

桃叶珊瑚苷对谷氨酸诱导的兴奋性神经毒性的抑制作用研究

卢仁睿¹, 张莉¹, 王慧慧¹, 李孟¹, 郑晓珂^{1,2*}, 冯卫生^{1,2*} (1.河南中医药大学药学院, 郑州 450046; 2.河南省中药开发工程技术研究中心, 郑州 450046)

摘要: **目的** 研究桃叶珊瑚苷对谷氨酸诱导的兴奋性神经毒性的抑制作用。**方法** 采用 20 mmol·L⁻¹ 谷氨酸诱导 PC-12 细胞损伤建立神经毒性模型, 加入 1, 5, 10, 20, 40 μmol·L⁻¹ 的桃叶珊瑚苷处理 24 h 后, 通过 MTT 法检测细胞活力, 用流式细胞术检测细胞内 Ca²⁺ 和活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平, 采用 In Cell Western 检测谷氨酸受体 N-甲基-D-天冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartic acid receptor, NMDA)亚基 NMDAR1 的水平, 采用 ELISA 试剂盒检测细胞上清中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)水平。**结果** 谷氨酸 20 mmol·L⁻¹ 作用 24 h 可使体外培养的 PC-12 细胞活力明显下降($P<0.01$), 细胞内 Ca²⁺、NMDAR1 蛋白水平和 ROS、MDA、LDH 水平明显增加($P<0.01$), SOD 水平明显降低。10 μmol·L⁻¹ 的桃叶珊瑚苷可以明显提高谷氨酸诱导后 PC-12 细胞的细胞活力($P<0.01$), 降低细胞内 Ca²⁺、NMDAR1 蛋白水平和 ROS、LDH 水平($P<0.01$), 升高细胞内 SOD 水平($P<0.01$)。**结论** 桃叶珊瑚苷可能通过抑制 NMDAR1 的表达, 从而降低细胞内 Ca²⁺ 的堆积, 并抑制氧化应激水平来改善谷氨酸诱导的 PC-12 细胞损伤, 抑制谷氨酸诱导的兴奋性神经毒性。

关键词: 桃叶珊瑚苷; N-甲基-D-天冬氨酸受体亚基; 细胞内 Ca²⁺ 水平; 谷氨酸; PC-12

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2022)24-3197-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.24.002

引用本文: 卢仁睿, 张莉, 王慧慧, 等. 桃叶珊瑚苷对谷氨酸诱导的兴奋性神经毒性的抑制作用研究[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(24): 3197-3203.

Study on the Inhibitory Effect of Aucubin on Glutamate-Induced Excitatory Neurotoxicity

LU Renrui¹, ZHANG Li¹, WANG Huihui¹, LI Meng¹, ZHENG Xiaoke^{1,2*}, FENG Weisheng^{1,2*} (1.School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2.Henan Engineering Technology Research Center for Chinese Medicine Development, Zhengzhou 450046, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the inhibitory effect of aucubin on glutamate-induced excitatory neurotoxicity. **METHODS** A neurotoxicity model was established using 20 mmol·L⁻¹ glutamate to induce damage in PC-12 cells. After treatment with 1, 5, 10, 20 and 40 μmol·L⁻¹ aucubin for 24 h, cell viability was measured by MTT, intracellular Ca²⁺ and reactive oxygen species(ROS) levels were measured by flow cytometry, the level of glutamate receptor N-methyl-D-aspartic acid receptor(NMDAR1) were measured by In Cell Western. And superoxide dismutase(SOD), malondialdehyde(MDA), and lactate dehydrogenase(LDH) levels in cell supernatants were measured by using ELISA kits. **RESULTS** After treated with 20 mmol·L⁻¹ glutamate for 24 h, the viability of PC-12 cells was significantly reduced($P<0.01$), the levels of intracellular Ca²⁺, NMDAR1 ROS, MOA, LDH were significantly increased ($P<0.01$), the level of SOD was significantly reduced. 10 μmol·L⁻¹ aucubin could significantly increase the cell viability of PC-12 cells injured by glutamate($P<0.01$), it could reduce the levels of intracellular Ca²⁺, NMDAR1, ROS and LDH($P<0.01$), and elevate intracellular SOD level($P<0.01$). **CONCLUSION** Aucubin may ameliorate glutamate-induced damage in PC-12 cells by inhibiting NMDAR1 expression, thereby reducing the accumulation of intracellular Ca²⁺, and inhibiting oxidative stress levels to suppress glutamate-induced excitatory neurotoxicity.

KEYWORDS: aucubin; N-methyl-D-aspartic acid receptor subunit; intracellular Ca²⁺ level; glutamate; PC-12

抑郁症是以情绪低落、快感缺失、意志活动减退且伴有认知障碍为特征的一种常见的精神障碍疾病, 具有高致残率、高复发率和高自杀率等

特点, 造成了严重的健康和社会经济问题^[1]。目前临床应用的抗抑郁药物如选择性 5-HT 再摄取抑制剂、三环类抗抑郁药等具有起效慢、缓解率低及

基金项目: 国家重点研发计划中医药现代化研究重点专项(2017YFC1702800); 河南省重大科技专项项目(171100310500); 河南省高层次人才特殊支持计划“中原千人计划”-中原领军人才(ZYQR201810080); 河南省教育厅河南省科技攻关项目(212102311106); 河南省中医药科学研究专项课题(20-21ZY2151)

作者简介: 卢仁睿, 女, 硕士 E-mail: 13203703171@163.com
郑晓珂, 女, 博士, 教授 E-mail: zhengxk.2006@163.com

***通信作者:** 冯卫生, 男, 博士, 教授 E-mail: fwsh@hactcm.edu.cn

复发率高的缺点^[2]。因此寻找新的安全有效的抗抑郁药物是目前临床抑郁症研究的热点。

本实验室在前期对地黄进行抗抑郁活性成分筛选时,发现桃叶珊瑚苷对慢性不可预知刺激的小鼠的抑郁样行为有明显的改善作用。桃叶珊瑚苷是一种天然的环境萜苷化合物,于1905年首次在东瀛珊瑚(*Aucuba japonica*)的叶中发现^[3],后来发现其在天然植物中分布十分广泛,在杜仲、玄参、地黄和车前草等植物中尤其丰富。查阅文献发现,桃叶珊瑚苷具有较好的药理活性,Wang等^[4]发现桃叶珊瑚苷能通过诱导自噬和抑制坏死性凋亡而改善癫痫状态;陈东等^[5]研究发现桃叶珊瑚苷能通过上调 miR-374 表达改善高糖诱导的肾小管上皮细胞炎症损伤;Li等^[6]实验研究得到桃叶珊瑚苷能通过 Nrf2/HO-1 通路对人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞中过氧化氢诱导的毒性的神经保护作用;马智慧等^[7]发现桃叶珊瑚苷可以抑制 A β_{25-35} 诱导的神经突起萎缩和神经元凋亡,具有治疗阿尔兹海默病的潜在药理活性。除此之外,桃叶珊瑚苷还参与抑制神经炎症和调节神经传递^[8],能通过抗氧化来改善骨质疏松症^[9],且具有抑制海马神经元细胞凋亡^[10]的作用。但是目前为止尚未有桃叶珊瑚苷抗抑郁或者抑制谷氨酸诱导的兴奋性神经毒性的相关文献报道,因此本实验主要研究桃叶珊瑚苷对谷氨酸诱导的 PC-12 细胞损伤的修复作用,并初步探讨其对抑郁的作用以及可能的作用机制。

1 仪器与试剂

1.1 细胞株

大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞 PC-12,购买于中科院上海细胞库。在 RPMI-1640(含 10%FBS)培养液中培养,放置于含有 5%CO₂ 的 37℃ 恒温培养箱中培养。当细胞量达到 70%~80%时即进行传代,取对数生长期的细胞进行实验。

1.2 仪器

Centrifuge-5810 离心机(德国 Eppendorf); AB204-N 万分之一精密分析天平(瑞典 MettlerToledo);微量加样器(德国 Eppendorf); OdysseyCLx 双色红外激光成像系统(美国 LI-COR); Forma3111 细胞培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific); iMark 酶标仪(美国 Bio-Rad); Arium611VF 型超纯水仪(德国 Sartorius); HVA-85 全自动高压灭菌锅(上海申安医疗器械厂); ECLIPSETS100 倒置显微镜(日本 Nikon);

BDFACSAria III 流式细胞仪(美国 BD); SW-CJ-2FD 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司)。

1.3 药物与试剂

桃叶珊瑚苷(成都普思生物科技股份有限公司,批号:PS020259;纯度:99.87%);超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)检测试剂盒、丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)检测试剂盒(批号分别为 20200514, A00312, 20200516)均购自南京建成生物工程研究所;活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号:20291220);细胞膜可渗透钙离子检测试剂盒(上海翊圣生物科技有限公司,批号:F0930021);盐酸氟西汀分散片(法国 PATHEONFRANCE,批号:7298A);谷氨酸(美国 Sigma-Aldrich,批号:090M0237V);RPMI-1640 培养基(美国 Gibco,批号:2110284);胎牛血清(FBS)(杭州四季青生物工程研究所,批号:20010502);二甲基亚砜(DMSO)、胰酶(批号分别为 1213C0215, T1350)均购自北京 Solarbio; MTT(美国 Genviue,批号:9523010150);NMDA 一抗、 β -actin(货号分别为 A11699, AC004),均购自 ABclonal;羊抗兔二抗、羊抗鼠二抗(货号分别为 C80911-11, C80816-10),均购自德国 Licor;其他试剂均为进口或国产分析纯。

2 方法

2.1 MTT 法检测细胞活力

将处于对数生长期的 PC-12 细胞接种于 96 孔板中,以 4×10^4 cell·mL⁻¹ 为种板密度,每孔 200 μ L,放入培养箱培养 1 d(24 h)后,分为正常对照组、模型组、阳性组和桃叶珊瑚苷不同剂量组。正常对照组在 RPMI-1640 培养基中培养,模型组给予 20 mmol·L⁻¹ 的谷氨酸(glutamic acid, Glu),阳性组是在模型组的基础上给予 0.3 μ mol·L⁻¹ 的氟西汀(flouxetine, FLX),桃叶珊瑚苷(aucubin, AUC)不同剂量组是在模型组的基础上分别给予 1, 5, 10, 20, 40 μ mol·L⁻¹ 的桃叶珊瑚苷,处理 24 h 后,每孔加入 20 μ L 5mg·mL⁻¹ 的 MTT,放入培养箱中继续培养,4 h 后用酶标仪检测 490 nm 处吸光度(OD),计算细胞活力(细胞活力=测量组 OD 值/正常对照组平均 OD 值 $\times$ 100%)。

2.2 细胞膜可渗透 Ca²⁺检测

将处于对数生长期的 PC-12 细胞以每毫升 8×10^4 个细胞的种板密度接种于 6 孔板中,在给药

处理 24 h 后, 弃去上清, 使用 HBSS 溶液洗涤细胞 3 次, 加入 Fluo-4, AM 工作液(Fluo-4, AM : HBSS=1 : 250)覆盖细胞, 在 37 °C 培养箱中孵育 0.5 h, 再用 HBSS 溶液洗涤细胞 3 次, 充分去除残留的 Fluo-4, AM 工作液, 然后加入 HBSS 覆盖细胞, 在 37 °C 培养箱中孵育 20~30 min, 确保 AM 基团在细胞内的完全去酯化作用, 在流式细胞仪上使用 494 nm 激发波长, 516 nm 发射波长对细胞内 Ca^{2+} 含量进行检测。

2.3 NMDAR1 蛋白检测

将处于对数生长期的 PC-12 细胞以每毫升 4×10^4 个细胞的密度接种于 96 孔板中, 给药处理 24 h 后, 吸取上清, 用 3.7% 的甲醛(每孔 150 μL)固定 20 min 后, 吸净孔内液体, 加入 0.1% 的 Triton (每孔 200 μL)透化 5 次, 再用 5% 的 BSA(脱脂奶粉)封闭 1.5 h, 加入一抗(每孔 50 μL)NMDAR1, 4 °C 过夜孵育后室温平衡 30 min, 用含吐温-20 的磷酸盐缓冲液 PBST 洗 5 次, 每次 5 min, 二抗(每孔 50 μL)孵育 1 h, 用 PBST 洗 4 遍, 磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered solution, PBS)洗 1 遍后显影。最后用 Odyssey CLx 双色红外激光成像系统扫描结果。

2.4 ROS 检测

将处于对数生长期的 PC-12 细胞以 $8 \times 10^4 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的种板密度接种于 6 孔板中, 在给药处理 24 h 后, 弃去孔内培养基, 每孔用 2 mL RPMI-1640 培养液清洗 1 次后, 加入 1 mL 新鲜配制好的 DCFH-DA 荧光探针, 37 °C 培养箱内孵育 20 min, 培养液再洗涤 2 次, 以清除未进入细胞内的 DCFH-DA, 之后每孔加入 600 μL 的胰酶消化 1 min, 弃去胰酶, 加入 500 μL PBS 小心吹打收集细胞, 以 $211 \times g$, 离心 5 min, 弃去上清, 加 500 μL 的 PBS 进行重悬后转移到流式管内, 在流式细胞仪上使用 488 nm 激发波长, 525 nm 发射波长对荧光强弱进行检测。

2.5 SOD、MDA、LDH 检测

按“2.2”项下方法进行细胞处理及分组, 给药 24 h 后, 按照试剂盒操作说明书进行处理, 孵育后测各样品吸光度值, 计算各组 SOD、MDA、LDH 的水平。

2.6 统计方法

采用 SPSS 26.0 统计软件, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间数据采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 认

为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 桃叶珊瑚苷对谷氨酸诱导后的 PC-12 细胞活力的影响

与正常对照组比较, 模型组细胞活力极显著降低($P < 0.01$); 与模型组相比, 5, 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的桃叶珊瑚苷组细胞的活力有显著提升($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 其中, 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 桃叶珊瑚苷能极显著提升谷氨酸诱导后损伤的 PC-12 细胞活力($P < 0.01$), 因此, 后续实验中选择 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 桃叶珊瑚苷进行实验研究。结果见图 1。

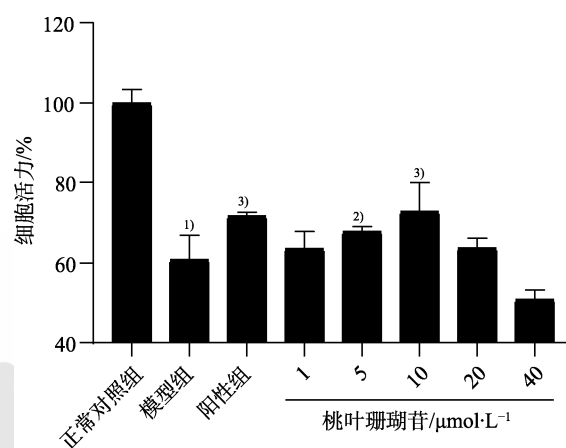


图1 桃叶珊瑚苷对谷氨酸诱导后的PC-12细胞活力的影响与正常对照组比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 1 Effect of aucubin on the viability of PC-12 cells after glutamate induction

Compared with normal control group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with model group, ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$.

3.2 桃叶珊瑚苷对谷氨酸诱导后的 PC-12 细胞膜 Ca^{2+} 含量的影响

与正常对照组比较, 模型组细胞膜上的 Ca^{2+} 水平极显著升高($P < 0.01$); 与模型组相比, 桃叶珊瑚苷组细胞膜上 Ca^{2+} 水平极显著降低($P < 0.01$), 表明桃叶珊瑚苷能明显抑制谷氨酸诱导后 PC-12 细胞膜上的 Ca^{2+} 含量升高, 抑制 Ca^{2+} 内流。结果见图 2。

3.3 桃叶珊瑚苷对谷氨酸诱导后的 PC-12 细胞中 NMDAR1 含量的影响

与正常对照组比较, 模型组细胞中的 NMDAR1 水平极显著升高($P < 0.01$); 与模型组相比, 桃叶珊瑚苷组细胞中的 NMDAR1 水平极显著降低, 表明桃叶珊瑚苷能明显抑制谷氨酸诱导后 PC-12 细胞中的 NMDAR1 水平升高。结果见图 3。

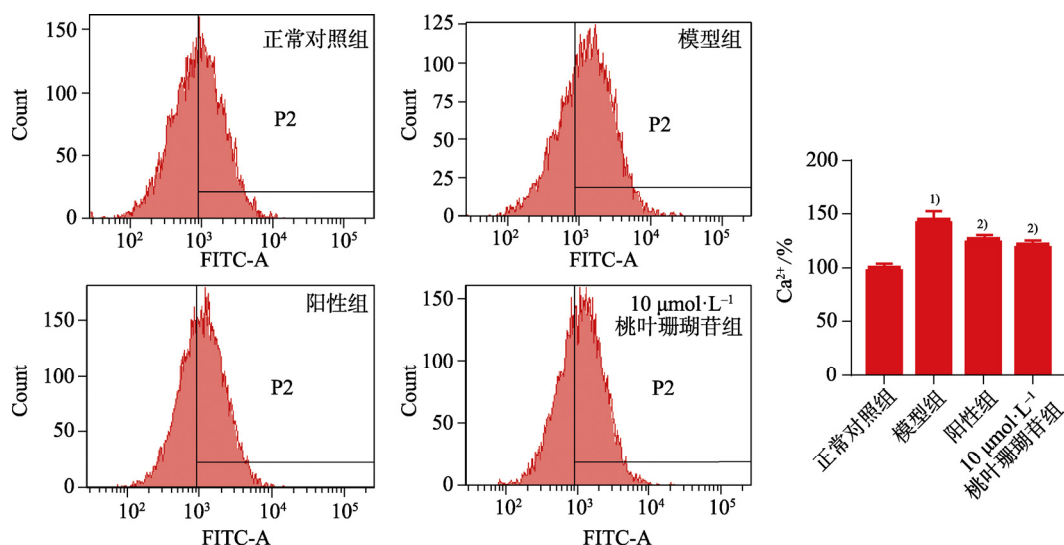


图2 桃叶珊瑚苷对谷氨酸诱导后的 PC-12 细胞膜 Ca^{2+} 含量的影响
与正常对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 2 Effect of aucubin on the Ca^{2+} content of PC-12 cell membrane after glutamate induction
Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.01$.

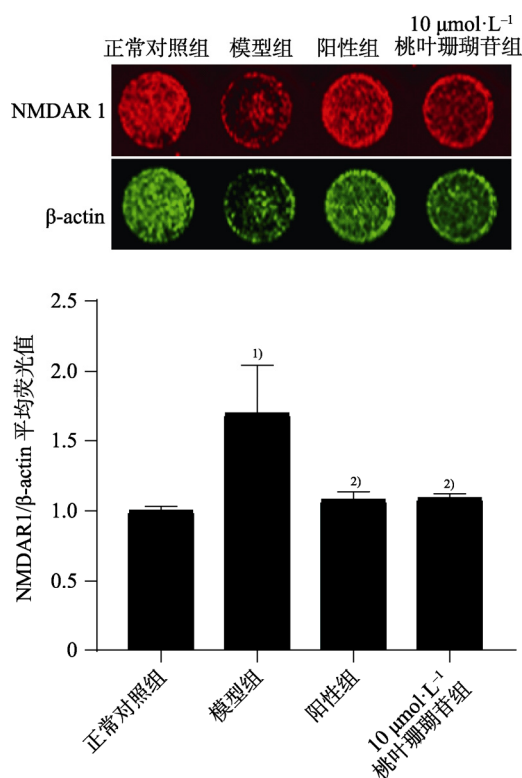


图3 桃叶珊瑚苷对谷氨酸诱导后的 PC-12 细胞中 NMDAR1 含量的影响
与正常对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 3 Effect of aucubin on NMDAR1 content in PC-12 cells after glutamate induction
Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.01$.

3.4 桃叶珊瑚苷对谷氨酸诱导后的 PC-12 细胞中 ROS 含量的影响

与正常对照组比较, 模型组细胞中的 ROS 水

平极显著升高($P<0.01$); 与模型组相比, 桃叶珊瑚苷组细胞中的 ROS 水平极显著降低($P<0.01$), 表明桃叶珊瑚苷能有效改善谷氨酸诱导后 PC-12 细胞中出现的高 ROS 状态, 降低细胞 ROS 水平, 缓解细胞损伤。结果见图 4。

3.5 桃叶珊瑚苷对谷氨酸诱导后的 PC-12 细胞中 SOD、MDA、LDH 含量的影响

与正常对照组比较, 模型组细胞中的 SOD 水平极显著降低($P<0.01$), MDA 和 LDH 水平极显著升高($P<0.01$); 与模型组相比, 桃叶珊瑚苷组细胞中的 SOD 水平极显著升高($P<0.01$), MDA 水平降低, LDH 水平极显著降低($P<0.01$)。表明桃叶珊瑚苷能有效提升谷氨酸诱导后 PC-12 细胞中的 SOD 水平, 并有效抑制谷氨酸诱导后 PC-12 细胞中的 MDA 和 LDH 水平, 缓解细胞损伤。结果见图 5。

4 讨论

谷氨酸是一种广泛分布于中枢神经系统中的兴奋性神经递质, 谷氨酸受体在神经传递、神经元兴奋性, 递质释放和长期突触可塑性中起重要作用^[11]。当抑郁发生时, 机体内会产生大量的谷氨酸堆积, 高浓度的谷氨酸会过度激活 NMDA 或 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸受体 (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptor, AMPA), 导致神经元损伤, 产生神经毒性^[12]。研究发现, 抑郁症患者血浆、脑脊液中谷氨酸水平明显增高, 与抑郁症状的严重程度密切相关^[13]。且动物实验显示, 抑郁模型

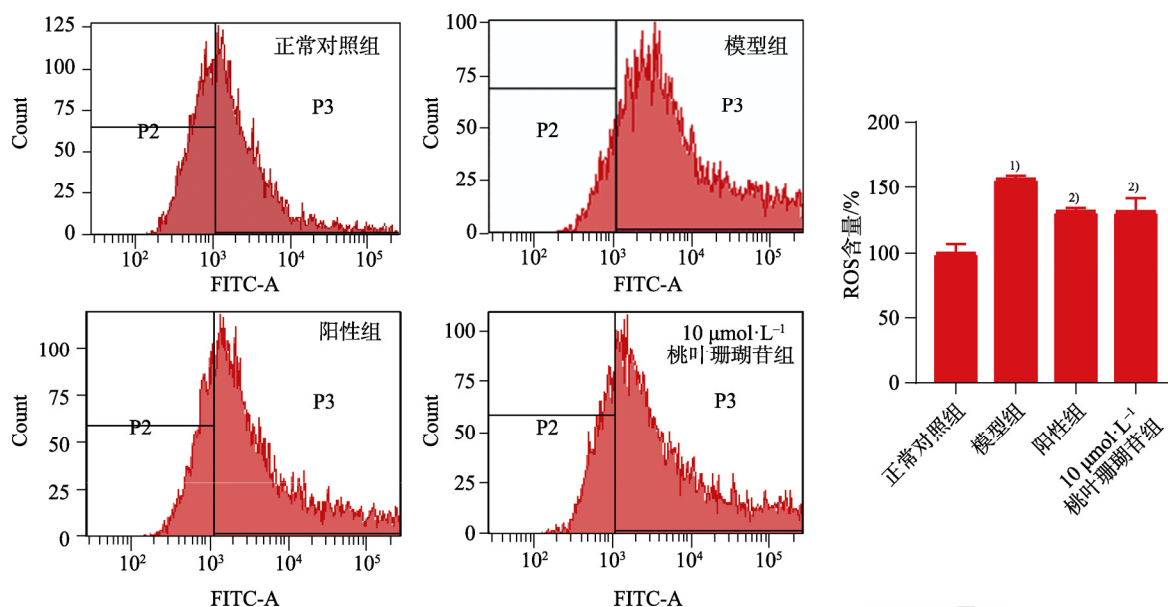


图4 桃叶珊瑚苷对谷氨酸诱导后的PC-12细胞中ROS含量的影响
与正常对照组比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 4 Effect of aucubin on ROS content in PC-12 cells after glutamate induction
Compared with normal control group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with model group, ²⁾ $P < 0.01$.

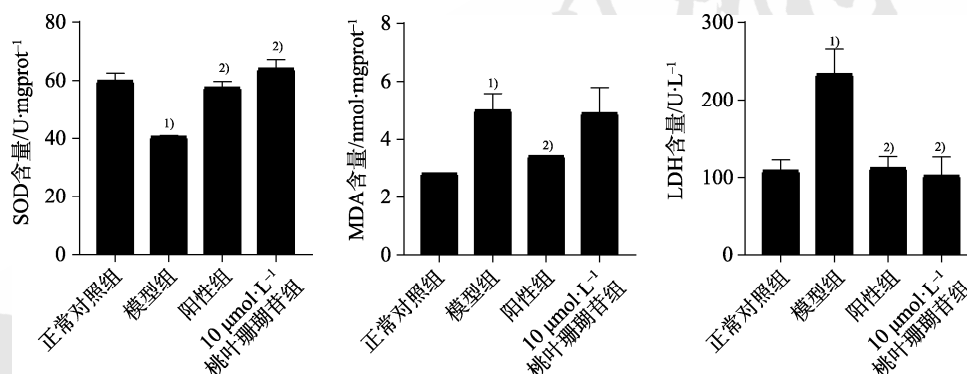


图5 桃叶珊瑚苷对谷氨酸诱导后的PC-12细胞中SOD、MDA、LDH含量的影响
与正常对照组比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 5 Effect of aucubin on the levels of SOD, MDA, LDH in PC-12 cells after glutamate induction
Compared with normal control group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with model group, ²⁾ $P < 0.01$.

大鼠体内谷氨酸代谢异常^[14]。同时,谷氨酸受体拮抗剂也具有成为一线抗抑郁药的潜力,研究发现静脉注射亚麻醉剂量非选择性NMDAR拮抗剂氯胺酮具有快速且持久的抗抑郁作用^[1]。综合说明,谷氨酸过度堆积引起的兴奋性神经毒性在抑郁症的发生与发展中具有重要意义。PC-12是大鼠肾上腺髓质嗜铬瘤细胞,具有神经内分泌细胞的一般特征,在抑郁症研究中应用广泛^[15]。因此,本实验采用谷氨酸诱导PC-12细胞建立体外抑郁模型来进行桃叶珊瑚苷抗抑郁的药理作用研究,判断对抗谷氨酸诱导的兴奋性神经损伤是否是它作用机制之一。本实验中选择24 h作为后续指标的检测时间,在细胞接受谷氨酸刺激后,细

胞内ROS水平增高、钙离子含量增加,导致细胞兴奋性毒性,进而诱导细胞死亡。因此在细胞凋亡阶段,即MTT明显观察到细胞活力受损结合流式检测到凋亡率升高时,细胞内氧化应激以及钙离子水平已经出现紊乱,导致凋亡,因此凋亡发生的阶段可以同时观察到细胞内氧化应激水平的升高以及钙离子水平的升高。结果显示,20 mmol·L⁻¹谷氨酸作用24 h可使体外培养的PC-12细胞活力明显下降($P < 0.01$),细胞内Ca²⁺,NMDAR1蛋白水平和氧化应激水平明显增加($P < 0.01$),可成功建立兴奋性神经损伤模型。

NMDA受体是Glu受体的主要亚型,谷氨酸受体的长期激活会引发一系列神经毒性。研究指

出, NMDA 受体是 Ca^{2+} 流入细胞的主要途径, 谷氨酸的兴奋毒性主要通过过度刺激 NMDAR 受体导致的钙超载而引起^[16]。在静息电位状态下, NMDAR 通道被 Mg^{2+} 阻滞, 功能受到抑制, 当突触后膜去极化, 谷氨酸和甘氨酸激动剂与 NMDAR 相应位点结合后, NMDAR 通道开放, 膜两侧 Na^+ 和 K^+ 通透性升高, 膜两侧产生兴奋性突触后电位, 同时也使 Ca^{2+} 通透性增加, Ca^{2+} 大量进入细胞内, 作为第二信使激活 Ca^{2+} 依赖酶, 引起细胞内生理效应的变化, 最终导致神经细胞死亡并产生强兴奋毒性^[17]。因此, 本实验对 NMDAR1 含量以及细胞内 Ca^{2+} 水平进行检测, 发现谷氨酸造模后, 细胞中 NMDAR1 受体的含量明显上升, Ca^{2+} 水平也明显上升, 而桃叶珊瑚苷能明显抑制受损细胞中的 NMDAR1 受体水平, 并进一步降低 Ca^{2+} 的内流, 缓解 PC-12 细胞损伤。

谷氨酸通过过度刺激 NMDAR 受体导致钙超载, 而过量的 Ca^{2+} 沉积在线粒体, 干扰线粒体呼吸链功能, 会导致氧自由基生成增多^[18]。已有研究报道, 抑郁症的发生与氧化应激损伤关系密切^[19]。抑郁模型小鼠海马的 ROS 水平显著升高, 给予药物治疗后, 小鼠抑郁行为改善, ROS 水平显著下降^[20]。SOD 是体内重要的抗氧化酶, 能有效清除机体自由基; MDA 是脂质过氧化的代谢产物, 在脑内大量堆积时可通过蛋白质一级氨基基团反应与蛋白质交联, 破坏胞膜脂质双分子层, 导致细胞通透性改变, 最终引起神经元的变性、凋亡^[21]。临床研究发现, 抑郁患者体内 SOD 活性降低, 而 MDA 含量升高, 给予治疗后能有效改善这一变化^[22]。张聪等^[23]实验发现大鼠在经过 6 周的应激之后, 海马内 ROS 水平升高, SOD 酶活性下降, 表明海马出现了明显的氧化应激损伤。此外, ROS 水平异常反过来又进一步引起线粒体功能障碍, 过量的 ROS 可激活线粒体的透化作用, 释放线粒体关键酶, 进而影响线粒体的整体功能, 使线粒体的产能作用降低, 导致中枢神经系统供能不足, 造成中枢神经损伤, 最终加重抑郁症的发生发展^[24]。因此, 本实验对细胞的 ROS、SOD 和 MDA 水平进行了检测, 结果显示, 谷氨酸造模后, 细胞的 ROS 和 MDA 水平明显上升, SOD 水平明显下降, 细胞出现氧化应激损伤, 而桃叶珊瑚苷处理后能明显降低受损细胞中的 ROS 水平, 升高 SOD 水平, 改善氧化损伤, 但对 MDA

水平没有明显的改善作用, 还需进行进一步的研究。除此之外, LDH 是一种细胞质酶, 可迅速释放到细胞培养基中, 培养基中的 LDH 泄漏是检测细胞毒性的证据之一^[25]。本实验的 LDH 实验结果和 MTT 实验结果相互印证, 可以辅助验证桃叶珊瑚苷能明显提升谷氨酸诱导损伤的细胞的存活率, 并降低细胞毒性, 改善细胞状态。

综上所述, 桃叶珊瑚苷能够通过抑制谷氨酸受体 NMDAR1 的水平和抑制氧化应激来改善谷氨酸兴奋毒性, 进而改善谷氨酸诱导的 PC-12 细胞损伤, 具有治疗抑郁症的潜在活性。除此之外, 谷氨酸受体的过度激活还与多种神经性疾病的病理过程密切相关^[3], 因此推测桃叶珊瑚苷用于其他神经损伤或神经退行性疾病的治疗, 例如缺血脑卒中、癫痫、阿尔兹海默病、精神病等, 值得进一步研究与开发。

REFERENCES

- [1] QIN Y, SONG W Y, LIANG Z H, et al. Progress in research on signal pathway related to antidepressant action of ketamine[J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2021, 56(22): 1791-1795.
- [2] WANG X J, XIA X W, MA M Y, et al. Study on antidepressant effect of rutin based on pathological mechanism of depression[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), (2022-07-15). <http://kns.cnki.net/dres/hactcm.edu.cn/kcms/detail/33.1210.R.20220614.1328.010.html>.
- [3] ZENG X C, GUO F, OUYANG D S. A review of the pharmacology and toxicology of aucubin[J]. Fitoterapia, 2020(140): 104443.
- [4] WANG J, LI Y, HUANG W H, et al. The protective effect of aucubin from *Eucommia ulmoides* against status epilepticus by inducing autophagy and inhibiting necroptosis[J]. Am J Chin Med, 2017, 45(3): 557-573.
- [5] CHEN D, JIANG Z X, ZHANG J, et al. The mechanism of aucubin up-regulating the expression of miR-374 to inhibit high glucose-induced inflammatory injury of renal tubular epithelial cells[J]. Med J West China(西部医学), 2022, 34(2): 173-177.
- [6] LI Y C, HAO J C, SHANG B, et al. Neuroprotective effects of aucubin on hydrogen peroxide-induced toxicity in human neuroblastoma SH-SY₅Y cells via the Nrf2/HO-1 pathway[J]. Phytomedicine, 2021(87): 153577.
- [7] MA Z H, YANG Z Y. The protective effect of aucubin on A β ₂₅₋₃₅-induced neurite atrophy and neuronal apoptosis[J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2020, 36(10): 1391-1396.
- [8] CHEN S Y, ZENG X C, ZONG W J, et al. Aucubin alleviates seizures activity in Li-pilocarpine-induced epileptic mice: Involvement of inhibition of neuroinflammation and regulation of neurotransmission[J]. Neurochem Res, 2019, 44(2): 173-177.

- 472-484.
- [9] ZHANG Y F, LIU X, LI Y Y, et al. Aucubin slows the development of osteoporosis by inhibiting osteoclast differentiation via the nuclear factor erythroid 2-related factor 2-mediated antioxidation pathway[J]. *Pharm Biol*, 2021, 59(1): 1556-1565.
- [10] SONG M, KIM H, PARK S, et al. Aucubin promotes differentiation of neural precursor cells into GABAergic neurons[J]. *Exp Neurobiol*, 2018, 27(2): 112-119.
- [11] LIU X, HONG H. Progress in studies of glutamate-glutamine cycle in the pathogenesis depression[J]. *Pharm Tod(今日药学)*, 2022, 32(3): 206-210.
- [12] GONÇALVES-RIBEIRO J, PINA C C, SEBASTIÃO A M, et al. Glutamate transporters in hippocampal LTD/LTP: Not just prevention of excitotoxicity[J]. *Front Cell Neurosci*, 2019(13): 357.
- [13] LIAO J W, WANG S S, YANG H H, et al. Levels of serum glutamate and gamma-aminobutyric acid system in patients with depression[J]. *Chin Ment Health J(中国心理卫生杂志)*, 2020, 34(2): 87-91.
- [14] ZHAO Q, WANG A N, GAO X S, et al. Research progress in depression-like rat model induced by chronic unpredictable mild stress[J]. *Lab Animal Comp Med(实验动物与比较医学)*, 2020, 40(4): 344-353.
- [15] MO H X, ZHANG R, WANG K, et al. Study on the mechanism of serum containing Sini San on CaSR of PC12 cells injured by corticosterone[J]. *Chin J Integr Tradit West Med(中国中西医结合杂志)*, 2022, 42(2): 187-194.
- [16] LI C Y, ZHAO H Q, YANG H, et al. Research progress on excitotoxicity of glutamate and its modulators[J]. *Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报)*, 2022(5): 645-649.
- [17] JIA Y, LIU Z C, WANG M Y, et al. Research progress of antidepressants targeting NMDAR[J]. *Chin J Med Chem(中国药物化学杂志)*, 2020, 30(8): 502-508.
- [18] GONG J J, LI Q Q, WANG P, et al. Molecular mechanisms and drug targets of Parkinson's disease associated with mitochondrial damage[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2021, 38(13): 1647-1658.
- [19] 朴兴强, 胡建. 抑郁障碍与氧化应激及其生物标志物的研究进展[J]. *神经损伤与功能重建*, 2021, 16(12): 740-742.
- [20] SHEN F M, SONG Z J, XIE P, et al. *Polygonatum sibiricum* polysaccharide prevents depression-like behaviors by reducing oxidative stress, inflammation, and cellular and synaptic damage[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021(275): 114164.
- [21] WANG Y Q, WANG Y H, ZOU M S, et al. Research progress on antidepressant effect and mechanism of quercetin and its glycoside derivatives[J]. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2022, 53(5): 1548-1557.
- [22] LV Q Y, HU Q Y, ZHANG W Z, et al. Disturbance of oxidative stress parameters in treatment-resistant bipolar disorder and their association with electroconvulsive therapy response[J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2020, 23(4): 207-216.
- [23] ZHANG C, HU C X, LI S H, et al. Anti-depressant effects of puerarin on depression induced by chronic unpredictable mild stress in rats[J]. *Acta Pharm Sin(药学报)*, 2018, 53(2): 220-226.
- [24] LIU S B, LINGHU T, GAO Y, et al. The key role of mitochondrial energy metabolism disorder in the pathogenesis of depression[J]. *Acta Pharm Sin(药学报)*, 2020, 55(2): 195-200.
- [25] GE K M, WANG W, XUE W D, et al. Neuroprotective effect of modified Yuejuwan and Ganmai Dazao Tang on glutamate-induced HT22 cell injury model[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志)*, 2019, 25(12): 22-27.

收稿日期: 2022-05-16

(本文责编: 陈怡心)