



芦荟提取物有效成分对神经细胞和脑线粒体的保护作用

王月华¹, 曹立莉², 杜冠华^{1*}

(1. 中国医学科学院 药物研究所, 北京 100050; 2. 沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016)

[摘要] 目的: 了解芦荟提取物有效成分(AV)对神经细胞和大鼠脑线粒体损伤的保护作用机制。方法: 叠氮钠处理PC12细胞后, 显微镜下观察细胞形态; MTT法检测细胞存活率; JC-1法检测PC12细胞线粒体膜电位变化。提取大鼠脑线粒体, 刃天青法检测大鼠脑线粒体功能, TBA法检测大鼠脑线粒体MDA含量。结果: AV能显著改善叠氮钠引起的PC12细胞线粒体损伤, 叠氮钠 $0.064 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作用4 h, PC12细胞存活率降低47.8%, AV $1, 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 均显著提高叠氮钠诱导的PC12细胞存活率降低, 提高率分别为16.7% ($P < 0.05$)和22.3% ($P < 0.01$); AV $1, 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 均可显著改善叠氮钠诱导的线粒体膜电位降低($P < 0.05$)。AV也可保护大鼠脑线粒体结构和功能的稳定, AV $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 显著改善叠氮钠诱导的线粒体的氧化还原功能损伤; AV $1, 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 显著抑制 Fe^{2+} -cysteine诱导的大鼠脑线粒体中脂质过氧化物生成($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论: 芦荟提取物有效成分对神经细胞和大鼠脑线粒体损伤具有保护作用。

[关键词] 芦荟提取物; 线粒体; 神经保护作用

百合科植物芦荟 *Aloe vera* L. 是一种应用广泛、历史悠久的传统中药, 用于治疗热结便秘、妇女闭经、小儿惊痫、癣疮、萎缩性鼻炎等。现代药理研究证明, 芦荟具有抗肿瘤、抗病毒及免疫增强等多方面的生物活性^[1]。但至今未见有关芦荟神经保护的文献报道。

神经退行性疾病与线粒体功能障碍密切相关。线粒体功能随着年龄的增长而衰退, 一些神经退行性疾病与线粒体电子传递缺陷相关^[2]。阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种以认知功能障碍为特征的神经退行性疾病, 病理表现为细胞内神经纤维缠结、细胞外淀粉样斑块沉积和神经细胞丢失^[3]。 β -淀粉样蛋白是淀粉样斑块的主要成分, 与线粒体相互作用产生神经毒性作用, β -淀粉样蛋白损伤线粒体可诱导神经细胞凋亡, 导致神经退行性病^[4]。近年来的AD病因研究表明, 线粒体异常、氧化应激损伤、钙稳态失衡在AD的发病过程中起着重要作用^[5]。

在前期的药理筛选过程中, 发现库拉索芦荟提取物有效成分(AV)具有一定的 β -分泌酶抑制作用, 而

且对D-半乳糖和叠氮钠诱导的衰老大鼠有一定的抗衰老作用。本研究从线粒体结构和功能和氧化应激方面观察芦荟提取物有效成分的神经保护作用机制。

1 材料

1.1 样品制备 样品由中国医学科学院药物所方维硕教授实验室制备。将芦荟的乙醇浸膏(购自北京同仁堂)悬浮于水中, 用醋酸乙酯萃取5次, 合并萃取液, 减压浓缩至干。所得样品以5%乙醇水分散后吸附于大孔树脂上, 分别用25%, 30%, 40%和80%的乙醇水洗脱, 收集30%和40%的洗脱液, 合并浓缩至干得灰色粉末。将该混合物进行反相柱色谱, 以37% MeOH/ H_2O 洗脱, 收集洗脱流分, 减压浓缩至干即为最终有效成分(AV)。其中含芦荟色苷D40%~50%。

1.2 试剂 叠氮钠, JC-1(美国Sigma公司); 刃天青(Aldrich Chem Ltd.); 其他试剂均为国产分析纯。

1.3 动物 雄性SD大鼠, 体重280~300 g(合格证号01-3008), 购自中国医学科学院实验动物繁殖中心。

2 方法

2.1 细胞培养和处理 PC12细胞以含10%马牛血清、5%胎牛血清、青霉素 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和链霉素 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的完全DMEM培养基于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2 恒温培养箱中培养, 每2~3 d换液1次。PC12细胞以 2×10^5 个/mL种植于96孔板中, 约80%融合后换成

[收稿日期] 2009-04-20

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30630073); 中国医学科学院药物研究所青年基金(2006QN40)

[通信作者] * 杜冠华, 研究员, 博士生导师, Tel: (010)63165184, E-mail: dugh@imm.ac.cn



无血清培养基同步化 24 h, 然后加入不同浓度的 AV 样品作用 1 h 后加入 $0.064 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 叠氮钠作用 4 h^[6]。显微镜下观察细胞形态, 并检测细胞存活率。

2.2 细胞存活率检测 参照文献采用 MTT 法检测细胞存活率^[7]。细胞处理结束后, 加入终浓度为 $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MTT 溶液 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 4 h。然后弃上清, 加入 DMSO 100 μL , 震荡混匀后于 540 nm 处测定吸光度(A)。

2.3 PC12 细胞线粒体膜电位的测定 JC-1 为一种特异性的阳离子荧光染料, 可定位在线粒体膜上, 其激发光为 490 nm, 单体发射光为 527 nm, 聚集体发射光为 590 nm, 其聚集程度与膜电位成正比。当线粒体膜电位增高时, 红色荧光增强, 红色荧光和绿色荧光的比值可代表膜电位的高低^[8]。细胞同步化后, 与 $0.064 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 叠氮钠孵育 4 h, 用 Hank's 液漂洗细胞一次, 然后与 $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 JC-1 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 负载 15 min, PBS 洗 2 次后于激发波长 490 nm, 发射波长 530 nm 处测定红色荧光值, 发射波长 590 nm 处测定绿色荧光值, 以红色荧光值与绿色荧光值的比值的大小来表示膜电位的高低。

2.4 刃天青法测定大鼠脑线粒体氧化还原能力 取大脑皮层, 称重, 转入玻璃匀浆器中, 加入 MSETB 缓冲液 $10 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 组织, (MSETB 缓冲液: $210 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇, $70 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖, $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 已二胺四乙酸, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 0.2% 牛血清白蛋白, pH 7.4), 手动匀浆 10 次。所得匀浆液以 $2000 \times g$ 离心 3 min, 取上清 $12000 \times g$ 离心 8 min。以 MSETB 缓冲液将所得沉淀洗涤一次, $12000 \times g$ 离心 10 min, 所得沉淀即为线粒体。将沉淀按 10:1 悬于 SET 缓冲液 ($280 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖, $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 已二胺四乙酸, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 7.4) 中, $12000 \times g$ 离心 10 min。最后将沉淀悬于 SET 缓冲液中, 整个线粒体制备过程均在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 进行。以 Lowry 法测定蛋白含量^[9]。

取线粒体蛋白 $5 \text{ } \mu\text{g}$ /孔加入到 96 孔板中, 加入不同浓度的 AV 及线粒体功能抑制剂 NaN_3 $650 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 作用 30 min, 加入刃天青 $5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 激发波长 530 nm, 发射波长 590 nm 处测定荧光强度为 F_0 , $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 继续孵育 60 min, 检测荧光 F_{60} 。荧光强度增长率 = $(F_{60} - F_0)/F_0 \times 100 \%$; F_0, F_{60} 分别为刃天青加入 0 min 和 60 min 时的荧光强度^[10]。

2.5 大鼠脑线粒体氧化应激损伤 大鼠脑线粒体

$100 \text{ } \mu\text{g}$ /孔加入到 96 孔板中, 以含有 FeSO_4 $50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 半胱氨酸 $500 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组氨酸缓冲液为缓冲体系。加入不同浓度的 AV, 混匀后置 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 温育 30 min, 然后加入 35% 高氯酸 $100 \text{ } \mu\text{L}$ 终止反应, $12000 \times g$ 离心 10 min, 取上清加入 $100 \text{ } \mu\text{L}$ 的 TBA 反应液, $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 加热 15 min 后于 532 nm 处测定吸光度^[11]。

3 结果

3.1 AV 对 NaN_3 诱导 PC12 细胞损伤的保护作用 叠氮钠与 PC12 细胞孵育 4 h 后, 细胞形态发生了显著变化, 表现为细胞轮廓消失, 有些裂解为碎片; 预先加入不同浓度的 AV 对细胞损伤有一定的保护作用。MTT 检测结果表明, NaN_3 可引起细胞存活率显著降低; 预先加入不同浓度的 AV 对细胞损伤有改善作用, 与 NaN_3 组相比, AV 1, 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组细胞存活率分别提高了 16.7% ($P < 0.05$) 和 22.3% ($P < 0.01$) (图 1)。

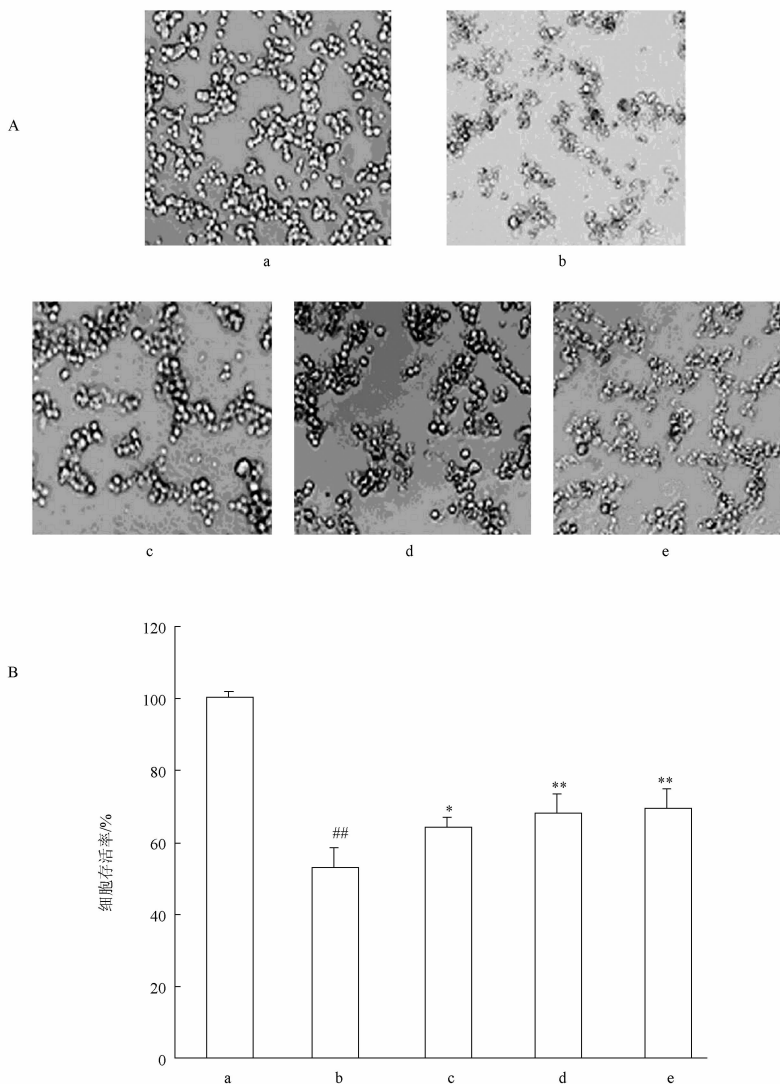
3.2 AV 对叠氮钠引起 PC12 细胞损伤线粒体膜电位的影响 结果表明, 叠氮钠处理后的细胞红、绿荧光值的比率和正常对照组比较有明显的下降, 预先加入 1, 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 AV 能减少比率的下降, 和模型组比较有显著性差异 ($P < 0.01$) (图 2), 说明 AV 能对抗叠氮钠诱导的 PC12 细胞损伤线粒体膜电位的下降。

3.3 AV 对大鼠脑线粒体损伤氧化还原能力的影响 刃天青的荧光变化率增加, 即表示刃天青的还原力增加, 表示线粒体的代谢功能增加。AV $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 可以改善线粒体复合体 IV 抑制剂叠氮钠引起的线粒体氧化还原能力的下降, 与模型组比较有显著性差异 ($P < 0.05$) (图 3)。

3.4 AV 对大鼠脑线粒体氧化应激损伤的体外保护作用 Fe^{2+} -cys 与线粒体共同温育 30 min 可引起 MDA 生成显著增加, 预先加入有效组分 AV 能明显抑制线粒体 MDA 的生成, 有明显的剂量依赖关系(图 4)。

4 讨论

AD 是以渐进性的记忆丧失和认知能力损伤为特点的一种常见神经退行性疾病, 与细胞内神经纤维缠结、细胞外老年斑、神经细胞丢失、细胞内钙超载、线粒体功能障碍及活性氧应激密切相关^[12-13]。建立在这些理论上, 笔者观察芦荟提取物对线粒体结构和功能、对线粒体脂质过氧化和细胞内钙的影响, 以期探讨芦荟提取物的神经保护作用机制。



A. 形态学观察(×40); B. 细胞存活率; a. 正常组; b. 模型组; c. AV 0.1 mg·L⁻¹组; d. AV 1 mg·L⁻¹组; e. AV 10 mg·L⁻¹组; 与正常组比较^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ (图2~4同)。

图1 AV对叠氮钠诱导的PC12细胞神经毒性的保护作用($\bar{x} \pm s, n=4$)

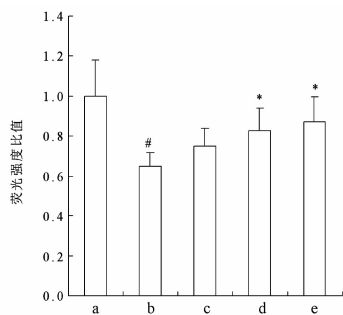


图2 AV对叠氮钠诱导的PC12细胞线粒体膜电位的影响(JC-1染色法, $\bar{x} \pm s, n=4$)

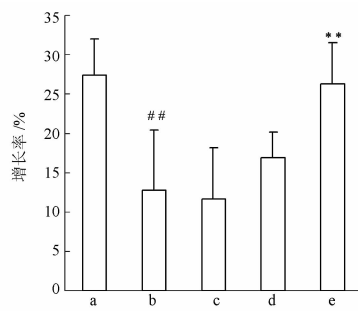


图3 AV对大鼠脑线粒体功能的影响(刃天青法, $\bar{x} \pm s, n=4$)

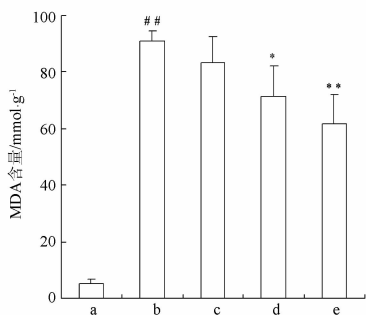


图 4 AV 对大鼠脑线粒体脂质过氧化的影响($\bar{x} \pm s, n = 4$)

AD 与脑内线粒体氧化磷酸化异常有关,这一观点已得到广泛的认同,AD 患者脑中的线粒体呼吸链复合体 IV 的活性显著下降^[12]。叠氮钠能抑制线粒体呼吸链复合体 IV,减少 ATP 合成,能造成线粒体功能障碍,常被用作建立“线粒体损伤”细胞模型的工具药。线粒体在呼吸氧化过程中,将所产生的能量以电学位能的形式储存于线粒体内膜,此电位差以外正内负的形式形成于线粒体内膜。线粒体跨膜电位是进行氧化磷酸化维持其功能的先决条件。许多亲脂性的阳离子化合物能结合到线粒体内膜,可以用荧光显微镜或共聚焦显微镜来观察线粒体的形态和变化情况。本研究以叠氮钠与 PC12 细胞共同孵育制备线粒体损伤模型,模拟神经细胞线粒体缺陷,探讨了 AV 对叠氮钠诱导的线粒体损伤的保护作用。

氧化应激在神经退行性疾病相关的神经细胞死亡中发挥重要作用。线粒体呼吸链是细胞产生 ATP 的主要部位,也是 ROS 产生的主要部位,同时也是易遭受 ROS 攻击的部位。线粒体 DNA 和蛋白质损伤将降低线粒体的生物能量合^[6]。Fe²⁺-cysteine 诱导产生的活性氧主要是羟自由基,损伤作用很大,是引起组织损伤的最主要的一类氧自由基^[13]。

线粒体呼吸链的损伤引起线粒体膜电位降低,因此线粒体 ROS 的产生与线粒体膜电位密切相关^[14]。JC-1 为一种特异性的阳离子荧光染料,可定位在线粒体膜上,当线粒体膜电位增高时,红色荧光增强,红色荧光和绿色荧光的比值可代表膜电位的高低^[15-16]。

刃天青是区分健康细胞与代谢损伤细胞的一种有力工具,刃天青为非荧光物质,在活细胞线粒体酶的作用下,被还原成为粉红色强荧光物质,因此可以

通过监测荧光强度的变化来反应线粒体的活性。刃天青已经用于检测诱导脑组织和培养神经细胞的线粒体代谢损伤的药物的研究^[12]。本研究应用刃天青作为检测大鼠脑线粒体代谢功能的指示剂,观察了 AV 对叠氮钠损伤线粒体能量代谢的保护作用。

研究表明,AV 表现出较强的抗叠氮钠损伤线粒体能力,提高细胞存活率,抑制叠氮钠所引起的线粒体膜电位下降。此外,AV 有改善线粒体结构和功能的作用,具有明显的抗氧化作用和保护线粒体功能的作用,维持线粒体的氧化还原功能,对大鼠脑线粒体氧化应激损伤具有保护作用,能抑制 MDA 的生成。因此,AV 的抗氧化作用和对线粒体的保护作用可能是其抗老年痴呆的机制之一,这可能是其保护神经元不受损伤的机制之一。因此,AV 具有神经保护作用,以期开发成防治老年痴呆等神经退行性疾病的药物。

[参考文献]

- [1] Ni Y, Turner D, Yates K M, et al. Isolation and characterization of structural components of *Aloe vera* L. leaf pulp[J]. *Int Immunopharmacol*, 2004, 4: 1745.
- [2] Wallace D C. Mitochondrial diseases in man and mouse[J]. *Science*, 1999, 283: 1482.
- [3] Vander Borgh T, Minoshima S, Giordani B, et al. Cerebral metabolic differences in Parkinson's and Alzheimer's diseases matched for dementia severity[J]. *J Nucl Med*, 1997, 38:797.
- [4] Kim H S, Lee J H, Lee J P, et al. Amyloid beta peptide induces cytochrome c release from isolated mitochondria[J]. *Neuroreport*, 2002, 13: 1989.
- [5] Reddy P H, Beal M F. Are mitochondria critical in the pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. *Brain Res Brain Res Rev*, 2005,49: 618.
- [6] Calderón F H, Bonnefont A, Muñoz F J, et al. PC12 and neuro 2a cells have different susceptibilities to acetylcholinesterase-amyloid complexes, amyloid₂₅₋₃₅ fragment, glutamate, and hydrogen peroxide[J]. *J Neurosci Res*, 1999, 56: 620.
- [7] Varming T, Drejer J, Frandsen A, et al. Characterization of a chemical anoxia model in cerebellar granule neurons using sodium azide: Protection by nifedipine and MK-801 [J]. *J Neurosci Res*, 1996,44: 40.
- [8] Smiley S T, Reers M, Mottola-Hartshorn C, et al. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 3671.
- [9] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent[J]. *J Biol Chem*, 1951, 193: 265.
- [10] Magnani E, Bettini E. Resazurin detection of energy metabolism



- changes in serum-starved PC12 cells and of neuroprotective agent effect[J]. *Brain Res Brain Res Protoc*, 2000, 5: 266.
- [11] Nakajima Y, Shimazawa M, Mishima S, et al. Water extract of propolis and its main constituents, caffeoylquinic acid derivatives, exert neuroprotective effects via antioxidant actions[J]. *Life Sci*, 2007, 80: 370.
- [12] Eckert A, Keil U, Marques C A, et al. Mitochondrial dysfunction, apoptotic cell death, and Alzheimer's disease[J]. *Biochem Pharmacol*, 2003, 66: 1627.
- [13] Castellani R, Hirai K, Aliev G, et al. Role of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease[J]. *J Neurosci Res*, 2002, 70: 357.
- [14] Votyakova T V, Reynolds I J. DeltaPsi(m)-dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria[J]. *J Neurochem*, 2001, 79: 266.
- [15] Radad K, Rausch W D, Gille G. Rotenone induces cell death in primary dopaminergic culture by increasing ROS production and inhibiting mitochondrial respiration[J]. *Neurochem Int*, 2006, 49: 379.
- [16] Mashimo K, Ohno Y. Ethanol hyperpolarizes mitochondrial membrane potential and increases mitochondrial fraction in cultured mouse myocardial cells[J]. *Arch Toxicol*, 2006, 80: 421.

Protective effects of *Aloe vera* extract on mitochondria of neuronal cells and rat brain

WANG Yuehua¹, CAO Lili², DU Guanhua^{1*}

(1. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China

2. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

[**Abstract**] **Objective:** To investigate the effects of *Aloe vera* extract (AV) on mitochondria in rat pheochromocytoma (PC12) cells and rat brain and to study the mechanism of its neuroprotection. **Method:** After treatment, the morphology of PC12 cells was observed under microscope, the activity of mitochondria in PC12 cells was measured by MTT method, and the mitochondrial membrane potential (MMP) in PC12 cells was detected by JC-1 method. The mitochondrial function in rat brain was detected by resazurin method. The production of malondialdehyd (MDA) in rat brain mitochondria was tested by thiobarbaturic acid (TBA) assay. **Result:** AV could improve mitochondrial damage induced by azide sodium (NaN_3) in PC12 cells. The viability of PC12 cells treated with NaN_3 $64 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ for 4 h decreased by 47.8%, and AV at 1 and $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ could respectively increase the viability of NaN_3 -treated cells by 16.7% ($P < 0.05$) and 22.3% ($P < 0.01$). MMP in PC12 cells in AV 1 and $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ group was significantly higher than that of NaN_3 -treated group ($P < 0.05$). AV also protected the structure and function of mitochondria in rat brain. AV at $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ had protective effect on mitochondria function impair induced by NaN_3 ($P < 0.01$). AV 1 and $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ markedly inhibited the lipid peroxidation of brain mitochondria induced by Fe^{2+} -cysteine ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** AV has protective effects on mitochondria of neuronal cells and rat brain.

[**Key words**] *Aloe vera* extract; mitochondria; neuroprotection

doi: 10.4268/cjmm20100324

[责任编辑 古云侠]