

蕨麻正丁醇提取物抑制大鼠海马神经元 缺氧所致一氧化氮生成的研究

卜婧¹, 张永亮^{2, 4}, 李灵芝^{3, 4}, 龚海英³, 李建宇³

(武警后勤学院附属医院 ①药剂科, ②训练部, ③药化教研室,

④天津市环境与职业危害防治重点实验室, 天津 300162)

【摘要】目的 研究蕨麻正丁醇提取物(NP)对大鼠海马神经元急性缺氧所致一氧化氮(NO)生成的抑制作用。**方法** 建立体外原代培养海马神经元缺氧损伤实验模型,随机分为空白对照组、缺氧模型组、尼莫地平组(2 $\mu\text{mol/L}$)及NP高(250.0 mg/L)、中(62.5 mg/L)、低(15.6 mg/L)剂量组。用四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法检测海马神经元细胞活性,同时检测其一氧化氮(NO)含量;用半定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)、蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)分别检测各组神经型一氧化氮合酶(nNOS)mRNA及蛋白的表达,用免疫细胞化学染色法检测nNOS阳性率。**结果** 与空白对照组比较,缺氧模型组神经元细胞活性[吸光度(A)值]明显降低(0.0826 ± 0.0095 比 0.3315 ± 0.0105), NO含量($\mu\text{mol/g}$: 0.0509 ± 0.0027 比 0.0291 ± 0.0032)、nNOS mRNA表达(A值: 0.1463 ± 0.0081 比 0.0801 ± 0.0058)、nNOS阳性率[(74.4238 ± 3.9423)% 比 (28.3714 ± 4.1361)%]及nNOS蛋白表达(A值: 1.9130 ± 0.0471 比 0.5068 ± 0.0368)均明显升高(均 $P < 0.01$)。与缺氧模型组比较,各药物组缺氧神经元细胞活性均增加, NO含量、nNOS mRNA及蛋白表达均降低,以高剂量组变化更显著[神经元细胞活性: 0.1681 ± 0.0118 , NO含量: 0.0319 ± 0.0044 , nNOS mRNA表达: 0.0648 ± 0.0032 , nNOS阳性率: (40.1240 ± 6.4900)%, nNOS蛋白表达: 1.3924 ± 0.0621 , 均 $P < 0.01$];而NP低剂量组与模型组比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。**结论** NP能减轻缺氧对体外培养大鼠海马神经元的损伤,其机制可能为有效抑制nNOS合成NO的过度升高。

【关键词】 蕨麻正丁醇提取物; 神经元; 缺氧损伤; 一氧化氮; 神经型一氧化氮合酶

An experimental study on inhibitory effects and mechanisms of N-butanol extract of *Potentilla anserina* L. against hypoxia-induced nitric oxide on hippocampus neurons of rats BU Jing*, ZHANG Yong-liang, LI Ling-zhi, GONG Hai-ying, LI Jian-yu. *Pharmaceutical Preparation Section, Logistical University of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China

Corresponding author: LI Ling-zhi, Email: llzhx@yahoo.cn

【Abstract】Objective To study *in vitro* the inhibitory effects and mechanisms of N-butanol extract of *Potentilla anserina* L. (NP) against hypoxia-induced nitric oxide (NO) in hippocampus neuron of rats. **Methods** The models of hippocampus neurons hypoxia injury of Sprague-Dawley (SD) neonatal rats were cultured *in vitro*. The cultured hippocampus neurons were divided randomly into blank control group, hypoxia injury model group, nimodipine group (2 $\mu\text{mol/L}$) and NP high (250.0 mg/L), middle (62.5 mg/L), low (15.6 mg/L) dose groups. The activities of hippocampus neurons were examined by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay, and meanwhile their contents of nitrogen monoxidum (NO) were detected. Half quantity reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting were used to detect neuronal nitric oxide synthetase (nNOS) mRNA and protein expression levels respectively in each group, immunocytochemistry stain was used to detect protein positive rate. **Results** Compared with blank control group, the activity of neuron [absorbance (A) value] was significantly decreased (0.0826 ± 0.0095 vs. 0.3315 ± 0.0105), content of NO ($\mu\text{mol/g}$: 0.0509 ± 0.0027 vs. 0.0291 ± 0.0032), the expression levels of nNOS mRNA (0.1463 ± 0.0081 vs. 0.0801 ± 0.0058), the positive rate of nNOS [(74.4238 ± 3.9423)% vs. (28.3714 ± 4.1361)%], the expression levels of nNOS protein (A value: 1.9130 ± 0.0471 vs. 0.5068 ± 0.0368) were all significantly increased in the hypoxia injury model group (all $P < 0.01$). Compared with hypoxia injury model, the activity of neuron was increased, contents of NO, the expression levels of nNOS mRNA, the positive rate of nNOS, the express levels of nNOS protein were decreased in each medicine group, especially prominent in the NP high concentration group [the activity of neuron: 0.1681 ± 0.0118 , contents of NO: 0.0319 ± 0.0044 , nNOS mRNA: 0.0648 ± 0.0032 , nNOS positive rate: (40.1240 ± 6.4900)%, nNOS protein: 1.3924 ± 0.0621 , all $P < 0.01$]. There were no statistical significant differences between the NP low concentration group and model group (all $P > 0.05$). **Conclusions** NP can ameliorate the injury of rat hippocampus neurons induced by hypoxia *in vitro*. The possible mechanisms might be related to the effective inhibition of the synthesis of nNOS and NO excessive generation.

【Key words】 *Potentilla anserina* L. N-butanol extract; Neuron; Hypoxia injury; Nitrogen monoxidum; Neuronal nitric oxide synthetase

蕨麻俗称人参果,为蔷薇科委陵菜属鹅绒委陵菜的地下块根,研究表明蕨麻有明显的抗缺氧^[1]、抗氧化作用^[1-2]。蕨麻正丁醇提取物(NP)是从蕨麻中提取的抗缺氧的活性部位,本课题组前期研究显示,大鼠海马神经元急性缺氧 3 h, NP 可通过提高机体清除氧自由基的能力,改善线粒体功能,抑制大鼠海马神经元缺氧所致的凋亡、坏死^[3-6]。本实验通过建立体外培养大鼠海马神经元缺氧模型,进一步研究 NP 对缺氧损伤中神经型一氧化氮合酶(nNOS)及一氧化氮(NO)过度生成的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 主要实验药品及试剂:蕨麻购自青海省,以 70% 乙醇提取浓缩后以水分散,依次用石油醚、氯仿、正丁醇萃取,减压浓缩得到正丁醇提取物(相当于蕨麻生药 59 g/g)。尼莫地平注射液购自拜耳医药公司,批号: BXC94E3。DMEM-F12 和 N2 营养因子为美国 Gibco 公司产品, NO 检测试剂盒为南京建成生物公司产品,总 RNA 提取试剂盒为日本 TaKaRa 公司产品,兔抗大鼠 nNOS 多克隆抗体(多抗)为美国 Santa Cruz 公司产品。

1.2 体外原代大鼠海马神经元的培养:取出生 24 h 内 SD 乳鼠[由解放军军事医学科学院实验动物中心提供,动物合格证号: SCK-(军)2002-001],分离海马组织,剪碎过 200 目滤网筛,用 DMEM-F12 培养基、10% 胎牛血清、1% 青链霉素溶液及 5% 葡萄糖稀释细胞悬液,以 4×10^5 个/ml 的密度接种于培养皿,48 h 后更换全液撤销胎牛血清,添加剂 1% N2,3~4 d 后更换半液,将细胞培养到第 7 日备用。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.3 急性神经细胞缺氧损伤模型的建立及实验分组:将培养到第 7 日的神经元以无糖 D-Hank 液(预先持续通入 95% N₂-5% CO₂ 混合气体 30 min)替换正常神经元培养基,然后将其放入含 95% N₂-5% CO₂ 混合气体的 37 °C 培养箱。实验随机分为空白对照组、缺氧模型组、尼莫地平组(2 μmol/L)以及蕨麻正丁醇提取物高(250.0 mg/L)、中(62.5 mg/L)、低(15.6 mg/L)剂量组。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法检测细胞活性:将分离所得海马神经元接种于 96 孔板培养 7 d,缺氧模型组及各剂量药物干预组缺氧培养 3 h,空白对照组于培养箱中同步孵育(37 °C,5% CO₂);每孔加入 20 μl 0.5% MTT 溶液(4 h,37 °C)终止培养,吸去孔内培养液,每孔加入 150 μl 二甲亚砜

(DMSO),用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测仪在波长 490 nm 处测量各孔的吸光度(A)值。

1.4.2 NO 含量测定:海马神经元接种于 24 孔板,取样 200 μl,根据试剂盒操作说明检测 NO 的含量。计算公式: NO 含量(μmol/g) = (测定管 A 值 - 测定空白管 A 值) / (标准管 A 值 - 标准空白管 A 值) × 标准品浓度(2 mmol/L) / 样本蛋白量(g/L)。

1.4.3 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 nNOS 基因表达:按总 RNA 抽提试剂盒提取各组细胞的总 RNA,取 A₂₆₀/A₂₈₀ 值在 1.8~2.0 的 RNA 进行逆转录。nNOS 及内参照 β-肌动蛋白(β-actin)的 PCR 扩增引物由美国 Invitrogen 公司设计、合成。按照试剂盒说明书步骤进行 PCR 扩增,扩增产物经琼脂糖凝胶(含 0.5 mg/L 伊文斯蓝)电泳鉴定,nNOS RT-PCR 产物的相对含量等于各实验组 nNOS 扩增带 A 值与同组 β-actin 扩增带 A 值的比值。

1.4.4 免疫细胞化学法检测 nNOS 蛋白表达:将细胞爬片,丙酮固定 4 h,封闭非特异性抗原,加入兔抗大鼠 nNOS 多抗(1:1000,4 °C)、生物素化山羊抗兔二抗工作液(37 °C,1 h),过氧化物酶标记的链霉素卵白素(SP)复合物(37 °C,1 h),3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色液中显色,苏木素复染胞核、脱水、透明、封片。空白对照组以磷酸盐缓冲液(PBS)替换一抗,其余实验步骤一致。于显微镜下观察阳性细胞(为胞核或胞质被染色成棕黄色的神经元)。

1.4.5 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测 nNOS 蛋白:按总蛋白提取试剂盒说明书提取各实验组细胞总蛋白,经考马斯亮蓝对蛋白质进行定量。通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)恒压电泳分离蛋白,用垂直电转移槽将分离所得蛋白转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,恒电流转移(90 V,2 h)。冲洗 PVDF 膜后将其置于 5% 牛血清蛋白(BSA)封阻液(1 h),加入兔抗大鼠 nNOS 多抗(1:1000 稀释,4 °C)、生物素化山羊抗兔二抗工作液(37 °C,1 h)、SP 复合物(37 °C,1 h),DAB 显色液中显色。以同一样品 nNOS 条带的 A 值与 β-actin A 值比值作为蛋白的相对含量。

1.5 统计学分析:用 SPSS 11.5 统计软件分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各实验组结果采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NP 对大鼠海马神经元细胞活性的影响(表 1):急性缺氧 3 h 时,与空白对照组比较,缺氧模型组

表 1 各组大鼠海马神经元细胞活性、NO 含量、nNOS mRNA、nNOS 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

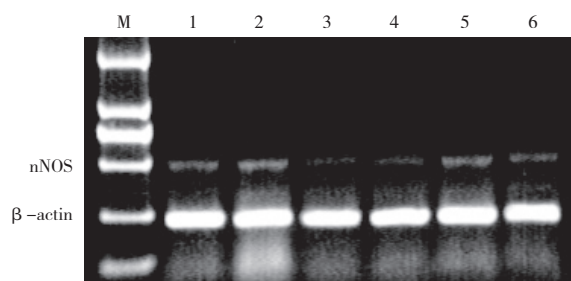
组别	样本数	神经元细胞活性 (A 值)	NO ($\mu\text{mol/g}$)	nNOS mRNA (A 值)	nNOS 蛋白阳性率 (%)	nNOS 蛋白 (A 值)
空白对照组	8	0.3315 $\pm$ 0.0105	0.0291 $\pm$ 0.0032	0.0801 $\pm$ 0.0058	28.3714 $\pm$ 4.1361	0.5068 $\pm$ 0.0368
缺氧模型组	8	0.0826 $\pm$ 0.0095 ^a	0.0509 $\pm$ 0.0027 ^a	0.1463 $\pm$ 0.0081 ^a	74.4238 $\pm$ 3.9423 ^a	1.9130 $\pm$ 0.0471 ^a
尼莫地平组	8	0.1893 $\pm$ 0.0201 ^b	0.0335 $\pm$ 0.0051 ^b	0.0436 $\pm$ 0.0017 ^b	36.2912 $\pm$ 7.2557 ^b	1.4236 $\pm$ 0.0578 ^b
NP 高剂量组	8	0.1681 $\pm$ 0.0118 ^b	0.0319 $\pm$ 0.0044 ^b	0.0648 $\pm$ 0.0032 ^b	40.1240 $\pm$ 6.4900 ^b	1.3924 $\pm$ 0.0621 ^b
NP 中剂量组	8	0.1121 $\pm$ 0.0156 ^b	0.0392 $\pm$ 0.0018 ^b	0.1135 $\pm$ 0.0048 ^b	51.9800 $\pm$ 8.0617 ^b	1.6195 $\pm$ 0.0614 ^b
NP 低剂量组	8	0.0701 $\pm$ 0.0106	0.0469 $\pm$ 0.0037 ^c	0.1389 $\pm$ 0.0094	71.8012 $\pm$ 9.0124	1.8065 $\pm$ 0.0594

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.01$;与缺氧模型组比较,^b $P < 0.01$,^c $P < 0.05$

神经元细胞活性显著降低 ($P < 0.01$);尼莫地平组及 NP 高、中剂量组神经元细胞活性均较模型组明显增加 (均 $P < 0.01$);NP 低剂量组与模型组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 NP 对大鼠海马神经元 NO 含量的影响 (表 1):模型组 NO 含量较空白对照组显著增加 ($P < 0.01$);各药物组 NO 含量较模型组明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.3 NP 对大鼠海马神经元 nNOS mRNA 表达的影响 (表 1;图 1):模型组神经元 nNOS mRNA 表达较空白对照组明显升高 ($P < 0.01$);尼莫地平组及 NP 高、中剂量组 nNOS mRNA 表达均较模型组明显降低 (均 $P < 0.01$);NP 低剂量组与模型组 nNOS mRNA 表达比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

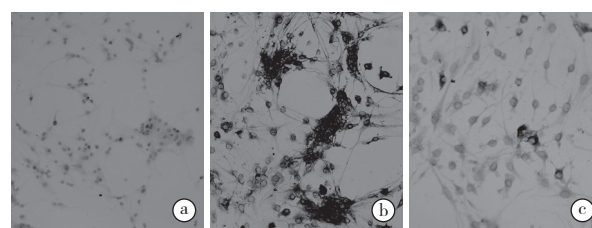


M: Marker; 1 ~ 6 依次为:空白对照组、缺氧模型组、尼莫地平组及 NP 高、中、低剂量组

图 1 RT-PCR 检测各组神经元 nNOS mRNA 表达

2.4 NP 对大鼠海马神经元免疫细胞化学染色结果的影响 (表 1;图 2):nNOS 蛋白主要在神经细胞胞质及胞核中表达,其免疫反应阳性的产物表现为棕黄色颗粒。显微镜下观察,空白对照组免疫反应阳性的 nNOS 蛋白表达较弱,而缺氧模型组免疫反应阳性的 nNOS 蛋白表达增强。模型组神经元 nNOS 蛋白免疫反应阳性率较空白对照组显著增强 ($P < 0.01$);尼莫地平组及 NP 高、中剂量组神经元 nNOS 蛋白免疫反应阳性率均较模型组明显降低 (均 $P <$

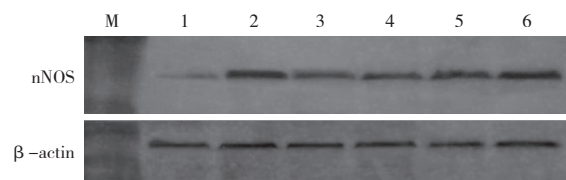
0.01);但 NP 低剂量组与缺氧模型组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。



(a):空白对照组;(b):缺氧模型组;(c) NP 高剂量干预组

图 2 免疫细胞化学染色法检测各组神经元 nNOS 蛋白阳性率 (免疫细胞化学染色 中倍放大)

2.5 NP 对大鼠海马神经元 nNOS 蛋白表达的影响 (表 1;图 3):模型组神经元 nNOS 蛋白的表达量较空白对照组明显升高 ($P < 0.01$);尼莫地平组及 NP 高、中剂量组神经元 nNOS 蛋白均较模型组明显降低 (均 $P < 0.01$);但 NP 低剂量组与模型组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。



M: Marker; 1 ~ 6 依次为:空白对照组、缺氧模型组、尼莫地平组及 NP 高、中、低剂量组

图 3 Western blotting 检测各组神经元 nNOS 蛋白表达

3 讨论

活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶具有催化 MTT 生成紫红色不溶性物质的特性,通过测定紫红色不溶物质的 A 值的可间接反映细胞活性, A 值越大,表明细胞的活性越强^[7]。本实验结果显示,急性缺氧模型组较空白对照组 A 值降低,反映缺氧损伤使神经元内琥珀酸脱氢酶的活性降低,神经元的呼吸功能受到损伤,说明急性缺氧 3 h 就具有了损害

海马神经元代谢的能力。与缺氧损伤模型组比较, NP 各剂量组 A 值升高, 表明琥珀酸脱氢酶的活性增高, 神经元的呼吸功能得到保护。因此, NP 能对抗缺氧损伤对海马神经元代谢能力的损害, 提高缺氧情况下海马神经元的存活率。

研究发现, NO 在脑缺血损伤中具有神经保护和神经毒性的双重作用, 这与由不同类型 NOS 催化生成的 NO 密切相关^[8-9]。一氧化氮合酶 (NOS) 分为内皮型 (eNOS)、nNOS、诱导型 (iNOS) 3 种类型, 研究显示 eNOS 的活性增加可能具有神经细胞保护作用^[10], nNOS 和 iNOS 活性增加则具有神经毒性作用^[11]。nNOS 为结构性生物酶, 广泛分布于神经细胞, 研究发现, 当缺血数小时, nNOS 催化产生过量的 NO, 可形成自由基, 损伤细胞 DNA 以及线粒体, 导致细胞变性或凋亡^[12-14]。选择性 nNOS 抑制剂 7-硝基吡啶可有效降低 nNOS 活性, 在局灶性脑缺血中发挥神经元保护作用^[15], 提示了 nNOS 在脑缺血中的负性作用。本研究显示, 缺氧 3 h 时细胞 NO 生成显著增加, 神经元细胞 nNOS 基因及蛋白表达水平均显著升高, 表明缺氧可能激活了神经元细胞 nNOS, 继而催化合成过量的 NO。与缺氧模型组比较, NP 各剂量干预组缺氧神经元细胞 NO 的生成降低, 下调了 nNOS 在基因及蛋白水平的表达, 且随着药物浓度升高, 细胞 NO 含量及 nNOS 表达均降低, 表明 NP 能抑制 nNOS 表达, 进而抑制了由 nNOS 催化生成的 NO 大量释放, 且具有浓度依赖性。

综上所述, 本研究结果提示, NP 可能通过抑制 nNOS 源性的 NO 大量生成, 发挥其对缺氧所致神经元损伤的保护作用。

参考文献

- [1] 李灵芝, 张丽, 龚海英, 等. 蕨麻醇提取物的抗缺氧与抗氧化研究. 中国食品卫生杂志, 2005, 17 (4): 306-308.
- [2] 李建宇, 李灵芝, 张永亮, 等. 蕨麻醇提取物对心肌细胞缺氧损伤的保护作用. 中国新药杂志, 2007, 16 (12): 944-946.
- [3] 李建宇, 李怡, 龚海英, 等. 蕨麻正丁醇提取部位对小鼠急性缺血心肌 caspase-9/3 mRNA 表达的影响. 中国中西医结合急救杂志, 2009, 16 (1): 18-21.
- [4] 王震, 李建宇, 董化江, 等. 蕨麻正丁醇提取物对心肌缺血 / 再灌注损伤大鼠肿瘤坏死因子- α 水平的影响. 中国中西医结合急救杂志, 2012, 19 (3): 141-143.
- [5] 唐琼琳, 高宏生, 刘丽华, 等. 急性高原缺氧大鼠脑皮质相关细胞因子变化及蕨麻的保护作用. 中国中西医结合急救杂志, 2012, 19 (3): 137-140.
- [6] Qin XJ, Li LZ, LV Q, et al. Neuroprotection of n-Butanol Extract from Roots of *Potentilla anserina* on Hypoxic Injury in Primary Hippocampal Neurons. Chin Herb Med, 2012, 4 (3): 195-200.
- [7] Jong NN, Nakanishi T, Liu JJ, et al. Oxaliplatin transport mediated by organic cation/carnitine transporters OCTN1 and OCTN2 in overexpressing human embryonic kidney 293 cells and rat dorsal root ganglion neurons. J Pharmacol Exp Ther, 2011, 338 (2): 537-547.
- [8] Keynes RG, Garthwaite J. Nitric oxide and its role in ischaemic brain injury. Curr Mol Med, 2004, 4 (2): 179-191.
- [9] 吴晓华, 李玮, 韩瑛, 等. 亚低温对脑出血患者血清 NO、SOD 及 LPO 含量的影响. 中国危重病急救医学, 2003, 15 (9): 571-572.
- [10] 刘伟, 杨明会. 急性肺损伤时一氧化氮与宗气关系的探讨. 中国中西医结合急救杂志, 2009, 16 (6): 382-384.
- [11] Fabian RH, Perez-Polo JR, Kent TA. Perivascular nitric oxide and superoxide in neonatal cerebral hypoxia-ischemia. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008, 295 (4): H1809-1814.
- [12] 唐广宁, 展群岭, 吴志龙. 危重病评分与炎症介质对危重患者预后的综合评估分析. 中国危重病急救医学, 2006, 18 (12): 759-760.
- [13] 陈建华, 刘晓娟. 脑血管患者血清内源性氧化剂和抗氧化剂水平变化的研究. 中国危重病急救医学, 2003, 15 (4): 232-234.
- [14] 庄海舟, 张淑文, 李昂, 等. 中药 912 液对脓毒症大鼠心肌损伤保护的实验研究. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 15 (1): 16-19.
- [15] Sigauco-Roussel D, Fromy B, Saumet JL. In vivo vasodilating mechanisms: who's NOS involved?. J Physiol, 2008, 586 (3): 689-690.

(收稿日期: 2013-05-27) (本文编辑: 李银平)

• 学术活动预告 •

科研思路与论文发表培训班通知

由中国中西医结合学会编辑工作委员会主办、天津市第一中心医院和《中国中西医结合急救杂志》杂志社承办的国家级中医药继续教育项目科研思路与论文发表培训班将于 2013 年 9 月 13 日至 15 日在天津召开, 参加者将授予国家级继续教育学分 6 分。

培训班将邀请国内著名专家就科研设计和标书书写、国家自然科学基金申报方法以及医学论文的写作及投稿方法等内容进行详细剖析。希望通过培训能使广大中西医结合等专业的医务工作者对所在专业的临床工作、科研设计、医学论文写作等多方面有更深入地了解, 提高业务水平以及科研和论文写作能力。

1 会议时间: 2013 年 9 月 13 日至 15 日。

2 会议费用: 会务费 300 元 / 人, 食宿统一安排, 费用自理。

3 报名办法: ①电话报名: 022-23306917, 23197150; 联系人: 李银平。②将报名信息发至会务组邮箱 (Email: cccm@em120.com, 邮件主题请注明参会回执), 也可邮寄到会务组 (天津市和平区睦南道 122 号《中国中西医结合急救杂志》杂志社, 邮编: 300050), 信封上请注明参会回执。我们会在收到参会回执后尽快与您联系。