

# 查尔酮类衍生物 G01 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导小鼠皮层神经元氧化损伤保护作用研究

郭宏举, 梁海, 向卓, 张捷, 吴久鸿\*

解放军第 306 医院药学部, 北京 100101

**摘要:** 本研究查尔酮类衍生物 G01 (3'-甲酰基-4',6'-二羟基-2'-甲氧基-5'-甲基-3,4-二羟基查尔酮) 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导小鼠皮层神经元氧化损伤的保护作用, 并探讨其作用机制。Neurobasal (含有 B-27) 的培养基无血清体外原代培养新生小鼠大脑皮层神经元, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 μmol/L) 诱导氧化应激损伤模型, MTT 法检测不同浓度 (0.001、0.01、0.1 g/L) G01 对细胞存活的影响, 生化法测定乳酸脱氢酶 (LDH) 释放量和丙二醛 (MDA)、超氧歧化酶 (SOD) 的含量。与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组比较, 0.01、0.1 g/L G01 能显著提高 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导损伤皮层神经元的生存率 74.51%、81.31% ( $P < 0.05$ ), 并且降低了培养液中乳酸脱氢酶 (LDH) 的漏出量, 抑制细胞内丙二醛 (MDA) 的生成, 提高细胞内超氧歧化酶 (SOD) 的活性。研究结果表明 G01 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤皮层神经元具有显著的保护作用, 其机制与抗氧化作用有关。

**关键词:** 查尔酮衍生物; 小鼠神经元; 氧化损伤; 抗氧化; 神经保护作用

中图分类号: R963

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.12.026

## Protective Effects of a Chalcone Derivative G01 on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Oxidative Damage in Cortical Neurons of Mice

GUO Hong-ju, LIANG Hai, XIANG Zhuo, ZHANG Jie, WU Jiu-hong\*

Department of Pharmacy, The 306<sup>th</sup> Hospital of P. L. A, Beijing 100101, China

**Abstract:** This study was designed to investigate the protective effects of a new chalcone derivative G01, 3'-formyl-4',6'-dihydroxy-2'-methoxy-5'-methyl-3,4-dihydroxy chalcone, on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage in cortical neurons of mice, and the underlying mechanisms. Primary cortical neurons of newborn mice were cultured in Neurobasal containing B-27, free of serum, and the oxidative damage was induced by 50 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. After the damage, the effects of different concentrations of G01 (0.001, 0.01, 0.1 g/L) on cell survival was tested by MTT assay, and the levels of LDH, MDA and SOD were measured by biochemistry assay. Compared with the damage group, 0.01, 0.1 g/L G01 significantly improved the survival rate of neurons to 74.51% and 81.31%, respectively, reduced the release of LDH in the medium, inhibited MDA synthesis, and enhanced the activity of SOD. These results indicated G01 had significantly protective effects against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced damage in cortical neurons, and the mechanisms were related to its antioxidative effects.

**Key words:** chalcone analogues; neurons of mice; oxidative damage; antioxidation; neuroprotective effect

黄酮类化合物在生物合成过程中会产生一类非常重要的合成底物——查尔酮类化合物。天然药用植物中在查尔酮异构化酶的作用下查尔酮类化合物转化为黄酮类化合物, 天然查尔酮类化合物在南美、非洲、亚洲等地区的各种药用植物的花、叶、皮、根中广泛分布。其骨架结构柔性大, 能进行多种形式的结构修饰, 且能与多种受体结合, 具有广泛的药理活

性, 尤其在抗肿瘤<sup>[1]</sup>, 抗氧化<sup>[1,2]</sup>等方面广泛的生物学活性, 现已成为一类具有重要研究价值的天然药用产物。我课题组 2014 年首次利用化学全合成的方法得到查尔酮衍生物 G01 (3'-甲酰基-4',6'-二羟基-2'-甲氧基-5'-甲基-3,4-二羟基查尔酮), 结构见

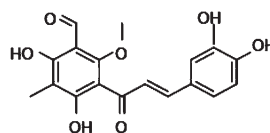


图 1 G01 化学结构式

Fig. 1 Chemical structure of G01

收稿日期: 2015-05-12 接受日期: 2015-07-27

基金项目: 国家自然科学基金 (81072546; 81470156)

\* 通讯作者 Tel: 86-10-64879825; E-mail: jiu hongwu@hotmail.com

图 1。

向卓<sup>[3]</sup>等实验研究表明,G01 体外对 DPPH 引起的自由基清除、NO 自由基的抑制、超氧阴离子清除、羟基自由基清除、总抗氧化活性等方面表现出良好的生物活性,特别是对  $O_2^{\cdot-}$  具有良好的清除作用。目前临床研究证实,由  $O_2^{\cdot-}$  累积引起的脑神经细胞氧化损伤,从而导致神经细胞凋亡产生的神经系统疾病主要有两大类,一类是因大剂量长时间的空间射线辐照所造成的严重的中枢神经系统损伤<sup>[4]</sup>;一类是以阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)为代表的神经退行性疾病<sup>[5]</sup>。虽然这两大类的疾病的病因复杂多样,但  $O_2^{\cdot-}$  的过多累积是其共同的发病原因之一。临床治疗上采用提高 AD 病的脑内抗氧化治疗,保护神经凋亡、提高神经细胞的活性是治疗 AD 重要方法之一。鉴于 G01 体外良好的抗氧化活性,特别是对  $O_2^{\cdot-}$  诱导的氧化具有良好的防护作用,由此提示 G01 可能具有神经系统氧化伤害的保护作用。由于目前关于 G01 对中枢系统皮层神经氧化损伤保护作用的研究未见报道。故本研究采用  $H_2O_2$  的氧化作用建立体外培养小鼠大脑皮层神经元氧化损伤模型,观察其对  $H_2O_2$  所致皮层神经损伤的保护作用,探讨其可能的作用机制。

## 1 材料与仪器

### 1.1 动物

昆明仔鼠(SPF 级)购于北京维通利华公司,动物合格证号:SCXK(京)2012-0001。

### 1.2 药品与试剂

查尔酮衍生物(3'-甲酰基-4',6'-二羟基-2'-甲氧基-5'-甲基-3,4-二羟基查尔酮)G01 由梁海硕士根据参考文献<sup>[2]</sup>的合成方法合成并提供。Neurobasal TM Medium 购于 Gibco(批号 814344)、DMEM 均购于 Gibco(批号 923638)、B-27 supplement 购于 Gibco(批号 846984)。新生牛血清(杭州四季青公司,批号:131018)。L-多聚赖氨酸(分子量为 15 万~30 万)Gibco 公司(批号:1000719679)、四甲基偶氮噻唑蓝(MTT) Amresco 分装(批号 T0973-1G)、二甲基亚砷(DMSO) Amresco 分装(批号 D0231-100ML)。乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase, LDH)南京建成生物工程研究所(批号 20131224)、超氧歧化酶(superoxidedismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒,均为南京建成生物工程研究所(批号 20130221)。

### 1.3 仪器

BIO-RAD(Model 680)型酶标仪,SW-CJ-IF 型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司),倒置相差显微镜(OLYMPUS CKX41), $CO_2$  培养箱(Hera Cell),PHS-3C 精密 pH 计(上海精密科学仪器有限公司),96 孔培养板(Costar),弯头和直头眼科无齿镊,直头和弯头眼科剪等器械。

## 2 实验与方法

### 2.1 大脑皮层神经元培养

出生 14~16 d 的昆明仔鼠,无菌条件下分离双侧大脑,迅速置于预冷的 CMF-HBSS 液中除去大脑髓质、脑膜和血管,将皮层部分剪碎为 1~2 mm<sup>3</sup> 的小组织块。转入含 5 mL 0.125% 胰蛋白酶的离心管中,细口玻璃管轻轻吹打后置 37 °C 消化 15 min(每 5 min 振荡 1 次)。将组织块转入等体积含 10% 新生牛血清的 DMEM 培养基中,终止消化 5 min。再吸出组织块置于离心管中,用 3 mL DMEM 的培养液轻轻吹打 15 次左右,静置 3 min 后取上清。重复上步两次,集约上清液,500 rpm 离心 5 min。弃离上清液,200 目金属网过滤,调整细胞数至  $0.8 \times 10^6$  / mL,接种于 0.01% L-多聚赖氨酸包被过的培养板中,置 37 °C、5%  $CO_2$  孵箱中培养,每 3 d 进行一次半量换液。每天观察细胞生长情况。

### 2.2 $H_2O_2$ 诱导神经元损伤模型

取培养 7 d 的皮层神经元,分为对照组、 $H_2O_2$  处理组(0、10、25、50、100、200  $\mu$ mol/L)、G01 +  $H_2O_2$  处理组进行实验。 $H_2O_2$  处理组吸去原培养液,PBS 洗 2 遍,加入含各种浓度  $H_2O_2$  的 Neurobasal 培养基,继续培养 6 h 进行实验。对照组不加  $H_2O_2$ ,其余同  $H_2O_2$  处理组。给药组在  $H_2O_2$  处理前 24 h 加入不同浓度的 G01,终浓度为 0.001、0.01、0.1 g/L。

### 2.3 MTT 比色法测定细胞存活率

$H_2O_2$  作用 6 h 后,每孔内加入 20  $\mu$ L MTT 液(终浓度为 0.5 mg/mL),37 °C 继续培养 4 h,吸弃上清液,加入 DMSO 150  $\mu$ L,室温振荡 10 min。待孔内颗粒完全溶解后,酶标仪上测定 570 nm 处的吸光度(A570),由公式计算存活率。细胞存活率(100%) = (用药组或模型组 A570/对照组 A570) × 100%。

### 2.4 培养液中 LDH 测定

细胞处理后,收集细胞培养上清液,按文献报道的方法,参照试剂盒说明书测定培养液中 LDH 漏出量。

## 2.5 细胞内 SOD 活性和 MDA 测定

细胞经损伤处理后去除原培养液,细胞用 PBS 洗 2 遍,每孔加入 0.1 mol/L PBS 和 0.05 mmol/L EDTA(pH8.0)1 mL,再加入 1% Triton-X100 50  $\mu$ L,将培养板置振荡器振荡 1 min 使之溶解,加入 25%  $H_3PO_4$ 100  $\mu$ L 以沉淀蛋白,10000 rpm 于 4  $^{\circ}C$  离心 1 h,取上清液按说明书测定 SOD 活性和 MDA 含量。

## 2.6 统计学处理

所有数据均采用  $\bar{x} \pm s$  表示,应用 SPSS13.0 软件进行统计学处理分析,对所测定结果进行方差齐性检验,各组间比较使用单因素方差分析检验,以  $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 3 实验结果

### 3.1 G01 对 $H_2O_2$ 损伤皮层神经元存活率的影响

25  $\mu$ mol/L 以下浓度  $H_2O_2$  对神经元生存率无影响,从 50  $\mu$ mol/L 开始细胞存活率明显下降。与正常组相比 50、100、200  $\mu$ mol/L  $H_2O_2$  诱导神经元

不同程度的损伤( $P < 0.01$ ),细胞生存率呈浓度依赖性的降低。其细胞存活率分别降至 70.32%、36.45%、10.18%。

为进一步明确 G01 对  $H_2O_2$  损伤皮层神经元的保护作用,又选用培养液中 LDH 漏出量作为观察指标进行实验,神经元经 50  $\mu$ mol/L  $H_2O_2$  损伤后,细胞膜通透性增大,LDH 大量漏出。致使培养液中 LDH 的量显著增加。预先 24 h 给予 G01(0.001、0.01、0.1 g/L)与  $H_2O_2$  处理组相比,其中 0.01、0.1 g/L G01 可明显降低细胞培养液中 LDH 的漏出量。结果见表 1。

### 3.2 G01 对细胞内 MDA 含量和 SOD 活性的影响

与对照组相比,皮层神经元经 50  $\mu$ mol/L  $H_2O_2$  损伤后培养液中 MDA 含量显著增加,SOD 活性显著降低;预先 24 h 给予 G01(0.001、0.01、0.1 g/L)与  $H_2O_2$  处理组相比,其中 0.01、0.1 g/L 的 G01 可明显降低培养 MDA 含量、并且提高 SOD 活性,结果见表 2。

表 1 G01 对 50  $\mu$ mol/L  $H_2O_2$  损伤原代培养皮层神经元的保护作用( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

Table 1 The protective effect of G01 on primary cortical neurons injured by 50  $\mu$ mol/L  $H_2O_2$ ( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	<i>n</i>	存活率 Survival rate (%)	LDH 释放量 LDH release rate (kU/L)
对照组 Control group	6	95.13 $\pm$ 1.43	24.31 $\pm$ 1.23
模型组 Model group	6	60.25 $\pm$ 3.58 *	61.86 $\pm$ 2.42 *
0.001 g/L G01 组 0.001 g/L G01 group	6	62.18 $\pm$ 2.97	69.43 $\pm$ 4.34
0.01 g/L G01 组 0.001 g/L G01 group	6	74.51 $\pm$ 3.65 $\Delta$	57.23 $\pm$ 3.21
0.1 g/L G01 组 0.001 g/L G01 group	6	81.31 $\pm$ 4.72 #	46.31 $\pm$ 4.12 $\Delta$

注:与对照组比较 \*  $P < 0.01$ ;与模型组比较  $\Delta P < 0.05$ , #  $P < 0.01$ 。

Note: \*  $P < 0.01$  vs control group,  $\Delta P < 0.05$ ; #  $P < 0.01$  vs model group.

表 2 G01 对  $H_2O_2$  损伤皮层神经元培养液内 MDA 含量和 SOD 活性的影响( $n=5, \bar{x} \pm s$ )

Table 2 Effect of G01 on MDA concentration and SOD activity in the medium of neurons injured by  $H_2O_2$ ( $n=5, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	<i>n</i>	MDA concentration ( $\mu$ mol/L)	SOD Activity rate (U/mL)
对照组 Control group	5	0.40 $\pm$ 0.03	15.38 $\pm$ 1.12
模型组 Model group	5	1.21 $\pm$ 0.10 *	7.87 $\pm$ 1.23 *
0.001 g/L G01 组 0.001 g/L G01 group	5	1.08 $\pm$ 0.09	8.12 $\pm$ 1.44
0.01 g/L G01 组 0.001 g/L G01 group	5	0.71 $\pm$ 0.08 $\Delta$	10.20 $\pm$ 2.31 $\Delta$
0.1 g/L G01 组 0.001 g/L G01 group	5	0.59 $\pm$ 0.11 #	13.87 $\pm$ 1.86 #

注:与对照组比较 \*  $P < 0.01$ ;与模型组比较  $\Delta P < 0.05$ ; #  $P < 0.01$ 。

Note: \*  $P < 0.01$  vs control group,  $\Delta P < 0.05$ ; #  $P < 0.01$  vs model group.

## 4 讨论

经典的细胞培养是以各种血清提供神经营养因

子,虽然神经元生长良好,但由于血清中所富含的丰富营养成分也同时促进了神经胶质细胞生长。神经胶质细胞不仅增殖能力强,且占神经元的比例大,往

往往对实验的针对性造成影响。往往需要加入阿糖胞苷等有丝分裂抑制剂抑制此类细胞的生长<sup>[6]</sup>。另外,带血清培养的神经元细胞不宜做长时间的实验研究,血清的成分相对比较复杂,含有一些可能影响实验结果的未知因素。采用无血清培养则可以去除血清带来的各种弊端,同时能明显改善神经元的生长状态和存活时间<sup>[7]</sup>。本实验则以无血清培养基培养新生小鼠的大脑皮层神经元,细胞生长良好皮层神经元典型清楚,且神经胶质细胞的干扰很少。

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 是一种较强的氧化剂,极易进入细胞内,通过 Haber-Weiss 或 Fenton 反应,形成高活性的氧自由基(O<sub>2</sub><sup>·</sup>)和羟基自由基(·OH)。这些自由基几乎可与细胞内的任何成分发生反应造成细胞损伤<sup>[6]</sup>。使神经元发生脂质过氧化反应生成 MDA,MDA 的含量间接的反映了机体氧化损伤的程度。SOD 主要是存在于细胞浆和线粒体里德一种金属蛋白酶,能够清除超氧阴离子,催化歧化反应。是体内抗氧化系统的艰要组成部分。因此测定 MDA、SOD 活性既可以反应细胞损伤程度又可以判断细胞损伤原因<sup>[9,10]</sup>。大脑皮层是中枢神经系统的重要组成部分,参与多种功能作用。

目前研究表明大剂量空间辐射、质子等重离子辐射所造成的严重的中枢神经系统损伤以及帕金森病(Parkinson's disease, PD)、阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)等神经性退行疾病都与机体氧自由基增多有关,体外 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型可以部分模拟此类疾病的中枢皮质神经元的氧化损伤作用,为体外评价针对此类疾病的药物提供了针对性的模型。本实验显示 G01 可明显的减弱 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所造成的皮质神经元氧化应激损伤。因此推测 G01 可能对因空间辐射造成的氧化应激损伤以及其它的神神经性疾病具有保护作用。

本实验研究结果显示 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 μmol/L) 诱导皮层神经元 6 h,与对照组相比胞内 MDA 含量明显升高而胞内 SOD 活性显著降低胞,提示 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 μmol/L) 所致皮层神经元损伤与脂质过氧化损伤有关,G01 可提高皮层神经元内 SOD 活性并著降低胞内 MDA 含量,提高皮层神经元生存率。具有中枢

皮质神经元氧化应激损伤的保护作用。提示天然查尔酮衍生物 G01 (3'-甲酰基-4',6'-二羟基-2'-甲氧基-5'-甲基-3,4-二羟基查尔酮)具有因氧化损伤引起的相关疾病的保护方面具有开发的潜力和研究价值。

#### 参考文献

- 1 Ye CL, Liu Y, Wei DZ, *et al.* Antioxidant and anticancer activity of 3'-formyl-4,6-dihydroxy-2'-methoxy-5-methylchalcone and (2S)-8-formyl-5-hydroxyl-7-methoxy-6-methyl-flavanone. *J Pharm Pharmacol*, 2007, 59:553-559.
- 2 Liang H (梁海), Xiang Z (向卓), Ma TX (马天翔), *et al.* Synthesis and antioxidant activities of novel chalcone FMC and its analogues. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2014, 21:1939-1944.
- 3 Xiang Z (向卓). Study on design and synthesis of novel chalcone Des-C, FMC analogous and their in vitro anti-tumor, anti-oxidation study. Xi'an: The Fourth Military Medical University (解放军第四军医大学), PhD. 2014.
- 4 Cucinotta FA, Wilson JW, Shinn JL, *et al.* Effects of target fragmentation on evaluation of LET spectra from space radiations; implications for space radiation protection studies. *Radiat Meas*, 1996; 26:923-934.
- 5 Xie RY (谢荣源). Recent research progress on medical treatment for Alzheimer's disease. *J Changzhou Univ, Nat Sci Ed* (常州大学学报, 自科版), 2014, 26(3):56-63.
- 6 Brewer GJ. Isolation and culture of adult rat hippocampal neurons. *Neurosci Methods*, 1997, 71:143-155.
- 7 Gu Y, Jing Y, Kumar A, *et al.* Isolation of human neuronal cells resistant to toxicity by the prion protein peptide 106-126. *Alzheimers Dis*, 2001, 3:169-180.
- 8 Li WG, Miller FJ Jr, Zhang HJ, *et al.* H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced O<sub>2</sub><sup>·</sup> production by a non-phagocytic NAD(P)H oxidase causes oxidant injury. *Biol Chem*, 2001, 3276:251-256.
- 9 Kinnula VL, Everitt JI, Whorton AR, *et al.* Hydrogen peroxide production by alveolar type II cells, alveolar macrophages, and endothelial cells. *Am J Physiol*, 1991, 261:L84-91.
- 10 Mügge A, Elwell JH, Peterson TE, *et al.* Release of intact endothelium-derived relaxing factor depends on endothelial superoxide dismutase activity. *Am J Physiol*, 1991, 260:219-225.