

大豆苷元对谷氨酸体外诱导海马神经元损伤大鼠的保护作用

秦传勇

(湖北省随州市曾都医院药剂科, 441300)

[摘要] 目的 探讨大豆苷元对谷氨酸体外诱导原代培养大鼠海马神经元损伤的作用及机制。方法 通过对海马神经元的超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)生化测试及胞内游离钙浓度测定,观察大豆苷元对谷氨酸诱导海马神经元损伤的作用。结果 大豆苷元呈浓度依赖性的拮抗由 $400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 谷氨酸诱导的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增高、MDA 生成,并提高 SOD 活性。结论 大豆苷元对谷氨酸体外诱导大鼠海马神经细胞损伤具有保护作用,可能与缓解胞内 Ca^{2+} 超载、提高神经元抗氧化能力有关。

[关键词] 大豆苷元;谷氨酸;海马神经元; $[\text{Ca}^{2+}]_i$;

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1004-0781(2010)01-0025-03

The Neuroprotective Effects of Daidzein on Hippocampal Neurons Injury Induced by Glutamate *in Vitro* on Rats

QIN Chuan-yong (Department of Pharmacy, Zengdu Hospital of Suizhou, Hubei 441300, China)

ABSTRACT Objective To investigate the action and mechanism of daidzein on glutamate-induced injury in cultured cerebral hippocampal neuron of rats. **Methods** Effects of daidzein on hippocampal neuron injury induced by glutamate was determined by observing SOD, MDA and calcium concentration of neuron. **Results** Daidzein prevented the elevation of intracellular calcium and content of MDA, and increased activity of SOD induced by $400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Glutamate in a concentration dependent manner. **Conclusion** The neuroprotective effects of daidzein could be associated with inhibiting intracellular calcium overloading, decreasing MDA content, and increasing activity of SOD.

KEY WORDS Daidzein; Glutamate; Hippocampal neuron; $[\text{Ca}^{2+}]_i$;

大豆苷元(daidzein)属异黄酮类物质,是从大豆、葛根中分离提取所得。目前认为大豆苷元具有抗心律失常、耐缺氧、抗氧化及局部麻醉、治疗骨质疏松等作用,并对免疫器官有一定的影响^[1]。也有研究表明,大豆苷元具有一定的抗氧化作用,但大豆苷元是否同时存在对脑神经元的保护作用,笔者未见文献报道。谷氨酸(glutamate, Glu)的过度释放是脑缺血等多种病理情况下神经元兴奋性毒性损伤的关键环节。因此,笔者在本实验建立 Glu 体外诱导大鼠海马神经元损伤模型^[2],从细胞水平观察大豆苷元对 Glu 致原代培养大鼠海马神经元兴奋性毒性的影响并对其机制进行初步研究。

1 材料与方

1.1 材料 大豆苷元由陕西海天制药有限公司提供(批号: DA02102);超氧化物歧化酶(superoxide-dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒均购于南京生物工程研究所;维拉帕米注射液,

由青岛黄海制药有限责任公司提供、谷氨酸(L-Glutamate)、二甲亚砜(DMSO)、荧光染料 Fura-2/AM、多聚赖氨酸(poly-D-lysine)、EDTA 均购于 Sigma 公司;DMEM/12 完全培养基购于 Gibco 公司;胎牛血清购于 Hyclone 公司;二氧化碳(CO_2)培养箱(Shellab 2306, USA);ELX800 型酶标仪(Bio-Tek Instruments INC, Cole-parmar, USA);荧光分光光度计(日立, H2100);其他试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 药品溶解 用 DMSO 溶解大豆苷元,然后用培养液制备成终浓度分别为 $50, 100, 200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的含药培养液。调整 DMSO 的体积百分比,使其浓度 $< 1\%$ 。

1.2.2 细胞培养 取新生 3 d 内的 Wistar 大鼠,于超净工作台内, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 的 PBS 平衡液(含氯化钠 $136.89 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 氯化钾 $2.68 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 磷酸氢二钠 $9.75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 磷酸二氢钾 $1.15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 值 7.2)中,小心分离出大脑海马。用眼科剪将海马剪碎,转移入含有 0.125% 胰蛋白酶的 PBS 液中, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴消化 28 min。消化完毕后,加入等体积 DMEM/12 完全培养基(含有 10% 胎牛血清、 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉

[收稿日期] 2009-02-17 **[修回日期]** 2009-03-20

[作者简介] 秦传勇(1971-),男,湖北随州人,主管药师,学士,主要从事药理研究及医院药剂管理。电话:0722-3314666, E-mail: qinchuanrong2009@163.com。

素、100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 链霉素), 吹打终止消化。加入 DMEM/12 完全培养基, 吹打呈混悬液, 接种于 poly-D-lysine 预处理的 24 孔板中, 置于 5% CO_2 , 37 $^\circ\text{C}$ 的培养箱。第 2 天加入阿糖胞苷, 抑制胶质细胞的增殖。第 3 天用 DMEM/F12 完全培养基换液, 培养至第 7 天, 加药处理。

1.2.3 SOD、MDA 测定 第 8 天, 在大豆苷元组和阳性对照组中, 预处理分别加入 50, 100, 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 大豆苷元和 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 维拉帕米, 培养 24 h, 再加入 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 谷氨酸, 培养 30 min。去除原培养液, 用 PBS 洗 2 遍, 24 孔板每孔加入 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 和 0.05 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA (pH = 8.0) 1 mL, 再加入 1% Triton-X100 50 μL , 将 24 孔培养板振荡 1 min 使细胞溶解, 加入 25% 磷酸 100 μL 以沉淀蛋白, 10 000 $\times g$ 于 4 $^\circ\text{C}$ 离心 1 h, 取上清液, 按试剂盒说明书测定 SOD 活性和 MDA 含量。蛋白定量用 Folin 法测定。

1.2.4 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 测定 采用荧光分光光度计测定 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 。将各组海马神经元转移至离心管中, 1 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 弃去上清液, 以 PBS 5 mL 混悬细胞, 加入 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Fura-2/AM, 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 30 min, 1 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃去上清液, 加入 2 mL PBS 悬浮。采用荧光分光光度计检测, 激发波长 340 nm, 接收波长 510 nm, 测定值 F 值。将样品经 5% Triton X-100 和 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA 处理, 分别得到 F_{max} , F_{min} 。按公式 $[\text{Ca}^{2+}]_i = \text{KD} \times (F - F_{\text{min}}) / (F - F_{\text{max}})$ 测定钙离子浓度 (KD 为 240 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。

1.3 统计学方法 各组数据以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SAS 8.1 统计软件进行方差分析的 Dunnett t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 大豆苷元对 SOD 活性和 MDA 含量的影响 神经细胞经 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Glu 损伤后, 细胞内 MDA 含量增高, SOD 活性降低。经各浓度的大豆苷元预处理 24 h, 大豆苷元组较 Glu 组, MDA 含量明显降低, 而 SOD 活性明显增高, 均差异有显著性 ($P < 0.05$), 并且大豆苷元的神经保护作用呈浓度依赖关系, 见表 1。

2.2 大豆苷元降低 Glu 诱导的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增高 如图 1 所示, 经 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Glu 诱导 30 min 后, 明显增高 $[\text{Ca}^{2+}]_i$, 至 (730.89 \pm 56.18) $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。而给予 50, 100, 200 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 大豆苷元预处理 24 h, Glu 诱导 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增高的幅度分别降低 (19.23 \pm 8.99)%, (32.52 \pm 10.21)% 和 (45.47 \pm 13.60)%, 且大豆苷元组与 Glu 组比较, 差异有显著性。

表 1 大豆苷元对海马神经细胞 SOD 活性和 MDA 含量的影响

组别	浓度/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	MDA/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{gpr}^{-1}$)	SOD/ ($\text{KU} \cdot \text{gpr}^{-1}$)
Glu 组	400	23.41 \pm 1.92 ^{*1}	0.45 \pm 0.14 ^{*1}
Ver 组	100	9.89 \pm 2.13 ^{*2}	1.96 \pm 0.33 ^{*2}
Daidzein 组	50	18.32 \pm 2.04	0.54 \pm 0.11
	100	13.72 \pm 1.91 ^{*2}	0.92 \pm 0.26 ^{*2}
	200	10.79 \pm 3.28 ^{*2}	1.57 \pm 0.12 ^{*2}
正常组		4.92 \pm 0.32	3.63 \pm 0.22

与正常组比较, ^{*1} $P < 0.05$; 与 Glu 组比较, ^{*2} $P < 0.05$

Compare with normal group, ^{*1} $P < 0.05$; Compare with Glu group, ^{*2} $P < 0.05$

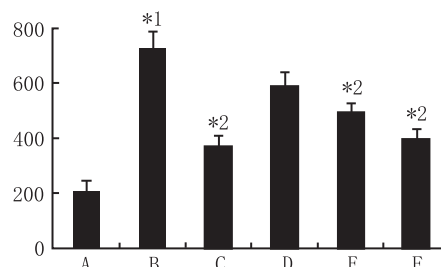


图 1 不同浓度的大豆苷元降低 Glu 诱导的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增高 与正常组比较, ^{*1} $P < 0.05$; 与 Glu 组比较, ^{*2} $P < 0.05$

A. 正常组; B. Glu 组; C. Ver 组; D. 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Daidzein 组; E. 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Daidzein 组; F. 2 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Daidzein 组

Fig. 1 Inhibition of the increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induced by Glu by various concentration of daidzein

Compare with normal group, ^{*1} $P < 0.05$; Compare with Glu group, ^{*2} $P < 0.05$

A. normal group ; B. Glu group ; C. Ver group ; D. 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Daidzein ; E. 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Daidzein ; F. 2 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Daidzein

3 讨论

内源性 Glu 参与多种生理功能调控是脑内重要的兴奋性神经递质, 但 Glu 过量释放则导致的神经元兴奋性毒性的产生。研究者认为, 神经元兴奋毒性是在脑缺氧缺血、脑外伤、癫痫等病理情况下参与发病的重要因素^[3]。同时为了解决神经元兴奋性毒性产生的一系列严重反应, 人们一直在积极寻找新的治疗药物。本实验研究中的大豆苷元是系葛根中的主要成分, 豆科植物野葛和粉葛的干燥根, 入药历史悠久, 具有发表解肌、透疹生津止渴除烦、升阳止泻、活血疗疮、解酒等功效^[4]。笔者通过建立 Glu 体外诱导大鼠海马神经元神经元损伤的实验模型发现, 大豆苷元保护性预处理 24 h 后海马神经元, 可降低胞内 MDA 含量同时增强 SOD 活性。

而 MDA 为脂质过氧化物的分解产物,它能交联蛋白质与核酸,导致蛋白质合成能力下降或功能紊乱,破坏细胞结构,使细胞存活率降低。SOD 是机体内重要的氧自由基清除剂,发挥抗氧化作用^[5]。从而提示大豆苷元对 Glu 引起的脑神经元损伤具有一定的保护作用。

突触后膜的 N-甲基-D-天冬氨酸 (N-methyl-D-aspartate, NMDA)受体门控通道是 Glu 引起的钙离子 (Ca^{2+})内流的主要途径,病理性 Glu 过度释放会导致 NMDA 受体门控通道开放,胞外大量钠离子 (Na^+)、 Ca^{2+} 内流,胞内钾离子 (K^+)外流,引起细胞内 Ca^{2+} 超载,继而激活一系列钙依赖性酶,促使大量的氧自由基的生成,导致脂质过氧化反应,MDA 生成增加,SOD 活性降低,加速细胞损伤^[6]。本实验中结果显示,400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Glu 导致 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 明显增加,而预先给予大豆苷元 24 h 保护,可显著降低由 Glu 诱导的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增高,提示大豆苷元对 Glu 致神经元损伤的保护,可能与减轻胞内 Ca^{2+} 超载、抗氧化损伤有关,这也与上述理论推测相符。

本研究显示,大豆苷元对 Glu 体外诱导的大鼠海马神经细胞损伤具有较强的保护作用,从而为临床上大豆苷元治疗缺血性脑血管疾病提供了一定的实验依据。大豆苷元对 Glu 致神经元损伤的保护机制可能与其降低胞内 Ca^{2+} 水平、提高神经细胞抗氧化能力、保护细胞免受过氧化损伤有关,但该机制是否通过抑制

NMDA 受体而发挥作用以及是否存在其他的保护机制,还有待进一步研究。

[DOI] 10.3870/yydb.2010.01.008

[参考文献]

- [1] 许大庆,雷 婕,彭晓东,等.大豆苷元对乳鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用[J].宁夏医学院学报,2007,29(4):344.
- [2] SURIN A M, BOLSHAKOV A P, MIKHAILOVA M M, et al. Arachidonic acid enhances intracellular $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase and mitochondrial depolarization induced by glutamate in cerebellar granule cells [J]. *Biochemistry*, 2006, 71(8):864-870.
- [3] HE Z, LU Q, XU X, et al. DDPH ameliorated oxygen and glucose deprivation-induced injury in rat hippocampal neurons via interrupting Ca^{2+} overload and glutamate release [J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 603(1-3):50-55.
- [4] 孙海燕,吕树铮,刘 舒,等.大豆苷元对大鼠颈总动脉球囊损伤后内膜增殖的抑制作用[J].中国介入心脏病学杂志,2007,15(5):872.
- [5] XIONG Z, LIU C, WANG F, et al. Protective effects of breviscapine on ischemic vascular dementia in rats [J]. *Bio Pharm Bull*, 2006, 29(9):1880-1885.
- [6] KIM Y S, CHANG H K, LEE J W, et al. Protective effect of gabapentin on N-methyl-D-aspartate-induced excitotoxicity in rat hippocampal CA1 neurons [J]. *J Pharmacol Sci*, 2009, 109(1):144-147.

盐酸氨溴索口腔崩解片的生物等效性研究

薛洪源¹,杨汉煜²,贺文涛¹,王宇奇¹,贾丽霞¹

(1.白求恩国际和平医院临床药理室,石家庄 050082;2.石药集团中奇制药技术有限公司,石家庄 050011)

[摘要] 目的 研究盐酸氨溴索口腔崩解片的人体生物利用度和生物等效性。方法 采用随机交叉试验设计,20例健康男性志愿者单剂量口服试验制剂盐酸氨溴索口腔崩解片和参比制剂盐酸氨溴索片各60 mg,用高效液相色谱-串联质谱法测定血浆中氨溴索的浓度,计算两药的药动学参数。结果 单剂量口服试验制剂和参比制剂后氨溴索的 C_{\max} 分别为 (84.7 ± 29.3) 和 (81.2 ± 28.2) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, t_{\max} 分别为 (1.7 ± 0.5) 和 (1.8 ± 0.4) h, $t_{1/2}$ 分别为 (7.9 ± 0.9) 和 (8.3 ± 1.0) h, $AUC_{0-24\text{h}}$ 分别为 (638.7 ± 180.8) 和 (591.4 ± 148.3) $\text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$, 试验制剂的相对生物利用度为 $(108.2 \pm 16.5)\%$ 。结论 试验制剂与参比制剂具有生物等效性。

[关键词] 氨溴索,盐酸;口腔崩解片;生物利用度,相对;生物等效性;药动学;液相色谱-串联质谱法

[中图分类号] R974

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2010)01-0027-04

Study of bioequivalence of Ambroxol Hydrochloride Orally Disintegrating Tablets

XUE Hong-yuan¹, YANG Han-yu², HE Wen-tao¹, WANG Yu-qi¹, JIA Li-xia¹ (1. Department of Pharmacology, Bethune International Peace Hospital, Shijiazhuang 050082, China; 2. Shijiazhuang Pharmaceutical Group Co. Ltd. Zhongqi Corporation, Shijiazhuang 050011, China)

ABSTRACT Objective To study the bioequivalence and relative bioavailability of ambroxol hydrochloride orally