

丁香脂素对谷氨酸钠诱导的 SH-SY5Y 细胞 兴奋性损伤的保护作用

严秋霞¹, 李艳梅², 范艳华², 张明生^{1*}, 杨礼寿², 姚尧², 杨珏²,
陈娟², 龙群², 邱剑飞², 杨小生^{2*}

(1. 贵州大学生命科学院, 贵阳 550025;

2. 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵阳 550014)

[摘要] **目的:** 基于谷氨酸钠诱导人神经母细胞瘤细胞 (SH-SY5Y) 细胞损伤构建的模型, 观察从枫香榭寄生中提取得到丁香脂素的保护, 并探讨其作用机制。**方法:** 采用谷氨酸钠构建 SH-SY5Y 细胞损伤模型, 实验分为正常组, 损伤模型组 (谷氨酸钠 50 mmol·L⁻¹, 谷氨酸钠 50 mmol·L⁻¹ + DMSO), 丁香脂素组 (6.25, 12.5, 25 μmol·L⁻¹), 通过细胞计数法, 细胞形态学观察, Annexin V-FITC/碘化丙啶 (PI) 细胞凋亡检测、活性氧 (ROS) 检测、线粒体膜电位以及蛋白免疫印迹法 (Western blot) 等方法, 评价丁香脂素对谷氨酸钠诱导的神经兴奋性损伤的神经保护活性。**结果:** 与正常组比较, 模型组的细胞存活率明显降低 ($P < 0.01$), ROS 显著升高 ($P < 0.01$), 线粒体膜电位显著降低 ($P < 0.01$), 聚腺苷二磷酸-核糖聚合酶 (PARP), PARP1 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$), 细胞的凋亡率显著增大 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 丁香脂素组 (6.25, 12.5, 25 μmol·L⁻¹) 呈浓度依赖性增加细胞的存活率 ($P < 0.01$), 减少 ROS 的积累 ($P < 0.01$), 显著恢复线粒体膜电位的变化 ($P < 0.01$), 显著上调 PARP, PARP1 蛋白 ($P < 0.01$), 显著降低细胞凋亡率 ($P < 0.01$)。**结论:** 提示丁香脂素对谷氨酸钠诱导的 SH-SY5Y 神经细胞的兴奋性损伤具有显著的保护活性, 其作用机制可能是通过抗氧化应激, 修复线粒体功能及 DNA 损伤等通路来显著降低谷氨酸钠诱导的神经细胞凋亡。

[关键词] 丁香脂素; 谷氨酸钠; 神经兴奋性损伤; 人神经母细胞瘤细胞 (SH-SY5Y); 神经保护作用

[中图分类号] R2-0; R285.5; R289; R322.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)18-0076-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191839

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190603.1420.004.html>

[网络出版时间] 2019-06-04 16:03

Protective Effect of Syringaresinol on Excitatory Damage Induced by Sodium Glutamate in SH-SY5Y Cells

YAN Qiu-xia¹, LI Yan-mei², FAN Yan-hua², ZHANG Ming-sheng^{1*}, YANG Li-shou²,
YAO Yao², YANG Jue², CHEN Juan², LONG Qun², QIU Jian-fei², YANG Xiao-sheng^{2*}

(1. School of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China;

2. The Key Laboratory of Chemistry for Natural Products of Guizhou Province and Chinese
Academy of Sciences, Guiyang 550014, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a model for the injury of human neuroblastoma cell (SH-SY5Y) induced by sodium glutamate, and to observe the protective effect of syringaresinol on cell damage from *Viscum*

[收稿日期] 20190314(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81860609); 贵州省科技厅项目(黔科合人才[2015]4027号); 贵州省科技计划项目(黔科合基础[2018]1409)

[第一作者] 严秋霞, 在读硕士, 从事天然药物成分及生理活性研究, E-mail: 1097306685@qq.com

[通信作者] * 杨小生, 研究员, 博士生导师, 从事特色民族药食用生物资源中的功能天然产物、品质评价及新产品研究与开发, E-mail: gzcnp@sina.cn; * 张明生, 教授, 博士生导师, 从事植物生理生化研究, E-mail: mshzhang@163.com

liquidambaricolum hayataon, and to explore its mechanism. **Method:** Construction of SH-SY5Y cell injury model using sodium glutamate. The experiment was divided into normal cell group, injury model group (sodium glutamate $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, sodium glutamate $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} + \text{DMSO}$), syringaresinol experimental group ($6.25, 12.5, 25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), by cell counting, cell morphology observation, Annexin V-FITC/PI apoptosis detection, ROS reactive oxygen species detection, mitochondrial membrane potential, and Western blot, evaluation of syringaresinol on glutamate-induced neuronal excitability injury neuroprotective activity. **Result:** Compared with normal group, the cell survival rate of the model group was significantly decreased ($P < 0.01$), ROS accumulation was significant ($P < 0.01$), mitochondrial membrane potential was significantly decreased ($P < 0.01$), and the expression of poly-ADP-ribose polymerase (PARP) and PARP1 protein was significantly decreased ($P < 0.01$), the apoptotic rate of cells also increased significantly ($P < 0.01$). Compared with the model group, the syringaresinol group ($6.25, 12.5, 25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) showed a concentration-dependent increase in cells. Survival rate ($P < 0.01$), decreased ROS accumulation ($P < 0.01$), restored mitochondrial membrane potential ($P < 0.01$), up-regulated PARP, PARP1 protein ($P < 0.01$), decreased apoptosis rate ($P < 0.01$). **Conclusion:** Syringaresinol has significant protective activity against excitatory damage induced by sodium glutamate in SH-SY5Y neurons, the mechanism may be through anti-oxidative stress, repairing mitochondrial function and DNA damage to significantly reduce sodium glutamate-induced neuronal apoptosis.

[**Key words**] syringaresinol; sodium glutamate; nerve excitatory injury; human neuroblastoma cell (SH-SY5Y); neuroprotective effect

神经退行性疾病是一种由中枢神经组织的神经元凋亡、丢失、退化等导致其功能衰减或丧失的一类慢性进行性疾病的总称,并随着时间而加重病情,这类疾病主要包括阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD),帕金森病(Parkinson's disease, PD),亨廷顿病(Huntington disease, HD)等,这些神经退行性疾病严重危害到人们的身心健康,成为世界性的卫生难题^[1]。现目前市场上的治疗药物,其治疗效果仅能够延缓病情恶化,因此,寻找有效的治疗神经退行性疾病已刻不容缓。大量研究表明,神经退行性疾病的发病机制与细胞的凋亡、氧化应激反应和线粒体功能失调等密切相关^[2]。近年来,天然类活性化合物,因其来源天然无毒或低毒,现已成为神经退行性疾病预防保护药物筛选的重要研究热点。丁香脂素是一种较为常见的双环氧型木脂素,常以糖苷的形式存在,是多种药用植物中重要的活性成分。丁香脂素及其糖苷具有抗氧化、抑制乙酰胆碱酯酶、抗肿瘤、促进神经元的生长和神经突起分枝的生长等作用^[3-6],但其对谷氨酸钠诱导 SH-SY5Y 神经细胞的损伤保护作用尚未见报道。谷氨酸(glutamate, Glu)是哺乳动物脑内主要的兴奋性氨基酸,参与中枢神经系统的信息传递,但谷氨酸过度释放可产生神经兴奋性毒性,引起神经细胞损伤或死亡^[7]。人神经母细胞瘤细胞株(SH-SY5Y)具有与正常神经细胞相似的特点,广泛用于神经类药物体外模型作用机

制的筛选^[8-9]。本研究基于谷氨酸钠诱导 SH-SY5Y 神经细胞建立损伤模型,探讨丁香脂素对谷氨酸钠诱导 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用,以旨为神经退行性疾病的治疗提供基础研究。

1 材料

1.1 细胞 SH-SY5Y 为贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室生物活性筛选,并经肿瘤药理实验室李艳梅实验组鉴定保存,传至第 8 代用于实验。

1.2 药物及试剂 本研究所用的丁香脂素是从枫香榭寄生中提取并经过贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室杨礼寿助理研究员鉴定。谷氨酸钠(美国 Sigma 公司,批号 G5889);RPMI-1640,胰蛋白酶(EDTA)(美国 Gibco 公司,批号分别为 C11875500BT, 25200072);胎牛血清(FBS,美国 Vacca Biologics Llc 公司,批号 411840);细胞级二甲亚砜(DMSO),彩虹 245 广谱蛋白 marker,BCA 蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝公司,批号分别为 D8371-50 mL, 920, 500T);Pen-Strep Solution(美国 Biological Industries,批号 2502);DAPI 染料,SDS-PAGE 凝胶试剂盒(北京碧云天生物公司,批号分别为 C1005, P0012AC);Annexin V-FITC/碘化丙啶(PI)凋亡试剂盒(美国 BD 公司,批号 7303806);PVDF 膜(德国 Merck 公司,批号 R8MA5356);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GADPH,美国 Proteintech 公司,批号 60004-1-Ig);抗兔二抗,聚腺苷二磷酸-核糖聚合

酶(PARP)抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号分别为 7074,9542);PARP1(美国 Abcam 公司,批号 ab191217)

1.3 仪器 1300 SERIES A2 型二级生物安全柜, Forma Series II Water Jacketed 型 CO₂ 细胞培养箱(美国 Thermo Fisher 公司); Allegra X-15R 型冷冻台式通用离心机, Microfuge 20R 型台式微量冷冻离心机(德国 Beckman 公司); NovoCyte 型流式细胞仪(美国 ACEA Biosciences 公司); Axio Vert A1 型倒置荧光显微镜(德国卡尔·蔡司公司); Synergy 2 型多功能酶标仪(美国 Gene 公司); Powerpac 型凝胶电泳仪及转膜仪(美国 Bio-Rad 公司); Odyssey CLx LICOR 型双色红外激光成像系统(美国 Odyssey 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 SH-SY5Y 细胞株用含有 10% 胎牛血清的培养基 RPMI-1640, 放置于 37 °C 5% CO₂ 培养箱培养, 每 2 d 处理 1 次细胞, 用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞后进行传代培养。每次实验取对数生长期的细胞进行铺板, 加药处理。

2.2 分组及处理 实验分为正常组、模型组以及丁香脂素组。其中模型组包括谷氨酸钠 50 mmol·L⁻¹, 谷氨酸钠 50 mmol·L⁻¹ + DMSO; 而丁香脂素组, 根据细胞的毒性检测结果, 丁香脂素浓度在 50 μmol·L⁻¹ 以下对细胞没有损伤, 因此其浓度选择为 6.25, 12.5, 25 μmol·L⁻¹。

2.3 细胞计数法检测细胞的存活率 取对数生长期的细胞进行铺板, 以 2.2 项下的加药方式进行加药处理, 处理后置于细胞培养箱继续培养(谷氨酸钠损伤浓度的建立作用 24 h, 细胞毒性筛选 72 h, 丁香脂素对谷氨酸钠诱导的神经细胞损伤作用 72 h), 通过细胞计数的方式计算细胞的存活率。

2.4 DAPI 凋亡染色观察细胞的凋亡形态 取干净的盖玻片用乙醇浸泡 3~5 min 后, 用无血清培养基洗 2 遍, 再用含有 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基浸泡。将处理好的盖玻片放置进六孔板中, 取对数生长期的细胞进行铺板, 放培养箱过夜, 进行谷氨酸钠及不同浓度的丁香脂素处理后, 放培养箱继续培养 24 h 后, 去掉培养基, 用 PBS 清洗 2 遍, 用固定液固定 10 min, 去掉固定液, 用 PBS 清洗, 用 DAPI 避光染色 5 min 后, 在荧光显微镜下拍照。

2.5 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测细胞的凋亡率 取对数生长期的细胞, 以 20 × 10⁴ 个/mL 的密度铺板于 6 孔板中, 放于恒温培养箱中继续培养, 用 Pen-

Strep Solution 进行细胞消化以收集细胞, 然后用 1 × binding buffer 进行重悬, 加入 Annexin V-FITC/PI 凋亡染料, 染色 20 min, 1 000 r·min⁻¹ 离心 3~5 min, 去上清, 然后用 1 × binding buffer 进行重悬, 上流式细胞仪检测荧光强度。

2.6 检测线粒体膜电位的变化情况 以 2.2 项下的加药方式进行加药处理后, 收集细胞, 配置 JC-1 染色工作液, 每个样品 1 mL, 37 °C 孵育 30 min, 600 × g 离心 4 min, PBS 洗涤去染料, 重悬, 流式细胞仪检测线粒体膜电位的荧光强度。

2.7 检测细胞中活性氧(ROS)的积累变化 细胞以 2.2 项下的加药方式进行加药处理后, 收集细胞, 配置 DCFH-DA 在 37 °C 孵育 30 min, 用无血清培养基洗涤 3 次, 用荧光显微镜和流式细胞仪进行荧光强度检测。

2.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 PARP, PARP1 的表达量 细胞以 2.2 项下的加药方式进行加药处理后, 收集细胞, 加入适量体积裂解液, 冰上裂解 30 min, 1 万 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上清, 用 BCA 蛋白测定试剂盒计算蛋白的浓度, 加入适量 loading buffer, 100 °C 变性 5 min 得到蛋白样品。根据 SDS-PAGE 凝胶试剂盒配置适合蛋白大小浓度的胶块; 组装上样胶块, 以 50 μg 体积上样, 加入适量 running buffer, 跑电泳 2 h(100 V), 再根据胶的大小, 裁剪相应大小的 PVDF 膜, 用 transfer buffer 进行转膜 2 h(220 mA), 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 用 TBS 洗涤 3 次, 每次 10 min, 孵一抗(4 °C 过夜), GAPDH(1:1 000), 抗兔二抗(1:3 万), PARP 抗体(1:1 000), PARP1(1:1 000), 用 TBS 洗涤 3 次, 每次 10 min, 常温下孵二抗 2 h, TBS 洗涤 3 次后, OdysseyLICOR 双色红外激光成像系统成像。

2.9 统计学处理 使用 SPSS 11.5 软件进行 One-Way ANOVA 分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。样本均数间比较行方差分析, 统计显著性设定为 *P* 值, *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 谷氨酸钠对 SH-SY5Y 细胞存活率及细胞形态的影响 与正常组比较, 模型组细胞的存活率显著降低(*P* < 0.01), 且随谷氨酸钠浓度的增加逐渐降低; 观察细胞的形态发现, 与正常组比较, 谷氨酸钠诱导损伤的细胞呈现细胞皱缩, 有小颗粒; 根据细胞形态和细胞存活率结果, 计算 IC₅₀ 值, 确定谷氨酸钠的最佳损伤浓度为 50 mmol·L⁻¹。见图 1, 表 1。

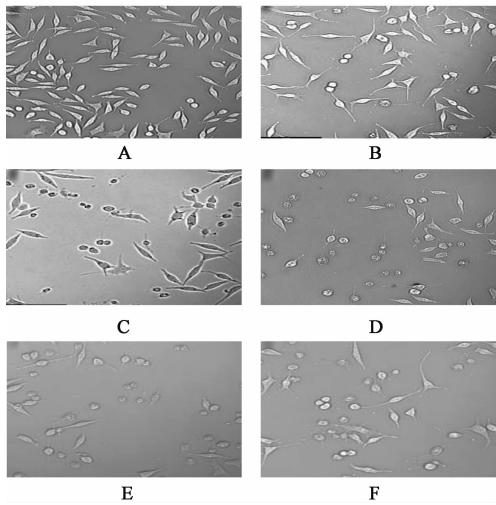


图 1 不同浓度谷氨酸钠对 SH-SY5Y 细胞形态的变化(倒置显微镜, $\times 200$)
A. 正常组; B. 谷氨酸钠 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; C. 谷氨酸钠 $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$;
D. 谷氨酸钠 $60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; E. 谷氨酸钠 $80 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; F. 谷氨酸钠
 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

表 1 不同浓度谷氨酸钠对 SH-SY5Y 神经细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of different concentrations of sodium glutamate on survival rate of SH-SY5Y neurons ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞存活率/%
正常	-	100
模型	20	$72.46 \pm 2.27^{2)}$
	40	$64.13 \pm 3.76^{2)}$
	60	$36.54 \pm 1.50^{2)}$
	80	$34.88 \pm 0.67^{2)}$
	100	$40.60 \pm 0.45^{2)}$

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.2 丁香脂素对 SH-SY5Y 细胞毒性的影响 与正常组比较, $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的丁香脂素对 SH-SY5Y 神经细胞的形态和细胞存活率没有影响, 细胞的形态仍然很完整。细胞计数的实验结果表明, $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的丁香脂素处理 SH-SY5Y 细胞后, 细胞存活率基本与正常组一致, 提示低于 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的丁香脂素对 SH-SY5Y 细胞没有影响。见图 2, 表 2。

3.3 丁香脂素对谷氨酸钠引起细胞损伤保护作用的影响 正常细胞呈梭型, 突起明显, 有光泽, 与正常组比较, 模型组则不能维持正常的形态; 而丁香脂素组的细胞形态与正常组一致。从细胞的存活率结果显示, 与正常组比较, 模型组的细胞存活率显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 丁香脂素组的细胞存

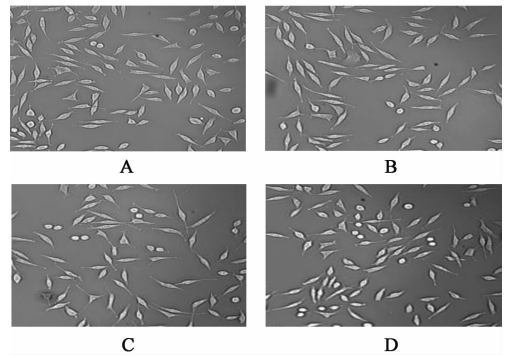


图 2 丁香脂素对 SH-SY5Y 神经细胞形态的变化(倒置显微镜, $\times 200$)
A. 正常组; B. 丁香脂素 $6.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; C. 丁香脂素
 $12.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; D. 丁香脂素 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组

表 2 丁香脂素对 SH-SY5Y 神经细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Cell viability of syringaresinol on SH-SY5Y cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞的存活率/%
正常	-	100
丁香脂素	6.25	96.96 ± 4.28
	12.5	99.38 ± 6.12
	25	95.44 ± 4.28
	50	94.46 ± 3.86
	100	$81.02 \pm 3.12^{1)}$

活率显著上升 ($P < 0.01$), 且细胞的存活率随浓度的增加而增加, 表明丁香脂素对谷氨酸钠引起的神经细胞损伤具有良好的保护作用。见表 3, 图 3。

表 3 丁香脂素对谷氨酸钠诱导的神经损伤保护细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of syringaresinol on cell proliferation induced by sodium glutamate ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度	细胞存活率/%
正常	-	100
模型	$50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	$26.99 \pm 0.11^{2)}$
	$50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} + \text{DMSO}$	$27.85 \pm 0.14^{2)}$
丁香脂素	$50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} + 6.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$51.21 \pm 3.16^{3)}$
	$50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} + 12.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$65.93 \pm 0.40^{3)}$
	$50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} + 25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$70.60 \pm 5.15^{3)}$

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较³⁾ $P < 0.01$ 。

3.4 丁香脂素对谷氨酸钠诱导损伤 SH-SY5Y 细胞 ROS, 线粒体膜电位以及 Annexin V-FITC/PI 凋亡率的影响 与正常组比较, 模型组 ROS 显著积累 ($P < 0.01$), 线粒体膜电位显著降低 ($P < 0.01$), 细胞的

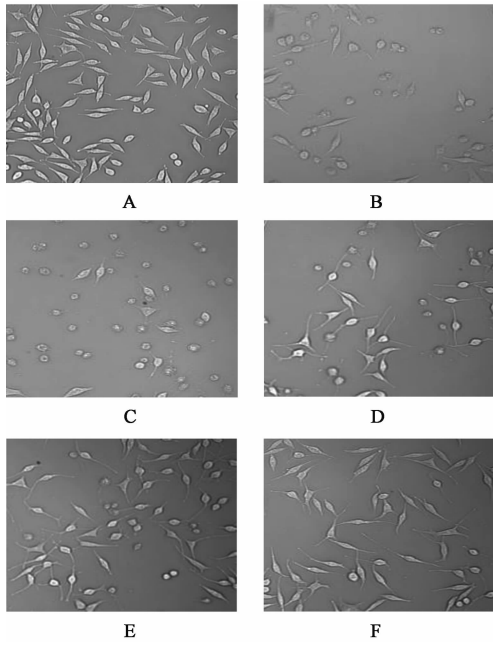


图 3 丁香脂素对谷氨酸钠诱导 SH-SY5Y 细胞损伤保护细胞形态变化(倒置显微镜, ×200)
A. 正常组; B. 谷氨酸钠 50 mmol·L⁻¹ 组; C. 谷氨酸钠 50 mmol·L⁻¹ + DMSO 组; D. 谷氨酸钠 50 mmol·L⁻¹ + 丁香脂素 6.25 μmol·L⁻¹ 组; E. 谷氨酸钠 50 mmol·L⁻¹ + 丁香脂素 12.5 μmol·L⁻¹ 组; F. 谷氨酸钠 50 mmol·L⁻¹ + 丁香脂素 25 μmol·L⁻¹ 组(图 4 同)

图 3 丁香脂素对谷氨酸钠诱导 SH-SY5Y 细胞损伤保护细胞形态变化(倒置显微镜, ×200)
Fig. 3 Syringaresinol protection morphological changes of SH-SY5Y cells injury induced by sodium glutamate(inverted microscope, ×200)

表 4 丁香脂素对谷氨酸钠诱导的神经损伤保护中 ROS, 线粒体膜电位, Annexin V-FITC/PI 凋亡率的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of syringaresinol on apoptosis rate of ROS, mitochondrial membrane potential and Annexin V-FITC/PI in protection of glutamate-induced nerve injury ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度	ROS/%	线粒体膜电位	Annexin V-FITC/PI 凋亡率/%
正常	-	0.01	1.17 ± 0.35	2.13 ± 0.3
模型	50 mmol·L ⁻¹	35.93 ± 5.42 ¹⁾	0.19 ± 0.04 ¹⁾	44.61 ± 10.55 ¹⁾
	50 mmol·L ⁻¹ + DMSO	39.07 ± 0.76 ¹⁾	0.18 ± 0.13 ¹⁾	42.32 ± 4.18 ¹⁾
丁香脂素	6.25 μmol·L ⁻¹	4.08 ± 1.07 ³⁾	0.23 ± 0.08	15.75 ± 2.9 ³⁾
	12.5 μmol·L ⁻¹	3.11 ± 0.44 ³⁾	0.23 ± 0.07	6.69 ± 3.32 ³⁾
	25 μmol·L ⁻¹	0.64 ± 0.11 ³⁾	0.48 ± 0.19 ²⁾	2.47 ± 1.01 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

大量的病因学和神经病理学研究提示神经退行性疾病与多种因素有关,如遗传因素、传染性因素、外源性毒素的接触、内源性活性氧类的产生、兴奋性氨基酸递质引起的神经元损伤以及各种代谢过程的失调,包括神经营养素的缺乏、神经细胞的凋亡、氧化应激、线粒体功能障碍以及 DNA 损伤修复机制障碍等密切相关^[2,11]。

凋亡率显著增加($P < 0.01$);与模型组比较,丁香脂素组能显著降低 ROS 的积累($P < 0.01$),增加线粒体膜电位($P < 0.01$),降低细胞的凋亡率($P < 0.01$)。见表 4。

3.5 丁香脂素对谷氨酸钠诱导损伤 SH-SY5Y 细胞 ROS 荧光强度的影响 DCFH-DAC 荧光标记法显示,与正常组比较,模型组细胞中 ROS 显著积累,荧光显著加强;与模型组比较,丁香脂素组细胞中 ROS 显著降低,荧光显著降低,见图 4。

3.6 丁香脂素对谷氨酸钠诱导损伤 SH-SY5Y 细胞凋亡形态的影响 为进一步的验证细胞的凋亡,本实验采用 DAPI 染色进行凋亡细胞的形态学观察。结果显示,与正常细胞比较,模型组细胞核质明显皱缩,不均匀,且较正常细胞的荧光强;与模型组比较,丁香脂素组随着浓度的增加,核质逐渐变得均匀,无皱缩现象,无较强荧光,见图 5。

3.7 丁香脂素对谷氨酸钠诱导损伤 SH-SY5Y 神经细胞中 DNA 损伤修复蛋白的影响 Western blot 的结果显示,与正常组比较,模型组细胞中凋亡相关蛋白 PARP 以及 PARP1 的蛋白水平显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,丁香脂素组能够显著增加 PARP 与 PARP1 蛋白的表达($P < 0.01$),降低损伤细胞的凋亡。见图 6,表 5。

谷氨酸是一种兴奋性神经递质,生理浓度下诱导神经营养发挥作用,病理条件下大脑中谷氨酸浓度增加,最终导致神经细胞氧化损伤。研究发现,高水平谷氨酸在大脑神经元会增加 ROS 积累,导致细胞内抗氧化不平衡。谷氨酸兴奋性损伤神经细胞经常作为神经类疾病的损伤模型,包括脑缺血、帕金森、抑郁症等神经退行性疾病^[12-17]。ROS 主要在线粒体生成,参与细胞正常增殖、凋亡和细胞衰老等重

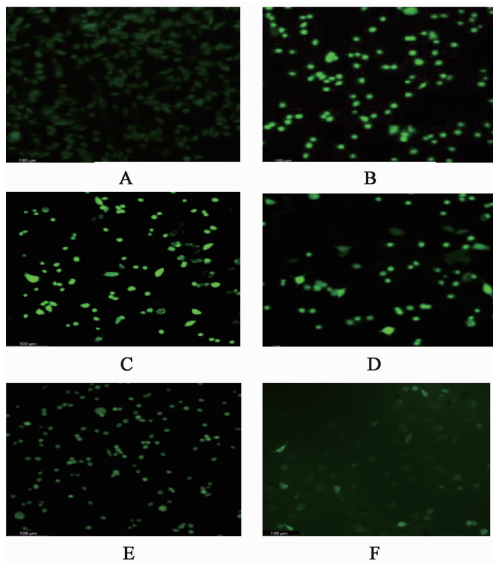


图 4 丁香脂素对谷氨酸钠诱导 SH-SY5Y 神经细胞损伤中 ROS 的荧光强度变化(倒置荧光显微镜, ×200)

Fig.4 Syringaresinol protection ROS fluorescence changes of SH-SY5Y cells injury induced by sodium glutamate(inverted fluorescence microscope, ×200)

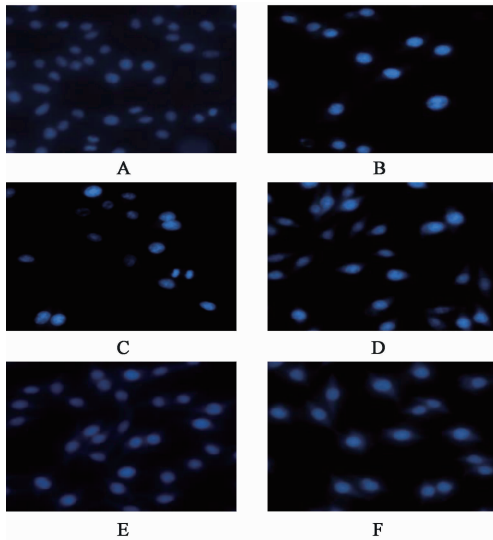


图 5 丁香脂素对谷氨酸钠诱导损伤 SH-SY5Y 细胞 DAPI 荧光凋亡染色形态学变化(倒置荧光显微镜, ×200)

Fig.5 Syringaresinol protection morphological changes of DAPI fluorescence apoptosis staining of SH-SY5Y cells induced by sodium glutamate(inverted fluorescence microscope, ×200)

要的生物学进程。正常情况下,ROS 的产生和清除处于动态平衡状态;当细胞内 ROS 过量时,发生氧化应激反应,累积的 ROS 造成线粒体膜电位下降,增加膜的通透性,使细胞色素 C(cyt-C)等凋亡因子释放到胞质中,与凋亡蛋白酶激活因子 1 形成凋亡小体并在 ATP 的参与下,激活 Caspase-9,释放

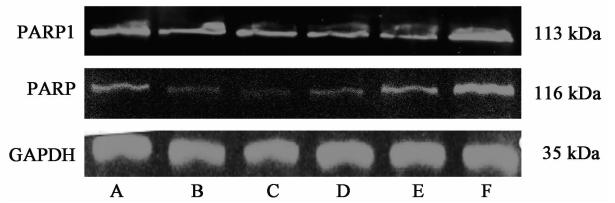


图 6 丁香脂素对谷氨酸钠诱导损伤 SH-SY5Y 神经细胞损伤保护中 PARP,PARP1 蛋白表达电泳

Fig.6 Syringaresinol for expression of PARP and PARP1 protein in injury of SH-SY5Y neurons induced by sodium glutamate

表 5 丁香脂素对谷氨酸钠诱导损伤 SH-SY5Y 神经细胞损伤保护中 PARP,PARP1 蛋白的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of syringaresinol on protection of PARP and PARP1 proteins induced by glutamate-induced injury in SH-SY5Y cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度	PARP1/ GADPH	PARP/ GADPH
正常	-	1.00 ± 0.08	0.99 ± 0.07
模型	50 mmol·L ⁻¹	0.80 ± 0.04 ²⁾	0.46 ± 0.07 ²⁾
	50 mmol·L ⁻¹ + DMSO	0.60 ± 0.03 ²⁾	0.35 ± 0.05 ²⁾
丁香脂素	50 mmol·L ⁻¹ + 6.25 μmol·L ⁻¹	0.30 ± 0.02 ³⁾	0.52 ± 0.03 ³⁾
	50 mmol·L ⁻¹ + 12.5 μmol·L ⁻¹	0.50 ± 0.03 ³⁾	0.94 ± 0.03 ³⁾
	50 mmol·L ⁻¹ + 25 μmol·L ⁻¹	1.06 ± 0.05 ³⁾	1.61 ± 0.04 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.01$ 。

PARP-1,引发 DNA 修复障碍,最终导致细胞凋亡^[18]。PARP 是真核生物中重要的 DNA 损伤修复酶。但其具体的作用机制还有待进一步验证。

本研究选用人神经母瘤细胞 SH-SY5Y,50 mmol 谷氨酸钠建立损伤模型进行体外筛选,检测到丁香脂素能够减少 ROS 的生成、恢复线粒体膜电位、提高 PARP,PARP1 蛋白的表达以及降低细胞的凋亡率,这提示了丁香脂素对谷氨酸钠引起的细胞损伤有较好的保护作用。

综上所述,本研究提示丁香脂素可能通过避免氧化应激反应的发生,恢复线粒体膜电位的变化, DNA 损伤修复等通路降低神经细胞的凋亡,对谷氨酸钠引起的神经兴奋性损伤具有很好的保护作用,且没有细胞毒性,这为后续神经退行性疾病治疗药物的开发奠定了基础。

[参考文献]

[1] Tsagalioti E, Trifonos C, Morari A, et al. Clinical value

- of nutritional status in neuro-degenerative diseases; what is its impact and how it affects disease progression and management [J]. *Nutr Neurosci*, 2018, 21 (3): 162-175.
- [2] LIU Z W, ZHOU T Y, Ziegler A C, et al. Oxidative stress in neurodegenerative diseases: from molecular mechanisms to clinical applications[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017:1-11.
- [3] Yoko N, Kensaku T, Kouji W, et al. Antioxidative compounds isolated from kokuto, non-centrifugal cane sugar[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1996, 60(10): 1714-1716.
- [4] El-Hassan A, El-Sayed M, Hamed A I, et al. Bioactive constituents of *leptadenia arborea* [J]. *Fitoterapia*, 2003, 74(1/2):184-187.
- [5] Sunil R, FANG X P, Anderson J E, et al. Bioactive constituents from the twigs of *asimina parviflora* [J]. *J Nat Prod*, 1992, 55(10):1462-1467.
- [6] Kenzo C, Matsumi Y, Emiko U, et al. Neuritogenesis of Herbal (+)- and (-)-Syringaresinol separated by chiral HPLC in PC12h and neuro2a cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2002, 25(6):791-793.
- [7] Nishizaw Y. Glutamate release and neuronal damage in ischemia[J]. *Life Sci*, 2001, 69(4):369-381.
- [8] 冯波,王蓉,盛树力. 神经退行性疾病研究中拟神经细胞模型:人神经母细胞瘤株 SH-SY5Y 的来源特性及应用[J]. *中国临床康复*, 2006, 10(6):121-123.
- [9] 韩凤昭,彭涛,王林,等. 红景天苷衍生物 S01 对谷氨酸及缺氧缺糖所致 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2008, 22(3): 180-185.
- [10] Park H W, Cho S Y, Kim H H, et al. Enantioselective induction of SIRT1 gene by syringaresinol from *Panax ginseng berry* and *acanthopanax senticosus* harms stem [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015, 25(2):307-309.
- [11] Beal M F. Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases[J]. *Ann Neurol*, 1995, 38(3):357-366.
- [12] Yunes R, Estrella C R, García S, et al. Postnatal administration of allopregnanolone modifies glutamate release but not BDNF content in striatum samples of rats prenatally exposed to ethanol[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 27(10):6.
- [13] Girbovan C, Plamondon H. Resveratrol downregulates glutamate-1 transporter expression and microglia activation in the hippocampus following cerebral ischemia reperfusion in rats[J]. *Brain Res*, 2015, 1608: 203-214.
- [14] Guerriero R M, Giza C C, Rotenberg A. Glutamate and GABA imbalance following traumatic brain injury [J]. *Curr Neurol Neurosci*, 2015, 15(5):1-11.
- [15] Buchanan R J, Gjini K, Darrow D, et al. Glutamate and GABA concentration changes in the globus pallidus internus of Parkinson's patients during performance of implicit and declarative memory tasks: a report of two subjects[J]. *Neurosci Lett*, 2015, 589(3):73-78.
- [16] Yong S, Seung J B, Hyun-O P. Involvement of heme oxygenase-1 expression in neuroprotection by piceatannol, a natural analog and a metabolite of resveratrol, against glutamate-mediated oxidative injury in HT22 neuronal cells[J]. *Amino Acids*, 2013, 45(2): 393-401.
- [17] Shukla S, Sharma A, Pandey V K, et al. Concurrent acetylation of FoxO1/3a and p53 due to sirtuins inhibition elicit Bim/PUMA mediated mitochondrial dysfunction and apoptosis in berberine-treated HepG2 cells[J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2015, 291: 70-83.
- [18] Hyun S K, Yeo J K, Young R S. An overview of carcinogenic heavy metal: molecular toxicity mechanism and prevention [J]. *J Cancer Prev*, 2015, 20(4): 232-400.

[责任编辑 孙丛丛]