9.38 $\pm$ 3.16 <sup>1)</sup>	15.25 $\pm$ 3.95 <sup>2)</sup>	19.12 $\pm$ 6.93 <sup>1)</sup>
L-NAME 组	100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	6.29 $\pm$ 2.27 <sup>2)</sup>	11.86 $\pm$ 3.72 <sup>2)</sup>	13.77 $\pm$ 3.51 <sup>2)</sup>

**3.4 三七总皂苷对细胞形态的影响** Hoechst33342 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, 凋亡细胞也发蓝色荧光, 但染色质凝集, 核皱缩、碎裂, 细胞皱缩出芽, 凋亡小体产生, 坏死细胞发红色荧光。对照组只可见少量的凋亡细胞和极少量的坏死细胞; 缺氧/缺糖组可见大量的凋亡细胞及少量坏死细胞, 并随再给氧时间的延长凋亡细胞及坏死细胞均增加, 以凋亡细胞为主; 加入三七总皂苷及 L-NAME 后, 凋亡及坏死细胞均明显减少见表 4。

#### 4 讨论

缺血性或缺血性再灌注性脑损伤时神经细胞凋亡和坏死并存, 共同参与梗塞区的形成, 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病的

治疗<sup>[2,4]</sup>。通过一些措施(如药物)可使神经细胞凋亡过程减弱或停止, 阻止缺血中心区的扩大<sup>[2,3]</sup>。

表 4 三七总皂苷对神经细胞坏死的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	终浓度 ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	细胞坏死百分率 (%)		
		3 h	12 h	24 h
对照组	—	0.55 $\pm$ 0.22 <sup>2)</sup>	0.89 $\pm$ 0.34 <sup>2)</sup>	2.89 $\pm$ 0.39 <sup>2)</sup>
缺氧/缺糖组	—	6.83 $\pm$ 1.53	7.57 $\pm$ 1.33	11.49 $\pm$ 1.50
三七总皂苷组	25	3.81 $\pm$ 0.38 <sup>2)</sup>	4.17 $\pm$ 0.55 <sup>2)</sup>	6.08 $\pm$ 0.94 <sup>2)</sup>
三七总皂苷阻	100	2.30 $\pm$ 0.57 <sup>2)</sup>	2.50 $\pm$ 0.31 <sup>2)</sup>	5.19 $\pm$ 0.78 <sup>2)</sup>
L-NAME 组	100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	1.92 $\pm$ 0.75 <sup>2)</sup>	2.35 $\pm$ 0.58 <sup>2)</sup>	3.29 $\pm$ 0.82 <sup>2)</sup>

NO 是 L-精氨酸在一氧化氮合酶(NOS)作用下氧化生成的一种极不稳定的、可扩散的具有高度化学活性的神经递质, 参与神经的信息传递、突触可塑性的形成、脑血流量调节等中枢神经系统的多种生理功能。生理量的 NO 对脑具有保护作用, 而过量的 NO 有神经毒性作用, 参与多种组织和细胞凋亡过程<sup>[5,6]</sup>。在脑缺血再灌注性损伤时 NOS 活性增强, 合成过量的 NO, NO 与 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 结合产生过氧化亚硝基阴离子(ONOO<sup>-</sup>), 这是一种强氧化剂, 能氧化蛋白质的巯基, 使多种酶失活; NO 也能引起 DNA 损伤, 并可使呼吸链中重要酶的铁硫中心失活, 使线粒体电子传递受阻, 导致细胞能量代谢障碍, 最终引起细胞死亡<sup>[7]</sup>。

本文以培养大鼠胎鼠海马神经细胞缺氧/缺糖再给氧为模型, 模拟缺血再灌注状态, 诱导培养的海马神经细胞凋亡的发生。结果发现, 随着缺氧/缺糖 5 h 后再给氧的时间延长, NO 的产生随之增加, 神经细胞凋亡的发生也越来越多, 坏死的神经细胞也增多, 代表神经细胞损伤程度的 LDH 的漏出也越来越多, 而用 NOS 抑制剂——L-NAME 则能减少 NO 的产生, 神经细胞凋亡的发生、坏死的神经细胞及 LDH 的漏出也减少, 提示抑制 NOS 能减少 NO 的过量产生, 降低神经细胞凋亡的发生, 而三七总皂苷组的细胞 LDH 漏出、NO 产生、细胞凋亡及坏死的神经细胞均明显降低, 这提示三七总皂苷可能对神经细胞的凋亡过程具有抑制作用。

我们推测三七总皂苷拮抗神经细胞凋亡的作用可能与降低或抑制 NOS 活性, 减少 NO 的过量产生有关。其机制有待于进一步研究。

#### [参考文献]

[1] 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): 52-55.

- [ 2 ] Danielisova V, Nemethova M, Burda J. The protective effect of aminoguanidine on cerebral ischemic damage in the rat brain[ J]. *Physiol Res*, 2004, 53( 5) : 533-40.
- [ 3 ] Bhardwaj A, Alkayed NJ, Kirsch JR, *et al.* Mechanisms of ischemic brain damage[ J]. *Curr Cardiol Rep*, 2003, 5( 2) : 160-167.
- [ 4 ] Shin DH, Lee E, Kim JW, *et al.* Protective effect of growth hormone on neuronal apoptosis after hypoxia ischemia in the neonatal rat brain[ J]. *Neurosci Lett*, 2004, 354( 1) : 64-68.
- [ 5 ] 王建社,董大翠,严永杰,等.大鼠脑缺血再灌注后海马神经细胞 NOS 表达与细胞凋亡及复方丹参的保护作用[ J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2006, 15( 3) : 307-311.
- [ 6 ] Vannucchi MG, Corsani L, Gianfriddo M, *et al.* Expression of neuronal and inducible nitric oxide synthase in neuronal and glial cells after transient occlusion of the middle cerebral artery [ J]. *Neuroscience*, 2005, 136( 4) : 1015-1026.
- [ 7 ] 陈应柱,顾永健,包仕尧.刺五加皂苷对皮质神经元缺血缺氧性损伤的保护作用[ J]. *临床神经病学杂志*, 2006, 19( 2) : 127-129.