

香菇多糖对 H_2O_2 损伤神经细胞保护作用的研究

逯爱梅¹, 于天贵^{2*} (1. 济南市传染病医院, 济南 250021; 2. 山东医学高等专科学校, 济南 250002)

摘要:目的 研究香菇多糖 (lentinan) 对 H_2O_2 损伤体外原代培养大鼠皮层神经细胞的保护作用, 并初步探讨其作用机制。方法 体外培养胚胎大鼠大脑皮层神经细胞, 建立 H_2O_2 氧化应激损伤模型, 观察香菇多糖的保护作用。结果 香菇多糖能显著提高氧化损伤神经细胞的生存率, 降低培养液中乳酸脱氢酶 (LDH) 的漏出量和一氧化氮 (NO) 含量, 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。结论 香菇多糖对 H_2O_2 损伤神经细胞具有显著的保护作用, 其机制可能与其抗氧化作用有关。

关键词: 香菇多糖; 过氧化氢 (H_2O_2); 氧化应激; 抗氧化; 阿尔茨海默病

中图分类号: R965.1; R979.5

文献标识码: A

文章编号: 1007-7693(2008)05-0393-04

作者简介: 逯爱梅, 女, 主管药师

Tel: (0531) 87935971 - 8104

E-mail: sdluamei@163.com

* 通讯作者: 于天贵, 男, 博士, 教授

Tel: (0531) 86305118

E-mail: sdyutg@163.com

Protective Effects of Lentinan on H_2O_2 -induced Oxidative Damage in Primary Cultured Rat Cortical Neurons

LU Ai-mei¹, YU Tian-gui^{2*} (1. Jinan Infectious Disease Hospital, Jinan 250021, China; 2. Shandong Medical College, Jinan 250002, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the protective effects of lentinan (LNT) on H_2O_2 -induced oxidative damage in primary cultured rat cortical neurons, and to explore the possible mechanisms. **METHODS** Cortical neurons of newly born rat were cultured *in vitro*. The protective effects of LNT on H_2O_2 -induced oxidative damage were observed. **RESULTS** Exposure of rat cortical neurons to H_2O_2 led to not only increased the cell death, the efflux of LDH, the content of NO and the production of MDA but also decreased the activity of SOD in rat cortical cells. These changes were reversed by 24 h pretreatment with LNT significantly. **CONCLUSION** These results suggest that LNT prevent H_2O_2 -induced oxidative damage and it may attribute to its effect of antioxidation.

KEY WORDS: lentinan (LNT); hydroperoxide (H_2O_2); oxidative stress; antioxidation

香菇多糖 (lentinan, LNT) 是从香菇的子实体中提取的一组多糖成分, 已证实具有清除自由基和调节一氧化氮 (NO) 的作用, 其临床应用在不断拓宽^[1]。LNT 可用于免疫抑制的中枢神经系统疾病, 这提示它可对神经细胞发挥作用^[2], 体内实验结果显示 LNT 可增强大鼠齿状回的长时程增强 (long-term potentiation, LTP) 易化突触效能^[3]。但目前国内外尚缺乏有关 LNT 对神经细胞保护作用的实验研究。本实验利用 H_2O_2 的氧化作用建立体外培养大鼠大脑皮层神经细胞氧化损伤模型, 观察 LNT 对 H_2O_2 氧化损伤的保护作用, 并探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

Wistar 大鼠, 孕 17~19 d, 由山东大学实验动物中心提供, 合格证号为 2001002。

1.2 药品与试剂

香菇多糖 (LNT) 购自福州梅峰制药厂 (批号 00093, 纯度为 98.8%), 用前以 DMEM 培养基配成所需浓度; L-多聚赖氨酸 (分子量为 15 万~30 万)、四甲基偶氮唑蓝 (MTT)、二甲基亚砜 (DMSO) 均购自 Sigma 公司; DMEM 高糖培养基、胎牛血清均系 Gibco 公司产品; 盐酸阿糖胞苷, 上海华联制药有限公司, 批号 030703A; 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、一氧化氮 (nitric oxide, NO)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒, 均为南京建成生物工程研究所产品; 总蛋白试剂盒, 北京中生生物工程高技术公司; 其余试剂均为市售分析纯。

1.3 仪器

RS-232C 型酶标仪, 上海分析仪器有限公司; CO_2 培养箱 (Foma Scientific, Inc. In USA); 净化工作台, 济南空气净化消毒设备厂; 倒置显微镜, 日本 Nikon 公司; BT124s 电子天平, Sartorius 公司; UV-9100 型紫外分光光度计, 北京瑞利分析仪器有限公司。

1.4 大脑皮层神经细胞培养

参照 Kim 等^[4]报道的方法进行。无菌条件下分离孕 17~19 d 大鼠胎鼠大脑皮层, 迅速放入 DMEM 培养基中, 剔除软脑膜和血管, 将脑组织移入另一含 DMEM 培养基 (含

10% 小牛血清, $100 \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素, $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 链霉素和神经生长因子 $2.5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的培养皿中, 细口吸管反复吹打分散成细胞悬液, 200 目金属网过滤, 调整细胞数至 $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$, 接种于 0.01% L-多聚赖氨酸过夜处理的 96 孔培养板或培养瓶中, 置 37°C 、5% CO_2 孵箱中培养, 第 2 天待细胞贴壁后换液 1 次去除死细胞, 以后每 2~3 d 换液 1 次, 细胞培养至 3~4 d 后, 加入阿糖胞苷 (终浓度为 $3 \sim 5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 培养 24 h, 以抑制非神经细胞过度增殖。继续培养至 7~8 d 后开始实验。

1.5 H_2O_2 损伤神经模型的建立

取培养 7~8 d 的神经细胞, 分为对照组、 H_2O_2 处理组、LNT + H_2O_2 处理组进行实验。 H_2O_2 处理组, 吸去原培养液, D-Hanks ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$: NaCl 140, KCl 5.0, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.4, KH_2PO_4 0.4, NaHCO_3 4.0, pH 7.4) 洗 2 遍, 加入含各种浓度 H_2O_2 的 DMEM 培养基, 继续培养 6 h 进行实验。正常组不加 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 LNT。

1.6 MTT 比色法测定细胞存活率

每孔内加入 MTT 液 0.1 mL ($0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 继续培养 4~6 h, 换 DMSO $100 \mu\text{L}$, 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 (A_{570}), 由公式计算存活率。细胞存活率 (100%) = (用药组或模型组 A_{570} / 对照组 A_{570}) $\times 100\%$ 。

1.7 培养液中 LDH 和 NO 的测定 细胞处理后, 收集细胞培养上清液, 按文献报道的方法^[5-6], 参照试剂盒说明书测定培养液中 LDH 漏出量和 NO 的含量。

1.8 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 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$: NaCl 137, KCl 2.7, Na_2HPO_4 10, KH_2PO_4 1.76, pH 7.2~7.4) 洗 2 遍, 每孔加入 0.1 mL $0.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA (pH 8.0) 1 mL , 再加入 1% Triton-X100 $50 \mu\text{L}$, 将培养板置振荡器振荡 1 min 使之溶解, 加入 25% H_3PO_4 $100 \mu\text{L}$ 以沉淀蛋白, $10\,000 \times g$ 于 4°C 离心 1 h, 取上清液按说明书测定 SOD 活性和 MDA 含量。蛋白质定量用 Folin 法。

1.9 统计学处理 所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 *t* 检验

进行显著性检验, $P < 0.05$ 代表有显著性差异。

2 结果

2.1 LNT对H₂O₂损伤神经细胞生存能力的影响

10 μmol·L⁻¹以下H₂O₂对神经细胞生存率影响不明显($P > 0.05$), 但20~200 μmol·L⁻¹ H₂O₂可引起神经细胞不同程度的损伤($P < 0.01$), 细胞生存率呈浓度依赖性的降低, 见图1。

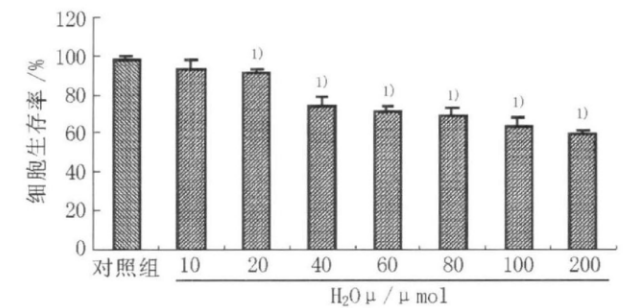


图1 H₂O₂对原代培养皮层神经细胞生存率的影响

注: 与正常对照组比较, 1) $P < 0.01$

Fig 1 Effect of H₂O₂ on cell viability in primary cultured cortical neurons

Note 1) $P < 0.01$ vs normal group

为进一步明确LNT对H₂O₂损伤神经细胞的保护作用, 又选用培养液中LDH漏出量作为指标进行观察。神经细胞经100 μmol·L⁻¹ H₂O₂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LNT(1, 10和100 mg·L⁻¹), 与H₂O₂处理组相比, 其中100 mg·L⁻¹ LNT可明显降低细胞培养液中LDH的漏出量, 见表1。

表2 LNT对H₂O₂损伤皮层神经细胞培养液中NO含量、细胞内MDA含量和SOD活性的影响 ($n = 6 \bar{x} \pm s$)

Tab 2 Effects of LNT on NO contents, MDA contents and SOD activity in primary cultured cortical cells induced by H₂O₂ ($n = 6 \bar{x} \pm s$)

组别	LNT浓度 / mg·L ⁻¹	NO / μmol·L ⁻¹	SOD / kU·g (pro) ⁻¹	MDA / μmol·g (pro) ⁻¹
对照组		16.23 ± 1.04	1.72 ± 0.16	5.92 ± 0.48
H ₂ O ₂ 组		64.23 ± 2.81 ¹⁾	0.76 ± 0.07 ¹⁾	16.68 ± 1.17 ¹⁾
LNT预处理组	1	61.12 ± 2.13	0.77 ± 0.05	15.70 ± 1.19
	10	57.07 ± 2.57 ³⁾	0.94 ± 0.04 ²⁾	13.09 ± 1.11 ³⁾
	100	44.70 ± 2.86 ³⁾	1.18 ± 0.07 ³⁾	10.57 ± 0.99 ³⁾

注: 与H₂O₂未处理组比较, 1) $P < 0.01$; 与H₂O₂处理组比较, 2) $P < 0.05$ 3) $P < 0.01$

Note 1) $P < 0.01$ vs H₂O₂-untreated group 2) $P < 0.05$ 3) $P < 0.01$ vs H₂O₂-treated group

3 讨论

氧化应激是指细胞受到氧自由基损伤所致的细胞毒作用。当细胞内自由基含量超过细胞自身的清除能力时, 可产生破坏脂质和细胞膜的作用, 并导致蛋白、核酸损坏等氧自由基毒性。H₂O₂是一种较强的氧化剂, 极易进入细胞内, 通过Haber-Weiss或Fenton反应, 形成高活性的自由基如单态氧、羟自由基等。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^[7]。因其操作简单, 容易控制, 现广泛用于体外模拟细胞氧化应激损伤实验。本研究以体外培养大鼠皮层神经细胞为实验对象, 以100 μmol·L⁻¹ H₂O₂作为实验条件诱导细胞产生氧化应激状态, 观察LNT的神经保护

作用。预先24 h给予LNT(1, 10和100 mg·L⁻¹), 其中100 mg·L⁻¹的LNT可明显提高细胞生存率($P < 0.01$), 这些结果表明LNT对H₂O₂损伤神经细胞有明显的保护作用, 见表2。

2.2 LNT对细胞内MDA含量和SOD活性的影响

与H₂O₂未处理细胞相比, 神经细胞经100 μmol·L⁻¹ H₂O₂损伤后培养液中NO含量及细胞内MDA含量显著增加, SOD活性显著降低。预先24 h给予LNT(1, 10和100 mg·L⁻¹), 与H₂O₂处理组相比, 其中100 mg·L⁻¹ LNT可明显均可显著降低培养液中NO含量及MDA含量、升高SOD活性, 见表2。

表1 LNT对100 μmol·L⁻¹ H₂O₂损伤原代培养皮层神经细胞的保护作用 ($n = 6 \bar{x} \pm s$)

Tab 1 Neuroprotective activity of LNT in primary cultured cortical cells insulted by 100 μmol·L⁻¹ H₂O₂ ($n = 6 \bar{x} \pm s$)

组别	LNT浓度 / mg·L ⁻¹	细胞生存率 / %	LDH / kU·L ⁻¹
对照组	-	97.68 ± 1.88	17.04 ± 1.53
H ₂ O ₂ 组	-	63.22 ± 4.69 ¹⁾	44.95 ± 1.51 ¹⁾
LNT预处理组	1	63.57 ± 3.08	43.34 ± 1.66
	10	70.11 ± 3.02 ²⁾	40.55 ± 2.07 ²⁾
	100	75.71 ± 3.08 ³⁾	33.17 ± 1.78 ³⁾

注: 与H₂O₂未处理组比较, 1) $P < 0.01$; 与H₂O₂处理组比较, 2) $P < 0.05$ 3) $P < 0.01$

Note 1) $P < 0.01$ vs H₂O₂-untreated group 2) $P < 0.05$ 3) $P < 0.01$ vs H₂O₂-treated group

作用。

细胞损伤时, 细胞膜通透性增加, 释放进入培养液中的LDH升高。因此, 细胞培养液中LDH水平可作为衡量细胞损伤程度的重要指标之一。研究结果显示100 μmol·L⁻¹ H₂O₂作用于细胞6 h可使细胞培养液中LDH漏出明显增加, 10 mg·L⁻¹和100 mg·L⁻¹的LNT可降低培养液中LDH的漏出量, 提示LNT可降低神经细胞损伤程度, 对H₂O₂损伤的神经细胞具有一定的保护作用, 与LNT提高H₂O₂损伤神经细胞的生存率是一致的。

缺血时, 兴奋性氨基酸释放增加, 引起活性氧自由基和NO的产生^[8]。NO和O₂⁻反应生成ONOO⁻, 并进而分解成

毒性极强的 $\text{OH}^\cdot$ 和 $\text{NO}_2^\cdot$ 。这些自由基可使神经细胞发生脂质过氧化反应,生成大量的髓过氧化物酶(MPO)。MPO的代谢产物MDA可使磷脂、蛋白质发生交链、变性,同时其含量的变化间接反映了组织中氧自由基含量的变化^[9]。因此,MDA常用来反映组织脂质过氧化损伤的程度。SOD是主要存在于细胞浆和线粒体中的一种金属蛋白酶,可催化歧化反应,清除引发自由基连锁反应的起始基-超氧阴离子,是体内抗氧化系统的重要组成部分。因此,测定MDA、SOD活性不仅可反映神经细胞损伤的原因而且还可以判断细胞损伤的程度^[10]。

本研究结果显示, H_2O_2 ($100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 诱导皮层神经细胞6h时,与 H_2O_2 未处理组相比, H_2O_2 处理组皮层神经细胞培养液中NO和胞内MDA含量明显升高,而胞内SOD活性显著降低,提示 H_2O_2 ($100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 所致皮层神经细胞损伤与脂质过氧化损伤有关。LNT可提高皮层神经细胞内SOD活性并显著降低培养液中NO和胞内MDA含量,提示LNT可能是通过抗过氧化作用保护 H_2O_2 诱导的皮层神经细胞损伤。上述实验结果与在其他实验模型所得到的结果是相似的,用富含硒香菇干粉喂老龄大鼠,能显著提高谷胱甘肽过氧化物歧化酶,体内过氧化脂质明显降低^[11]。

本实验结果表明,LNT能显著抑制 H_2O_2 对神经细胞的氧化损伤,提高细胞存活率和细胞活力,降低细胞培养液中LDH的漏出量;减少NO和MDA的生成,提高SOD活性,表现出较强的抗氧化作用和氧化修复能力。因此,LNT对 H_2O_2 诱导神经细胞损伤的保护作用可能与提高神经细胞抗氧化作用有关。

REFERENCES

[1] HOU G, HUANG D N, ZHU Q F. Effects of lentinan on the

inducible nitric oxide synthase and intracellular glutathione in mouse peritoneal macrophages [J]. Chin J Gerontol (中国老年学杂志), 2002, 22(5): 396-397.

- [2] LUEN E J. Fungal metabolites and Chinese herbal medicines as immunostimulants [J]. Prog Drug Res, 1990, 34: 395-420.
- [3] EDAGAWA Y, SMRIGA M, NISHIYAMA N, *et al.* Systemic administration of lentinan, a branched beta-glucan, enhances long-term potentiation in the rat dentate gyrus in vivo [J]. Neurosci Lett, 2001, 314(3): 139-142.
- [4] KIM SR, KIM YC. Neuroprotective phenylpropanoid esters of rhamnose isolated from roots of *Scrophularia buergeriana* [J]. Phytochemistry, 2000, 54(5): 503-509.
- [5] KOLH JY, CHOI DW. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in culture by lactate dehydrogenase efflux assay [J]. J Neurosci Methods, 1987, 20(1): 83-90.
- [6] KELLER JN, KINDY MS, HOLTBERG FW, *et al.* Mitochondrial manganese superoxide dismutase prevents neural apoptosis and reduces ischemic brain injury: suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction [J]. Neurosci, 1998, 18(2): 687-697.
- [7] LI WG, MILLER FJ Jr, ZHANG HJ, *et al.* H_2O_2 -induced $\text{O}_2^{\cdot-}$ production by a non-phagocytic NAD(P)H oxidase cause oxidant injury [J]. J Biol Chem, 2001, 276(31): 29251-29256.
- [8] BECKMAN JS, YE YZ, Chen J. The interaction of nitric oxide with oxygen radical scavenger in cerebral ischemic injury [J]. Adv Neurol, 1996, 71(1): 339-350.
- [9] KINNULA VL, EVERITT JL, WHORTON AR, *et al.* Hydrogen peroxide production by alveolar type II cells, alveolar macrophages and endothelial cells [J]. Am J Physiol, 1991, 261(2 pt 1): L84-91.
- [10] MUGGE A, ELWELL J, PETERSON TE, *et al.* Release of intact endothelium-derived relaxing factor depends on endothelial superoxide dismutase activity [J]. Am J Physiol, 1991, 260(2 Pt 1): C219-225.
- [11] XUN X T, ZHANG X C, WANG Z L. Effect of mushroom rich in Se on free radical of aging rat [J]. J Shanx Med Coll (山西医学院学报), 1993, 24(2): 126-128.

收稿日期: 2007-11-29