

## • 基础论著 •

## 人参皂苷 Rb1 对谷氨酸导致海马神经元损伤的保护作用

陆海芬 陈兆耀

**【摘要】** 目的 在体外研究人参皂苷 Rb1 (GRb1) 对谷氨酸漏出所导致海马神经元损伤的保护作用, 并探讨可能的作用机制。方法 培养至 10 d 的海马神经元分为谷氨酸损伤组和 GRb1 治疗组, 以 MTT 法测定细胞存活率, 以 Hoechst 33258 染色法检测细胞凋亡, 丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)测定细胞氧化损伤程度。结果 与正常对照组比较, 谷氨酸(1.25、2.5、5、10  $\mu\text{mol/L}$ )作用 2 h 后细胞活力下降, 分别为(93.9  $\pm$  2.1)%、(82.3  $\pm$  1.4)%、(51.2  $\pm$  1.2)%、(32.7  $\pm$  1.3)%。其中谷氨酸 5  $\mu\text{mol/L}$  作用 2 h 后存活(51.2  $\pm$  1.2)%的细胞(与对照组比较,  $P < 0.01$ ), 接近对照组的 50%。与对照组相比, 给予 5  $\mu\text{mol/L}$  谷氨酸作用 2 h 后, 谷氨酸组脂质过氧化产物 MDA 水平上升[(7.52  $\pm$  0.11) nmol/mg pro vs. (3.93  $\pm$  0.36) nmol/mg pro]; 抗氧化的 SOD 活性明显下降[(37.28  $\pm$  1.72) NU/mg pro vs. (55.39  $\pm$  1.73) NU/mg pro]。同时观察到大量的凋亡细胞出现[(34.5  $\pm$  1.8)% , 与对照组比较,  $P < 0.01$ ]。而与谷氨酸组(5  $\mu\text{mol/L}$ , 2 h)相比, GRb1(1、10、100、200  $\mu\text{mol/L}$ )能够明显提高细胞存活率, 分别是(64.9  $\pm$  1.7)%、(72.3  $\pm$  2.2)%、(70.4  $\pm$  3.2)%、(71.6  $\pm$  2.3)% ,  $P < 0.01$ , GRb1 1、10、100  $\mu\text{mol/L}$  组可以观察到 MDA 水平的轻度下降, 但与谷氨酸组比较没有统计学差异, GRb1 10、100  $\mu\text{mol/L}$  可以提高 SOD 活性( $P < 0.01$ ), GRb1 1  $\mu\text{mol/L}$  组未观察到该效应。给予 GRb1 1、10、100  $\mu\text{mol/L}$  干预后细胞凋亡率下降, 分别为(27.3  $\pm$  1.7)%、(19.4  $\pm$  1.2)%、(23.5  $\pm$  1.9)% ,  $P < 0.01$ 。结论 GRb1 具有良好的神经保护作用, 其保护作用与抗氧化及抗凋亡有关。

**【关键词】** 人参皂甙; 海马; 神经元; 细胞凋亡

**Investigation on the neuroprotective effect of ginsenoside Rb1 on glutamate induced hippocampal neurons injury** LU Hai-fen, CHEN Zhao-yao. Encephalopathy Center, The Affiliated Hospital of Nanjing University of TCM, Nanjing 210029, China

Corresponding author: CHEN Zhao-yao, Email: zhaoyaochen@yahoo.cn

**【Abstract】 Objective** To investigate the neuroprotective effect of ginsenoside Rb1 (GRb1) on glutamate induced hippocampal neurons injury and the possible mechanisms. **Methods** Hippocampal neurons cultured for 10 days was divided into glutamate treated group and GRb1 treated group. MTT method was used to test the cell viability, Hoechst 33258 was used to detect the cell apoptosis, MDA, SOD method were adopt to determine the oxidative damage. **Results** To compared with control group, glutamate (1.25, 2.5, 5, 10  $\mu\text{mol/L}$ ; 2 h) group cell viability was decline, respectively (93.9  $\pm$  2.1)% ; (82.3  $\pm$  1.4)% ; (51.2  $\pm$  1.2)% ; (32.7  $\pm$  1.3)%. After 5  $\mu\text{mol/L}$  glutamate treated for 2 h, cell viability declined to (51.2  $\pm$  1.2)% ( $P < 0.01$  vs. control group), nearly 50% of the control group. And MDA level was increased compared with control group [(7.52  $\pm$  0.11) nmol/mg pro vs. (3.93  $\pm$  0.36) nmol/mg pro]; SOD level had significant decline [(37.28  $\pm$  1.72) NU/mg pro vs. (55.39  $\pm$  1.73) NU/mg pro]. Meanwhile, cell apoptosis was increased significantly [(34.5  $\pm$  1.8)% ,  $P < 0.01$  vs. control group]. Compared with glutamate (5  $\mu\text{mol/L}$ , 2 h) treated group, GRb1 (1, 10, 100, 200  $\mu\text{mol/L}$ ) could increase cell viability (64.9  $\pm$  1.7)% , (72.3  $\pm$  2.2)% , (70.4  $\pm$  3.2)% , (71.6  $\pm$  2.3)% ,  $P < 0.01$  vs. glutamate-treated group, GRb1 1, 10, 100  $\mu\text{mol/L}$  treated group had slightly decreased MDA level, but had no significant difference with glutamate treated group. GRb1 10, 100  $\mu\text{mol/L}$  could increase the SOD activity ( $P < 0.01$  vs. glutamate-treated group), GRb1 1  $\mu\text{mol/L}$  group did not have this effect. Cell apoptosis rate was decline when treated with 1, 10, 100  $\mu\text{mol/L}$  GRb1, respectively (27.3  $\pm$  1.7)% , (19.4  $\pm$  1.2)% , (23.5  $\pm$  1.9)% ,  $P < 0.01$  vs. glutamate-treated group. **Conclusions** GRb1 could confront glutamate induced neurons injury, the neuroprotective effect was related to anti-

oxidation and reducing apoptosis.

**【Key words】** GINSENSIDE; Hippocampus; Neurons; Apoptosis

脑梗死是发病率和死亡率都很高的疾病,脑梗死后谷氨酸的漏出在脑梗死急性期的病理生理机制中起到中心环节的作用,是脑组织损伤的启动者和执行者。在我国,中药制剂已经广泛应用于脑梗死急性期的治疗。比如三七总皂苷制剂是临床常用的中药制剂,而人参皂苷 Rb1 (ginsenoside Rb1, GRb1) 的含量在三七总皂苷中可占 50%, 是其发挥抗缺血效应的主要成分<sup>[1]</sup>。本实验拟采用谷氨酸漏出模拟急性缺血性脑损伤,探讨 GRb1 发挥神经保护作用的可能具体机制。

## 材料与方 法

### 一、动物

选用出生 24 h 以内的清洁级 SD 大鼠,雌雄不限,由本院动物实验中心提供。

### 二、大鼠海马神经元的原代培养

取出生 24 h 以内的新生 SD 大鼠,依次经碘伏、75% 乙醇消毒;断头,解剖分离出双侧大脑海马,以虹膜剪将海马组织剪成糜状,约 1 mm<sup>3</sup> 的小块,滴以等体积 0.125% 的胰酶,放入 37 °C 培养箱内消化 7 ~ 10 min。将组织块吸出,置于离心管中,加入种植培养液洗 5 min × 2 次以终止胰酶消化。向离心管中加入适量种植培养液,轻轻吹打,静置,吸取上层细胞悬液,轻轻吹打混匀,调整细胞浓度至 (1 ~ 1.5) × 10<sup>6</sup>/ml。取合适的细胞量接种到经 PLL 处理的 96 孔板或 24 孔板中。每天观察细胞生长状态,注意培养液颜色变化,观察有无混浊,有无细菌污染,每 3 d 换液 1 次,换液量为总液体量的 1/2,培养 8 ~ 10 d 后即可开展下一步实验。

### 三、谷氨酸导致海马神经元损伤模型的建立及评估

取培养至 10 d 的海马神经元,加入稀释至不同浓度的谷氨酸 (1.25、2.5、5、10 μmol/L) 作用 2 h,以噻唑蓝 (MTT) 比色法来评测细胞活力和损伤程度。活细胞线粒体内的琥珀酸脱氢酶可以使外源性 MTT 还原为难溶性的蓝紫色结晶物甲臞 (formazan) 并且沉积在细胞中,死细胞无此功能。DMSO 能溶解细胞中沉积的甲臞,并呈现出紫红色,用酶标仪在 490 nm 波长处测定其吸光度值,可间接反映细胞存活率。

### 四、GRb1 对谷氨酸致神经元损伤的保护作用

1. 人参皂苷 Rb1 干预谷氨酸损伤实验:为评估 GRb1 的保护作用,细胞被分为以下几组:(1)正常对照组,细胞正常培养;(2)谷氨酸损伤组,给予 5 μmol/L

的谷氨酸;(3)GRb1 治疗组,在谷氨酸 (5 μmol/L) 损伤的同时给予 GRb1 (0.1、1、10、100、200 μmol/L) 干预。

2. Hoechst 33258 染色:Hoechst 33258 是核酸染料,能将所有细胞的 DNA 染成蓝色。在细胞凋亡时,染色质浓集,Hoechst 33258 染色的细胞核表现皱缩,在荧光显微镜发出明亮的蓝色荧光。实验结束时,将 Hoechst 33258 (5 μmol/L) 加入培养基中,37 °C 孵育 15 min。荧光显微镜下观察。计数凋亡细胞和总细胞数,计算细胞凋亡率。

3. 测量丙二醛 (MDA) 和超氧化物歧化酶 (SOD):检测不同浓度的 GRb1 对谷氨酸漏出所致细胞氧化损伤指标 MDA 和抗氧化指标 SOD 的影响。采用分光光度测定法,步骤按照南京建成试剂盒说明进行。

### 五、统计学分析

数据均以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。资料分析采用 SPSS 16.0 统计软件。组间均数比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 两两比较采用 SNK 检验或 Tukey-Kramer 检验。 $P < 0.05$  认为差异具有统计学意义。

## 结 果

1. 谷氨酸暴露对神经元的影响:在神经元体外培养至 8 ~ 10 d 时,进行实验。首先我们比较了不同浓度的谷氨酸 (1.25、2.5、5、10 μmol/L) 作用 2 h 对海马神经元造成的损伤,以 MTT 法测定,将正常对照组的存活细胞比例标定为 100%。与正常对照组比较,谷氨酸 (1.25、2.5、5、10 μmol/L) 作用 2 h 后活细胞量分别为 (93.9 ± 2.1)%、(82.3 ± 1.4)%、(51.2 ± 1.2)%、(32.7 ± 1.3)%。谷氨酸 5 μmol/L 作用 2 h 后存活 (51.2 ± 1.2)% 的细胞(与对照组比较, $P < 0.01$ ),接近对照组的 50% (图 1),以后的实验均使用这一浓度和时间。

2. GRb1 对谷氨酸致神经元损伤的保护作用:我们首先比较了谷氨酸 5 μmol/L 与不同浓度的 GRb1 (0.1、1、10、100、200 μmol/L) 共同作用 2 h 对神经元的影响。谷氨酸干预后,细胞活力降至 (51.3 ± 2.4)% ( $P < 0.01$ ),与谷氨酸损伤组相比,GRb1 (1、10、100、200 μmol/L) 能够明显提高细胞存活率 ( $P < 0.01$ ),细胞活力分别为:(64.9 ± 1.7)%、(72.3 ± 2.2)%、(70.4 ± 3.2)%、(71.6 ± 2.3)%;可以看出 0.1 μmol/L 剂量则未能显示出保护作用 [(52.7 ± 2.6)%、 $P > 0.05$ ];在 10 μmol/L 时,GRb1 的保护作用最大,继续增加剂量 (100 μmol/L、200 μmol/L) 没有增加其保护作用 ( $P >$

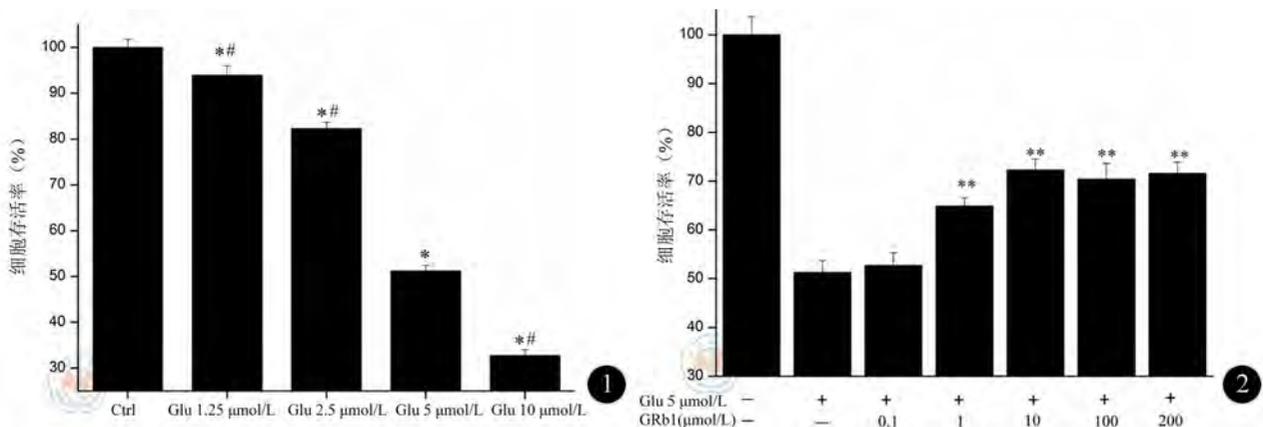


图1 谷氨酸导致的海马神经元损伤。与对照组比较,谷氨酸1.25~10 μmol/L浓度作用2 h对细胞均造成损伤,与对照组比较,\**P*<0.01,与5 μmol/L比较,#*P*<0.01 图2 GRb1对谷氨酸所致海马神经元损伤的保护作用,与治疗组比较,\*\**P*<0.01

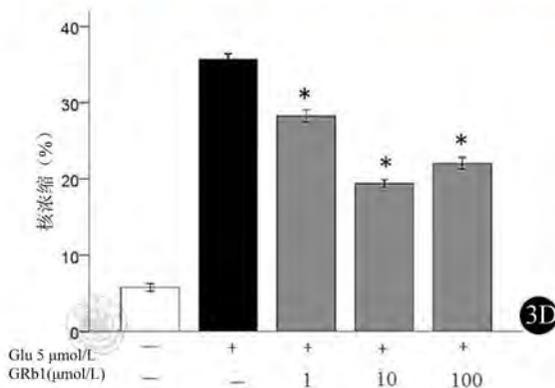
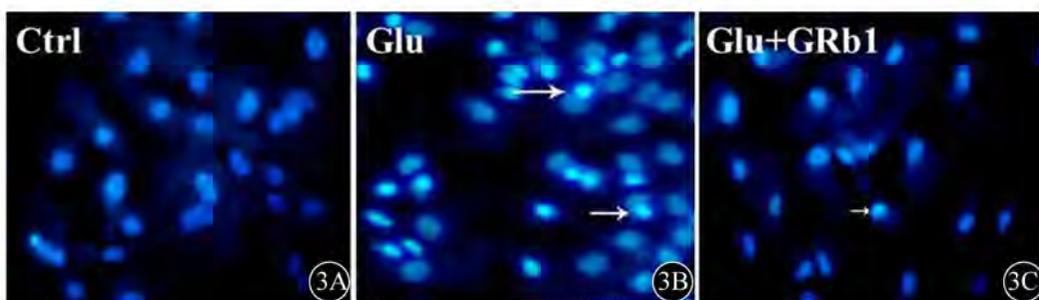


图3 GRb1对谷氨酸所致的细胞凋亡的影响,给予海马神经元5 μmol/L谷氨酸作用2 h, Hoechst 33258染色显示大量细胞核皱缩,浓染,呈现出凋亡的征象,给予GRb1可以有效对抗谷氨酸造成的细胞凋亡的发生(×300)

0.05)(图2)。我们采用1~100 μmol/L的剂量开展接下来的研究。

从Hoechst 33258染色来看,正常培养至8 d的神经元,有少量细胞发生凋亡[(5.8 ± 1.0)%],而给予谷氨酸5 μmol/L作用2 h后,有大量的凋亡细胞出现,表现为细胞核皱缩,发出明亮的蓝色荧光[(34.5 ± 1.8)%],与对照组比较,*P*<0.01],而同时给予GRb1 1、10、100 μmol/L可以有效发挥抗凋亡作用[各组凋亡细胞数分别为(27.3 ± 1.7)%、(19.4 ± 1.2)%、(23.5 ± 1.9)%,*P*<0.01,图3]。

3. GRb1对MDA和SOD的影响:给予谷氨酸干预后,脂质过氧化产物MDA水平上升,抗氧化的SOD活性明显下降。GRb1 1~100 μmol/L干预可以观察到MDA水平的轻度下降,但与谷氨酸损伤组比较无统计学差异,GRb1 10~100 μmol/L可以提高SOD活性(*P*

<0.01),GRb1 1 μmol/L组未观察到该效应。以上结果提示GRb1能够减弱谷氨酸带来的氧化损伤,但其神经保护作用并非只依赖于抗氧化损伤的效应(表1)。

表1 GRb1对谷氨酸损伤模型中MDA和SOD的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数	MDA (nmol/mg pro)	SOD (NU/mg pro)
正常对照组	6	3.93 ± 0.36	55.39 ± 1.73
谷氨酸损伤组	6	7.52 ± 0.11	37.28 ± 1.72
GRb1 1 μmol/L	6	7.42 ± 0.16	39.32 ± 0.82
GRb1 10 μmol/L	6	7.40 ± 0.25	42.63 ± 2.43 <sup>a</sup>
GRb1 100 μmol/L	6	7.30 ± 0.18	45.17 ± 2.49 <sup>a</sup>

注:与谷氨酸损伤组比较,<sup>a</sup>*P*<0.01

## 讨论

神经元体外培养模型是研究神经系统疾病发生机制及治疗等众多研究领域的重要模型<sup>[2]</sup>。谷氨酸是哺

乳动物中枢神经系统中主要的兴奋性神经递质之一,同时也是一种潜在的导致神经元损伤的介质<sup>[3,4]</sup>。比如脑缺血、阿尔茨海默病等情况下,谷氨酸在细胞外积聚,当细胞外谷氨酸浓度达到2~5 μmol/L时即可引起神经元的损伤<sup>[5]</sup>。本实验观察发现,当给予1.25 μmol/L的谷氨酸作用2 h即可观察到神经元的损伤,给予5 μmol/L谷氨酸作用2 h后,神经元的细胞活力降至50%左右。

目前认为缺血性脑损伤中谷氨酸毒性发生的机制主要是因为脑缺血时ATP合成不足导致谷氨酸的再摄取发生障碍,缺血区周围谷氨酸大量积聚,刺激谷氨酸相关受体,导致Na<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>内流,引起细胞急性渗透性肿胀,并造成细胞内钙超载,导致一系列病理反应,最终引起神经元损伤<sup>[6]</sup>。细胞也可以通过胱氨酸/谷氨酸转运体调节谷氨酸释放。胱氨酸是胞内重要的抗氧化损伤物质谷胱甘肽的合成原料<sup>[7]</sup>。高浓度谷氨酸暴露情况下,胱氨酸摄取被抑制,致使胞内抗氧化物质合成减少,自由基增加并攻击脂质,使脂质发生过氧化,其过氧化终产物MDA积聚,抗氧化产物SOD减少,氧化产物可以介导后续反应,导致细胞死亡<sup>[8]</sup>。这与我们此次实验观察到的谷氨酸导致氧化终产物MDA增高,抗氧化屏障SOD减少相符合。

动物实验表明,GRb1具有很好的神经营养和神经保护作用,可以对抗缺血性脑损伤、治疗神经系统变性疾病<sup>[9]</sup>;本实验中,我们发现GRb1对于谷氨酸致神经元损伤具有保护作用,能够减少氧化损伤,减少海马神经元的凋亡率,这些可能是GRb1发挥神经保护作用的机制。谷氨酸损伤状态下,GRb1 1 μmol/L即可显示出神经保护作用,10 μmol/L剂量的神经保护作用最明显,表现为细胞活力较谷氨酸损伤组明显增加,凋亡细胞数减少,抗氧化产物SOD增加,继续增加剂量(100、

200 μmol/L)未增加其保护作用,提示GRb1的保护作用有一定的有效浓度范围。

GRb1的抗氧化损伤活性可能能够帮助我们部分解释其保护作用。有研究认为,在三萜达玛烷的C20位置处连接有糖基的人参皂苷单体通常具有抗氧化损伤的活性,GRb1即属于此类<sup>[10]</sup>。总之,GRb1具有较好的对抗缺血性脑损伤的作用,有良好的临床应用前景,但其发挥保护作用的具体机制尚需要进一步阐明。

#### 参 考 文 献

- [1] Lai CM, Li SP, Yu H, et al. A rapid HPLC-ESI-MS/MS for qualitative and quantitative analysis of saponins in "XUESETONG" injection. *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 40:669-678.
- [2] Banker GA, Cowan WM. Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Res*, 1977, 126:397-342.
- [3] Doble A. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacol Ther*, 1999, 81:163-221.
- [4] Radad K, Gille C, Moldzio R, et al. Ginsenosides Rb-1 and Rg(1) effects on mesencephalic dopaminergic cells stressed with glutamate. *Brain Research*, 2004, 1021:41-53.
- [5] 黄晓磊,王树礼,夏作理. 谷氨酸、NMDA受体1与缺血性脑损伤关系研究进展. *中国微循环*, 2006, 10:4.
- [6] 吴喆,赵宇阳,康秋君,等. 谷氨酸代谢变化与脑缺血损伤. *中国实用医药*, 2008, 3:3.
- [7] Phillis JW, Ren J, O'Regan MH. Transporter reversal as a mechanism of glutamate release from the ischemic rat cerebral cortex: studies with DL-threo-beta-benzyloxyaspartate. *Brain Res*, 2000, 868:105-112.
- [8] Li N, Liu B, Dluzen DE, et al. Protective effects of ginsenoside Rg2 against glutamate-induced neurotoxicity in PC12 cells. *J Ethnopharmacol*, 2007, 111:458-463.
- [9] Attele AS, Wu JA, Yuan CS. Ginseng pharmacology-Multiple constituents and multiple actions. *Biochemical Pharmacology*, 1999, 58:1685-1693.
- [10] Liu ZQ, Luo XY, Liu GZ, et al. In vitro study of the relationship between the structure of ginsenoside and its antioxidative or prooxidative activity in free radical induced hemolysis of human erythrocytes. *J Agric Food Chem*, 2003, 51:2555-2558.

(收稿日期:2012-12-29)

(本文编辑:戚红丹)