

# 排风藤提取物中东莨菪苷对神经细胞的抗氧化活性研究

孔玉珊, 黄少兰, 谢明霞, 薛艳红, 邹坤, 刘士平\*

天然产物研究与利用湖北省重点实验室 三峡大学生物与制药学院, 宜昌 443002

**摘要:** 前期研究显示排风藤提取物具有较好的抗氧化活性, 为进一步明确其活性成分与功效, 本文经过提取分离、结构鉴定后, 探讨了其单体化合物东莨菪苷对  $H_2O_2$  所致人神经母细胞瘤株 SH-SY5Y 细胞系氧化应激损伤后的抗氧化保护作用。结果表明在远离其毒性范围内, 东莨菪苷呈现出与阳性对照维生素 E 相近的抗氧化活性, LDH 漏出率明显降低, 说明东莨菪苷具有降低膜损伤的作用; 此外,  $0.1 \mu M$  的东莨菪苷将有助于细胞提高超氧化物歧化酶、谷胱甘肽等抗氧化物质的含量, 表明其可以作为一种潜在的抗神经退行性疾病药物进行开发和利用。

**关键词:** 排风藤; 东莨菪苷;  $H_2O_2$ ; SH-SY5Y 细胞; 抗氧化活性

中图分类号: R961; Q946.8

文献标识码: A

## Antioxidant Activity of Scopolin from *Solanum cathayanum* to SH-SY5Y cells

KONG Yu-shan, HUANG Shao-lan, XIE Ming-xia, XUE Yan-hong, ZOU Kun, LIU Shi-ping\*

Hubei Key Laboratory of Natural Products Research and Development, College of Biology and pharmaceuticals, Three Gorges University, Hubei Yichang 443002, China

**Abstract:** *Solanum cathayanum* extracts showed obviously antioxidant activity in previous study. Here, in order to further investigate the active components of *S. cathayanum*, the monomeric compound scopolin was isolated, purified and structurally identified. The antioxidant effects of scopolin to SH-SY5Y cells under  $H_2O_2$  oxidative stress were assessed. The results revealed that scopolin had evident antioxidant activity in the nontoxic concentration, similar to that of the positive control vitamin E. Besides, LDH leakage rate decreased obviously, suggested that scopolin had the ability of protecting membrane from injury.  $0.1 \mu M$  of scopolin helped the cells to improve antioxidant content such as superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH). All the results indicated that scopolin can be developed as a potential anti-nerve degenerative disease drug.

**Key words:** *Solanum cathayanum*; scopolin;  $H_2O_2$ ; SH-SY5Y cells; antioxidant activity

排风藤 (*Solanum cathayanum*) 又称千年不烂心、蜀羊泉等, 是我国特有的一种茄属植物, 主要分布于三峡流域及神农架、恩施和湘西等地<sup>[1]</sup>。作为一种民间草药, 排风藤具有清热利湿、解毒消肿的功效, 在三峡库区具有多年的使用历史<sup>[2]</sup>。本实验室的前期研究表明, 排风藤的部分提取物不仅可杀菌抗炎、保肝护胆<sup>[3]</sup>, 而且对神经细胞具有较好的抗氧化保护能力<sup>[3]</sup>, 具有可作为治疗神经退行性疾病 (如帕金森症, 阿尔茨海默病和亨廷顿氏病等) 药物的潜能<sup>[4]</sup>。为进一步探讨排风藤提取物在神经元氧化损伤中的保护作用, 本实验室从排风藤中分离

出 9 个单体化合物<sup>[1,5]</sup>, 经结构鉴定其中一种为东莨菪苷 (Scopolin)。本文分析了东莨菪苷的细胞毒性, 进行了过氧化氢胁迫下人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 的氧化损伤保护作用分析, 试验结果表明东莨菪苷具有有效的抗  $H_2O_2$  介导的氧化损伤作用, 具有缓解细胞膜损伤、恢复超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽 (GSH) 等抗氧化物质的含量, 为新型神经退行性疾病药物的开发和设计提供了参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

排风藤采自湖北恩施, 经三峡大学生物与制药学院陈发菊教授鉴定为 *Solanum cathayanum*。人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 由华中科技大学同济医学院实验动物中心惠赠。

收稿日期: 2013-07-15 接受日期: 2013-11-21

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31270389, 31070313); 湖北省教育厅自然科学基金项目 (D20121301)

\* 通讯作者 E-mail: shipingliu@zju.edu.cn

## 1.2 药品和仪器

实验中使用的药品和试剂有:胰蛋白酶(美国 GIBCO 公司),四氮唑蓝(MTT)(美国 AMRESCO 公司),新生小牛血清(杭州四季青生物材料有限公司),过氧化氢( $H_2O_2$ ,分析纯,国药集团),LDH、SOD、GSH 检测试剂盒(上海宝曼生物公司)。其中 D-MEM/F-12 完全培养基内含  $2.2 \text{ mg/mL NaHCO}_3$ ,  $100 \text{ U/mL}$  青霉素,  $100 \text{ }\mu\text{g/mL}$  链霉素,  $15\%$  新生小牛血清。基础培养基将新生小牛血清降为  $3\%$ 。所用的仪器有酶联免疫检测仪(Genius Tecan);  $CO_2$  培养箱(日本三洋公司),LD4-2A 离心机(北京医用离心机厂),XDS-1B 倒置显微镜(重庆光学仪器厂)和 96 孔板(美国 Corning 公司)。

## 1.3 东莨菪苷的分离与鉴定

取  $6.5 \text{ kg}$  排风藤干燥全草粉碎,  $95\%$  乙醇回流提取 3 次,每次  $2 \sim 3 \text{ h}$ ,过滤,滤液减压浓缩至无醇味后用石油醚脱脂。脱脂后的水层用  $4\%$  HCl 冷浸 3 次,用  $Na_2CO_3$  调至成不同的 pH( $7, 10, 12$ )后经氯仿萃取三次,最后水层再用正丁醇萃取得正丁醇部位( $260.2 \text{ g}$ )。将正丁醇部位水悬浮后,其水溶部分经大孔吸附树脂和反相硅胶柱层析,经 HPLC 制备获得  $30 \text{ mg}$  样品。将该化合物进行硅胶薄层色谱、重氮化氨基苯磺酸反应、Molish 反应和核磁共振后确定其结构。

## 1.4 细胞培养及 $H_2O_2$ 损伤模型的建立

SH-SY5Y 细胞用 D-MEM/F-12 完全培养基于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $5\%$   $CO_2$  饱和湿度孵箱中培养。待细胞  $80\% \sim 90\%$  铺满瓶底时进行传代、转板,贴壁细胞用  $0.25\%$  的胰蛋白酶进行消化,传代按  $1:3$  比例进行。 $H_2O_2$  损伤模型的建立按照<sup>[3]</sup>的方法进行。

## 1.5 东莨菪苷对神经细胞毒性检测

取对数生长期的 SH-SY5Y 细胞以  $1 \times 10^5$  个/ $\text{mL}$  的浓度接种于 96 孔板,  $100 \text{ }\mu\text{L}$ /孔,培养  $24 \text{ h}$  贴壁后弃去旧培养基,加入浓度为  $0.1, 1, 10, 100, 1000 \text{ }\mu\text{M}$  的药物(含  $3\%$  血清的培养基配制),同时设空白对照组,每组设 6 次重复,继续培养  $24 \text{ h}$ , MTT 比色法在  $492 \text{ nm}$  处检测吸光值并计算细胞存活率<sup>[6-8]</sup>(存活率 = 处理组 OD 值/空白组 OD 值  $\times 100\%$ )。

## 1.6 东莨菪苷对神经细胞抗氧化保护活性及量效关系分析

根据毒性实验结果,选取  $100 \text{ }\mu\text{M}$  以下的浓度先进行初筛。弃去旧培养基后,模型组及给药组加

入浓度为  $700 \text{ }\mu\text{M}$  的双氧水(无血清培养基配制),培养  $12 \text{ h}$  后用 MTT 比色法检测细胞存活率。量效关系分析中将浓度设置为  $0.01, 0.1, 1, 10, 100 \text{ }\mu\text{M}$ , 同时设空白组、模型组及正对照维生素 E(VE)组(VE 的浓度为  $5 \text{ mg/mL}$ )。

## 1.7 乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)检测

利用黄递酶法分别检测细胞内外的 LDH,计算漏出率。LDH 漏出率 = [细胞外值/(细胞外值 + 细胞内值)]  $\times 100\%$ 。LDH、SOD、GSH 检测的具体操作均按上海宝曼生物公司的试剂盒说明进行。

## 1.8 统计学处理

实验数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS13.0 进行单因素方差分析,。

## 2 结果与分析

### 2.1 东莨菪苷的结构鉴定

分离纯化后的样品呈白色粉末状, mp.  $203 \sim 204 \text{ }^\circ\text{C}$ 。硅胶薄层色谱在  $365 \text{ nm}$  紫外灯下观察呈蓝色荧光斑点,  $UV\lambda_{nm}^{MeOH}$ :  $203 \text{ nm}, 275 \text{ nm}$ , 提示该化合物有较大的共轭体系,重氮化氨基苯磺酸反应呈阳性,提示该化合物可能是香豆素类化合物。Molish 反应呈阳性,原位酸水解只检测到葡萄糖。ESI-MS  $m/z$ :  $355 [M + H]^+$ 。 $^1H \text{ NMR}$  (DMSO- $d_6$ ,  $400 \text{ MHz}$ )  $\delta_H$ :  $7.97 (1H, d, J = 9.5 \text{ Hz}, H-4), 7.29 (1H, s, H-8), 7.16 (1H, s, H-5), 6.33 (1H, d, J = 9.5 \text{ Hz}, H-3), 5.00 (1H, d, J = 6.0 \text{ Hz}, H-1'), 3.81 (3H, s, 6-OCH_3)$ ;  $^{13}C \text{ NMR}$  (DMSO- $d_6$ ,  $100 \text{ MHz}$ )  $\delta_C$ :  $160.4 (C-2), 149.8 (C-7), 148.8 (C-9), 145.9 (C-6), 144.1 (C-4), 113.4 (C-5), 112.2 (C-10), 109.6 (C-3), 105.5 (C-8), 102.9 (C-1'), 77.0 (C-3'), 76.2 (C-5'), 72.9 (C-2'), 69.5 (C-4'), 60.6 (C-6'), 55.9 (6-OCH_3)$ 。以上数据与文献<sup>[9]</sup>报道一致,故鉴定化合物为东莨菪苷(scopolin),其化学结构式见图 1。

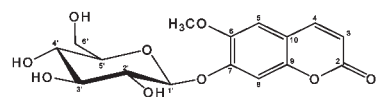


图 1 东莨菪苷的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of scopolin

### 2.2 东莨菪苷对神经母瘤细胞生长的影响

为明确东莨菪苷对神经细胞的生长是否具有毒

害作用,并寻找到合适的药物浓度范围,试验中我们考察了不同浓度的单体对 SH-SY5Y 细胞存活率的影响。结果显示(表 1)东莨菪苷对 SH-SY5Y 细胞的毒性作用随着浓度的增加而增强:当浓度达到 100  $\mu\text{M}$  时,细胞的生长会受到影响;而当浓度升高到 1000  $\mu\text{M}$  时,细胞的存活率仅有对照的 82.23%。统计分析还表明,当用 0~100  $\mu\text{M}$  浓度的东莨菪苷进行处理时,其对 SH-SY5Y 细胞的毒害作用较小,因此选用此浓度范围进行抗氧化保护作用分析。

表 1 东莨菪苷对 SH-SY5Y 细胞生长的影响

Table 1 Effect of scopolin on growth of SH-SY5Y cells

组别 Groups	浓度 Concentration ( $\mu\text{M}$ )	OD <sub>492</sub>	相对存活率 Relative survival rate (%)
空白组 Control group	0	0.8576 $\pm$ 0.012	100 $\pm$ 1.40
给药组 Drug group	0.1	0.8260 $\pm$ 0.010	96.32 $\pm$ 1.17
	1	0.8605 $\pm$ 0.023	100.34 $\pm$ 2.68
	10	0.8492 $\pm$ 0.017	99.02 $\pm$ 1.98
	100	0.8032 $\pm$ 0.024*	93.66 $\pm$ 2.80
	1000	0.7052 $\pm$ 0.007**	82.23 $\pm$ 0.82

注:与空白组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ , $n = 5$ 。

Note:compared with control group,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.05$ , $n = 5$ 。

### 2.3 东莨菪苷的抗氧化能力分析

在建立了 700  $\mu\text{M}$  双氧水氧化胁迫模型的基础上,我们分析了东莨菪苷对人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 的抗氧化活性分析。MTT 比色法实验结果显示东莨菪苷对双氧水损伤的 SH-SY5Y 细胞具有明显的保护作用。在 0.01~100  $\mu\text{M}$  浓度范围内东莨菪苷均显示出很好的抗氧化活性,保护细胞免于遭到双氧水的氧化损伤,其效果优于阳性对照 VE(图 2)。但在所试验的浓度范围内,其量效关系不明显。

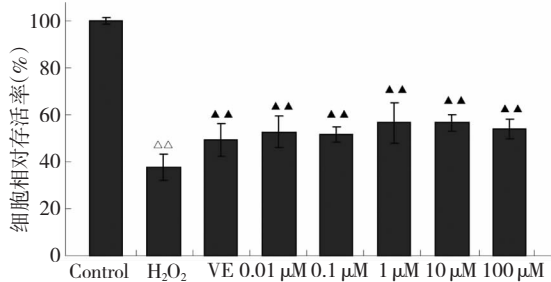


图 2 东莨菪苷对 SH-SY5Y 细胞的抗氧化保护作用

Fig. 2 Protective effect of scopolin on SH-SY5Y cells under H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidative stress

注:与空白组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$ , $n = 5$ ;与模型组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$ , $n = 5$ 。

Note:compared with control group, $\Delta\Delta P < 0.01$ , $n = 5$ ;compared with model group, $\Delta\Delta P < 0.01$ , $n = 5$ 。

### 2.4 LDH、SOD、GSH 检测

为进一步分析排风藤提取物东莨菪苷对神经细胞的氧化保护作用机理,我们分别测定了 SH-SY5Y 细胞在不同东莨菪苷浓度(0.001、0.01 和 0.1  $\mu\text{M}$ )下的 LDH、SOD、GSH 值(图 3)。实验结果表明,在细胞正常生长时,LDH 的活性主要集中在细胞内,可 700  $\mu\text{M}$  的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 使得 LDH 的漏出率达到近 30 倍(图 3A),即 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 导致神经细胞的氧化损伤部分原因是由于细胞膜受损,使得胞内 LDH 的活性降低,胞外 LDH 活性增高。但东莨菪苷可与阳性对照 VE 一样,起到部分降低 LDH 漏出率的作用,在浓度超过 0.01  $\mu\text{M}$  时效果明显(图 3A),说明东莨菪苷可以降低因 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 导致的细胞膜损伤,从而起到保护神经细胞的作用。

在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 存在下,SH-SY5Y 细胞的 SOD 酶活显著下降(图 3B)。VE 可以显著恢复其活性(恢复率:68%),而东莨菪苷对其也有很好的恢复效果(图 3B),在 0.1  $\mu\text{M}$  时 SOD 酶活可以恢复到正常生长的 63%。GSH 活性检测的结果和 SOD 类似,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 使得 GSH 的活性下降 80% 以上(图 3C),VE 和 0.1  $\mu\text{M}$  的东莨菪苷使得其活性得以部分恢复,恢复度达 40% 以上(图 3)。这一系列实验结果表明,东莨菪苷对神经细胞的抗氧化保护作用,除了可以减少膜损伤之外,还可以显著提高抗氧化酶的活性。

## 3 讨论

活性氧可诱导神经细胞发生凋亡,是造成许多退化性神经系统疾病的一种重要诱因。故找到合适的抗氧化剂,保护神经元免受氧化应激损伤,是防治该类疾病的有效途径。前期研究表明排风藤的提取物对神经细胞具有较好的抗氧化保护能力<sup>[3]</sup>,本文在前期研究的基础上从排风藤中分离了一个单体化合物——东莨菪苷,并探讨了其对神经母瘤细胞 SH-SY5Y 的抗氧化保护活性,结果表明在 0.01~100  $\mu\text{M}$  浓度范围内东莨菪苷均显示出很好的抗氧化活性,其效果甚至优于阳性对照 VE,因此为神经退行性疾病的药物设计提供了一定的参考价值。

作为一种潜在药物,东莨菪苷具有抗炎、镇痛的效果,可用于治疗风湿痛和神经痛等疾病,显示出很大的潜在药用价值<sup>[1-3]</sup>。但是其对神经细胞的抗氧化保护作用机理却很复杂,本文研究结果表明,东莨菪苷既可以一定程度上保护细胞膜免遭损伤,又可

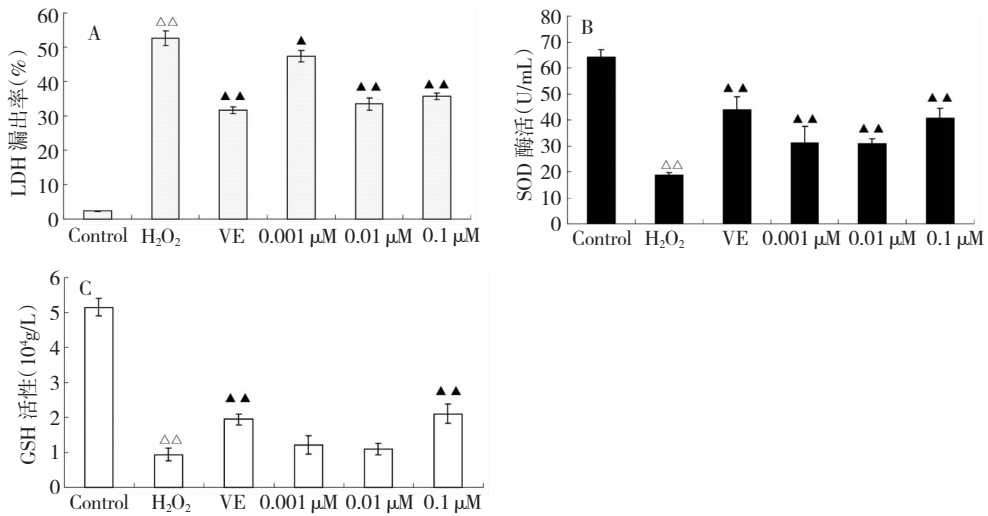


图3 东莨菪苷对神经细胞 LDH 漏出率 (A)、SOD 酶活 (B) 及 GSH (C) 活性影响

Fig. 3 Influence of scopolin on LDH leakage (A), SOD (B) and GSH (C) activities of SH-SY5Y cells

注:与空白组比较,△△ $P < 0.01$ , $n = 5$ ;与模型组比较,▲▲ $P < 0.01$ ,▲ $P < 0.05$ , $n = 5$ 。

Note: compared with control group, △△ $P < 0.01$ ,  $n = 5$ ; compared with model group, ▲▲ $P < 0.01$ , ▲ $P < 0.05$ ,  $n = 5$ .

以恢复神经细胞抗氧化酶 (SOD) 或抗氧化剂 (GSH) 的活性, 这些生理指标均接近正对照 VE。其中, 不管是 VE 还是东莨菪苷, 其对 SOD 和 GSH 的恢复度均分别可达到正常生长的 60% 和 40% (图 3); 相比之下, 东莨菪苷和 VE 对 LDH 漏出率的作用有限, 是正常生长的 15 ~ 20 倍 (图 3), 反映细胞膜的损伤度仍较高。这一些说明东莨菪苷介导的神经细胞的抗氧化作用, 机制复杂多样, 其详细机理还有待进一步研究。

#### 参考文献

- Xie MX(谢明霞), Zhou Y(周媛), Zou K(邹坤), et al. Chemical constituents of the *Solanum cathayanum*. *J Chin Med Mater* (中药材), 2008, 31: 1332-1334.
- Guo JH(郭江红), Zhou Y(周媛), Liu R(刘蓉), et al. Determination of tomatine in *Solanum cathayanum* by RP-HPLC. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2010, 35: 882-884.
- Huang SL(黄少兰), Dong WJ(董文娟), Xue YH(薛艳红), et al. Protective effect of alkaloid of *Solanum cathayanum* on SH-SY5Y cell damage caused by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Jiangsu J Trad Chin Med* (江苏中医药), 2011, 43: 90-92.
- Milton NG. Role of hydrogen peroxide in the aetiology of

Alzheimer's disease; implications for treatment. *Drugs Aging*, 2004, 21: 81-100.

- Zuo XM(左小明), Deng ZS(邓张双), Guo ZY(郭志勇), et al. Isolation and identification of chemical constituents of *Solanum cathayanum*. *J Huazhong Norm Univ, Nat Sci* (华中师范大学学报, 自科版), 2012, 46: 322-324.
- Wu D(吴迪), Wu GR(吴桂荣), Abulizi A(阿布力孜·阿布杜拉), et al. Preventive effect of different ω-3 / ω-6 constituent ratio of compatibility safflower seed oil on SH-SY5Y cells against oxidative cell damage. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2011, 23: 420-424.
- Sun FL(孙芳玲), Wang W(王文), An Y(安宜), et al. Morroniside inhibits H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative injury in SH-SY5Y neuroblastoma cell. *Chin Remed Clin* (中国药物与临床), 2008, 8: 843-845.
- Yu J(余涓), Hu GF(胡桂芳), Weng SM(翁绳美), et al. Protective effects of 13-MTD on injury of SH-SY5Y neuroblastoma cells induced by hydrogen peroxide. *Chin J Clin Pharm Ther* (中国临床药理学与治疗学), 2010, 15: 622-626.
- He L(何雷), Yang SL(杨顺丽), Wu DS(吴德松), et al. Coumarins from *Skimmia arborescens* and its anti-inflammatory effect. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2012, 37: 811-813.