

大麦提取物对星形胶质细胞氧化损伤的保护作用

刘国安*, 董欢, 张佳佳, 韩潇, 丁兰

西北师范大学生命科学学院, 兰州 730070

摘要: 活性氧如 H_2O_2 、 $O_2^{\cdot-}$ 以及 $OH\cdot$ 造成的生物分子及细胞损伤与许多神经退行性疾病如阿尔茨海默病、癫痫和帕金森氏病等有关。本实验对 Wistar 大鼠脑星形神经胶质细胞进行了分离和原代培养, 以此为材料检测了大麦提取物对由 H_2O_2 处理引起的细胞生长抑制的保护作用。通过细胞形态学观察和 SRB 法测定细胞生长率, 实验结果表明大麦提取物对 H_2O_2 诱导下星形胶质细胞生长率降低具有一定的保护作用, 且呈浓度依赖性, 当大麦提取物浓度增加到 $1600\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 细胞生长率达到 100%。

关键词: 活性氧; 大麦提取物; 星形胶质细胞; 细胞生长率

中图分类号: G804.7

文献标识码: A

Protective Effect of Barley Extracts on Oxidative Damage of Astrocytes

LIU Guo-an*, DONG Huan, ZHANG Jia-jia, HAN Xiao, DING Lan

College of Life Science, Northwest Normal University, Gansu Lanzhou 730070, China

Abstract: Reactive oxygen species (ROS) such as H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ and $OH\cdot$ are related to neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease, Epilepsy, Parkinson's disease, etc. In this study, the astrocytes of Wistar rat were separated and cultured. It was used as the raw material for detecting the protective effect of barley extracts on the cell growth inhibition induced by H_2O_2 . The cell morphology was then observed and the cell growth rate was determined by SRB method. The experimental results indicated that barley extracts had the protective effect on the decrease of the growth rate of astrocytes under the induction of H_2O_2 , in which there was a trait of concentration dependence, namely when concentration of barley extracts increased to $1600\ \mu\text{g}/\text{mL}$, the growth rate of cells was 100%.

Key words: reactive oxygen species; barley extracts; astrocyte; the growth rate of cells

大麦为禾本科大麦属植物, 一年生草本, 我国分布有 30 余种, 世界大麦年产量约 600 万吨, 仅次于小麦、稻谷、玉米, 其深度开发利用已引起国内外关注^[1]。大麦提取物有较强的还原力和金属离子螯合能力, 可清除 DPPH 自由基, 抑制亚油酸自氧化, 具有一定的抗氧化活性, 酚类化合物是大麦中主要的抗氧化物质之一^[2]。抗氧化剂对自由基和活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 引起的机体损伤有干扰作用, 其应用被公认为是一种可能的新的治疗途径^[3]。因此, 大麦有望成为开发天然植物酚类抗氧化剂的首选谷物。

星形胶质细胞 (Astrocyte, AS) 是脑中数量众多的一组神经胶质细胞, 充填在神经元及其突起间几乎全部的空隙, 研究显示, 由于星形胶质细胞以多种方式和神经元相互作用, 可以保护神经元免受 ROS 的损伤, 而当星形胶质细胞抗氧化功能受损, 并随之

出现凋亡或坏死, 也就失去了对神经元的保护及对神经元功能的维持作用^[4]。ROS 如 H_2O_2 、 $O_2^{\cdot-}$ 以及 $OH\cdot$ 与许多神经退行性疾病如阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD)、癫痫 (Epilepsy)、帕金森氏病 (Parkinson's disease, PD) 等的发病有关, 病因学和发病机制尚不十分明确, 其病理特点为: 具有特定功能的神经核团萎缩和神经元丢失, 并伴有星形胶质细胞增生以及特定的神经病理标记^[5]。目前国内外大麦提取物抗氧化活性在脑组织方面的相关研究, 尤其对星形胶质细胞的研究未见报道。因此, 检测大麦提取物对星形神经胶质细胞氧化损伤的保护作用有着十分重要的意义。

本实验以 Wistar 大鼠脑星形神经胶质细胞为材料, 用 H_2O_2 致损, 拟建立一种良好的模型用以筛选有效的抗氧化神经保护剂。以此为基础研究了大麦提取物对 H_2O_2 诱导的脑星形胶质细胞氧化损伤的保护作用, 以期为大麦产品的深度开发及发展神经退行性疾病防治相关产品提供一定的基础数据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料、试剂及仪器

大麦(*Hordeum vulgare* L.)由甘肃黄河啤酒股份有限公司提供;Wistar大鼠(合格证号:SYXK军2012-0029)购自兰州陆军总院动物实验中心;DMEM培养基购自Gibco公司;新生小牛血清购自杭州四季青生物技术有限公司;其他试剂为国产分析纯。

旋转蒸发仪(EYELAN-1000,日本);冷冻干燥器(LGJ-18S,北京松源华兴科技发展有限公司);低温冷冻离心机(TDL-5000,上海);脱色摇床(WELL Ts-A);酶标仪(Bio-Rad Model 550);微量振荡器(XK 96);倒置显微镜;细胞培养瓶;6孔、96孔细胞培养板;CO₂培养箱;恒温水浴锅;粉碎机;电子天平等。

1.2 大麦活性成分的提取

取200 g干燥大麦粉以石油醚脱脂两次后再用80%丙酮萃取3次,其间超声提取1 h,过滤后合并滤液并在低温减压条件下回收丙酮得浓缩液,40 ℃真空干燥后-70 ℃冷冻干燥,此法所得干燥物总酚含量为3.11 g/kg^[6]。

1.3 大鼠AS的纯培养

参照McCarthy等^[7]的报道并加以改进,采用限制性细胞培养方法。Wistar大鼠幼鼠于75%的酒精中浸泡,迅速取出大脑,稍做剪碎,胰蛋白酶消化,加完全培养基(10%的小牛血清、青霉素、链霉素各100 IU/L的DMEM培养液)终止消化后清洗,之后转移至完全培养基中并轻柔吹打组织团块后接种于培养瓶中。于37 ℃ 5% CO₂培养箱中培养24 h后换新鲜培养液,至第7~9 d细胞可铺满培养瓶,其间换液2~3次。置摇床37 ℃ 140 rpm摇22 h,舍去含脱落细胞的代谢液,以除去少突胶质细胞和小胶质细胞,更换新鲜培养液,得到纯化的AS。继续进行传代培养,实验所用为2~3代细胞。

1.4 SRB法检测H₂O₂处理AS的细胞生长率

磺基罗丹明B(Sulforhodamine B, SRB)法是继二苯基溴化四氮盐(MTT)比色法后新一代肿瘤药物敏感实验方法,SRB是一种蛋白质结合染料,可与生物大分子中的碱性氨基酸结合,其颜色的变化与活细胞中的蛋白质含量成正比,因此,可通过测定SRB的颜色变化间接测定培养液中活细胞数^[8]。

检测时将AS细胞以密度为 2×10^4 个/mL接种

于96孔细胞培养板,加入不同浓度的H₂O₂进行氧化损伤造模。置培养箱中继续孵育24 h后每孔加100 μL 10% TCA放入冰箱中固定1 h,用蒸馏水冲洗5遍并晾干后每孔加入100 μL SRB溶液染色20 min,用1%乙酸冲洗以去除非特异性结合的染料,最后每孔加入150 μL 10 mM Tris-碱溶液,酶标仪测定OD₄₉₀值并计算细胞生长率。除了测定对照组细胞(C)及加药细胞(T)的OD值外,用另外的对照平板测定加药时的细胞OD值(T₀)。生长率% = [(T - T₀) / (C - T₀)] × 100。

1.5 大麦提取物作用于H₂O₂损伤AS的形态学观察

细胞以大麦提取物保护,用H₂O₂处理后,于倒置显微镜下观察细胞形态并照相。

1.6 大麦提取物作用于H₂O₂损伤AS的细胞生长率

将密度为 2×10^4 个/mL的AS细胞接种于6孔细胞培养板,37 ℃ 5% CO₂培养箱中培养24 h,用完全培养基配制不同浓度的大麦提取物,与AS孵育30 min,再加入200 μM H₂O₂作用24 h,再固定染色细胞后,酶标仪测定490 nm处的OD值,并计算细胞生长率。

1.7 数据处理

以上所有实验,每组重复3次以上,结果以均值 ± 标准差表示,T-test检验,P < 0.05为差异显著。

2 结果与分析

2.1 不同浓度H₂O₂处理对AS细胞生长率的影响

SRB法检测不同浓度的H₂O₂对AS细胞生长率的影响如图1所示。

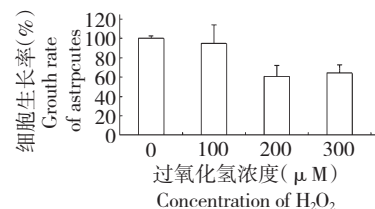


图1 不同浓度的H₂O₂对星形胶质细胞生长率的影响

Fig. 1 Effect of H₂O₂ on the growth rate of astrocytes

从图中可以看出,H₂O₂处理星形胶质细胞24 h后,细胞生长率随着H₂O₂浓度的升高而下降。当用200 μM H₂O₂处理时,细胞生长率明显降低,达到60.67%。因此,采用200 μM H₂O₂处理星形胶质细胞建立氧化损伤模型。

2.2 大麦提取物对 H_2O_2 损伤的 AS 细胞形态学变化的影响

显微镜下观察细胞,发现不同浓度大麦提取物

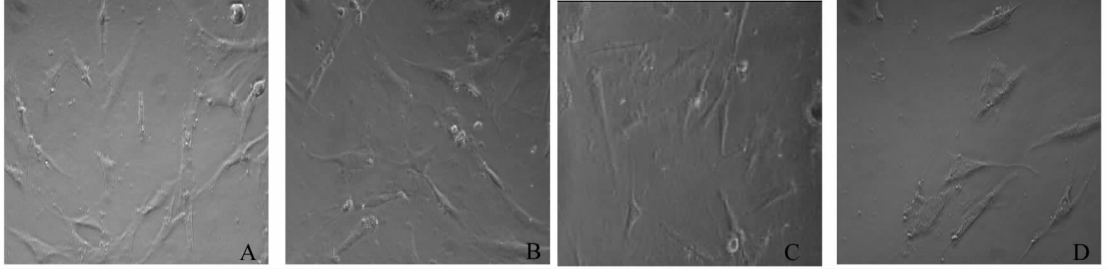


图2 不同浓度的大麦提取物对 H_2O_2 损伤的 AS 的保护作用(400 ×)

Fig. 2 Protective effect of different concentrations' barley extracts on oxidative damage of astrocytes induced by H_2O_2 (400 ×)

注:A:对照细胞;B:200 $\mu M H_2O_2$ 处理;C:200 $\mu g/mL$ 大麦提取物+200 $\mu M H_2O_2$ 处理;D:1600 $\mu g/mL$ 大麦提取物+200 $\mu M H_2O_2$ 处理。

Note: A: control cells; B: treated with 200 μM of H_2O_2 ; C: treated with 200 $\mu g/mL$ of barley extracts and 200 μM of H_2O_2 ; D: treated with 1600 $\mu g/mL$ of barley extracts and 200 μM of H_2O_2 .

从图中可看出,未经药物作用的细胞,全部贴壁生长,突起多而粗(A);而 H_2O_2 处理的细胞表现出聚集状态,细胞贴壁生长减少,突起减少,有些悬浮于培养液中(B);在 200 $\mu g/mL$ 大麦提取物保护下的细胞,聚集状态减弱,突起开始增多(C);当提取物浓度达到 1600 $\mu g/mL$ 时,细胞状态基本接近于对照组的细胞状态(D)。

2.3 大麦提取物对 H_2O_2 损伤 AS 细胞生长率的影响

当用 SRB 法检测不同浓度的大麦提取物对 H_2O_2 损伤的 AS 细胞生长率的影响时,提取物表现出良好的保护活性,并呈浓度依赖性。结果如图 3 所示。

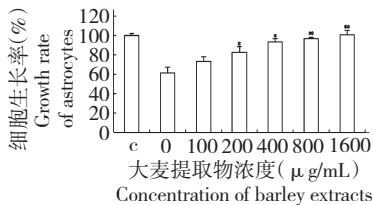


图3 不同浓度的大麦提取物对 H_2O_2 降低的 AS 细胞生长率的影响

Fig. 3 The protective effect of barley extracts on the growth rates of astrocytes reduced by H_2O_2 damage

注: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

Note: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

用 200 $\mu M H_2O_2$ 处理星型胶质细胞 24 h 后细胞的生长率降至 61.0%。用大麦提取物先保护 30

对 H_2O_2 处理的 AS 细胞损伤有明显的保护作用(图 2)。

min 再加入 H_2O_2 处理,浓度为 100 $\mu g/mL$ 时,生长率上升至 73.3%。增加提取物浓度后,与对照相比,细胞生长率逐渐升高。浓度为 800 $\mu g/mL$ 时生长率达 97.0%,保护作用非常明显。

3 讨论

大麦由于富含酚类化合物而具有较强清除自由基的能力,抗氧化活性是大麦生理功能的重要组成部分^[2]。酚类物质除了存在于天然化合物中外,还可通过化学合成法得到,如 BHT、BHA 和 TBHQ 等化学合成酚类抗氧化剂便有较强的活性,但近年来有实验表明,合成抗氧化剂在大剂量使用时具有一定毒性和致癌作用,因此寻找安全、健康的天然抗氧化剂成为近年来人们极为关注的课题^[9]。

神经退行性疾病 (Neurodegenerative disease, ND) 是一类以神经元退行性病变或凋亡,进而导致个体行为异常乃至死亡为主要特征的疾病,多数病例发病较晚,进展缓慢。星形胶质细胞是一类较易受损的敏感细胞,氧化损伤后将不能行使其保护中枢神经系统的功能,并触发一系列改变加重原始损伤,即其摄取谷氨酸、调节细胞外 K^+ 、清除自由基等作用将会减弱或发生逆转,从而成为神经损害发展过程中的促进因素。因此,可以通过保护星形胶质细胞,维持其正常的结构与功能,间接保护神经元从而延缓疾病的进展^[5]。

生物体内羟自由基 ($OH \cdot$) 是氧化能力极强的自由基,具有高毒性,可引发脂质过氧化。 H_2O_2 可

直接作用于膜结构上的不饱和脂肪酸,诱发脂质过氧化,从而导致细胞代谢紊乱。超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)产生的形式有非酶和酶促反应两种,在体内可直接导致DNA损伤并使过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶和肌酸激酶失活^[6]。因此,对活性氧清除作用的研究有重要意义。 H_2O_2 所致神经元的氧化损伤已成功建立了细胞氧化损伤模型^[10]。本实验中,采用浓度为200 μM H_2O_2 处理星形胶质细胞24 h,可引起细胞生长率显著下降,说明星形胶质细胞内抗氧化机制可能失衡,氧化胁迫对细胞的损伤增加。

本文结果表明, H_2O_2 处理星形胶质细胞,其细胞生长率明显下降,而预先加入大麦提取物保护后,观察细胞形态显示,随着提取物浓度的增加,细胞突起增多并逐渐接近对照细胞,说明提取物对细胞氧化损伤具有保护作用。SRB法检测细胞生长率的实验结果表明,大麦提取物从100到1600 $\mu g/mL$ 保护时,提高了 H_2O_2 处理后的AS细胞生长率,并呈现浓度依赖性。说明大麦提取物对由 H_2O_2 引起的星形胶质细胞因氧化损伤导致的生长率降低有一定的保护作用。其机制可能与大麦提取物清除超氧阴离子和羟自由基,并保护细胞膜的脂质过氧化有关^[6],其他机理有待进一步研究。

参考文献

- 1 Chen HH(陈海华), Dong HZ(董海洲). Development and utilization of barley in the food industry. *Cereals Oils*(粮食与油脂), 2002, 4(2): 30-31.
- 2 Liu Q(刘清), Li Y(李玉), Yao HY(姚惠源). Study on *in vitro* antioxidant activity of barley extracts. *Sci Technol Food Ind*(食品工业科技), 2007, 28: 131-133.
- 3 Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol Med*, 1996, 20: 933-956.
- 4 Hu HL(胡皓璐), Wang XP(王晓平), Zhao YL(赵艳玲). Oxidative damage in the mechanism of copper toxicity in cultured astrocytes. *Chin J Clinician, Electronic Ed*(中华临床医师杂志, 电子版), 2011, 5: 3193-3200.
- 5 De Felice FG, Ferreira ST. Beta-amyloid production, aggregation, and clearance as targets for therapy in Alzheimer's disease. *Cell Mole Neurobiol*, 2002, 5-6: 545-563.
- 6 Liu GA(刘国安), Zheng W(郑炜), Yang QM(杨庆明), et al. Evaluation of *in vitro* antioxidant activities of barley extracts. *J Huazhong Norm Univ, Nat Sci*(华中师范大学学报, 自科版), 2011, 45: 612-614.
- 7 McCarthy KD, Vellis JD. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol*, 1980, 85: 890-902.
- 8 Zhou SL(周思朗), Qu YN(屈艳妮), Zhang J(张健), et al. A new method of cell counting-sulfo rhodamine B staining method. *Chin J Cell Mole Immunol*(细胞与分子免疫学杂志), 2005, 21: 663-664.
- 9 Chen L(陈琳), Xiao ZY(肖宗源). A study of the antioxidative activity of natural composite antioxidants on docosahexenoic acid oil. *China Food Add*(中国食品添加剂), 2012, 3: 55-59.
- 10 Lee MK, Yeo H, Kim J, et al. Cynandione A from *Cynanchum wilfordii* protects cultured cortical neurons from toxicity induced by H_2O_2 , L-glutamate, and kainite. *J Neurosci Res*, 2000, 59: 259-264.
- 14 Dai Z(戴忠), Wang GL(王钢力), Wang F(王峰), et al. Chemical constituents of *Balanophora simaoensis* (I). *Chin Tradit Herb Drug*(中草药), 2005, 36: 830-831.
- 15 Nakane T, Madea Y, Ebihara H, et al. Fern constituents: triterpenoids from *Adiantum capillus-veneris*. *Chem Pharm Bull*, 2002, 50: 1273-1275.
- 16 Akihisa T, Yamamoto K, Tamura T, et al. Triterpenoid ketones from *Lingnania chungii* McClure: Arborinone, friedelin and glutione. *Chem Pharm Bull*, 1992, 40: 789-791.
- 17 Wang XH(王夕红), Han GQ(韩桂秋). The chemical constituents of *Aristolochia kunmingensis*. *Acta Bot Yunnanica*(云南植物研究), 1993, 15: 306-308.
- 18 Lam SH, Chen CK, Wang JS, et al. Investigation of flavonoid glycosides from *Neolitsea sericea* var. *aurata* via the general method and HPLC-SPE NMR. *J Chin Chem Soc*, 2008, 55: 449-455.
- 19 Prachayasittikul S, Suphapong S, Worachartcheewan A, et al. Bioactive metabolites from *Spilanthes acmella* Murr. *Molecules*, 2009, 14: 850-867.

(上接第1964页)