

淫羊藿苷对氧自由基所致大鼠脑线粒体损伤的保护作用

李 梨^{1,2}, 吴 芹², 周岐新¹, 石京山^{2*}

(1. 重庆医科大学生化与分子药理学重点实验室, 重庆 400016; 2. 遵义医学院
药理学教研室, 贵州 遵义 563003)

摘要:目的 设想神经元缺氧损伤与自由基损伤线粒体有关, 由此探讨淫羊藿苷的保护作用机制。方法 采用 Fe^{2+} /维生素 C (VitC) 为氧自由基生成系统建立氧自由基损伤线粒体的体外模型。观察淫羊藿苷对线粒体肿胀度、呼吸链复合体酶 I ~ IV 活性、丙二醛 (MDA) 含量的影响。结果 Fe^{2+} /VitC ($1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}/1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}/10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 可使线粒体的肿胀度和 MDA 含量显著增加, 呼吸链复合体酶 II ~ IV 活性不同程度下降。预先加入淫羊藿苷 (0.03 和 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 能显著抑制线粒体肿胀, 减少 MDA 含量, 提高呼吸链复合体酶 II ~ IV 的活性。结论 淫羊藿苷对氧自由基损伤的大鼠脑线粒体呼吸链具有保护作用。

关键词: 淫羊藿苷; 活性氧; 线粒体

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2005)05-0333-05

线粒体是重要的细胞器, 不仅参与细胞的能量代谢, 也是自由基产生的主要场所。近年来对线粒体的研究日益受到重视。越来越多的证据表明, 许多疾病如缺血缺氧损伤、老年性痴呆、衰老、帕金森病等发生、发展均与线粒体损伤密切相关。寻找有效的抗氧化损伤的线粒体保护剂对于防治这些疾病具有重要意义。淫羊藿苷 (icariin) 是从小檗科淫羊藿属植物中提取的黄酮醇苷类化合物, 文献报道淫羊藿苷具有免疫调节、影响内分泌、抗氧化、改善冠

脉循环、增加脑血流量等作用^[1,2]。作者以前的实验证明淫羊藿苷对原代培养皮质神经元缺氧缺糖损伤具有保护作用^[1], 但对其细胞保护作用的确切机制还不完全清楚。本研究在此基础上以 Fe^{2+} /维生素 C (vitamin C, VitC) 为氧自由基生成系统建立体外模拟氧自由基损伤的线粒体模型, 观察了淫羊藿苷是否对 Fe^{2+} /VitC 引起的脑线粒体损伤具有保护作用, 以期为其用于延缓衰老和防治某些神经系统疾病的可能性提供实验资料。

1 材料和方法

1.1 实验动物、试剂和仪器

Wistar 大鼠, 雄性, 体重 250 ~ 280 g, 2 ~ 3 月龄, 由重庆医科大学实验动物中心提供。

淫羊藿苷单体, 高效液相色谱检测纯度大于 98%, 由贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室杨小生研究员提供。鱼藤酮 (rotenone)、叠氮钠 (sodium azide)、抗霉素 A (antimycin A)、辅酶 Q₁₀ (CoQ₁₀)、还原型辅酶 I (NADH)、Ficoll 400、Tris 碱、细胞色素 C、2,6-二氯酚吡啶酚 (2, 6-dichlorophenolindophenol, DCPIP) 均购自 Sigma。蛋白含量和丙二醛 (MDA) 含量测试盒购自南京建成生物工程公司。

主要仪器有 UV-265 可见-紫外分光光度计 (日本岛津公司); 3k30 低温高速离心机 (Sigma); KR-20000T 型低温超速离心机 (美国 Kubota); XW-80A 型旋涡混合器 (江苏海门麒麟医用仪器厂)。

1.2 大鼠脑线粒体的提取^[3,4]

大鼠断头迅速取全脑, 去小脑, 称重后按 1:9 (W/V) 比例加入预冷的匀浆液 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$: 蔗糖 250, EDTA 0.5, Tris-HCl 10, pH 7.40) 置于玻璃匀浆器中冰浴手动匀浆。2000 × g 离心 3 min。取上清液, 12 000 × g 离心 8 min。将沉淀仔细悬于 Ficoll 梯度中, 11 500 × g 离心 30 min。弃上清液, 沉淀用匀浆液洗 1 次, 12 000 × g 离心 8 min, 所得沉淀即为线

收稿日期: 2005-01-10 接受日期: 2005-04-11

基金项目: 贵州省高校发展专项基金项目 (黔科教 2003112)

作者简介: 李 梨 (1975 -), 女, 河南省开封人, 药理学博士生, 讲师, 主要从事神经药理与生化药理研究。

* 联系作者 E-mail: shijs@zmc.edu.cn Tel: (0852) 8205416 Fax: (0852) 8204729

粒体。以上所有操作均在 4℃ 进行。Follin 酚法测定线粒体悬液的蛋白含量,调整浓度为线粒体蛋白 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。用于测定呼吸链复合体酶的线粒体蛋白悬液分装后 -70℃ 保存,保存时间不超过 2 周。测定前将线粒体蛋白置于 20℃ / -20℃ 反复冻融 3 次,使之成为线粒体膜片段以达到最大酶活性。用于测定线粒体肿胀度的线粒体蛋白置于冰浴,放置加测定的时间不超过 72 h,以保持线粒体膜的完整性。其余实验所用线粒体均于 -20℃ 保存。

1.3 Fe^{2+} / VitC 自由基产生体系损伤线粒体模型的建立和分组^[5,6]

实验分为正常对照组、 Fe^{2+} / VitC 损伤组和 Fe^{2+} / VitC + 淫羊藿苷处理组。用 Tris-HCl 缓冲液配制不同浓度的 FeSO_4 和 VitC。实验时分别加入新鲜分离的线粒体 0.2 mL (含线粒体蛋白 1 mg) 和淫羊藿苷 (终浓度为 0.01, 0.03 和 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 5 min 后再加入不同浓度的 Fe^{2+} / VitC, 37℃ 反应 30 min。20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA 终止反应。10 000 × *g* 离心 10 min, 用悬浮介质洗 1 次。

1.4 线粒体肿胀程度测定^[7,8]

所用线粒体为新鲜制备,未经冻融,测定前放置于 4℃。以 Tris-HCl 为缓冲体系,含线粒体蛋白 0.5 mg,加入不同浓度的淫羊藿苷,温孵 5 min 后加入 Fe^{2+} / VitC, 反应终体积 1 mL。分别于加入 Fe^{2+} / VitC 前及加入后 2, 4, 6, 8, 10, 20 min 用分光光度计测定 520 nm 处的吸光度 ($A_{520 \text{ nm}}$) 值。以不同时间点 $A_{520 \text{ nm}}$ 与加入 Fe^{2+} / VitC 前 $A_{520 \text{ nm}}$ 的差值表示结果。 $A_{520 \text{ nm}}$ 值的降低与线粒体肿胀度呈正比。

1.5 线粒体呼吸链复合体酶活性测定^[9,10]

按方法 1.3 处理后离心收集的线粒体蛋白,测定前置于 20℃ / -20℃ 反复冻融 3 次,使之成为线粒体膜片段以进行线粒体呼吸链复合体酶活性测定。

呼吸链复合体酶 I 活性测定: 5 ~ 10 μg 线粒体蛋白加入反应缓冲体系 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$: MgCl_2 5, 叠氮钠 2, pH 7.2 磷酸盐缓冲液 35) 中,加入抗霉素 A ($2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、 CoQ_{10} ($65 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 混匀后, 30℃ 温孵 5 min。加入 NADH ($0.13 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 启动反应, 1 min 内连续测定 $A_{340 \text{ nm}}$ 值的变化, 根据 1 min $A_{340 \text{ nm}}$ 值的变化反映呼吸链复合体酶 I 的活性, 单位 $\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

呼吸链复合体酶 II 活性测定: 5 ~ 10 μg 线粒体蛋白加入反应缓冲体系 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$: pH 7.2 磷酸盐缓冲液 35, MgCl_2 5, 叠氮钠 2) 中, 加入抗霉素 A (2

$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、 CoQ_{10} ($65 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、鱼藤酮 ($2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、DCPIP ($88 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 混匀后, 30℃ 温孵 5 min。加入新配的琥珀酸钠 ($25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 启动反应, 1 min 内连续测定 $A_{600 \text{ nm}}$ 值的变化。以 1 min $A_{600 \text{ nm}}$ 值的变化反映呼吸链复合体酶 II 的活性, 单位 $\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

呼吸链复合体酶 III 活性测定: 5 ~ 10 μg 线粒体蛋白加入反应缓冲体系 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$: MgCl_2 5, 叠氮钠 2, EDTA 0.5, 氧化型细胞色素 C 0.035, pH 7.2 磷酸盐缓冲液 35) 中, 混匀后, 加入新还原的 CoQ_{10} ($0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 启动反应, 1 min 内连续测定细胞色素 C $A_{550 \text{ nm}}$ 值的变化, 反映呼吸链复合体酶 III 的活性, 单位 $\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

呼吸链复合体酶 IV 活性测定: 40 ~ 60 μg 线粒体蛋白加入反应缓冲体系 ($8.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液, pH 7.0) 加入 0.1% 还原型细胞色素 C (以过量 VitC 还原至 $A_{550 \text{ nm}} / A_{565 \text{ nm}} > 12$) 启动反应, 1 min 内连续测定细胞色素 C $A_{550 \text{ nm}}$ 值的变化, 反映呼吸链复合体酶 IV 的活性, 单位 $\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

1.6 丙二醛含量测定

按试剂测试盒说明书进行操作, 测定线粒体 MDA 含量。

1.7 统计学分析

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用方差分析和 *t* 检验。

2 结果

2.1 淫羊藿苷对自由基损伤线粒体肿胀度的影响

线粒体膜受损伤后其形态发生变化, 线粒体肿胀, 表现为 $A_{520 \text{ nm}}$ 值的下降。表 1 结果显示, 正常对照组线粒体的 $A_{520 \text{ nm}}$ 值比较稳定。而 2 个浓度的 Fe^{2+} / VitC 均能造成线粒体明显肿胀, 高浓度时 $A_{520 \text{ nm}}$ 值的下降更为明显。预先加入淫羊藿苷 0.01 ~ 0.1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 能不同程度地抑制 Fe^{2+} / VitC 引起的线粒体肿胀, 尤其 0.1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 淫羊藿苷可使 Fe^{2+} / VitC ($1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} / 1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 引起的线粒体肿胀基本恢复至正常组水平 ($P > 0.05$)。

2.2 淫羊藿苷对自由基损伤线粒体呼吸链复合体酶活性的影响

表 2 结果显示, Fe^{2+} / VitC ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} / 10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 使线粒体呼吸链复合体酶 I 的活性有升高趋势, 但无明显统计学差异 ($P > 0.05$)。而预先加入淫羊藿苷 0.01 ~ 0.1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 可明显降低这种趋

Tab 1. Effect of icariin on mitochondrial swelling induced by Fe²⁺/VitC in rat brain cells

Group	Mitochondrial swelling($\Delta A_{520\text{nm}}$)					
	2	4	6	8	10	20 (min)
Control	-0.001 ± 0.001	-0.003 ± 0.002	-0.003 ± 0.003	-0.004 ± 0.004	-0.005 ± 0.004	-0.013 ± 0.002
Fe ²⁺ 1/VitC 1	-0.019 ± 0.006**	-0.027 ± 0.009**	-0.033 ± 0.012**	-0.034 ± 0.013**	-0.036 ± 0.012**	-0.044 ± 0.014**
Fe ²⁺ 1/VitC 1 + Ica 0.01	-0.021 ± 0.005**	-0.025 ± 0.007**	-0.028 ± 0.010**	-0.027 ± 0.011**	-0.029 ± 0.010**	-0.036 ± 0.012**
Fe ²⁺ 1/VitC 1 + Ica 0.03	-0.013 ± 0.006**	-0.015 ± 0.004**#	-0.016 ± 0.001**#	-0.017 ± 0.001**#	-0.019 ± 0.003**#	-0.026 ± 0.008**#
Fe ²⁺ 1/VitC 1 + Ica 0.1	-0.007 ± 0.008#	-0.008 ± 0.010#	-0.009 ± 0.010#	-0.011 ± 0.009#	-0.012 ± 0.009##	-0.015 ± 0.010##
Fe ²⁺ 10/VitC 10	-0.066 ± 0.031**	-0.097 ± 0.027**	-0.127 ± 0.024**	-0.145 ± 0.033**	-0.160 ± 0.044**	-0.218 ± 0.049**
Fe ²⁺ 10/VitC 10 + Ica 0.01	-0.048 ± 0.011**	-0.070 ± 0.024**	-0.088 ± 0.022**#	-0.102 ± 0.016**#	-0.116 ± 0.019**	-0.164 ± 0.033**
Fe ²⁺ 10/VitC 10 + Ica 0.03	-0.039 ± 0.010**	-0.052 ± 0.009**#	-0.072 ± 0.013**#	-0.084 ± 0.013**#	-0.097 ± 0.018**#	-0.139 ± 0.030**#
Fe ²⁺ 10/VitC 10 + Ica 0.1	-0.030 ± 0.013**#	-0.043 ± 0.021**#	-0.056 ± 0.024**#	-0.064 ± 0.021**#	-0.073 ± 0.017**#	-0.109 ± 0.018**#

Mitochondria were incubated with icariin 0.01, 0.03 and 0.1 mg·L⁻¹ for 5 min, then Fe²⁺/VitC were added to start reaction. The mitochondrial swelling was reflected by the decrease between A_{520nm} before and after Fe²⁺/VitC. Fe²⁺ 1/VitC 1; Fe²⁺ 1 mmol·L⁻¹/VitC 1 mmol·L⁻¹; Fe²⁺ 10/VitC 10; Fe²⁺ 10 mmol·L⁻¹/VitC 10 mmol·L⁻¹, respectively. $\bar{x} \pm s$, n = 5. * P < 0.05, ** P < 0.01, compared with control; # P < 0.05, ## P < 0.01, compared with corresponding Fe²⁺/VitC group.

Tab 2. Effects of icariin on complexes I – IV activities in mitochondria of rat brain cells injured by Fe²⁺/VitC

Group	Complex I	Complex II	Complex III	Complex IV
	/mmol·min ⁻¹ ·g ⁻¹			
Control	1.50 ± 0.32	1.50 ± 0.20	1.88 ± 0.42	0.27 ± 0.08
Fe ²⁺ 1/VitC 1	1.62 ± 0.21	1.57 ± 0.59	1.27 ± 0.27*	0.18 ± 0.05**
Fe ²⁺ 1/VitC 1 + Ica 0.01	1.57 ± 0.35	1.77 ± 0.57	1.19 ± 0.23**	0.17 ± 0.06**
Fe ²⁺ 1/VitC 1 + Ica 0.03	1.50 ± 0.35	1.36 ± 0.40	1.31 ± 0.28*	0.22 ± 0.05
Fe ²⁺ 1/VitC 1 + Ica 0.1	1.48 ± 0.21	1.34 ± 0.21	1.54 ± 0.34	0.26 ± 0.05#
Fe ²⁺ 10/VitC 10	1.76 ± 0.19	0.99 ± 0.28**	0.94 ± 0.15**	0.13 ± 0.06**
Fe ²⁺ 10/VitC 10 + Ica 0.01	1.38 ± 0.23#	1.10 ± 0.26*	1.17 ± 0.22**	0.15 ± 0.06**
Fe ²⁺ 10/VitC 10 + Ica 0.03	1.36 ± 0.26#	1.41 ± 0.37#	1.31 ± 0.20**#	0.21 ± 0.04#
Fe ²⁺ 10/VitC 10 + Ica 0.1	1.40 ± 0.20#	1.63 ± 0.37##	1.64 ± 0.27##	0.25 ± 0.04##

Mitochondria were incubated with icariin 0.01, 0.03 and 0.1 mg·L⁻¹ for 5 min, then Fe²⁺/VitC were added and incubated at 37°C for another 30 min. Mitochondria were centrifuged at 10 000 × g for 10 min and resuspended for complexes I – IV activity tests. Adding NADH(0.13 mmol·L⁻¹), succinate sodium(25 mmol·L⁻¹), reduced CoQ₁₀(0.1 mmol·L⁻¹) or 0.1 % reduced cytochrome C to start reaction. The changes in corresponding absorbance within 1 min reflect the activity of corresponding complex I, complex II, complex III or complex IV, respectively. $\bar{x} \pm s$, n = 6. * P < 0.05, ** P < 0.01, compared with control; # P < 0.05, ## P < 0.01, compared with corresponding Fe²⁺/VitC group.

势。Fe²⁺/VitC 可使线粒体呼吸链复合体酶 II、III、IV 活性显著降低。预先加入淫羊藿苷 0.01 ~ 0.1 mg·L⁻¹ 能浓度依赖性地阻止 Fe²⁺/VitC 所致的呼吸链复合体酶 II、III、IV 活性的降低, 0.1 mg·L⁻¹ 淫羊藿苷可使呼吸链复合体酶活性基本恢复至正常组水平 (P > 0.05)。

2.3 淫羊藿苷对自由基损伤线粒体丙二醛含量的影响

线粒体被 Fe²⁺/VitC 损伤后, 其 MDA 含量显著增加(表 3)。预先加入淫羊藿苷(0.03 和 0.1 mg·

L⁻¹) 能明显抑制 Fe²⁺/VitC 引起的线粒体 MDA 生成, 与模型组比较有统计学显著性意义, 但尚不能降低至正常对照组水平。

3 讨论

自由基是在机体代谢过程中产生的一类内源性分子, 是引起许多疾病及衰老过程的重要原因。与其他组织相比, 脑组织由于含有高浓度的不饱和脂肪酸、需要相对较多的氧供应等自身的特点, 使得脑

Tab 3. Effect of icariin on malondialdehyde (MDA) content in mitochondria of rat brain cells injured by Fe²⁺/VitC

Group	MDA/ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{ protein}$
Control	14.9 ± 0.5
Fe ²⁺ 1/VitC 1	17.0 ± 0.3 ^{**}
Fe ²⁺ 1/VitC 1 + Ica 0.01	16.1 ± 0.8 [*]
Fe ²⁺ 1/VitC 1 + Ica 0.03	15.9 ± 0.3 ^{**#}
Fe ²⁺ 1/VitC 1 + Ica 0.1	15.9 ± 0.4 ^{**##}
Fe ²⁺ 10/VitC 10	34.4 ± 1.7 ^{**}
Fe ²⁺ 10/VitC 10 + Ica 0.01	32.4 ± 2.1 ^{**}
Fe ²⁺ 10/VitC 10 + Ica 0.03	29.3 ± 1.7 ^{**#}
Fe ²⁺ 10/VitC 10 + Ica 0.1	28.6 ± 0.8 ^{**##}

Mitochondria were incubated with icariin 0.01, 0.03 and 0.1 mg·L⁻¹ for 5 min, then Fe²⁺/VitC were added and incubated at 37°C for another 30 min. Mitochondria were centrifuged at 10 000 × g for 10 min and resuspended for detecting MDA content. $\bar{x} \pm s$, $n = 6$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with control; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, compared with corresponding Fe²⁺/VitC group.

组织产生氧自由基的机会较多。而且脑内相对缺乏抗氧化防御系统,脑细胞清除自由基和修复损伤的能力较弱,对各种不良因素十分敏感,使得自由基的损伤愈显严重。线粒体是细胞重要的能量转换器,也是自由基产生的主要场所。线粒体受到自由基攻击后其形态、结构和功能均可能发生病理改变,因而寻找有效的脑线粒体保护剂对于防治衰老和神经系统疾病等具有重要意义。

目前研究发现中药单体淫羊藿苷具有扩张血管、改善微循环、调节免疫、促进核酸合成、提高成骨细胞活性、抗氧化和性激素样作用^[1,2]。Zhang等^[2]以人脐静脉内皮细胞缺氧/复氧体外模型筛选抗缺氧/复氧的传统中药,结果发现淫羊藿苷能明显抑制缺氧/复氧诱导的细胞损伤并呈剂量依赖性。有报道证明^[11,12],淫羊藿苷体内主要是以其代谢产物存在,但淫羊藿苷原形药物仍可在肺、心、肝等各组织中广泛分布,在大鼠静脉给药或小鼠灌胃给药时在脑组织中均可检测到原形药物,说明本品可过血脑屏障直接作用于脑细胞。作者以前的实验还证明淫羊藿苷对原代培养皮质神经元缺氧缺糖损伤具有保护作用^[1]。在此基础上,本实验采用 Fe²⁺/VitC 作为氧自由基生成系统诱导线粒体损伤,选择线粒体肿胀度、MDA 含量和呼吸链复合酶活性作为线粒体损伤的检测指标,观察到淫羊藿苷对自由基损伤线粒体有保护作用。这极可能是淫羊藿苷对中枢神

经细胞的直接作用机制。

线粒体膜的通透性是维持线粒体功能的必要条件。线粒体的肿胀度反映了线粒体膜瞬时孔道的开放程度,因而线粒体肿胀度是观察线粒体膜通透性进而评价线粒体功能的敏感指标之一。MDA 是脂质过氧化的最终产物。在机体自由基清除系统功能较低或下降的情况下,MDA 不能被迅速清除。自由基氧化生物膜的不饱和脂肪酸,产生脂质过氧化,破坏细胞的脂膜(细胞膜、线粒体膜、内质网及溶酶体膜),使之发生功能障碍。测定 MDA 的含量可以间接判定自由基造成的损伤程度。本实验结果显示 Fe²⁺/VitC 可浓度依赖性的造成大鼠脑线粒体肿胀、脂质过氧化物 MDA 的生成增加,而预先加入一定浓度的淫羊藿苷能够明显抑制线粒体肿胀、减少 MDA 的累积,说明淫羊藿苷对自由基损伤线粒体具有明显的保护作用。

呼吸链是线粒体内膜的主要成分,能将底物的氧化与 ATP 的合成相耦联,共同组成生物能量转化的分子机构。有研究认为线粒体呼吸链是最可能受 Fe²⁺ 致过氧化损伤的靶标^[13,14]。尤其呼吸链复合酶 IV 是线粒体电子传递链中的一个关键氧化还原酶,也是线粒体的特征酶,对于活性氧作用十分敏感。本实验发现,Fe²⁺/VitC 损伤线粒体的呼吸链复合酶 I 活性没有显著性变化,而呼吸链复合酶 II ~ IV 活性随着 Fe²⁺/VitC 浓度的增高呈降低趋势。这可能是随着 Fe²⁺/VitC 浓度的增高,自由基损伤越来越严重,呼吸链复合酶 II ~ IV 活性进行性降低。预先加入淫羊藿苷则可防止呼吸链复合酶 II ~ IV 的活性下降,并呈浓度依赖性。

本研究结果说明淫羊藿苷可保护脑线粒体,防止氧化损伤,这对改善氧应激状态下脑的能量代谢障碍有一定意义。

4 参考文献:

- [1] Li L, Wu Q, Jiang QS, Zhou QX, Shi JS. Protection against anoxic and glucose-deprived injury in primary cultured neurons by icariin[J]. *Chin J Cerebrovasc Dis* (中国脑血管病杂志), 2004, 1(8):359-361.
- [2] Zhang YW, Morita I, Shao G, Yao XS, Murota S. Screening of anti-hypoxia/reoxygenation agents by an *in vitro* model. Part 1. Natural inhibitors for protein tyrosine kinase activated by hypoxia/reoxygenation in cultured human umbilical vein endothelial cells[J]. *Planta Med*, 2000, 66

- (2):114-118.
- [3] Clark JB, Nicklas WJ. The metabolism of rat brain mitochondria. Preparation and characterization [J]. *J Biol Chem*, 1970, **245**(18):4724-4731.
- [4] Feng WH, Liu GT. Comparative study of the toxic effect of *n*-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine and dopamine on rat brain mitochondria *in vitro* [J]. *Acta Pharm Sin*(药学报), 2000, **35**(1):11-17.
- [5] Xue Y, Ren XJ, Zhang K, Mu Y, Liu JQ, Cao P, *et al.* Protection of mitochondria against oxidative damage by the GPX mimic 2-TeCD[J]. *Chin J Biochem Mol Biol*(中国生物化学与分子生物学报), 2002, **18**(4):506-510.
- [6] Przedborski S, Jackson-Lewis V, Muthane U, Jiang H, Ferreira M, Naini AB, *et al.* Chronic levodopa administration alters cerebral mitochondrial respiratory chain activity [J]. *Ann Neurol*, 1993, **34**(5):715-723.
- [7] Hunter FE Jr, Scott A, Hoffsten PE, Guerra F, Weinstein J, Schneider A, *et al.* Studies on the mechanism of ascorbate-induced swelling and lysis of isolated liver mitochondria [J]. *J Biol Chem*, 1964, **239**:604-613.
- [8] Eling TE, Curtis JF, Harman LS, Mason RP. Oxidation of glutathione to its thyl free radical metabolite by prostaglandin H synthase. A potential endogenous substrate for the hydroperoxidase [J]. *J Biol Chem*, 1986, **261**(11):5023-5028.
- [9] Zheng XX, Shoffner JM, Voljavec AS, Wallace DC. Evaluation of procedures for assaying oxidative phosphorylation enzyme activities in mitochondrial myopathy muscle biopsies [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1990, **1019**(1):1-10.
- [10] Xiong J, Feng YP. Effects of butylphthalide on the activities of complexes of the mitochondrial respiratory chain [J]. *Acta Pharm Sin*(药学报), 1999, **34**(4):241-245.
- [11] Ye LK, Chen JM, Liu SH, Li GX. Pharmacokinetics of icariin in rats [J]. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 1999, **34**(1):33-36.
- [12] Qiu F, Chen YJ, Kano YH, Yao XS. Metabolism of orally administered icariin in rats [J]. *Acta Pharm Sin*(药学报), 1999, **34**(3):222-226.
- [13] Samuni A, Aronovitch J, Godinger D, Chevion M, Czapski G. On the cytotoxicity of vitamin C and metal ions. A site-specific Fenton mechanism [J]. *Eur J Biochem*, 1983, **137**(1-2):119-124.
- [14] Richter C, Gogvadze V, Laffranchi R, Schlapbach R, Schweizer M, Suter M, *et al.* Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1995, **1271**(1):67-74.

Protective effect of icariin against mitochondrial damage induced by oxygen free radical in rat cerebral cells

LI Li^{1,2}, WU Qin², ZHOU Qi-Xin¹, SHI Jing-Shan^{2*}

(1. Research Center of Biochemistry and Molecular Pharmacology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. Department of Pharmacology, Zun'yi Medical College, Zun'yi 563003, China)

Abstract: **AIM** To investigate the mechanism of protective effects of icariin with the hypothesis that hypoxia-induced neuron injury is related to oxygen free radical-induced mitochondrial damage. **METHODS** The mitochondria were damaged by oxygen free radical derived from ferrous sulfate/vitamin C ($\text{Fe}^{2+}/\text{VitC}$) *in vitro*. The mitochondrial swelling, activity of complex I - complex IV and the content of malondialdehyde (MDA) were measured. **RESULTS** The swelling and content of MDA of mitochondria were significantly increased, and activities of complex II - complex IV of mitochondria were decreased in model group induced by $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Fe}^{2+}/10$

$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{VitC}$ or $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Fe}^{2+}/10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{VitC}$. Pretreating mitochondria with icariin (0.03 and $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) obviously decreased swelling and content of MDA, and significantly increased activities of complex II - complex IV. **CONCLUSION** Icariin has protective effect on rat cerebral mitochondria injury induced by oxygen free radical.

Key words: icariin; reactive oxygen species; mitochondria

Foundation item: The project supported by Higher Education Development Special Fundation of Guizhou Province (2003112)

* Corresponding author.

(本文编辑 董立春)