神经病学研究 文章编号：0253-3626（2011）06-0667-03

隐丹参酮对谷氨酸诱导的皮层神经元凋亡的保护作用

张芳艳[1]，梅峥嵘[2]，陈少锐[3]，刘培庆[3]
（1. 重庆市食品药品检验所生化室，重庆 401121；2. 广州医学院第三附属医院药剂科，广州 510150；
3. 中山大学药学院药理教研室，广州 510080）

【摘 要】目的：观察隐丹参酮（Cryptotanshinone，CTN）对谷氨酸（Glutamate，Glu）损伤体外原代培养大鼠皮层神经细胞的保护作用并探讨可能的机制。方法：体外培养大鼠大脑皮层神经细胞，建立 Glu 损伤模型，采用 MTT 法检测细胞存活率，DCFH-DA 染色法检测细胞氧自由基水平，Hoechst 荧光染色检测细胞凋亡，Western blot 检测 Bcl-2 和 Bax 的表达。结果：CTN 能明显减轻 Glu 对皮层细胞的损伤，提高细胞的存活率，降低细胞内的活性氧水平，显著上调 Bc1-2 蛋白表达，减少 Bax 蛋白表达，抑制细胞凋亡。结论：CTN 对 Glu 损伤神经细胞有显著的保护作用，其机制可能与抑制或清除 Glu 诱导的细胞内活性氧的生成，调节凋亡相关基因 Bcl-2 蛋白家族的表达有关。

【关键词】隐丹参酮；谷氨酸；皮层神经元；活性氧；凋亡
【中国图书分类法分类号】R965 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-12-28

Protective effect of cryptotanshinone on cortical neurons apoptosis induced by glutamate

ZHANG Fang-yan[1], MEI Zheng-rong[2], CHEN Shao-rui[3], LIU Pei-qing[3]
(1. Laboratory of Biochemistry, Chongqing Institute for Food and Drug Control; 2. Department of Pharmacy, the Third Affiliated Hospital, Guangzhou Medical University; 3. Laboratory of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University)

【Abstract】*Objective*: To observe the protective effect of cryptotanshinone on glutamate-induced apoptosis in cultured cortical neurons. *Methods*: Cell viability was detected by MTT assay. Intracellular reactive oxygen species(ROS) level was detected using DCFH-DA. The apoptosis rate was measured by Hoechst 33342, and the expression of Bcl-2 was detected by Western blot. *Results*: Compared with glutamate group, cryptotanshinone could increase cell survival rate, decrease apoptosis rate and the level of intracellular ROS. Moreover, cryptotanshinone could remarkably increase the expression of Bcl-2 protein and decrease Bax protein. *Conclusion*: Cryptotanshinone could significantly protect cortical neurons from the apoptosis induced by glutamate, the mechanisms of which may be the inhibition or decrease of ROS formation, and increase of Bcl-2 expression.

【Key words】cryptotanshinone; glutamate; cortical neurons; oxidative stress; apoptosis

谷氨酸（Glutamate，Glu）是中枢神经系统主要的兴奋性氨基酸，参与中枢神经系统的信息传递，对神经系统正常功能的维持起重要作用。但其过度释放可产生严重的神经兴奋毒性，可引起神经元损伤或死亡。现已发现，许多神经系统疾病如阿尔茨海默病、缺氧/缺血性脑损伤、癫痫及肌萎缩侧索硬化症等的发生和发展均与之有密切的关系[1,2]。隐丹参酮（Cryptotanshinone，CTN）是从唇形科植物丹参根中提取分离的二萜醌类有效单体，现有的研究表明，CTN 能抑制胆碱酯酶及环氧化酶-2 的活性[3,4]，对东莨宕碱等因素导致的记忆损伤具有明显改善作用[5]，并且能够显著抑制胆酸诱导的肝细胞凋亡模型中细胞内活性氧的产生[6]，但其对神经细胞的保护作用仍未见报道。鉴于 Glu 在神经细胞损伤中的重要作用，本实验旨在研究 CTN 对 Glu 诱导神经细胞损伤的保护作用，并对其机制进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物

出生 24 h 内的新生 SD 大鼠，由中山大学动物实验中心提供。CTN 由中山大学药学院制备，纯度>98%。溶于二甲基亚砜（DMSO）制成 10^{-2} mol/L 母液，-20℃冻存备用，临用时用完全培养基稀释至适当浓度。

1.2 试剂

Neurobasal 培养液、B27 和胎牛血清为 Gibico 公司产品；四甲基偶氮噻唑蓝（MTT）、Glu、DMSO、Hoechst 33342、DCFH-DA 均购自 Sigma 公司；一抗 Bcl-2、Bax 购自 cell signaling 公

作者介绍：张芳艳（1975-），女，讲师，博士，研究方向：神经药理学。
通信作者：刘培庆，男，教授，Email：liupq@mail.sysu.edu.cn。
基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：30772576）；科技部重大新药创制临床前研究专项资助项目（编号：2009ZX09102-152）。

司；二抗购自 Santa 公司。

1.3　大脑皮层神经细胞培养

无菌条件下分离出生 24 h 内的 SD 大鼠乳鼠大脑皮层，经 0.125%胰蛋白酶 37℃消化 20 min 后终止消化，用含 2% B27 的无血清 Neurobasal 培养基轻轻吹打成悬液，以 5×10^6 个/ml 细胞数种植到已铺被多聚赖氨酸的 6 孔板和 96 孔板中，37℃，5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后加入阿糖胞苷（终浓度 5 μmol/L）以抑制胶质细胞的增殖。选择培养 7 d 的皮层神经元进行微管相关蛋白 2（Microtubule-associated-protein，MAP-2）抗体染色鉴定。

1.4　MTT 比色法检测细胞活性

将神经元接种于 96 孔板内，在 37℃、5% CO_2 条件下培养 7 d 后，分别用不同浓度的 CTN（0~5 μmol/L）预处理 1 h，然后加入 200 μmol/L 的 Glu，继续培养 24 h 后测定 MTT。

1.5　细胞氧自由基（Intracellular reactive oxygen species，ROS）的检测

细胞内活性氧的测定采用荧光探针 DCFH，该荧光探针在乙酰乙酸盐的帮助下进入细胞内，在胞内水解氧化，脱氢后形成荧光素发光，荧光发光强度和细胞内活性氧的水平成正比，可定量检测细胞内活性氧。方法如下：生长在 96 孔板的皮层细胞，用不同浓度的 CTN 保护 1 h 后，加入 200 μmol/L 的 Clu 继续培养 4 h。加入 10 μmol/L DCFH-DA，37℃培养 30 min，PBS 洗涤后，用荧光分光光度计于 485 nm 激发波长和 520 nm 发射波长处测定细胞内的 ROS 水平。

1.6　Hoechst 荧光染色

皮层神经元接种于 24 孔培养板玻片上培养 7 d 后，同上分组进行药物处理，24 h 后，吸弃培养液，PBS 洗 2 次，4%的多聚甲醛固定，Hoechst33342 染液（5 μg/ml）室温孵育15 min，倒置荧光显微镜下观察计数各组细胞凋亡情况。

1.7　Western blot 检测 Bcl-2、Bax 表达

将细胞接种于 6 孔板中，同上分组进行药物处理，24 h 后，收集细胞，加入细胞裂解液，离心取上清。Lowry 法测定蛋白浓度后，调整蛋白裂解液到相同浓度，与等体积的 2X 上样缓冲液混匀，煮沸 5 min。用 12% 的分离胶和 5%的浓缩胶进行 SDS.PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳；电泳完毕后，用 100 V电压转移 2 h 将蛋白转至测 NC 膜上，用封闭液室温封闭 1 h。将膜与溶于封闭液中的一抗（1:1 000）室温孵育 2 h，TBS 洗 5 min × 3 次；后用加 HRP 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗（1:2 000）孵育，1 h 后取出膜洗 3 次，每次 5 min；最后加入化学发光剂，在暗室内显影定影。

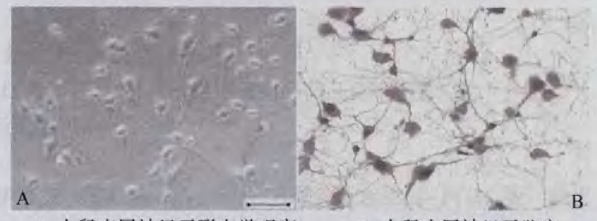
1.8　统计学方法

使用 SPSS11.0 软件进行统计学处理，所有数值均以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，组间检验采用单因素方差分析，$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　大鼠皮层神经元的形态及鉴定

培养 7 d 的神经元生长良好，胞体较大、饱满，胞体呈锥形或多角形，突起和分支明显延长并增粗，相互交织形成神经网络，有明显的光晕，折光性增强，富有立体感（图 1A）。经神经元特异性抗体 MAP-2 染色鉴定，光学显微镜下可见皮层神经元胞质染棕黄色，胞核蓝色为空泡状核，为一圆形或椭圆形淡染区，有明显的轴突，细胞形态典型（图 1B），显示皮层神经元（MAP-2 阳性细胞）的纯度达到 90%以上。

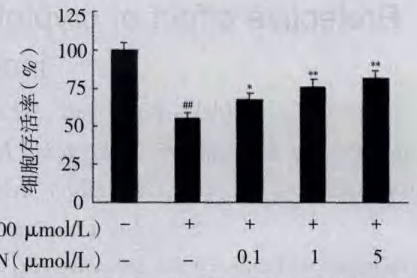


A. 大鼠皮层神经元形态学观察（标尺 = 50 μm）　　B. 大鼠皮层神经元鉴定（400×）

图 1　皮层神经元形态及鉴定

2.2　CTN 对 Glu 损伤皮层神经元存活率的影响

与正常对照组相比，Glu 损伤后细胞存活率显著下降，用不同浓度的 CTN 处理后，随着 CTN 浓度的升高，细胞的存活率表现为增加趋势（图 2）。表明 CTN 对 Glu 诱导的皮层细胞损伤有一定的保护作用。

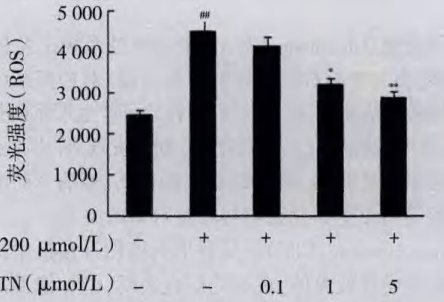


注：#，$P<0.05$，##，$P<0.01$，与对照组比较；*，$P<0.05$，**，$P<0.01$，与模型组比较（$F=31.077$，$P=0.000$）

图 2　CTN 对 Glu 处理的皮层细胞存活率的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

2.3　CTN 对细胞内活性氧的影响

与对照组相比，模型组细胞内产生大量的活性氧，ROS 含量明显升高。当用不同浓度的 CTN 保护后，随着 CTN 浓度的增加，其细胞内活性氧水平呈剂量依赖性下降（图 3）。



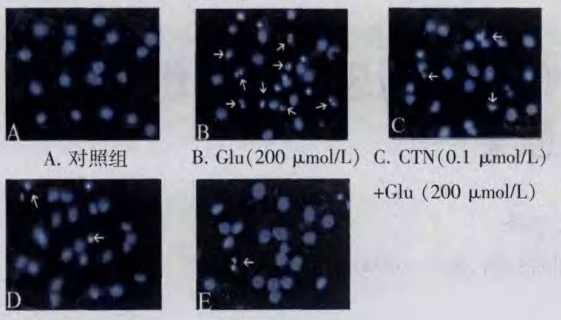
注：#，$P<0.05$，##，$P<0.01$，与对照组比较；*，$P<0.05$，**，$P<0.01$，与模型组比较（$F=21.159$，$P=0.000$）

图 3　CTN 对细胞内活性氧的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

2.4　CTN 对 Glu 诱导细胞凋亡的影响

对细胞进行 Hoechst 染色，荧光显微镜下可见正常皮层细胞核呈圆形或椭圆形，染色均匀（图 4A），Glu 损伤后部分细胞呈半月形的浓染细胞核和荧光碎片，形成凋亡小体（箭头所示）（图 4B）。CTN 能剂量依赖性的降低凋亡的细胞数，

减轻凋亡的程度(图 4C~E)。



A. 对照组　B. Glu(200 μmol/L)　C. CTN(0.1 μmol/L)+Glu (200 μmol/L)

D. CTN(1 μmol/L)+Glu(200 μmol/L)　E. CTN(5 μmol/L)+Glu(200 μmol/L)

箭头所指为凋亡细胞

图 4　CTN 对 Glu 诱导细胞凋亡的影响

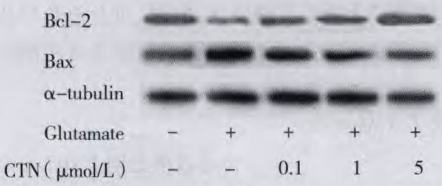


图 5　CTN 对 Bcl-2 及 Bax 蛋白表达的影响

2.5　CTN 对 Bcl-2 及 Bax 表达的影响

Bcl-2 家族是重要的凋亡调节因子，图 5 显示，Glu 可抑制 Bcl-2 的表达，增加 Bax 表达，导致 Bcl-2/Bax 比值下降，CTN 可剂量依赖性的增加 Bcl-2 的表达，减少 Bax 表达，使 Bcl-2/Bax 比值上升。

3　讨　论

Glu 作为中枢神经系统内一种重要的兴奋性神经递质，对神经系统正常的功能活动起着重要的维持作用。然而，在病理情况下，Glu 大量释放造成神经细胞损害是导致神经损伤和退行性疾病的重要因素。体外研究显示，Glu 诱发的细胞毒主要包括兴奋毒和非兴奋性依赖的神经毒，兴奋毒性是由 Glu 与 NMDA 等受体结合，使细胞内钙离子浓度持续升高，导致“钙超载”现象。钙离子引发一系列事件包括酶激活和基因表达改变，造成神经元凋亡和坏死[7]。而氧化应激则是 Glu 非兴奋性神经毒性作用的主要机制[8]。

本研究表明，神经细胞经 Glu 损伤后细胞存活率明显下降，CTN 对 Glu 诱导的细胞损伤有明显的抑制作用，且呈量效关系。通过 DCFH 荧光探针检测，发现模型组细胞内 ROS 堆积，这表明细胞内活性氧的大量堆积和自由基的产生可能是 Glu 诱导细胞死亡过程的主要路径之一，而 1 μmol/L 和 5 μmol/L 的 CTN 可明显抑制细胞内活性氧水平的升高，其中 5 μmol/L 的 CTN 能使活性氧基本恢复到正常水平。这些结果一方面进一步证实了 CTN 具有神经保护作用，另一方面也说明了 CTN 抵抗 Glu 神经毒性的机制与它抑制细胞内活性氧水平密切相关，但其抗氧化损伤的具体机制还有待于进一步的研究。

凋亡是一个基因调控的程序性细胞死亡过程，在这个过程中大量的基因被激活，蛋白质表达增加，其中 Bcl-2 蛋白家族在凋亡中起着重要的作用，属于凋亡过程的调控者。Bcl-2 家族是多基因家族，包括抑制细胞凋亡的 Bcl-2、Bcl-XL、Bcl-W 以及促进凋亡的 Bax、Bak、Bad 等。Bcl-2/Bax 的比率决定细胞凋亡是否发生。Bcl-2/Bax 比率的降低使线粒体外膜形成离子通道，促进细胞色素 C 释放，细胞色素 C 能活化 Caspase-3 引起级联反应[9,10]。

本实验通过荧光显微镜观察到，Glu 造模后在 Hoechst 染色时出现部分染色质浓缩和高度凝聚等典型细胞凋亡特征，药物 CTN 可剂量依赖性地减轻凋亡程度，降低凋亡率，说明 Glu 能够诱导皮层细胞凋亡，而 CTN 对 Glu 诱导的细胞凋亡具有明显抑制作用。研究进一步通过 Western blot 方法对细胞凋亡相关蛋白进行了检测，发现随着 CTN 浓度的升高，Bcl-2 蛋白表达升高，而 Bax 蛋白表达降低，提示 CTN 的抗凋亡作用可能与影响 Bcl-2 和 Bax 对细胞凋亡过程的调控有关。

本研究揭示了 CTN 对 Glu 诱导的皮层神经元凋亡具有保护作用，其机理可能是通过清除或抑制细胞内的活性氧产生，调节 Bcl-2 及 Bax 蛋白的表达，但其防治阿尔茨海默病的具体机制还待进一步研究。

参　考　文　献

[1] Meldrum B, Garthwaite J. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease[J]. Trends Phannacal Sci, 1990, 11(9): 379-387.

[2] Spencer P S, Nunn P B, Hugon J. Guam amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism-dementia linked to a plant excitant neurotoxin[J]. Science, 1987, 237(4814): 517-522.

[3] Ren Y, Houghton P J, Hider R C, et al. Novel diterpenoid acetylcholinesterase inhibitors from Salvia miltiorhiza[J]. Planta Med, 2004, 70(3): 201-204.

[4] Jin D Z, Yin L L, Ji X Q, et al. Cryptotanshinone inhibits cyclooxygenase-2 enzyme activity but not its expression[J]. Eur J Pharmacol, 2006, 549(1-3): 166-172.

[5] Kim D H, Jeon S J, Jung J W, et al. Tanshinone congeners improve memory impairments induced by scopolamine on passive avoidance tasks in mice[J]. Eur J Pharmacol, 2007, 574(2-3): 140-147.

[6] Park E J, Zhao Y Z, Kim Y C, et al. PF2401-SF, standardized fraction of Salvia miltiorrhiza and its constituents, tanshinone I, tanshinone Ⅱ A, and cryptotanshinone, protect primary cultured rat hepatocytes from bile acid-induced apoptosis by inhibiting JNK phosphorylation[J]. Food and Chemical Toxicology, 2007, 45(10): 1891-1898.

[7] Sattler R, Tymianski M. Molecular mechanisms of glutamate receptor mediated excitotoxic neuronal cell death [J]. Mol Neurobiol, 2001, 24(1-3): 107-129.

[8] 何其华，周慧芳，薛　冰，等. 雷公藤单体 T10 对谷氨酸所致 PC12 细胞损伤的保护作用及机制研究[J]. 北京大学学报·医学版，2003, 35(3): 252-255.

[9] Bost F, Caron L, Marchetti I, et al. Retinoic acid activation of the ERK pathway is required for embryonic stem cell commitmentinto the adipocyte lineage[J]. Biochem J, 2002, 361(3): 621-627.

[10] Burlacu A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins[J]. J Cell Mol Med, 2003, 7(3): 249-257.

（责任编辑：冉明会）