

# 槟榔提取物及其不同极性部位对 $H_2O_2$ 损伤的 SH-SY5Y 细胞的保护作用

吴 娇<sup>1</sup>, 于海川<sup>2\*</sup>, 赵 杰<sup>1</sup>, 王 琳<sup>3</sup>, 侯贝贝<sup>1</sup>, 石梦斐, 田 坤<sup>1</sup>

<sup>1</sup>新乡医学院药学院; <sup>2</sup>新乡医学院医学检验学院, 河南省分子诊断和检验医学协同创新中心; <sup>3</sup>新乡医学院基础医学院, 新乡 453003

**摘要:** 本研究采用 70% 乙醇超声提取和溶剂萃取获得槟榔提取物及其不同极性部位, 采用 200  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢损伤 SH-SY5Y 细胞, 建立体外模拟氧化应激损伤模型, 采用 MTT 法检测细胞的存活率, 评价槟榔提取物对过氧化氢损伤的 SH-SY5Y 细胞的保护作用。研究结果表明: 除石油醚提取物对过氧化氢损伤后的 SH-SY5Y 不显示保护作用外, 乙酸乙酯、正丁醇和水提取物均具有明显保护作用。其中乙酸乙酯部分分离得到的化学成分 (2*S*, 3*R*)-ent-catechin 表现出较高的抗氧化活性, 其体内生物活性和作用机制尚需进一步研究。

**关键词:** 槟榔; 过氧化氢; SH-SY5Y; 保护作用

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.S.027

## Protective Effects of *Areca catechu* Nut Extract and Its Different Polar Fractions on Damaged SH-SY5Y Cells Induced by $H_2O_2$

WU Jiao<sup>1</sup>, YU Hai-chuan<sup>2\*</sup>, ZHAO Jie<sup>1</sup>, WANG Lin<sup>3</sup>, HOU Bei-bei<sup>1</sup>, SHI Meng-fei<sup>1</sup>, TIAN Kun<sup>1</sup>

<sup>1</sup>School of Pharmacy, Xinxiang Medical University; <sup>2</sup>School of laboratory medicine, Xinxiang Medical University and Collaborative Innovation Center of Molecular Diagnosis and Laboratory Medicine in Henan Province; <sup>3</sup>School of Basic medical Sciences, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China

**Abstract:** *Areca catechu* nut extract and its different polar fractions were obtained using 70% ethanol extraction and solvent partition. The model of oxidative stress was established based on 200  $\mu\text{mol/L}$  hydrogen peroxide injury of SH-SY5Y cell and cell viability was measured by MTT assay. Protective effects of all the samples on damaged SH-SY5Y cells induced by  $H_2O_2$  were evaluated. The research results showed that ethyl acetate, n-butanol and water extracts have obvious protective effect except for petroleum ether part. Furthermore, (2*S*, 3*R*)-ent-catechin isolated from EtOAc fraction showed higher antioxidant activity, its *in vivo* biological activity and mechanism need to be further studied.

**Key words:** *Areca catechu* nut;  $H_2O_2$ ; SH-SY5Y; protective effect

槟榔为棕榈科植物槟榔 *Areca catechu* L. 的干燥成熟种子, 是继咖啡因、尼古丁和酒精之后的第四个民间最常用的精神活性物质, 具有抗抑郁作用<sup>[1]</sup>。近来研究发现, 槟榔壳、种子总酚可以改善小鼠的绝望行为, 具有明显抗抑郁作用<sup>[2,3]</sup>。槟榔乙醇提取物能够抑制 MAO-A 的活性, 具有明显的抗抑郁作用, 而槟榔生物碱无此活性<sup>[4,5]</sup>。本研究前期已开展了槟榔果实化学成分及其体外抗氧化活性研究,

发现抗氧化活性最强的是黄酮类化合物 (2*S*, 3*R*)-ent-catechin<sup>[6,7]</sup>。

已有研究表明神经细胞保护作用是抗抑郁剂作用的共同通路之一<sup>[8]</sup>。关于槟榔体外对氧化损伤的神经细胞的保护作用评价尚未见报道。本文采用过氧化氢损伤的 SH-SY5Y 细胞模型, 进行槟榔提取物及其不同极性部位对氧化损伤的神经细胞保护作用评价, 为我国丰富的槟榔资源产业深层次开发利用提供科学依据和开辟新的途径。

## 1 材料与仪器

### 1.1 试剂和药物

无水乙醇 (天津飞船化学试剂科技有限公司)、

收稿日期: 2014-11-04 接受日期: 2015-01-23

基金项目: 国家自然科学基金 (31301135); 河南省教育厅重点课题 (13B350215/14B320015); 新乡医学院高层次人才科研启动项目 (100403/505002); 新乡医学院科研培育基金 (2014QN150)

\* 通讯作者 Tel: 86-373-3831187; E-mail: haichuan\_yu@xxmu.edu.cn

95%乙醇(天津天力化学试剂有限公司)、石油醚(天津市德恩化学试剂有限公司)、乙酸乙酯(天津市东丽区天大化学试剂厂)、正丁醇(天津市瑞金特化学品有限公司)等分析纯试剂;SH-SY5Y细胞购自中科院上海细胞所细胞库;DMEM培养基(美国GIBCO),胰蛋白酶(北京拜尔迪生物公司),MTT,四甲基偶氮唑盐(美国Amresco),无支原体胎牛血清(HycLone),二甲基亚枫(北京化学试剂公司),PBS缓存液;儿茶素标准品购自中国药品生物制品检定所;槟榔种子购自康怡生大药房,经吴艳芳副教授鉴定。

## 1.2 仪器

FA2004B精密电子天平(上海佑科仪器有限公司),R206旋转蒸发仪(上海申生科技有限公司),96孔板(美国Coring),CO<sub>2</sub>培养箱HEAL FORCE(型号HF90),JJ-CJ-2F洁净工作台(吴江市净化设备总厂),酶标仪BIOTEK,离心机(上海安亭),倒置显微镜(Nikon),振荡器(海门其林贝尔),电子天平,纯水仪,高压锅,烘箱,HH恒温水浴锅,pH计,Eppendorf移液器。

# 2 实验方法

## 2.1 槟榔不同提取物的制备

将适量槟榔干燥种子粉碎,过筛20~40目,用70%的乙醇超声提取2次,合并滤液,将70%的乙醇滤液减压浓缩得浸膏,真空干燥成粉末后用水溶解,依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取,各萃取3次,将收集的萃取液减压浓缩,真空干燥后的提取物粉末用于后续实验。

## 2.2 SH-SY5Y细胞培养及药物处理

冻存于液氮中的SH-SY5Y细胞取出后,迅速置于37℃水浴锅中震荡融化,加入6 mL DMEM制得细胞悬液后离心,将细胞接种于10%胎牛血清的DMEM培养基中,放入CO<sub>2</sub>培养箱中。培养箱设置为37℃,5%CO<sub>2</sub>,4 d传代一次,培养至对数生长期时,以 $5 \times 10^4$ /mL接种于96孔板。

各药物粗提物样品用DMSO助溶,用DMEM培养基制备成最高终浓度200 μg/mL,最低终浓度6.25 μg/mL的溶液。

## 2.3 SH-SY5Y细胞未损伤模型

取对数生长期的SH-SY5Y细胞以 $5 \times 10^4$ /mL接种于96孔板,每孔100 μL培养24 h后,分为8组

(对照组,DMSO模型组,6.25、12.5、25、50、100、200 μg/mL药物组)每组4个复孔,其他各药物剂量组分分别换算成终浓度量。DMSO组的DMSO浓度为1%。继续培养20 h后MTT法检测不同浓度药物增殖活性。

## 2.4 SH-SY5Y细胞氧化损伤模型

取对数生长期的SH-SY5Y细胞以 $5 \times 10^4$ /mL接种于96孔板,每孔100 μL培养24 h后,分别加入终浓度为50、100、150、200、250、300、400 μmol/mL的过氧化氢处理,24 h后MTT法检测细胞活力。选择合适的SH-SY5Y细胞过氧化氢损伤的浓度。药物筛选实验:对数生长期的SH-SY5Y细胞以 $5 \times 10^4$ /mL接种于96孔板,每孔100 μL培养24 h后,分为8组(对照组,DMSO模型组,6.25、12.5、25、50、100、200 μg/mL药物组)每组4个复孔,对照组加入100 μL DMEM含血清培养基,其他各组分别加入终浓度100 μmol/mL过氧化氢含血清DMEM培养基,造模24 h后,弃去旧培养液,对照组加入新鲜培养基,其他各药物剂量组分分别换算成终浓度量,模型组加入浓度为1%的含DMSO培养液,继续培养20 h后MTT法检测不同浓度药物增殖活性。

## 2.5 MTT法检测细胞存活率

SH-SY5Y细胞经药物处理后,每孔加入终浓度为0.5 mg/mL的MTT溶液10 μL,培养4 h后,弃去上清液,每孔加入130 μL DMSO摇床均匀震荡15 min,使蓝紫色结晶完全溶解,用BIOTEK酶标仪检测570 nm处吸光度(A值),参考波长630 nm。计算细胞存活率(%) = (实验组A值-空白组A值)/(对照组A值-空白组A值) × 100%。重复实验4次。

## 2.6 统计方法

采用Excel进行统计分析,数据用Mean(SD示,组间比较用t检验, $P < 0.05$ 为显著差异, $P < 0.01$ 为差异极显著。

# 3 实验结果

## 3.1 过氧化氢损伤SH-SY5Y细胞模型的建立

由表1可知,随着过氧化氢浓度的逐渐增大,SH-SY5Y细胞的存活率显著降低,在200 μmol/L时,SH-SY5Y细胞的存活率约为50% ( $P < 0.01$ ),有显著的抑制作用,故选择200 μmol/L的过氧化氢进行造模实验。

表 1 不同浓度过氧化氢损伤对 SH-SY5Y 细胞存活率的影响 (Mean ± SD, n = 4)

Table 1 Effect of different concentrations of hydrogen peroxide on the cell viability of SH-SY5Y cells (Mean ± SD, n = 4)

组别 Group	剂量 Dose (μmol/L)	A <sub>570</sub>	细胞存活率 Cell viability (%)
对照 Control	-	1.43 ± 0.025	100 ± 2.3
空白 Blank	-	0.202 ± 0.009	0
	100	0.932 ± 0.046	59.4 ± 1.7 **
	150	0.870 ± 0.044	54.4 ± 1.8 **
	200	0.820 ± 0.035	50.3 ± 1.4 **
	250	0.760 ± 0.065	45.5 ± 1.3 **
	过氧化氢 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	300	0.675 ± 0.034
	350	0.554 ± 0.009	28.7 ± 0.9 **
	400	0.512 ± 0.062	25.2 ± 2.1 **
	450	0.460 ± 0.048	21.0 ± 3.2 **

注:与对照组相比, \*\* P < 0.01。

Note: compared with control group, \*\* P < 0.01.

### 3.2 槟榔不同提取物对 SH-SY5Y 细胞存活率的影响

药物对未损伤的 SH-SY5Y 细胞存活率的影响

结果显示:正常对照组的细胞存活率为 100%, DM-

SO 组与正常组相比,细胞的存活率为 98.9%。与对照组相比,槟榔 70% 乙醇提取物及其不同极性部位对正常 SH-SY5Y 细胞生长无抑制作用。

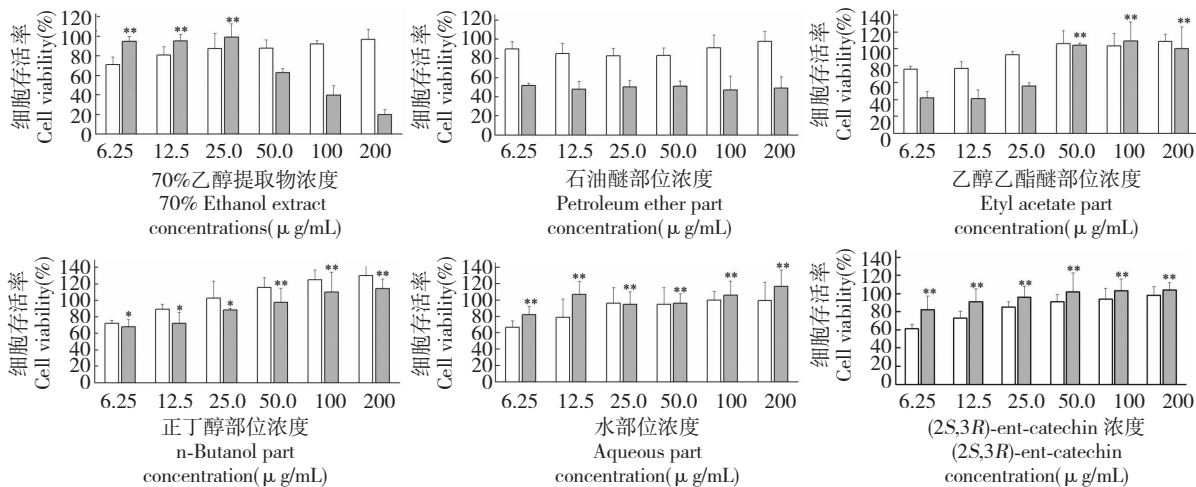


图 1 槟榔提取物及其不同极性部位对 SH-SY5Y 细胞存活率的影响 (Mean ± SD, n = 4)

Fig. 1 Effects of *A. catechu* nut extract and its different polar fractions on SH-SY5Y cell injury (Mean ± SD, n = 4)

注:白色柱形图表示未损伤;灰色柱形图表示过氧化氢损伤, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01。

Note: White column chart indicated without damage; gray column chart indicated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced injury, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01.

### 3.3 槟榔不同部位提取物对过氧化氢所致的 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用

由图 1 可知,6.25 ~ 25 μg/mL 槟榔 70% 乙醇提取物对过氧化氢诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤具有极显著的保护作用 (P < 0.01), 而 50 ~ 200 μg/mL 70% 乙醇提取物可使过氧化氢损伤的 SH-SY5Y 细胞存活率逐渐下降到约 20%, 并且随着剂量的增加

显著抑制氧化损伤后 SH-SY5Y 细胞生长;其石油醚部位浓度在 6.25 ~ 200 μg/mL 范围内对过氧化氢导致 SH-SY5Y 细胞存活率显著下降没有发挥保护作用。50 ~ 200 μg/mL 乙酸乙酯部位和正丁醇部位 (P < 0.01)、6.25 ~ 200 μg/mL 水部分提取物 (P < 0.01) 均显示具有极显著保护作用, 并呈明显的浓度依赖性。

### 3.4 (2S,3R)-ent-catechin 对过氧化氢诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤的修复作用

(2S,3R)-ent-catechin 是从槟榔果实中分离得到的五羟基黄烷类化合物(图 2),抗氧化活性最强( $SC_{50} = 19.2 \mu\text{mol/L}$ ),远高于阳性对照维生素 C( $SC_{50} = 28.9 \mu\text{mol/L}$ )<sup>[6]</sup>, $6.25 \sim 200 \mu\text{g/mL}$  均可使过氧化氢损伤的 SH-SY5Y 细胞存活率提高到 80% 以上(图 1)。

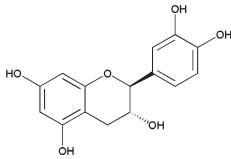


图 2 (2S,3R)-ent-catechin 的结构式

Fig. 2 Chemical structure of (2S,3R)-ent-catechin

## 4 讨论

近年来,临床发现氧化应激损伤导致的体内自由基增多是造成情感性精神障碍疾病(如焦虑或抑郁症)的重要因素之一<sup>[9]</sup>,具有强抗氧化活性的维生素类与现有抗抑郁药物联合用于治疗重度抑郁症,疗效显著。此外,能清除自由基的药物具有改善实验性抑郁现象<sup>[10]</sup>。过氧化氢作为和氧化应激密切相关的一种活性氧,是重要的自由基形式,常作为神经细胞氧化损伤的诱导剂。SH-SY5Y 细胞是人神经母细胞瘤细胞株,已被广泛用于体外神经细胞损伤及保护作用研究<sup>[11,12]</sup>。本研究通过有机溶剂分级分离和体外过氧化氢诱导 SH-SY5Y 细胞损伤评价实验,以期获得低毒高效的对氧化损伤的 SH-SY5Y 细胞具有保护作用的槟榔种子活性部位。SH-SY5Y 细胞是人神经母细胞瘤细胞株,形态、生理和生化功能与正常神经细胞相似,属多巴胺能神经元型细胞,能释放儿茶酚胺类神经递质,目前被广泛用于抑郁等神经系统疾病发病机制和药物作用机制方面的研究<sup>[13]</sup>。

本研究发现过氧化氢剂量依赖地诱导 SH-SY5Y 细胞氧化应激,过氧化氢终浓度为  $200 \mu\text{mol/L}$  作用 24 h 造成 SH-SY5Y 细胞严重损伤,存活率下降至 50% 左右。 $6.25 \sim 200 \mu\text{mol/L}$  槟榔乙酸乙酯提取物、正丁醇提取物和水提物剂量依赖地显著降低过氧化氢诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡,只有石油醚提取物对过氧化氢氧化损伤 SH-SY5Y 细胞后没有显示保护作用。这与前人研究结果相符,证实槟榔

中确实存在不同的抗抑郁活性成分和毒性成分<sup>[14,15]</sup>。因此,槟榔 70% 乙醇提取物经萃取除去石油醚部位,可获得高效、低毒的具有神经细胞保护作用的槟榔活性部位 AFL。此外,本研究发现槟榔中主要抗氧化活性成分 (2S,3R)-ent-catechin  $6.25 \mu\text{mol/L}$  时对过氧化氢损伤的 SH-SY5Y 细胞具有明显保护作用。综合上述实验结果,我们认为槟榔活性部位 AFL 及其主要抗氧化成分 (2S,3R)-ent-catechin 有可能是槟榔通过抗氧化应激损伤发挥神经细胞保护作用的物质基础,需要深入系统地研究它们的体内生物活性及其作用机制。

### 参考文献

- Gupta PC, Ray CS. Epidemiology of betel quid usage. *Ann Acad Med Singapore*, 2004, 33(4 Suppl): 31-36.
- He JY (何嘉泳), Chen JT (陈杰桃), Xin ZT (辛志添), et al. Antidepressant activity of total phenolic extracts from the shell of *Areca catechu*. *China Pharmacist (中国药师)*, 2012, 15: 1076-1078.
- He JY (何嘉泳), Huang B (黄保), Xin ZT (辛志添), et al. Antidepressant effect of Betel nut seed total phenolic. *J Chin Med Mater (中药材)*, 2013, 36: 1331-1334.
- Dar A, Khatoon S. Behavioral and biochemical studies of dichloromethane fraction from the *Areca catechu* nut. *Pharmacol Biochem Behav*, 2000, 65: 1-6.
- Dar A, Khatoon S, Rahman G, et al. Anti-depressant activities of *Areca catechu* fruit extract. *Phytomedicine*, 1997, 4: 41-45.
- Zhang X, Wu J, Han Z, et al. Antioxidant and cytotoxic phenolic compounds of Areca Nut (*Areca catechu*). *Chem Res Chin Univ*, 2010, 26: 161-164.
- Wu J (吴娇), Wang H (王辉), Li XN (李小娜), et al. Study on cytotoxic chemical constituents in *Areca catechu*. *J Henan Univ, Nat Sci (河南大学学报, 自科版)*, 2011, 41: 511-514.
- Li YF, Liu YQ, Huang WC, et al. Cytoprotective effect is one of common action pathways for antidepressants. *Acta Pharmacol Sin*, 2003, 24: 996-1000.
- Lanfume L, Mongeau R, Cohen-Salmon C, et al. Corticosteroid-serotonin interactions in the neurobiological mechanisms of stress-related disorders. *Neurosci Biobehav Rev*, 2008, 32: 1174-1184.
- Zhao Z, Wang W, Guo H, et al. Antidepressant-like effect of liquiritin from *Glycyrrhiza uralensis* in chronic variable stress induced depression model rats. *Behav Brain Res*, 2008, 194: 108-113.