

黄芩甙拮抗大鼠神经元和星形胶质细胞氧应激损伤

宋元宗[△] 杨于嘉 贾延

摘要 目的 探索过氧化氢(H_2O_2)致星形胶质细胞损伤的实验条件,研究黄芩甙对大鼠神经元和星形胶质细胞氧应激损伤的保护作用。方法 体外培养大鼠前脑星形胶质细胞和神经元,分别应用 H_2O_2 、黄芩甙及两者联用处理,应用MTT分析法测定细胞活力或存活率。结果 不同浓度 H_2O_2 对星形胶质细胞存活率的影响各组间差异有显著性($F=28.569, P<0.01$)。同一浓度的 H_2O_2 对不同接种密度细胞的损伤程度不同($F=5.439, P<0.01$)。在 $2.5\sim 40\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内,黄芩甙不影响各组神经元和星形胶质细胞的存活率(神经元, $F=0.49, P>0.05$;星形胶质细胞, $F=1.001, P>0.05$)。但黄芩甙对 H_2O_2 所致神经元和星形胶质细胞氧应激损伤有拮抗作用(神经元, $F=24.384, P<0.01$;星形胶质细胞, $F=5.000, P<0.01$)。黄芩甙浓度越高,则细胞存活率越高。结论 构建了一个 H_2O_2 氧化损伤星形胶质细胞的模型。在 $2.5\sim 40\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内,黄芩甙对神经元和星形胶质细胞均无毒性作用。但黄芩甙能够拮抗 H_2O_2 所致的神经元和星形胶质细胞氧化损伤,而且这种作用呈剂量依赖性。

关键词 神经细胞;黄芩甙;过氧化氢

Antagonistic Effect of Baicalin on Oxidative Stress Injury in Neurons and Astrocytes of Rats SONG Yuan-zong, YANG Yu-jia, JIA Yan-jie *Department of Pediatrics, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha (410008)*

Objective To explore the experimental conditions for H_2O_2 to injure astrocytes and the effect of baicalin in protecting neurons and astrocytes from oxidative stress injury. **Methods** Neurons and astrocytes from forebrain of rats were cultured in vitro and treated with H_2O_2 , baicalin and combination of the two, respectively. The cell viability or survival rate was determined using MTT. **Results** Effects of H_2O_2 in different concentrations on survival rate of astrocytes showed significant difference ($F=28.569, P<0.01$) in a dose-dependent manner. Degrees of H_2O_2 injury, with the same concentration of H_2O_2 , on cells with different seeding density were also significantly different ($F=5.439, P<0.01$), and dose-dependently. Baicalin didn't influence the survival rate of neurons and astrocytes when the concentration was within $2.5\sim 40\mu\text{mol/L}$ (for neurons, $F=0.49, P>0.05$; for astrocytes, $F=1.001, P>0.05$), but baicalin showed significant antagonism to the injury of oxidative stress (for neurons, $F=24.384, P<0.01$; for astrocytes, $F=5.000, P<0.01$). The higher the concentration of baicalin, the higher the cell survival rate. **Conclusion** A model of astrocytes oxidative injury induced by H_2O_2 is established. Baicalin shows no toxicity on neurons and astrocytes when the concentration is within $2.5\sim 40\mu\text{mol/L}$, but could antagonize the H_2O_2 caused oxidative injury on cells in a dose-dependent manner.

Key words nerve cells; baicalin; hydrogen peroxide

黄芩甙是从中药黄芩中提取出来的黄酮类有效成分。近年来,我科报道了黄芩甙对感染性脑水肿的保

护作用^[1,2],并在整体动物水平对其保护作用的机制进行探讨^[3,4],试图为脑水肿的治疗提供新的思路和线索,但黄芩甙治疗脑水肿的机制远未阐明。活性氧参与感染、缺血再灌注损伤、神经系统退行性变等神经系统损伤过程,是介导神经系统损伤的重要环节,其中过氧化氢(H_2O_2)是常用于研究活性氧作用的工具分子。本研究在以往的基础上探讨 H_2O_2 氧化损伤星形胶质

基金项目:国家自然科学基金资助(No. 39870251)

作者单位:中南大学湘雅医院儿科(长沙 410008),[△]现在暨南大学附属第一医院围产医学中心(广州 510632)

通讯作者:杨于嘉, Tel: 0731-4327208, E-mail: yujia_yang@hotmail.com
万方数据

细胞的实验条件,并进一步观察黄芩甙对神经元及星形胶质细胞氧应激损伤的作用。

材料与方法

1 材料

1.1 神经元与星形胶质细胞 取材于生后 1 天 SD 大鼠前脑,单细胞悬液制备参照文献^[5]进行。剪碎后以 0.25% 胰酶消化 15min,灭活胰酶后反复吹打制成单细胞悬液。将悬液 200g 离心 10min,吸除上层,加入适量的培养液后再次小心吹打制成细胞悬液,通过 300 目钢网过滤。调整细胞密度至 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 后接种,在湿化、8% CO_2 、92% 空气的孵箱中培养。

1.2 药物 黄芩甙(纯度 98%,分子量 446.35,溶液 pH 7.6)由我院药剂科提供。

1.3 试剂和仪器 DMEM 培养基为 Gibco 产品,MTT 为 Sigma 产品,胰蛋白酶、HEPES、二甲亚砜(DMSO)等均为 AMRESCO 产品;IKEMOTO 湿化 CO_2 培养箱,NJ-1450 型医用净化工作台,Olympus 倒置相差显微镜,ELx800 全自动酶标仪等。

2 方法

2.1 神经元及星形胶质细胞培养 神经元培养:在细胞初次接种 12h 后,加入等量阿糖胞苷浓度为 $10\mu\text{mol/L}$ 的培养基抑制胶质细胞的增殖,36h 后换成阿糖胞苷浓度为 $10\mu\text{mol/L}$ 、胎牛血清浓度为 10% 的培养基,而后每周换液 2 次培养。培养 1 周后,85% 以上的细胞为神经元。星形胶质细胞培养:接种后 3 天始换 DMEM 培养基,以后每周换液 2 次培养;细胞融合成片时传代接种至新瓶,传代 2~3 次后,可得纯度 >90% 的星形胶质细胞。

2.2 H_2O_2 损伤星形胶质细胞的实验条件

2.2.1 H_2O_2 对星形胶质细胞存活率的影响 神经胶质细胞悬液接种至 96 孔板,每孔接种 $100\mu\text{l}$ (同一细胞浓度)。加药前将各孔内培养基换成无血清培养基(其余成分相同)。不同浓度 H_2O_2 (分 6 组:设 1 组对照,余 5 组分别以 H_2O_2 10、20、40、80、 $160\mu\text{mol/L}$ 处理,组间浓度倍比稀释)处理 2h 后,MTT 法测定各组存活率。

2.2.2 接种密度对星形胶质细胞活力及氧应激后存活率的影响 不同接种密度(分 6 组,接种密度分别为 1.25、2.5、5、10、20、 $40 \times 10^4/\text{ml}$,相邻组间浓度倍比稀释)的星形胶质细胞在 96 孔板中培养 9 天,MTT 比色法测定各组活力;同样分组的细胞用 $160\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 作用 2h 后,MTT 法测定各组存活率。 万方数据

2.3 黄芩甙对神经细胞氧应激损伤的保护作用实验

2.3.1 黄芩甙自身对神经细胞的作用 96 孔板培养神经元和星形胶质细胞,不同浓度黄芩甙(分 6 组:设 1 组对照,余 5 组分别以黄芩甙 2.5、5、10、20、 $40\mu\text{mol/L}$ 处理,组间浓度倍比稀释)处理后 MTT 法测定各组存活率。

2.3.2 黄芩甙对神经细胞氧应激损伤的保护作用 神经元氧应激损伤模型参照文献^[6],星形胶质细胞氧应激损伤模型参照以上研究结果。空白组不用黄芩甙预处理,也不用 H_2O_2 损伤细胞;对照组不用黄芩甙预处理,但以 H_2O_2 损伤细胞;其余各组以相应浓度黄芩甙(2.5、5、10、 $20\mu\text{mol/L}$,组间浓度倍比稀释)处理 30min 后,再加入与对照组等量的 H_2O_2 处理。MTT 分析法检测细胞存活率。

2.4 MTT 分析法 药物处理结束后,更换新的含血清培养基,再加入 MTT 溶液(终浓度 0.5mg/ml), 37°C 孵育 2h 后,去除培养液,各孔加入 DMSO $150\mu\text{l}$,置摇床 80r/min 摇动 15min,然后用全自动酶标仪比色,选择波长 570nm 。

2.5 统计学方法 多样本均数比较采用单因素方差分析,样本均数间的两两比较用 LSD 法。

结 果

1 不同 H_2O_2 浓度实验中星形胶质细胞的存活率比较 见图 1。 H_2O_2 浓度越高,则细胞存活率越低,各实验组间差异有显著性($F = 28.569$, $P < 0.01$),提示 H_2O_2 对星形胶质细胞有氧化损伤作用,且这种效应呈剂量依赖性。

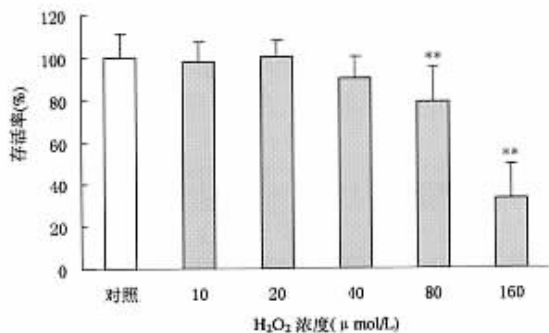


图 1 不同 H_2O_2 浓度实验中星形胶质细胞的存活率
注:与对照组比较,** $P < 0.01$; n 为 6~8

2 星形胶质细胞不同接种密度对细胞活力的影响 见图 2。接种密度不同的各组细胞培养 9 天后行 MTT 分析法检测细胞活力。其中密度 $40 \times 10^4/\text{ml}$ 组细胞接种后第 2 天即融合,密度 $20 \times 10^4/\text{ml}$ 组第 3 天融合,密度 $5 \times 10^4/\text{ml}$ 组第 5 天融合,密度 $2.5 \times 10^4/\text{ml}$ 组第 9 天融合,而其余两组 MTT 分析前镜下观察,数目较接种时增多,但未融合成片。第 9 天 MTT 分析结果显示,细胞活力各组间差异有显著性($F = 27.125, P < 0.01$)。接种密度越高则细胞活力越高(各组与接种密度最高组比较, $P < 0.01$)。

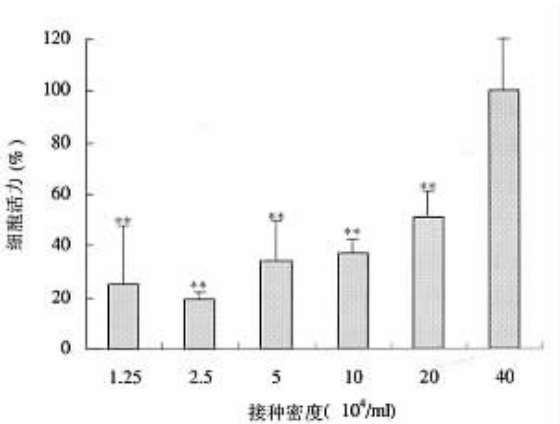


图 2 星形胶质细胞不同接种密度对细胞活力的影响
注:与接种密度 $40 \times 10^4/\text{ml}$ 组比较, ** $P < 0.01$; n 为 6~8

3 星形胶质细胞不同接种密度对细胞氧化损伤的影响 见图 3。 H_2O_2 对不同接种密度细胞的损伤程度不同,各组间差异有显著性($F = 5.439, P < 0.01$)。接种密度越高,则细胞抗氧化损伤的能力越强,表现为存活率越高。

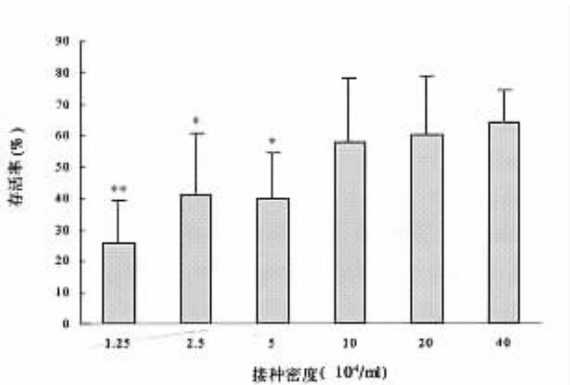


图 3 星形胶质细胞不同接种密度对细胞氧化损伤后存活率的影响
注:与接种密度 $40 \times 10^4/\text{ml}$ 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; n 为 6~8

4 黄芩甙对神经细胞氧应激损伤的保护作用 见图 4、图 5。在 $2.5 \sim 40 \mu\text{mol/L}$ 浓度范围内,黄芩甙对神经元和星形胶质细胞存活率的影响结果各组间差异无显著性(神经元, $F = 0.49, P > 0.05$;星形胶质细胞, $F = 1.001, P > 0.05$)。与空白组比较, H_2O_2 组(对照组)细胞存活率降低($P < 0.01$),提示 H_2O_2 对神经元和星形胶质细胞有损伤作用,黄芩甙浓度越高,则细胞存活率越高,提示黄芩甙对 H_2O_2 所致神经元和星形胶质细胞损伤有拮抗作用,而且这种作用呈剂量依赖性,各实验组差异有显著性(神经元,图 4, $F = 24.384, P < 0.01$;星形胶质细胞,图 5, $F = 5.000, P < 0.01$)。

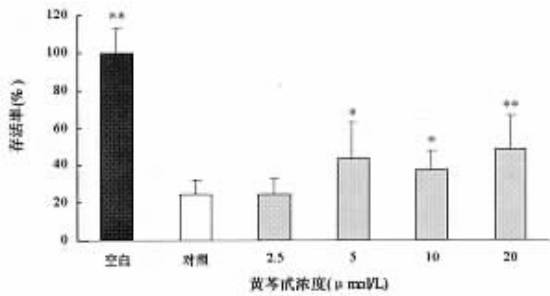


图 4 黄芩甙对神经元氧应激损伤的保护作用
注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; n 为 6~8

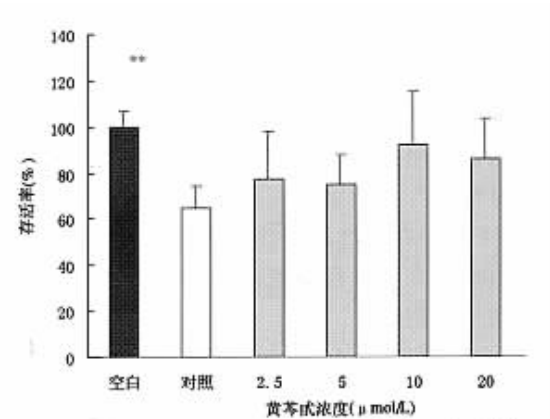


图 5 黄芩甙对星形胶质细胞氧应激损伤的保护作用
注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; n 为 6~8

讨 论

H_2O_2 所致神经元的氧化损伤早已引起重视,并成功建立了细胞氧化损伤模型^[6]。对于星形胶质细胞与活性氧的研究报道多侧重于星形胶质细胞抗氧化作用及其机制^[7,8]。本研究结果表明,高浓度 H_2O_2 对星形胶质细胞有损伤作用,而细胞接种密度也是影响 H_2O_2 所致细胞存活率下降的因素。图 2 中,按接种密度由高到低的顺序先后融合成片的前 4 组胶质细胞,接种密度高则细胞活力也高,提示星形胶质细胞生长的接触抑制现象不明显,细胞单层融合成片后仍可继续以复层形式生长^[9]。这可能是接种密度影响 H_2O_2 所致细胞存活率下降的原因。根据以上研究结果,本研究所用星形胶质细胞氧应激损伤模型的具体条件是:96 孔板每孔接种 $100\mu\text{l}$ 细胞浓度为 $2 \times 10^4/\text{ml}$ 的细胞悬液,培养时间为 9 天,以终浓度为 $160\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 处理 2h 后,MTT 分析法测细胞活力。

我们曾在整体动物水平发现黄芩甙具有抗感染性脑水肿的作用,并且报道了黄芩甙在感染性脑水肿模型血浆和脑脊液中的药代动力学,发现黄芩甙在脑脊液中的峰浓度可达 $5\mu\text{mol/L}$ ^[4]。在此基础上,本研究应用星形胶质细胞和神经元氧应激损伤模型,探讨了黄芩甙预处理对神经细胞氧应激损伤的影响。 $2.5 \sim 40\mu\text{mol/L}$ 的黄芩甙本身对神经元和胶质细胞的存活率无影响,提示此浓度范围黄芩甙对神经元和神经胶质细胞无毒性作用;但黄芩甙能够提高 H_2O_2 所致神经元及星形胶质细胞氧应激损伤后的存活率,而且这种作用呈剂量依赖性。这种作用的机制可能与黄芩甙清除羟自由基、烷基自由基,并保护线粒体膜的脂质过氧化有关^[10,11]。众所周知,活性氧参与感染所致神经系统损伤过程,是介导神经系统损伤的重要环节。黄芩甙减轻活性氧对神经细胞的损伤,而自身对神经细胞无毒副作用,这可能是黄芩甙抗大鼠感染性脑水肿的部分机理。以上结果提示,黄芩甙在治疗神经系统损伤,尤其是在有过高活性氧参与的感染、缺血再灌注及退行性病变等神经系统损伤的治疗方面,可能具有一定的应用前景。

参 考 文 献

- 1 杨于嘉,朱彩云,陈翔,等.黄芩甙对百日咳菌液致大鼠脑水肿的保护作用.中华医学杂志 1998;78(8):630—632.

Yang YJ, Zhu CY, Chen X, et al. The protective effects of baicalin on pertussis bacilli-induced brain edema in rats. Chin

Med J 1998;78(8):630—632.

- 2 陈光福,虞佩兰,金立明,等.黄芩甙、川芎嗪对兔百日咳菌液脑水肿与颅内高压的治疗作用.中国中西医结合杂志 1999;29(4):224—226.
- Chen GF, Yu PL, Jin LM, et al. Effect of baicalin and tetramethylpyrazine on intracranial hypertension and infectious brain edema in rabbits. Chin J Integr Tredit West Med 1999;29(4):224—226.
- 3 尹飞,杨于嘉,虞佩兰,等.大鼠脑水肿组织谷氨酸与 γ -氨基丁酸的改变与黄芩甙对其影响.中国中西医结合杂志 2000;20(7):524—526.
- Yin F, Yang YJ, Yu PL, et al. Changes of glutamate and γ -aminobutyric acid contents in brain tissue of brain edema and effects of baicalin on them in rats. Chin J Integr Tredit West Med 2000;20(7):524—526.
- 4 黄志强,杨于嘉,李新中,等.黄芩甙在兔脑水肿模型中血浆和脑脊液的药代动力学.中国当代儿科杂志 1999;1(3):146—148.
- Huang ZQ, Yang YJ, Li XZ, et al. Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of baicalin in the rabbit model of brain edema. Chin J Contemp Pediatr 1999;1(3):146—148.
- 5 Poulter MO, Brown LA. Transient expression of GABA receptor subunit mRNAs in the cellular processes of cultured cortical neurons and glia. Brain Res Mol Brain Res 1999;69(1):44—52.
- 6 Lee MK, Yeo H, Kim J, et al. Cynandione A from *Cynanchum wilfordii* protects cultured cortical neurons from toxicity induced by H_2O_2 , L-glutamate, and kainate. J Neurosci Res 2000;59(2):259—264.
- 7 Dringen R, Kussmaul L, Hamprecht B. Detoxification of exogenous hydrogen peroxide and organic hydroperoxides by cultured astroglial cells assessed by microtiter plate assay. Brain Res Protocols 1998;2(3):223—228.
- 8 Dringen R, Hamprecht B. Involvement of glutathione peroxidase and catalase in the disposal of exogenous hydrogen peroxide by cultured astroglial cells. Brain Res 1997;759(1):67—75.
- 9 McCarthy KD, De Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. J Cell Biol 1980;85(3):890—902.
- 10 Gao Z, Huang K, Yang X, et al. Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi. Biochem Biophys Acta 1999;1473(3):643—650.
- 11 Shieh DE, Liu LT, Lin CC. Antioxidant and free radical scavenging effects of baicalin, baicalin and wogonin. Anticancer Res 2000;20(5A):2861—2865.

(收稿 2003-04-01 修回 2003-12-24)