

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2012.01.006

# 何首乌提取物二苯乙烯苷对缺氧缺血大鼠星形胶质细胞的影响及其机制的初步探讨\*

张 琰 马奎元 董 睿

(济宁医学院医学影像系, 山东 济宁 272067)

**摘要 目的** 探讨 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷(TSG) 对大鼠大脑皮层星形胶质细胞(AS)缺氧、缺糖损伤的影响,并对其可能的机制进行初步探讨。**方法** 原代培养 Sprague-Dawley 大鼠大脑皮层 AS,建立缺氧、缺糖损伤模型,以四甲基偶氮唑盐(MTT)还原实验检测细胞活力;以乳酸脱氢酶(LDH)漏出率作为细胞损伤指标;以流式细胞术检测细胞凋亡率,研究氧糖剥夺(OGD)对不同组 AS 的影响。在此基础上,用超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)试剂盒测定细胞的氧化应激变化。**结果** 与正常对照组相比,细胞经 OGD 诱导处理后,细胞存活率降低,脂质过氧化产物 MDA 含量增加。不同浓度的 TSG 预处理后能减轻 OGD 所致的细胞损伤。**结论** TSG 可抑制 OGD 诱导的 AS 损伤,其机制可能与提高 SOD 活性、降低其消耗率和降低脂质过氧化反应有关。

**关键词** 星形胶质细胞;二苯乙烯苷;氧糖剥夺

**中图分类号**:R-33 **文献标识码**:A **文章编号**:1000-9760(2012)02-020-04

## Effects and mechanisms of 2,3,5,4'-tetrahydroxystibene-2-O- $\beta$ -D-glucoside(TSG) on oxygen-glucose deprived injury of rat astrocytes

ZHANG Yan, MA Kui-yuan, DONG Rui

(College of Medical Imageology, Jining Medical University, Jining 272067, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effects of 2,3,5,4'-tetrahydroxystibene-2-O- $\beta$ -D-glucoside(TSG) on cerebral cortical astrocytes subjected to oxygen-glucose deprived injury and explore the mechanisms. **Methods** Primary cultured cerebral cortical astrocytes were prepared from Sprague-Dawley rats, and a cell damage model was induced by oxygen-glucose deprivation (OGD). The cell damage and viability were evaluated by 3-[4,5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) reduction assay and lactate dehydrogenase (LDH) released rate. The detection of apoptotic cells was determined by the flow cytometry to study the oxygen-glucose deprived injury on different astrocytes groups. The SOD activity and content of MDA were detected by the kits. **Results** Compared with the normal control, the cell viability and the activities of antioxidantase were decreased, and the MDA contents were increased in OGD-induced group. OGD-induced cell injury was relieved in TSG pretreatment group. **Conclusion** TSG could inhibit the cell injury induced by OGD in AS, which might correlate with the increasing of SOD activity and inhibiting of lipid peroxidation.

**Key words:** Astrocytes; TSG; Oxygen-glucose deprivation

脑缺血疾病严重危害人类的健康和生命,其发病率、致残率、死亡率均较高。但迄今为止,临床治疗脑缺血损伤的疗效仍不理想。

AS 是哺乳动物脑内分布最广泛的一类细胞,数量远超过神经元,其功能状态对神经元功能和生存转归起十分重要的作用。但长期以来却一直被

忽视。AS 的终足包绕着毛细血管,因此,脑缺血缺氧后 AS 最先受到打击<sup>[1]</sup>,而且垂死的 AS 还会进一步杀死邻近的细胞<sup>[2]</sup>。有学者研究发现 AS 凋亡可以促成神经元的继发性死亡,从而导致梗死区的进一步扩大<sup>[3]</sup>。因此有效预防脑缺血后 AS 凋亡的发生,将很大程度上起到直接和间接的脑保护作用。

研究表明,中药何首乌的水溶性活性成分

\* [基金项目]济宁医学院 2008 年青年科研基金项目

TSG 具有抗炎、抗氧化、抗动脉粥样硬化作用<sup>[4-6]</sup>, 但 TSG 是否对脑缺血中 AS 损伤有保护作用, 目前尚未见报道。本实验应用体外培养鼠脑 AS 建立氧糖剥夺模型, 在简单可控的条件下模拟脑缺血对 AS 的病理损伤。利用 MTT 比色法、流式细胞术等技术观测 TSG 对缺氧、缺糖损伤 AS 的作用及其机制进行初步探讨。

## 1 材料与与方法

### 1.1 药品与试剂

TSG(C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>O<sub>9</sub>) 分子量 406, 纯度大于 98% (中国药品生物制品检定所), DMEM(美国 Invitrogen 公司), 小牛血清(杭州四季青生物工程公司), 胰蛋白酶、MTT(美国 Amresco 公司), LDH、SOD、MDA 试剂盒(南京建成生物工程研究所)、DMSO(美国 Sigma 公司), 鼠尾胶原、PBS、Earle 平衡盐溶液自制, 倒置显微镜 I $\chi^2$ 70(Olympus 公司)

### 1.2 方法

**1.2.1 鼠脑 AS 的分离培养** 参照 McCarthy KD 和 De Vellis J 的方法加以改进。具体步骤简述如下: 取出生 3d 内的新生 SD 大鼠, 在 75% 乙醇浸泡 5min 后, 断头取脑, 分离出双侧大脑皮层, 用钟表镊仔细剥离脑膜和血管, 用 D-hanks 平衡盐液冲洗 2 次, 剪碎后加入 0.25% 的胰蛋白酶, 37℃ 消化 15min, 中止消化后移入离心管中, 以 1500 r/min 离心 5 min, 去上清, 加入含 20% 新生小牛血清的 DMEM 培养基后混匀, 放入 37℃、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱孵育 30 min (差速贴壁, 去除成纤维细胞), 翻转培养瓶, 取出尚未贴壁的细胞悬液, 调整细胞密度, 以 1.0 × 10<sup>6</sup>/ml 接种于预先涂有自制鼠尾胶原的培养瓶内, 放入培养箱内继续培养, 以后每 2~3 天换 1 次液, 并逐渐降低血清浓度至 10%, 培养至 9~12d 时, 细胞铺满瓶底后, 胰蛋白酶消化法传代, 取生长状态良好的第 4 代细胞用于实验。

**1.2.2 AS 缺氧、缺糖损伤模型的建立** 首先将 AS 培养液换为预先通以缺氧混合气体(95% N<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>)30min 的无糖 Earle 平衡盐溶液, 液体量为原培养液的一半, 置于 37℃ 的缺氧密闭室内, 继续通以缺氧混合气(流量为 1.8~2 L/min), 30 min 后封闭, 37℃ 饱和湿度条件下培养, 此时开始计缺氧缺糖损伤处理时间, 根据本人前期工作, 取缺氧缺糖 12h, 记为 OGD<sub>12</sub>。

**1.2.3 实验分组** 分为 3 组: 1) 正常组, 普通培养箱 37℃、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度条件下培养, DMEM 中葡萄糖含量 4.5g/L; 2) 缺氧缺糖组, 缺氧密闭室饱和湿度条件下培养, Earle 液中葡萄糖浓度为 0 g/L, 缺氧缺糖损伤处理 12 h; 3) TSG 预处理组, 缺氧缺糖前 24h, 给予 TSG 预处理, 使其终浓度为 0.1, 1, 10, 50 μmol/L 组。

**1.2.4 MTT 比色法测 AS 活力** 第 4 次传代后 AS 按每孔 1 × 10<sup>5</sup> 个细胞接种于 96 孔培养板中, 每处理组接种 6 孔, 待细胞基本融合约 80% 时, 按分组给予不同处理。实验结束后, 吸去原培养液, 每孔加入 5mg/ml MTT 20 μL 和 DMEM 180 μL (终浓度为 0.5mg/ml), 37℃、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度下继续孵育 4h 后弃上清, 每孔加入 200 μL DMSO, 室温下振荡 20min 溶解甲瓚颗粒, 置酶标仪于 490nm 处进行比色, 测定 OD 值, 所检测 OD 值大小可反映 AS 代谢活性的强弱。

**1.2.5 LDH 漏出率的测定** 第 4 次传代后 AS 接种于 24 孔培养板内, 分组后给予不同处理, 实验结束后, 先收集细胞孵育液, 然后用 1% Triton X-100 处理细胞 1 h, 观察到细胞裂解后, 吹打、收集细胞裂解液, 两者均 4℃ 离心 5 min (3000 r/min), 分别在紫外分光光度计于 340 nm 波长处, 按厂家 LDH 试剂盒说明测定孵育液和细胞的 LDH 活性。LDH 漏出率按下列公式计算: LDH 漏出率(%) = 孵育液 LDH 活性 ÷ (孵育液 LDH 活性 + 细胞 LDH 活性) × 100%。

**1.2.6 流式细胞术测凋亡** 将第 4 代 AS 接种于事先涂有鼠尾胶原的培养瓶内, 待细胞铺满瓶底后, 分组进行相应处理, 实验结束后, 胰蛋白酶消化、离心 10min (1000r/min) 收集细胞, 用 PBS 洗 1 遍, 同样条件离心后, 去上清加入 -20℃ 预冷的 70% 乙醇于 4℃ 固定 24 h, 调整细胞浓度为 10<sup>6</sup> 个细胞/ml, 取 1ml 细胞悬液, 用 PBS 洗 3 次, 细胞重悬于含 RNase A 的 PI 染液中, 37℃ 孵育 30min, 以 COULTER EPICS XL 流式细胞仪检测凋亡细胞。

**1.2.7 超氧化物歧化酶(SOD)活性及丙二醛(MDA)测定**

胰酶消化收集细胞后用超声裂解细胞, 获取细胞匀浆。按照南京建成生物研究所的 MDA 试剂盒说明书操作进行。SOD 活性的测定依据黄嘌呤氧化酶法原理, MDA 的检测依据硫代巴比妥酸法。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS11.0 统计分析软件处理实验数据, 所得数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较用方差分析,  $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 TSG 对缺氧缺糖大鼠 AS 的代谢活性 (490nm 处 OD 值) 的影响

缺氧缺糖损伤处理 12 h 后, OD 值由正常对照组的  $0.49 \pm 0.02$ , 降至  $0.22 \pm 0.03$ 。TSG (0.1, 1, 10, 50  $\mu\text{mol/L}$ ) 预处理细胞 12 h 能够浓度依赖性的降低 AS 缺氧缺糖损伤, 其 OD 值分别为  $0.30 \pm 0.05$ ,  $0.34 \pm 0.02$ ,  $0.36 \pm 0.04$ ,  $0.40 \pm 0.03$ 。

### 2.2 TSG 对缺氧缺糖大鼠 AS 的 LDH 漏出率 (%) 的影响

TSG 抑制缺氧缺糖所致 AS 的 LDH 漏出率增高。缺氧缺糖损伤处理 12 h 后, AS 的 LDH 漏出率由正常对照组的  $1.40 \pm 0.4$ , 升至  $7.22 \pm 0.5$ 。TSG (0.1, 1, 10, 50  $\mu\text{mol/L}$ ) 预处理细胞 12 h 能够浓度依赖性的降低 AS 缺氧缺糖损伤, 其 LDH 漏出率分别为  $5.63 \pm 0.7$ ,  $3.27 \pm 0.5$ ,  $2.47 \pm 0.4$ ,  $1.96 \pm 0.3$ 。

### 2.3 TSG 对缺氧缺糖大鼠 AS 凋亡率 (%) 的影响

AS 正常对照组凋亡率为  $2.32 \pm 0.3$ , 缺氧缺糖损伤处理 12 h 后, AS 凋亡率升高至  $27.05 \pm 3.0$ 。TSG (0.1, 1, 10, 50  $\mu\text{mol/L}$ ) 预处理细胞 12 h 可不同程度降低 AS 细胞凋亡率, 分别为  $17.01 \pm 2.7$ ,  $13.88 \pm 2.2$ ,  $7.29 \pm 0.8$ ,  $4.05 \pm 1.1$ 。

### 2.4 TSG 对缺氧缺糖大鼠 AS 细胞内 SOD 活性和 MDA 的影响

如图 1 所示, 与对照组相比, 缺氧缺糖损伤组 SOD 活性降低、MDA 含量升高, 差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); TSG 预处理细胞 12 h (50  $\mu\text{mol/L}$ ) 后, SOD 活性显著增强, MDA 含量显著降低, 接近正常水平。

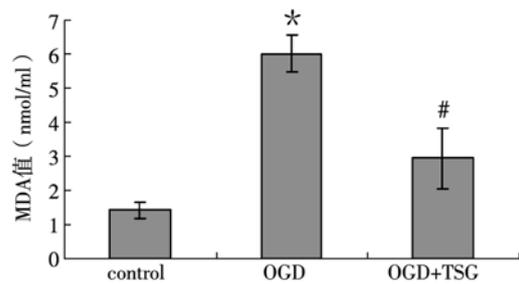
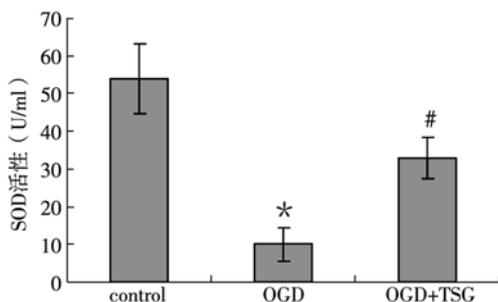


图 1 TSG 对缺氧缺糖损伤 AS 细胞内 SOD 活性和 MDA 含量的影响

注: SOD 活性,  $n=6$ ,  $\bar{x} \pm s$ , 与对照组相比 \*  $P < 0.05$ , 与 OGD<sub>12</sub> 组比较, #  $P < 0.05$

MDA 含量,  $n=6$ ,  $\bar{x} \pm s$ , 与对照组相比 \*  $P < 0.05$ , 与 OGD<sub>12</sub> 组比较, #  $P < 0.05$

## 3 讨论

氧、糖的缺乏可对细胞的结构和功能产生影响。线粒体是细胞的代谢中心, 是细胞最活跃的细胞器, 其内具有代谢 MTT 的酶 (琥珀酸脱氢酶), MTT 代谢降解率可反映细胞的功能状态水平 (活力)。因此, MTT 比色试验是一种检测细胞存活和生长的方法。LDH 是细胞内一种稳定的代谢酶, AS 内含量丰富, 当细胞膜完整时, LDH 不渗透到细胞外。因此, 培养液中 LDH 的活性可反映细胞结构 (细胞膜) 的完整性。

研究发现缺氧缺糖性损伤能诱导 AS 发生凋亡<sup>[7]</sup>, 其机制还不很清楚, 兴奋性氨基酸、细胞内钙离子增加、氧自由基、氧化亚氮等可能在凋亡过程中发挥重要作用。利用流式细胞仪可以检测细胞的凋亡率, 用于直观的判定缺氧缺糖引起的 AS 损伤。

何首乌为蓼科多年生草本植物的块根, 具有益寿延年、延缓衰老之功效, 系著名的滋补中药。TSG 是从干燥何首乌中提取分离得到的一种多酚结构的水溶性主要有效成分。研究表明, TSG 具有抗氧化和清除自由基的作用, 对几种自由基清除表现出了不同的效能<sup>[8]</sup>。本研究采用体外原代培养鼠脑 AS, 建立氧糖剥夺模型; 研究了 TSG 的细胞保护作用。实验结果显示, 与缺氧缺糖组比较, TSG 预处理后, 鼠脑 AS 代谢活性增加、LDH 漏出率降低, 细胞凋亡率显著降低, 接近正常水平。提示 TSG 对缺氧、缺糖所致脑 AS 的损伤起到保护作用, 且呈剂量依赖性。

在脑缺血过程中, 氧自由基的大量形成和脂质

过氧化物的增加是细胞损伤的主要病理过程之一。正常生理状态下,自由基生成与清除处在动态平衡中,在缺血再灌注时出现氧自由基形成和清除失衡。氧自由基对细胞的损害作用是引起生物膜上不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应,造成生物膜结构和功能的破坏。细胞膜发生脂质过氧化反应、膜磷脂被破坏降解可使细胞膜对钠、钙及大分子物质通透性增加,发生细胞毒性水肿,线粒体破坏,功能丧失<sup>[9]</sup>,攻击细胞内的 RNA 和 DNA,影响细胞的基因转录和蛋白表达过程<sup>[10]</sup>。中枢神经系统含有大量的不饱和脂肪酸,最易发生脂质过氧化反应,生成大量的过氧化脂。MDA 是脂质过氧化反应的稳定代谢物,因而测定 MDA 含量可反映组织中自由基的含量和自由基引发的脂质过氧化反应程度,间接反映细胞损伤的程度。

组织中存在能清除超氧阴离子自由基的 SOD,可通过歧化作用清除氧自由基减少细胞损伤,还可抑制缺血导致的 APE/Ref-1 下调和 DNA 裂解。研究发现 SOD 还能通过阻断细胞色素 c 依赖的线粒体凋亡途径保护细胞<sup>[11]</sup>,在其它细胞上也发现 SOD 活性提高能够抑制缺氧引起的细胞凋亡<sup>[12]</sup>。因而 SOD 活性可间接反映机体清除氧自由基的能力。脑缺血时脂质过氧化活跃,MDA 生成增多,SOD 则因消耗而减少。

本实验的研究采用黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活力,用硫代巴比妥酸法测定 MDA 含量,结果显示 TSG 预处理后,SOD 活性增强、MDA 含量降低,细胞凋亡率显著降低,接近正常水平。提示 TSG 可能通过抑制自由基产生、减少抗氧化剂的消耗从而减少细胞凋亡,对缺氧、缺糖所致脑 AS 的损伤起到保护作用。由于 AS 的功能状态对损伤应激中神经元的存活起到关键作用,所以如何有效地抑制 AS 凋亡成为缺血缺氧性脑病新的治疗策略。本实验只是初步探讨了 TSG 对氧糖剥夺 AS 的抗凋亡保护作用,其具体的分子机制和信号

通路尚需进一步的研究,以便为缺血性脑病的临床干预提供更多的理论依据。

参考文献:

[1] Jiang Z,Zhang Y,Chen XQ,et al. Apoptosis and activation of Erk1/2 and Akt in astrocytes postischemia[J]. *Neurochem Res*,2003,28(6):831-837.  
 [2] Dienel GA,Hertz L. Astrocytic contributions to bioenergetics of cerebral ischemia[J]. *Glia*,2005,50(4):362-388.  
 [3] Gibson CL,Coughlan TC,Murphy SP. Glial nitric oxide and ischemia[J]. *Glia*,2005,50(4):417-426.  
 [4] Wang X,Zhao L,Han T,et al. Protective effects of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene -2-O-beta-D-glucoside,an active component of Polygonum multiflorum Thunb on experimental colitis in mice[J]. *Eur J Pharmacol*,2008,578(2-3):339-348.  
 [5] 田汝芳,龙石银,田英,等. 二苯乙烯苷抗动脉粥样硬化的药理作用[J]. *现代生物医学进展*,2010,10(2):1193-1197.  
 [6] 张伟,王春华,李锋. 二苯乙烯苷对大鼠动脉硬化模型的 MMP-2,9 表达的影响[J]. *中国临床药理学杂志*,2008,24(2):134-138.  
 [7] Gabryel B,Chalimoniuk B,Stolecka A,et al. Activation of cPLA2 and sPLA2 in astrocytes exposed to simulated ischemia in vitro[J]. *Cell Biology International*,2007,31(9):958-965.  
 [8] 吕丽爽. 何首乌中二苯乙烯苷的体外抗氧化研究[J]. *食品科学*,2007,28(1):313-316.  
 [9] Naoi M,Maruyama W,Yi H,et al. Mitochondria in neurodegenerative disorders: regulation of the redox state and death signaling leading to neuronal death and survival[J]. *J Neural Transm*,2009,116(11):1371-1381.  
 [10] Rao KS. Free radical induced oxidative damage to DNA: relation to brain aging and neurological disorders[J]. *Indian J Biochem Biophys*,2009,46(1):9-15.  
 [11] Siren AL,Fratelli M,Brines M,et al. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2001,98(7):4044-4049.  
 [12] K Koshimura, Y Murakami, M Sohmiya, et al. Effects of erythropoietin on neuronal activity[J]. *J Neurochem*,1999,72(6):2565-2572.

(收稿日期 2011-12-23)

(上接第 19 页)

[4] 徐文昭. 月季花花瓣的黄酮类成分的研究[J]. *南京中医药大学学报*,2000,16(4):225-226.  
 [5] 戈延茹,曹恒杰. 双水相萃取技术及其在药物提取分离中的应用近况[J]. *中国现代应用药学*,2009,26(8):623-627.  
 [6] 吴敏. 双水相萃取技术在药物提取与分离中的应用[J]. *中成*

药,2006,28(10):1505-1508.

[7] 王志辉,朱建航,郑楠,等. 葛根素在乙醇/硫酸铵两水相体系中的分配特性[J]. *时珍国医国药*,2008,19(1):13-15.  
 [8] 高云涛,吴立生,王伟. 丙醇-硫酸铵-水液-液体系萃取分离铂、钯、铑和金[J]. *分析化学*,2001,29(8):901-903.

(收稿日期 2011-11-25)