

藏花素对  $H_2O_2$  诱导 PC12 细胞 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 的影响崔 勇<sup>1</sup>, 王艳杰<sup>1</sup>, 赵丹玉<sup>1</sup>, 正山征洋<sup>2</sup>, 李 刚<sup>3</sup>, 柳 春<sup>1\*</sup><sup>1</sup> 辽宁中医药大学解剖组胚教研室 辽宁中医药大学生物化学与分子生物学教研室, 沈阳 110847;<sup>2</sup> 日本长崎国际大学药学部生药学系, 长崎 8593298; <sup>3</sup> 日本三益制药株式会社, 福冈 8100000

**摘要:** 本文通过观察藏花素对  $H_2O_2$  诱导的 PC12 细胞的保护作用和对 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 的影响, 探讨藏花素对阿尔茨海默病细胞模型保护作用的机制。MTT 法及 LDH 活性测定观察藏花素对 PC12 细胞模型的影响, RT-PCR 检测 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 mRNA 表达水平, Western blot 检测 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 的蛋白表达。藏花素预保护浓度在 0.625  $\mu$ M 和 5  $\mu$ M 之间, 细胞存活率随着藏花素浓度的升高而升高; 藏花素组和 VE 组与模型组相比, Bcl-2 mRNA 和蛋白表达增加 ( $P < 0.05$ ), Bax 和 Caspase-3 mRNA 和蛋白表达降低 ( $P < 0.05$ )。研究表明: 藏花素可能是通过上调 Bcl-2 的表达, 从而介导 PC12 细胞发挥抗氧化和细胞凋亡的生物学功能。

**关键词:** 藏花素; 氧化应激; 凋亡; Bcl-2; Caspase-3

中图分类号: Q932

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.03.008

## Effects of Crocin on Bcl-2, Bax and Caspase-3 Expression of PC12 Cells Injured by $H_2O_2$

CUI Yong<sup>1</sup>, WANG Yan-jie<sup>1</sup>, ZHAO Dan-yu<sup>1</sup>, SHOYAMA Yukihiro<sup>2</sup>, LI Gang<sup>3</sup>, LIU Chun<sup>1\*</sup><sup>1</sup> Department of Anatomy and Embryo, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China;<sup>2</sup> Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki International University, Nagasaki 8593298, Japan;<sup>3</sup> San Yi Pharmaceutical Co Lt, Fukuoka 8100000, Japan

**Abstract:** In this study, the effects of crocin on Bcl-2, Bax and Caspase-3 expression of PC12 cells injured by  $H_2O_2$  were investigated. The possible mechanism of its protective effect on Alzheimer's disease (AD) model cells was further explored. The effect of crocin on PC12 cells was detected using MTT and LDH assays. The expression of mRNA and protein (Bcl-2, Bax and Caspase-3) were detected by RT-PCR and Western Blot assays. With the concentration of crocin at 0.625  $\mu$ M and 5  $\mu$ M, the cell survival rate increasing in a dose-dependent manner. The expression levels of mRNA and protein of Bcl-2 increased, while expressions of Bax and Caspase-3 were decreased in crocin group and VE group (compared with the model group,  $P < 0.05$ ). These results indicated that the antioxidant and antiapoptosis effects of crocin were possible induced through increasing expression of Bcl-2 in PC12 cells.

**Key words:** crocin; oxidative stress; apoptosis; Bcl-2; Caspase-3

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是导致进行性认知功能减退的最常见原因, 该病常见于老年人, 其发病率随年龄增长而逐渐上升, 是继心脏病、癌症、中风之后的第四大致死原因<sup>[1]</sup>。中药藏红花 (Saffron, *Crocus sativus* L) 又名番红花、西红花, 为鸢尾科多年生草本植物, 始载于《品汇精要》、《本草纲目》。中医认为藏红花性味甘平, 具有活血化

瘀、解郁安神等功效。现代药理学研究发现, 藏红花提取物及其单体藏花素 (Crocin) 对中枢神经系统具有广泛的生物学作用<sup>[2,3]</sup>。本实验旨在通过观察藏花素对  $H_2O_2$  诱导的 PC12 细胞的保护作用和对 Bcl-2、Caspase-3 的影响, 探讨藏花素对阿尔茨海默病细胞模型保护作用的机制。

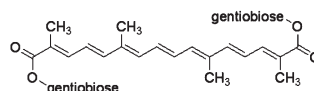


图 1 藏花素化学结构

Fig. 1 Chemical structure of crocin

收稿日期: 2014-07-31 接受日期: 2014-12-31

基金项目: 辽宁省科学技术计划 (2012225018); 沈阳市科技计划 (F12-278-6-10)

\* 通讯作者 E-mail: liuchun5@yahoo.com.cn

## 1 材料与仪器

### 1.1 细胞

高分化肾上腺嗜铬细胞瘤细胞株(PC12),购自中科院上海生化所。将PC12细胞接种于培养瓶中,采用含10%胎牛血清,100 U/mL青霉素和100 mg/L链霉素的DMEM培养基(Hyclone公司生产),37℃,5% CO<sub>2</sub>培养箱(Thermo Electron Corporation生产,classic 100型)中培养,采用对数生长期的细胞进行实验。

### 1.2 试剂与仪器

藏花素(购自沈阳药科大学中药学院,纯度>95.9%)分子式C<sub>44</sub>H<sub>64</sub>O<sub>24</sub>,相对分子质量976.96,为橙黄色粉末,无菌条件下,用二甲基亚砜(DMSO,武汉博士德生物工程有限公司生产)溶解至浓度1000 μM的母液,使用时稀释成浓度为0.625、1.25、2.5、5、10、20 μM的工作液。体积比为35%的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>水溶液(Alfa Aesar公司生产),使用时稀释为200 μM的工作液,为防止其分解,现用现配。0.950 g/mL维生素E(Sigma公司生产,VE),使用时稀释为10 μM的工作液。乳酸脱氢酶活性检测试剂盒(碧云天公司生产),RNAiso plus(TaKaRa公司生产),RT-PCR试剂盒(TaKaRa公司生产),梯度PCR仪(Thermal cycler BIO-RAD S1000),Bcl-2引物,Caspase-3引物,Bax引物,β-actin引物,兔抗大鼠Bcl-2、Bax、Caspase-3和GAPDH多克隆抗体(Cell Signalling公司生产),羊抗兔IgG-HRP,ECL试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司生产)。G:BOX Chemi XT4成像分析仪(Syngene公司生产)。

## 2 实验方法

### 2.1 细胞分组

细胞分为4组:正常组、模型组、藏花素组、维生素E组。MTT法测定细胞存活率时接种细胞于96孔板内,Western blot实验的细胞接种于25 CM<sub>2</sub>培养瓶中。模型组加入200 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>进行诱导24 h。藏花素组用不同浓度的藏花素进行预保护24 h,再加入造模浓度的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,通过检测细胞存活率,确定最佳藏花素的浓度。维生素E组用10 μM的维生素E进行预保护24 h,再加入造模浓度的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。

### 2.2 MTT法、LDH活性测定藏花素对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的PC12细胞的保护作用

在96孔板内,按照1×10<sup>5</sup>/mL密度接种细胞,

饥饿24 h使细胞同步化后,选用终浓度分别为0.625、1.25、2.5、5、10、20 μM的藏花素进行预保护24 h后,加入200 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>作用时间20 h。然后在培养板各孔中加入20 μL MTT试剂,37℃培养箱内继续培养4 h。吸出各孔液体加入200 μL二甲基亚砜(DMSO),摇床震荡10 min,490 nm测定其吸光度(A)。细胞存活率=(实验组A-空白组A)/(对照组A-空白组A)×100%。

各组细胞培养结束后,取细胞上清液,10 μL细胞裂解液,乳酸脱氢酶检测试剂盒(碧云天公司生产)检测乳酸脱氢酶(LDH)活性。根据标准曲线算出酶活力单位,细胞LDH释放率(%)=细胞培养基中测定的酶活力单位/(细胞裂解液测定的酶活力单位+细胞培养基测定的酶活力单位)×100%。

### 2.3 RT-PCR检测Bcl-2、Bax和Caspase-3 mRNA的变化

按照RNAiso plus说明书提取总RNA,微量紫外分光光度计检测A<sub>260</sub>、A<sub>280</sub>,取A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>在1.8~2.0样品进行实验,并计算总RNA浓度。引物序列:Bcl-2上游引物序列:5'-TGTGGCCTTCTTTGAGTTCG-3',下游引物序列:5'-TCACT TGTGGCTCA GATAAGC-3',产物453bp。退火温度64℃;Bax上游引物序列:5'-TCCACCAAGAAGCTGAGCGA-3',下游引物序列:5'-GTCCAGCCCATGATGTTCT-3',产物大小278bp,退火温度61℃;Caspase-3上游引物序列:5'-CAAACCTTTTTTCAGAGGGGATCG-3',下游引物序列:5'-GCATACTGTTTCAGCATGGCAC-3',产物272bp。β-actin上游引物序列:5'-ACACGAAAGCAATGCTATCACCTC-3',下游引物序列:5'-TGA-CAGCAGTCGGTTGGAGCGA-3'产物大小592bp,退火温度65℃,35个循环。PCR产物用1.5%的琼脂糖凝胶分离检测。将凝胶从电泳槽内取出,用G:BOX Chemi XT4成像分析仪(Syngene公司生产)进行拍照,利用Gelpro 32软件,对于目的基因及内参β-actin的平均A进行测量,并计算目的基因和内参的平均A的比值,该比值反应的是Bcl-2、Bax和Caspase-3的mRNA表达水平。

### 2.4 Western blot检测Bcl-2、Bax和Caspase-3的表达

用含1% PMSF的蛋白裂解液提取蛋白,并按BCA蛋白测定说明书对每组蛋白含量进行测定,样品经12%的凝胶电泳分离,转膜,封闭,将膜与溶于封闭液中的一抗(兔抗大鼠Bcl-2、Bax和Caspase-3

多克隆抗体 1:100,兔抗大鼠 GAPDH 多克隆抗体 1:100)室温孵浴 2 h 洗涤,将膜浸入以 1:1000 体积比用封闭液稀释的二抗稀释液,室温孵浴 2 h 洗涤,将 ECL 试剂盒内的 detection reagent 1 与 detection reagent 2 等体积混合后,均匀覆盖在 PVDF 膜上,反应 1~2 min 后,用 G;BOX Chemi XT4 成像分析仪 (Syngene 公司生产)进行检测拍照,用 Gelpro 32 软件分析,分析各组目的蛋白和内参平均光密度值的比值,该比值反应的是目的蛋白的表达水平。

2.5 统计方法

采用 SPSS18.0 统计软件,各组数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间的比较采用单因素方差分析,两两比较,以  $P < 0.05$  为显著性差异。

表 1 不同浓度藏花素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 PC12 细胞存活率和 LDH 释放率的影响

Table 1 Survival rate of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced PC12 cell and release rate of LDH with different concentrations of crocin

组别 Group	n	存活率 Survival rate (%)	LDH 释放率 LDH release rate (%)
对照组 Control group	6	90.70 ± 3.75 *	4.38 ± 0.70 #
模型组 Model group	6	56.24 ± 2.36	30.82 ± 1.82
0.625 μM 藏花素组 0.625 μM Crocin group	6	58.51 ± 2.06	28.29 ± 1.52
1.25 μM 藏花素组 1.25 μM Crocin group	6	69.77 ± 2.43 *	19.74 ± 1.65 #
2.5 μM 藏花素组 2.5 μM Crocin group	6	75.60 ± 2.52 *	14.85 ± 1.01 #
5 μM 藏花素组 5 μM Crocin group	6	85.05 ± 3.22 *	8.42 ± 0.36 #
10 μM 藏花素组 10 μM Crocin group	6	60.29 ± 2.96	24.39 ± 1.77 #
20 μM 藏花素组 20 μM Crocin group	6	31.37 ± 2.16 *	41.89 ± 2.59 #
维生素 E 组 VE group	6	80.11 ± 3.43 *	6.78 ± 0.67 #

注:与模型组比较,\*  $P < 0.05$ ;#  $P < 0.05$ 。

Note:Compare with model group,\*  $P < 0.05$ ;#  $P < 0.05$ 。

3.2 藏花素对 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 的 mRNA 的影响

如图 2、3 所示,用 200 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的模型组,

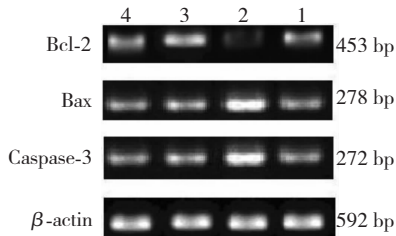


图 2 不同处理组 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 mRNA 的表达

Fig. 2 The expression of Bcl-2, Bax and Caspase-3 mRNA in different treatment groups

注:1,正常组;2,模型组;3,藏花素组;4,VE 组。

Note:1,normal group;2,model group;3,crocin group;4,VE group.

3 实验结果

3.1 藏花素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 PC12 细胞存活率和 LDH 活性的影响

应用 MTT 法计算存活率,进行藏花素药物浓度的筛选。加入 0.625、1.25、2.5、5、10、20 μM 的藏花素预保护后,加入 200 μM 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 进行干预。实验结果发现,藏花素预保护浓度在 0.625 μM 和 5 μM 之间,细胞存活率随着藏花素浓度的升高而升高,LDH 释放率逐渐下降。而在 10 μM 和 20 μM 浓度时,细胞存活率反而出现了下降,LDH 释放率增高。根据实验结果,本实验藏花素预保护浓度选取 5 μM。

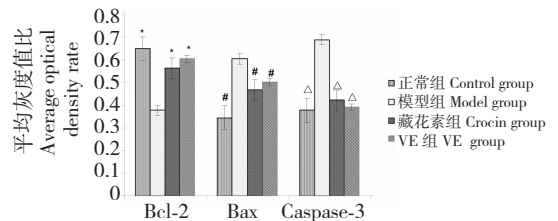


图 3 不同处理组 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 mRNA 平均光密度值比值 (与 β-actin) 统计柱状图

Fig. 3 Statistical histogram of the average optical density rate of Bcl-2, Bax and Caspase-3 mRNA (compared with β-actin) in different treatment groups

注:\* 与模型组相比, $P < 0.05$ ;# 与模型组相比, $P < 0.05$ ;△ 与模型组相比, $P < 0.05$ 。

Note:\*  $P < 0.05$  vs model group,#  $P < 0.05$  vs model group,△  $P < 0.05$  vs model group.

Bcl-2 mRNA 与  $\beta$ -actin 的平均光密度值比与正常组、藏花素组和 VE 组相比均明显降低 ( $P < 0.05$ ), 藏花素组和 VE 组无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。模型组 Bax 和 Caspase-3 mRNA 与  $\beta$ -actin 的平均光密度值比与正常组、藏花素组和 VE 组相比明显增高 ( $P < 0.05$ )。

### 3.3 藏花素对 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 蛋白表达的影响

如图 4、5 所示,用  $200 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  诱导的模型组, Bcl-2 与 GAPDH 的平均光密度值比与正常组、藏花素组和 VE 组相比均明显降低 ( $P < 0.05$ ), 模型组 Bax 和 Caspase-3 与 GAPDH 的平均光密度值比与正常组、藏花素组和 VE 组相比均明显增高 ( $P < 0.05$ ), 藏花素组和 VE 组无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。

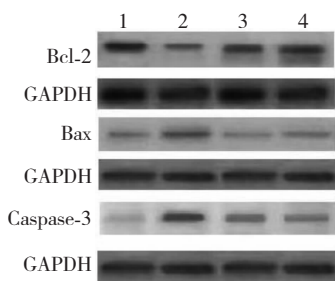


图 4 不同处理组 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 蛋白表达

Fig. 4 The expression of Bcl-2, Bax and Caspase-3 protein in different treatment groups

注: 1, 正常组; 2, 模型组; 3, 藏花素组; 4, VE 组。

Note: 1, normal group; 2, model group; 3, crocin group; 4, VE group.

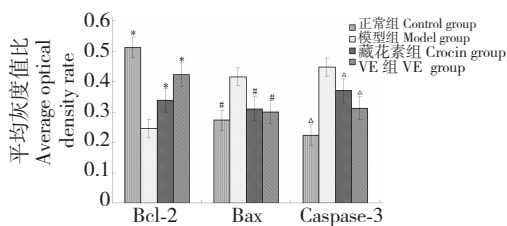


图 5 不同处理组 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 蛋白平均光密度值比值 (与 GAPDH) 统计柱状图

Fig. 5 Statistical histogram of the average optical density rate of Bcl-2, Bax and Caspase-3 protein (compared with GAPDH) in different treatment groups

注: \* 与模型组相比,  $P < 0.05$ ; # 与模型组相比,  $P < 0.05$ ;  $\Delta$  与模型组相比,  $P < 0.05$ 。

Note: \*  $P < 0.05$  vs model group, #  $P < 0.05$  vs model group,  $\Delta$   $P < 0.05$  vs model group.

## 4 讨论

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种

好发于老年期的以进行性痴呆为主要表现的全脑萎缩性病变,属中医健忘痴呆病范畴。中医认为这类疾病多属于衰老性疾病,本虚标实兼脾肾两虚为其本,淤浊毒为其标,瘀血、痰浊、毒邪既是脏气虚衰的结果,又是主要的致病因素。虚与瘀血浊毒相互影响,交互为患,成为 AD 复杂的病机。清热解毒药物在改善认知功能方面的应用已受到重视,如黄连、泽泻、栀子、白花蛇舌草、金银花、蔓荆子、夏枯草等药物,已经越来越多的用于改善记忆功能<sup>[2,3]</sup>。藏红花性味甘平,具有活血化瘀、解郁安神等功效,其在对阿尔茨海默病防治作用的现代药理学研究日益受到重视。

现代医学研究证明,细胞凋亡 (Apoptosis, APO) 在 AD 患者神经元的丢失中扮演重要角色,与 AD 的发生、发展关系密切<sup>[4-6]</sup>。而凋亡的发生与神经元氧化应激损伤密不可分,生存在有氧环境的生物体,不可避免的持续的暴露于活性氧 (reactive oxygen-species, ROS), 包括多种氧化代谢物 (如超氧阴离子、过氧化氢和羟自由基等), 它们比氧分子有着更高的反应性,是引起氧化损伤的主要原因<sup>[7,8]</sup>。本文用  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导 PC12 细胞形成氧化应激损伤的细胞模型,实验结果表明,藏花素可以对处于氧化应激状态下的 PC12 细胞起到明显的保护作用,藏花素预保护浓度在  $0.625 \mu\text{M}$  和  $5 \mu\text{M}$  之间时,细胞存活率随着藏花素浓度的升高而升高。当细胞受损伤后,LDH 被释放到细胞外,LDH 释放率是反映细胞膜受损的敏感指标。本实验的结果:藏花素预保护浓度在  $0.625 \mu\text{M}$  和  $5 \mu\text{M}$  之间时,LDH 释放率逐渐降低,说明细胞受到保护的作用与藏花素浓度存在剂量效应。综合细胞存活率和 LDH 释放率的结果,与中医关于藏红花的功效和现代药理学研究结果一致。而在  $10 \mu\text{M}$  和  $20 \mu\text{M}$  浓度时,细胞存活率反而出现了下降。分析可能是由于本实验采用 DMSO 溶解藏花素,而高浓度藏花素时,加入藏花素母液量加大,DMSO 也随之增多,造成了细胞毒性。也可能是藏花素本身在超过一定浓度后,产生了毒性。这些需要进一步的研究来证明。综合本实验的结果,表明藏花素对氧化应激状态下的 PC12 细胞具有保护作用。

细胞凋亡过程中的最重要的调节因子就是 Bcl-2 家族,该家族根据功能不同分为两类,一是促凋亡成员如 Bax、Bad 等,另外是抗凋亡成员如 Bcl-2、Bcl-xl 等。正如自然界中大多数平衡系统一样,抗

凋亡基因和促凋亡基因也组成一个重要的平衡体系,当有内在或者外在的因素破坏这一平衡体系时,就会导致细胞对外界的敏感性大大增加,从而容易引发细胞凋亡<sup>[9,10]</sup>。细胞凋亡可分为受体(如 Fas 等)依赖的外源性途径和线粒体损伤的内源性途径以及内质网途径等。外源性途径导致 Caspase-8 的活化,内源性途径导致 Caspase-9 的活化。无论何种途径,最终 Caspase-3 被激活,活化的 Caspase-3 裂解相应的胞浆胞核底物,导致细胞凋亡。本实验的研究结果表明,藏花素处理 PC12 细胞后,通过上调 Bcl-2、下调 Bax 和 Caspase-3 的表达,抑制细胞凋亡,可能是其保护 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 PC12 细胞氧化应激损伤的机制之一。

#### 参考文献

- Zhang JT (张均田). Pathogenesis and Treatment Strategies of Years of Dementia. Research Advances in Neuropharmacology(神经药理学研究进展). Beijing: People's Medical Publishing House, 2002. 16-29.
- Shuai HL (率红莉). Alzheimer's disease clinical drug research summary. *China Pharm*(中国药师), 2009, 12: 1139-1141.
- Chu BH (储奔虹), Dong WX (董文心). Role of oxidative stress on Alzheimer's disease and research advance of new drugs. *Chin J New Drugs*(中国新药杂志), 2010, 19: 940-943.
- Smitha MA, Zhua XW, Tabatonb M, *et al.* Increased iron and free radical generation in preclinical Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *J Alzheimer's Dis*, 2010, 19: 363-372.
- Kar S, Slowikowshi SP, Westaway D, *et al.* Interactions between  $\beta$ -amyloid and central cholinergic neurons; implications for Alzheimer's disease. *J Psychiatry Neurosci*, 2004, 29: 427-441.
- Wang HY, Wang GL, Yu YH, *et al.* The role of phosphoinositide-3-kinase/Akt pathway in propofol-induced post conditioning against focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *Brain Res*, 2009, 1297: 177-184.
- Yu S, Yang HK, Mi Y, *et al.* Function of PI3k/Akt signaling pathway in exogenous hydrogen sulfide post conditioning on isolated rat hearts. *Chin Pharmacol Bull*, 2010, 26: 759-764.
- Wang L, Nishida H, Ogawa Y, *et al.* Prevention of oxidative injury in PC12 cells by a traditional Chinese medicine, Shengmai San as a model of an antioxidant-based composite formula. *Biol Pharm Bull*, 2013, 26: 1000-1004.
- Morishita N, Tsukahara H, Chayama K, *et al.* Activation of Akt is associated with poor prognosis and chemotherapeutic resistance in pediatric B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*, 2012, 59: 83-89.
- Sun LH (孙丽华), Zheng XL (郑晓亮), Lu JZ (鲁健章), *et al.* Pilot study of protection of sweet potato extract to SK-N-SH cell injure caused by A $\beta$ 25-35. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2012, 10: 1359-1361.