

文章编号:1001-6880(2014)7-1072-06

# 干鲜人参对PC12细胞损伤保护作用的比较研究

姜宇懋<sup>1,2</sup>,李宗阳<sup>2</sup>,刘新民<sup>2</sup>,常琪<sup>2</sup>,张晶<sup>1\*</sup>,潘瑞乐<sup>2\*</sup><sup>1</sup>吉林农业大学中药材学院,长春130118;<sup>2</sup>中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所,北京100193

**摘要:**分别建立皮质酮、谷氨酸、过氧化氢诱导PC12细胞损伤模型,通过MTT和LDH测定,比较不同浓度的干、鲜人参水提液对于皮质酮、谷氨酸、过氧化氢诱导PC12细胞损伤的保护作用。结果表明皮质酮浓度为200 μmol/L、谷氨酸浓度为30 mmol/L和过氧化氢浓度为150 μmol/L时,PC12细胞的存活率分别为:53.42%、49.64%、54.27%,当PC12细胞与不同浓度人参提取液共同孵育24 h,再分别加入200 μmol/L的皮质酮和150 μmol/L的过氧化氢时,与模型组相比,细胞存活率明显提高,乳酸脱氢酶的释放明显减少( $P < 0.01$ );并且在中、高剂量组,鲜人参组的细胞存活率明显高于干人参组( $P < 0.01$ ),乳酸脱氢酶释放明显低于干人参组( $P < 0.01$ );但对谷氨酸诱导的PC12细胞损伤则无上述效果。干、鲜人参水提液对于皮质酮、过氧化氢诱导损伤的PC12细胞均有明显的保护作用;在中、高剂量时,鲜人参水提液对细胞保护活性明显好于干人参组,且组间表现出显著性差异( $P < 0.01$ ),表明鲜人参较干人参具有更好的细胞保护活性。干、鲜人参水提液对谷氨酸诱导损伤的PC12细胞却无保护活性。

**关键词:**鲜人参;干人参;PC12细胞;皮质酮;谷氨酸;过氧化氢;MTT;LDH

中图分类号:R964

文献标识码:A

## Comparative Study on Neuroprotective Effect of Dry and Fresh *Panax ginseng* Against the Damage in PC12 Cells

JIANG Yu-mao<sup>1,2</sup>, LI Zong-yang<sup>2</sup>, LIU Xin-min<sup>2</sup>, CHANG Qi<sup>2</sup>, ZHANG Jing<sup>1\*</sup>, PAN Rui-le<sup>2\*</sup><sup>1</sup>Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; <sup>2</sup>Institute of Medicinal Plant, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

**Abstract:** In this study, the PC12 cell damage model was induced by corticosterone, glutamic acid and hydrogen peroxide, respectively. The protective effect of different concentrations of water extracts of dry and fresh *Panax ginseng* on corticosterone-induced, glutamic acid-induced and hydrogen peroxide-induced damage in PC12 cells was determined by MTT and lactate dehydrogenase (LDH) assays. The results showed that the cell survival rates were 53.42%, 49.64% and 54.27%, when PC12 cells were exposed to 200 μmol/L corticosterone, 30 mmol/L glutamic acid and 150 μmol/L hydrogen peroxide, respectively. When PC12 cells were incubated with different concentrations of water extract of *P. ginseng* for 24 h, then exposed to 200 μmol/L corticosterone and 150 μmol/L hydrogen peroxide, the cell survival rate was significantly increased compared with the model group, and the release of LDH was significantly reduced ( $P < 0.01$ ); the cell viability of fresh *P. ginseng* group was obvious higher than that of dry *P. ginseng* group ( $P < 0.01$ ). The LDH release amount of fresh *P. ginseng* group (both medium and high doses) was significantly lower than that of dry *P. ginseng* group ( $P < 0.01$ ). However, no protective effect in glutamic acid-induced injury model was detected. Water extracts of dry and fresh *P. ginseng* had apparent protective effect on corticosterone-induced and hydrogen peroxide-induced damage in PC12 cells; in the medium and high dose groups, cytoprotective activity of water extract of fresh *P. ginseng* was significantly better than that of dry *P. ginseng* group ( $P < 0.01$ ). All the above results revealed that fresh *P. ginseng* had better cytoprotective activity than dry *P. ginseng*. Water extracts of dry and fresh *P. ginseng* had no protective effect on glutamate-induced injury in PC12 cells.

收稿日期:2013-10-22 接受日期:2014-02-24

基金项目:国际合作课题:人参益智药效与基因/蛋白表达谱关联  
规律合作研究项目(2011DFA32730);保健中药风险效益评估合作研究项目(1108)

\*通讯作者 Tel:86-431-84532803; E-mail:zhjing0701@sina.com; rlp@implad.ac.cn

**Key words:** fresh ginseng; dry ginseng; PC12 cells; corticosterone; glutamic acid; hydrogen peroxide; MTT; LDH

人参(*Panax ginseng*)是大补元气,安神益智的传统中药,其应用已超过2000年的历史。现代研究

表明人参提取物及其活性成分具有明显的抗抑郁、抗老年性痴呆等中枢神经活性<sup>[1,2]</sup>。由于抑郁症和老年性痴呆最终都会引起海马神经元树突回缩、神经元生成受抑、神经突触可塑性遭破坏和神经元死亡,导致海马萎缩,体积缩小等<sup>[3,4]</sup>。因此,神经细胞保护是抗抑郁、抗老年性痴呆药物共同的作用机理。干燥人参提取物及其活性成分对神经细胞保护作用的研究已有很多报道<sup>[5,6]</sup>。但目前对鲜人参的研究报道却很少。本文拟建立皮质酮、谷氨酸和过氧化氢诱导大鼠嗜铬细胞瘤(PC12)细胞损伤模型,比较干燥和新鲜人参水提液对三种PC12细胞损伤的保护活性,从细胞水平上评价干燥和新鲜人参水提液对神经细胞保护作用的差异,为参资源的合理开发利用及开发抑郁和老年性痴呆疾病的药物研究提供参考依据。

## 1 材料

### 1.1 药材与试剂

人参(吉林省抚松县);大鼠嗜铬细胞瘤PC12细胞(协和细胞中心);DMEM高糖培养基(Hyclone公司);胰蛋白酶、PBS(Solarbio公司);精制胎牛血清(Gibco公司);马血清(元亨金马公司);谷氨酸(Amresco公司);MTT(噻唑蓝)、皮质酮、过氧化氢、DMSO(Sigma公司);LDH检测试剂盒(STANBIO, USA)。

### 1.2 仪器

超净工作台(HDL公司);CO<sub>2</sub>培养箱(Thermo公司);XD-101型倒置显微镜(Olympus, Tokyo);连续波长酶标仪(BIOTEK公司);离心机(湖南湘仪,H-1850R);纯水仪(美国Millipore公司)。

## 2 实验方法

### 2.1 样品制备

将整株鲜人参平均分成重量相等的二部分,切成薄片。其中一份置于60℃烘箱中烘干至恒重,另一份置-20℃冰箱保存作鲜参用。将干、鲜人参片各10g分别置于250mL圆底烧瓶中,然后再加入200mL蒸馏水。于30℃超声仪中提取1h,过滤,残渣用蒸馏水清洗三次,合并滤液,定容于250mL容量瓶中,供实验用。试验液相当于0.04g干人参/mL。

### 2.2 PC12细胞培养

PC12细胞采用含10%胎牛血清,5%马血清,

青霉素100U/mL,链霉素100U/mL的DMEM培养液。在37℃,5%CO<sub>2</sub>饱和湿度的孵箱中培养,每2~3d换液1次,待细胞进入对数生长期到70%~80%融合,用0.25%胰酶消化约2min(37℃效果最佳),1000rpm离心4min,弃去上清液,培养重悬细胞,以1:3的比例传代。

### 2.3 PC12细胞损伤模型的建立

#### 2.3.1 皮质酮诱导PC12细胞损伤模型的建立

取对数生长期的PC12细胞,以1×10<sup>5</sup>/mL的密度接种于96孔板中,每孔100μL,放入37℃,5%CO<sub>2</sub>培养箱中孵育24h后,分别加入终浓度为6.25、12.5、25、50、100、200、400μmol/L的皮质酮处理,培养24h后,MTT法检测细胞活力,利用酶标仪在570nm处测定各组细胞吸光度A值。细胞存活率=A处理组/A对照组×100%。

#### 2.3.2 谷氨酸诱导PC12细胞损伤模型的建立

取对数生长期PC12细胞,以1×10<sup>5</sup>/mL的密度接种于96孔板中,每孔100μL,放入37℃,5%CO<sub>2</sub>培养箱中孵育24h后,分别加入终浓度为5、10、15、20、25、30、35mmol/L的谷氨酸处理,培养24h后,MTT法检测细胞活力。利用酶标仪在570nm处测定各组细胞吸光度A值。细胞存活率=A处理组/A对照组×100%。

#### 2.3.3 过氧化氢诱导PC12细胞损伤模型的建立

取对数生长期PC12细胞以1×10<sup>5</sup>/mL的密度接种于96孔板中,每孔100μL,放入37℃,5%CO<sub>2</sub>培养箱中孵育24h后,分别加入终浓度为50、100、150、200、250、300、400μmol/L的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理,培养24h后,MTT法检测细胞活力。利用酶标仪在570nm处测定各组细胞吸光度A值。细胞存活率=A处理组/A对照组×100%。

### 2.4 细胞培养与处理

取对数生长期的PC12细胞以1×10<sup>5</sup>/mL的密度接种于96孔板中,每孔100μL,放入37℃,5%CO<sub>2</sub>培养箱中孵育24h后,分为10组(对照组,模型组,4个干人参水提液组,4个鲜人参水提液组),每组4个复孔。对照组仅加入100μL DMEM培养液;三个模型组分别加入200μmol/L的皮质酮、30mmol/L的谷氨酸、150μmol/L的过氧化氢;干、鲜人参4个剂量组浓度分别为0.125、0.25、0.5、1.0mg/mL(以干人参重量计),首先加入不同浓度干、鲜人参水提取液培养24h,然后与模型组相同处理,各组继续培养24h,然后用MTT法检测细胞存活

率。利用酶标仪在 570 nm 处测定各组细胞吸光度 A 值。细胞存活率 = A 处理组/A 对照组 × 100%。

## 2.5 乳酸脱氢酶活性测定

PC12 细胞以  $1 \times 10^5$ /mL 的密度接种于 6 孔板中, 每孔 2 mL, 培养 24 h 后加入不同浓度的干、鲜人参水提液作用 24 h, 最后加入浓度为 200  $\mu\text{mol}/\text{L}$  的皮质酮、30  $\text{mmol}/\text{L}$  的谷氨酸和 150  $\mu\text{mol}/\text{L}$  过氧化氢损伤细胞 24 h, 收集培养细胞上清液, 按照说明书的方法测定 LDH 活性。

## 2.6 统计学处理

每个实验至少重复 5 次, 测定值以  $\bar{x} \pm s$  表示, 运用 SPSS16.0 分析软件处理数据, 采用单因素 ANOVA(方差分析)方法, 两组间显著性比较用 LSD-t 检验。

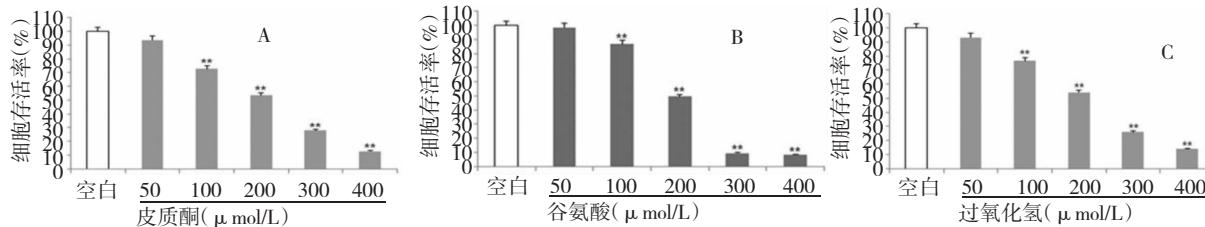


图 1 不同浓度皮质酮(A)、谷氨酸(B)、过氧化氢(C)对 PC12 细胞存活率的影响( $n=5$ )

Fig. 1 Effect of different concentrations of corticosterone (A), glutamic acid (B) and hydrogen peroxide (C) on survival rates of PC12 cells ( $n=5$ )

## $P < 0.01$  与空白组比较; \*\* $P < 0.01$  与模型组比较

## $P < 0.01$  vs control; \*\* $P < 0.01$  vs model

## 3.2 干、鲜人参对皮质酮、谷氨酸、过氧化氢诱导损伤的 PC12 细胞存活力影响

如表 1 和表 3 所示, MTT 结果显示干、鲜人参水提液对皮质酮和过氧化氢损伤的 PC12 细胞均有明显的保护作用;而表 2 显示干、鲜人参水提液对谷氨酸损伤的 PC12 细胞几乎没有保护活性。同时, 对

## 3 实验结果

### 3.1 不同浓度皮质酮、谷氨酸、过氧化氢对 PC12 细胞存活率影响

如图 1 所示, 皮质酮、谷氨酸、过氧化氢对 PC12 细胞的损伤呈浓度和时间依赖性上升。如图 1A, 当皮质酮浓度为 200  $\mu\text{mol}/\text{L}$ , 与 PC12 作用 24 h, 细胞存活率为 53.42%; 如图 1B, 当谷氨酸浓度为 30  $\text{mmol}/\text{L}$ , 与 PC12 作用 24 h, 细胞存活率为 49.64%; 如图 1C, 当过氧化氢浓度为 150  $\mu\text{mol}/\text{L}$ , 与 PC12 作用 24 h, 细胞存活率为 54.27%。所以选择皮质酮为 200  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、谷氨酸为 30  $\text{mmol}/\text{L}$ 、过氧化氢为 150  $\mu\text{mol}/\text{L}$ , 作为 PC12 细胞损伤模型的最佳浓度。

于皮质酮和过氧化氢损伤模型, 干、鲜人参水提液在低浓度时保护活性组间无显著性差异;而在中、高浓度时(0.25、0.5、1 mg/mL)时均, 干、鲜人参水提液对细胞保护活性组间表现出显著性差异( $P < 0.01$ ), 表明鲜人参较干人参具有较好的保护活性。

表 1 干、鲜人参水提液对皮质酮损伤 PC12 细胞的保护作用( $n=5$ )

Table 1 Protective effect of the water extract of dry, fresh *P. ginseng* on corticosterone-induced lesion in cultured PC12 cells ( $n=5$ )

组别 Group	剂量 Dose (mg/mL)	A570 nm	存活率 Cell viability (%)
空白对照 Control	-	$0.6505 \pm 0.0231$	100
皮质酮模型 Corticosterone model	200	$0.3532 \pm 0.0169^{##}$	54.30 <sup>##</sup>
鲜人参水提液 FWEG	0.125	$0.4863 \pm 0.0233^{**}$	74.76 <sup>**</sup>
	0.25	$0.5430 \pm 0.0348^{**}$	83.47 <sup>**</sup>
	0.5	$0.5816 \pm 0.0171^{**}$	89.41 <sup>**</sup>
	1	$0.6231 \pm 0.0226^{**}$	95.79 <sup>**</sup>
干人参水提液 DWEG	0.125	$0.4547 \pm 0.0251^{**}$	69.90 <sup>**</sup>

0.25	0.4852 ± 0.0135 **	74.59 **
0.5	0.5016 ± 0.0344 **	77.11 **
1	0.5324 ± 0.0285 **	81.84 **

注: # $P < 0.05$  与对照比较; ## $P < 0.01$  与空白对照比较。 \* $P < 0.05$  与模型比较; \*\* $P < 0.01$  与空白模型比较(表2、3同);模型组剂量单位为  $\mu\text{mol/L}$ (表3同)。

Note: # $P < 0.05$  vs control; ## $P < 0.01$  vs control. \* $P < 0.05$  vs model (the same as in Table 2,3); \*\* $P < 0.01$  vs model; the dosage unit of model group is  $\mu\text{mol/L}$  (the same as in Table 3).

表2 干、鲜人参水提液对谷氨酸损伤PC12细胞的保护作用( $n=5$ )

Table 2 Protective effect of water extract of dry,fresh *P. ginseng* on glutamic acid-induced lesion in cultured PC12 cells ( $n=5$ )

组别 Group	剂量 Dose (mg/mL)	A570 nm	存活率 Cell viability (%)
空白对照 Control	-	0.7455 ± 0.0399	100
谷氨酸模型 Glutamic acid model	30	0.4725 ± 0.0255 ##	63.38 ##
鲜人参水提液 FWEG	0.125	0.4870 ± 0.0194	65.33
	0.25	0.4902 ± 0.0291	65.75
	0.5	0.4753 ± 0.0344	63.76
	1	0.4940 ± 0.0143	66.26
干人参水提液 DWEG	0.125	0.4924 ± 0.0229	66.05
	0.25	0.4832 ± 0.0135	64.82
	0.5	0.4940 ± 0.0310	66.26
	1	0.4985 ± 0.0223	66.87

注:模型组剂量单位为  $\text{mmol/L}$ 。

Note: the dosage unit of model group is  $\text{mmol/L}$ .

表3 干、鲜人参水提液对过氧化氢损伤PC12细胞的保护作用( $n=5$ )

Table 3 Protective effect of water extract of dry,fresh *P. ginseng* on hydrogen peroxide-induced lesion in cultured PC12 cells ( $n=5$ )

组别 Group	剂量 Dose(mg/mL)	A570 nm	存活率 Cell viability (%)
空白对照 Control	-	0.9118 ± 0.0172	100
过氧化氢模型 Hydrogen peroxide model	150	0.5203 ± 0.0251 ##	57.06 ##
鲜人参水提液 FWEG	0.125	0.6512 ± 0.0323 **	71.42 **
	0.25	0.7168 ± 0.0211 **	78.61 **
	0.5	0.7897 ± 0.0124 **	86.61 **
	1	0.8614 ± 0.0324 **	94.47 **
干人参水提液 DWEG	0.125	0.6108 ± 0.0131 **	66.99 **
	0.25	0.6476 ± 0.0263 **	71.02 **
	0.5	0.7045 ± 0.0377 **	77.26 **
	1	0.7565 ± 0.0214 **	82.97 **

### 3.3 LDH 活性的测定

乳酸脱氢酶(LDH)是一种可溶性胞质酶,存在于大多数真核细胞中,由于细胞死亡,质膜破裂而释放到培养基中。培养基中LDH活性的增加与裂解的细胞数成正比。如图2所示,乳酸脱氢酶(LDH)释放检测法,进一步证实了干、鲜人参水提液在皮质

酮、谷氨酸、过氧化氢模型上所表现出的保护活性及差异。如图2B,在谷氨酸损伤模型上,干、鲜水提液在各浓度均不能降低LDH释放量;如图2A、C,在皮质酮、过氧化氢损伤模型上干、鲜人参水提液在各浓度均能明显降低LDH释放量且在浓度为0.125 mg/mL时无差异,浓度为0.25、0.5、1 mg/mL时鲜人参

较干人参降低 LDH 释放量更多,在最高浓度 1 mg/mL 时差异最为显著( $P < 0.01$ )。

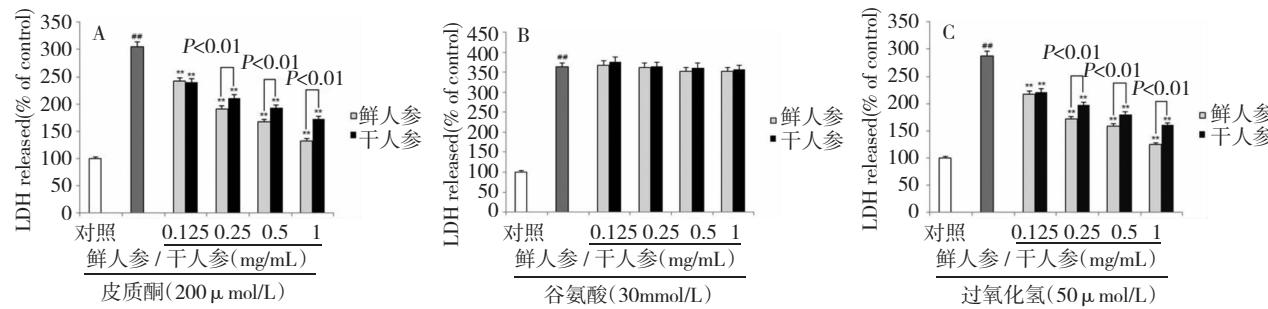


图 2 干、鲜人参水提液对皮质酮(A)、谷氨酸(B)、过氧化氢(C)诱导的 PC12 细胞 LDH 释放率的影响( $n = 5$ )

Fig. 2 Effect of water extract of dry, fresh *P. ginseng* on LDH level of corticosterone-induced (A), glutamic acid-induced (B) and hydrogen peroxide (C)-induced PC12 cells ( $n = 5$ )

<sup>†</sup> <sup>‡</sup>  $P < 0.01$  与空白组比较; <sup>‡</sup>  $P < 0.01$  与模型组比较

<sup>†</sup>  $P < 0.01$  vs control; <sup>‡</sup>  $P < 0.01$  vs model

## 4 讨论

本研究采用的 PC12 细胞为大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞,经诱导具有神经元特性,常用于神经细胞保护活性的研究<sup>[7]</sup>。

抑郁和应激时,下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴失调,GC 分泌增加,而长期接触高浓度的 GC 对中枢神经系统造成危害,引起海马神经元损伤。皮质酮诱导的神经细胞损伤是抗抑郁药物筛选和机理研究的常用体外模型<sup>[8]</sup>。谷氨酸是中枢神经系统中重要的兴奋性神经递质,在突触快速传递、学习记忆以及神经系统发育过程中起着十分重要的作用,N-甲基-D-门冬氨酸(NMDA)受体是 GLU 受体的一种,过度的激活可引起细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  超载继发引起线粒体损伤,细胞能量代谢的障碍,在神经系统退行性疾病的发生和发展中发挥着重要的作用<sup>[9]</sup>。 $\text{H}_2\text{O}_2$  与氧化应激反应密切相关,容易透过细胞膜。与细胞内铁离子通过 FENTON 反应形成高活性的自由基,从而诱发一系列氧化反应,最终导致细胞的损伤<sup>[10]</sup>。本文选用皮质酮、谷氨酸和  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导 PC12 损伤三种模型,比较了干燥和新鲜人参对这三种细胞损伤的保护作用,结果表明干燥和新鲜人参水提液对皮质酮和过氧化氢两种 PC12 细胞损伤模型均有明显保护作用,而对谷氨酸损伤模型无保护作用。

本文的研究发现人参水提液在较低浓度(0.125 mg/mL)时,干、鲜人参的对皮质酮和过氧化氢诱导的细胞保护活性无明显差异,当浓度为 0.25、0.5、1.0 mg/mL 时,鲜人参水提液对皮质酮和过氧化氢诱导的细胞损伤的保护活性明显强于干人

参水提液,且在剂量相同时,干、鲜人参组间存在显著性差异( $P < 0.01$ )。

干、鲜人参在不同物质损伤 PC12 细胞模型上所表现出药理作用的差异,与细胞损伤和药物作用机制的不同有关,更与干、鲜人参中所含化学成分及其比例的不同有关,如鲜人参中有活性酶,在干人参中则因高温而变性;鲜人参中所含水溶性氨基酸和蛋白质,在干人参中都损失很多<sup>[11]</sup>;鲜人参中特有丙二酰基人参皂苷,在干人参中则因高温使其水解成为相应的人参皂苷<sup>[12]</sup>;鲜人参中所含挥发油和多糖的含量都较干人参多等。然而,其中相关水溶性蛋白质等成分的差异,则很可能在鲜人参的神经保护活性中起到重要作用<sup>[13]</sup>。

## 参考文献

- Wang ZL(王中立), Dai JG(戴建国), Chen L(陈琳), et al. Preventive effects of *Panax ginseng* on neuron damage induced by hypercortisolism. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2010, 16(16):94-98.
- Shen HM(沈洪妹), Jiang ZL(姜正林), Gu XS(顾晓松). The study of Ginsenosides Rb3 on glutamic acid-induced hippocampal neurons injured and related mechanisms of action. *Chin J Appl Physiol* (中国应用生理学杂志), 2006, 22:31-34.
- Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, et al. Neurobiology of Depression. *Neuron*, 2002, 34:13-25.
- Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins and therapy. *Physiological Rev*, 2001, 81:741-760.

(下转第 1055 页)