

# 延龄草苷对过氧化氢诱导的 PC12 细胞氧化损伤和炎症因子表达的影响

高健美<sup>1</sup>, 徐 凡<sup>1</sup>, 雷 鸣<sup>1</sup>, 刘 双<sup>2</sup>, 龚其海<sup>2\*</sup><sup>1</sup>遵义医学院药学院; <sup>2</sup>遵义医学院 基础药理省部共建教育部重点实验室, 遵义 563000

**摘 要:** 探讨延龄草苷对过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)诱导的 PC12 细胞氧化损伤和炎症因子表达的影响。采用 MTT 法和 LDH 活性测定观察延龄草苷对 PC12 细胞模型的影响, 采用相关试剂盒检测活性氧(ROS)和丙二醛(MDA)含量, 超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活力, Western blot 检测 Sirt1、NF-κB 和 TNF-α 的蛋白表达。延龄草苷(5~20 μM)能够显著提高 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的 PC12 细胞的活力, 提高细胞抗氧化能力, 并上调 Sirt1 的表达, 下调 NF-κB 和 TNF-α 的表达, 其保护作用可能与提高抗氧化能力, 降低炎症因子损伤, 调控 Sirt1/NF-κB 信号通路有关。

**关键词:** 延龄草苷; PC12 细胞; 氧化应激; 炎症因子

中图分类号: R965.1

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.3.016

## Effects of Trillin on Hydrogen Peroxide-induced Oxidative Stress Injury and Inflammatory Factor in PC12 Cells

GAO Jian-mei<sup>1</sup>, XU Fan<sup>1</sup>, LEI Ming<sup>1</sup>, LIU Shuang<sup>2</sup>, GONG Qi-hai<sup>2\*</sup><sup>1</sup>School of Pharmacy, Zunyi Medical University; <sup>2</sup>Department of Pharmacology and Key

Laboratory of Basic Pharmacology of Ministry of Education, Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou 563000, China

**Abstract:** To investigate effects of trillin on hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)-induced oxidative stress injury and inflammatory factor expression in PC12 cells. MTT and LDH assay were used to determine the effects of trillin on PC12 cell model, respectively. Reactive oxygen species(ROS) and malondialdehyde(MDA) contents, superoxide dismutase(SOD) and glutathione peroxidase(GSH-Px) were detected by according kits, respectively. Furthermore, Sirt1, NF-κB and TNF-α protein expressions were determine by Western blot assay. Trillin(5-20 μM) significantly improved H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced PC12 cell viability and anti-oxidant enzyme activity. Moreover, trillin up-regulated Sirt1 protein expression, and down-regulated NF-κB and TNF-α protein expression. Its protective effect was possibly through enhancing anti-oxidant capability, decreasing inflammatory factor and regulating Sirt1/NF-κB signaling pathway.

**Key words:** trillin; PC12 cells; oxidative stress; inflammatory factor

中枢神经系统退行性疾病是指一组由慢性进行性的中枢神经组织退行性变性而产生的疾病的总称, 包括阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿病、肌萎缩侧索硬化症等<sup>[1]</sup>。氧化应激和炎症损伤是导致神经退行性疾病的重要原因<sup>[2]</sup>。

近年来, 从天然产物中寻找清除过多的活性氧(reactive oxygen species, ROS)和抑制炎症因子的物质备受关注。延龄草, 为百合科延龄草属植物延龄

草 *Trillium tschonoskii* Maxim. 的干燥根茎与成熟果实。主产于西藏、云南、四川、湖北、河南等省区<sup>[3]</sup>。延龄草苷是延龄草的主要活性成分之一, 现代药理学研究表明延龄草苷具有抗癌、抗炎等作用, 但是其抗氧化活性尚未见报道<sup>[4,5]</sup>。来源于大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤的 PC12 细胞株, 在形态、结构和功能上具有神经细胞特性, 被广泛用于神经药理学方面的实验研究。过氧化氢(hydrogen peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)是体内代谢产生的一种重要的 ROS, 其诱导 PC12 细胞损伤是经典的神经细胞氧化损伤模型<sup>[6]</sup>。本研究旨在观察在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 PC12 损伤模型中, 延龄草苷对 PC12 细胞的氧化损伤和炎症因子表达的影响。

收稿日期: 2016-12-15 接受日期: 2017-01-18

基金项目: 遵义医学院优秀青年人才计划(15zy-002); 贵州省淫羊藿开发利用科技创新人才团队(2015-4023); 贵州省高层次人才创新型人才培养计划—“百”层次人才(2016-5684)

\* 通讯作者 E-mail: gqh@zmc.edu.cn

# 1 材料与仪器

## 1.1 细胞株

大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤细胞株 PC12 购自中科院上海细胞库。

## 1.2 药物与试剂

延龄草苷购自成都普思生物科技股份有限公司(批号 PS160901-02, 纯度  $\geq 98\%$ )(见图 1)。实验药物用 DMSO 溶解, 于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冻存, 临用前用 DMEM 培养液稀释, 在超净台内采用  $0.22\text{ }\mu\text{m}$  微孔滤器过滤除菌备用。 $\text{H}_2\text{O}_2$  购自 Sigma 公司(批号 H1009), DMEM 培养液(批号 12100046)、胎牛血清(批号 1618862)均购自 Gibco 公司, 噻唑蓝(MTT, 批号 M2128)购自 Sigma 公司, ROS(批号 20160305)购自上海江莱生物科技有限公司, 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH, 批号 20160410), 丙二醛(malonaldehyde, MDA, 批号 20160412), 超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD, 批号 20160522), 谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px, 批号 20160515)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。Anti-沉默信息调节因子 1(sirtuin, Sirt1, 批号: ab110304), Anti-核因子  $\kappa\text{B}$  p65(nuclear factor- $\kappa\text{B}$  p65, NF- $\kappa\text{B}$  p65 抗体, 批号: ab16502), Anti-肿瘤坏死因子- $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF  $\alpha$ , 批号: ab6671)兔多克隆抗体均购自 Abcam 公司。

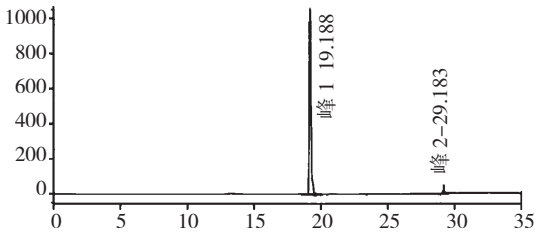


图 1 延龄草苷高效液相图

Fig. 1 HPLC chromatogram of trillin

## 1.3 仪器

Midi40 二氧化碳培养箱(Thermo Fisher Scientific 公司)、iMark 酶标仪(Bio-Rad 公司)、DDY-10 型三恒电泳仪(Bio-Rad 公司)、半干转印槽(Bio-Rad 公司)、全自动电泳凝胶成像分析系统(Bio-Rad 公司)。

# 2 实验方法

## 2.1 PC12 细胞的培养及分组

将 PC12 细胞接种于含 10% 胎牛血清, 2% 谷氨酰胺的 DMEM 培养液中, 在  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养箱

中培养。细胞分为 6 组: 对照组、模型组、延龄草苷(5、10、20  $\mu\text{M}$ )组、维生素 E(Vitamin E, VE)组。

## 2.2 延龄草苷对细胞活力的影响

取对数生长期的 PC12 细胞, 以  $2 \times 10^4$  个/mL 细胞密度, 每孔 100  $\mu\text{L}$  接种于 96 孔培养板中, 培养 12 h 后, 加入 5、10、20  $\mu\text{M}$  延龄草苷和 10  $\mu\text{M}$  阳性对照药(VE)预处理 1 h, 加入 400  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  继续作用 48 h 后, 每孔加入 25  $\mu\text{L}$  MTT(5 g/L), 继续培养 4 h 后, 弃上清, 每孔加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO 溶解, 酶标仪 492 nm 处检测吸光度(A), 并计算细胞存活率。药物作用 48 h 后, 取上清, 严格按照 LDH 试剂盒说明书检测各组细胞上清液中 LDH 的活性。根据标准曲线计算出酶活力单位, 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)  $\times 100\%$ 。

## 2.3 细胞形态观察

PC12 细胞按照 2.2 项方法接种于 6 孔板中, 在  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 12 h 后, 以 2.2 项方法给药处理细胞后, 在倒置显微镜下观察细胞形态。

## 2.4 ROS、MDA 含量, SOD 和 GSH-Px 活力的测定

PC12 细胞按照 2.2 项方法接种于 6 孔板中, 经药物作用 48 h 后, 收集细胞, 超声破碎细胞, 在  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下, 3000 rpm 离心 10 min, 收集上清, 严格按照试剂盒操作检测 ROS, MDA 含量, SOD 和 GSH-Px 活力。

## 2.5 Western blot 测定 Sirt1、NF- $\kappa\text{B}$ 和 TNF- $\alpha$ 蛋白

将药物作用后的 PC12 细胞用 PBS 洗 3 次, 加入 RIPA 细胞裂解液于冰上裂解 30 min, 离心取上清, 采用 BCA 试剂盒进行蛋白定量后, 将蛋白变性后取 20  $\mu\text{g}$  蛋白上样, 采用 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白后, 将蛋白转印至 PVDF 膜, 用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后, 加入相应一抗(Sirt1, 1:1 000; NF- $\kappa\text{B}$ , 1:1 000; TNF- $\alpha$ , 1:1 000)  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  封闭过夜, TBST 洗 3 次, 加二抗(1:5000)封闭液封闭 1 h, 采用 ECL 发光法显色, ChemiDoc XRS + 系统成像, 扫描记录, 用 Quantity One 软件进行分析。

## 2.6 统计学分析

采用 SPSS22.0 统计软件处理, 计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。各组间的两两比较采用单因素方差分析, 方差齐用 LSD 检验,  $P < 0.05$  有统计学意义。

### 3 实验结果

#### 3.1 延龄草苷对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 PC12 氧化损伤细胞存活率和 LDH 释放的影响

MTT 法和 LDH 活性检测实验结果表明,与模型

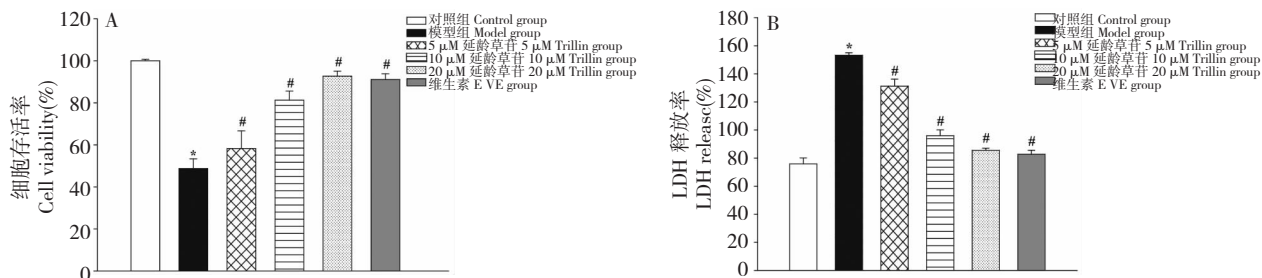


图 2 不同浓度延龄草苷对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 PC12 细胞存活率和 LDH 释放率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 2 Survival rate of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced PC12 cells and release rate of LDH with different concentrations of trillin ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

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

Note: Compared with control group, \* $P < 0.05$ ; Compared with model group, # $P < 0.05$

#### 3.2 延龄草苷对 PC12 细胞形态的影响

形态学观察结果显示,对照组 PC12 细胞贴壁牢固,细胞形态完整,排列整齐。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组细胞

数量显著减少,变圆,部分悬浮于培养液中。延龄草苷(5、10、20 μM)组细胞数量逐渐增加,排列紧密,状态接近正常组细胞(见图 3)。

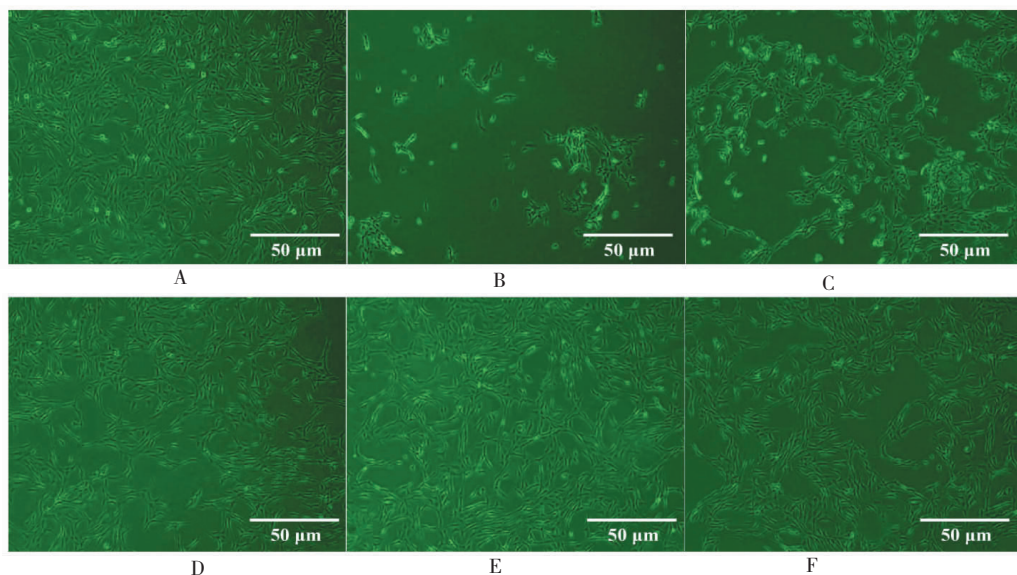


图 3 对照组(A)、模型组(B)、5 μM 延龄草苷(C)、10 μM 延龄草苷(D)、20 μM 延龄草苷(E)及维生素 E(F)对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 PC12 细胞形态学的影响

Fig. 3 Effects of control group(A), model group(B), 5 μM trillin group(C), 10 μM Trillin group(D), 20 μM Trillin group(E) and VE(F) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced morphological changes in PC12 cells

#### 3.3 延龄草苷对 ROS、MDA 含量和 GSH-Px、SOD 活性的影响

实验结果表明,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组较对照组 ROS 和 MDA 含量明显增加;而延龄草苷(5、10、20 μM)作

用组明显降低 ROS 及 MDA 含量 [ $F(5, 12) = 65.999, P < 0.001$ ;  $F(5, 12) = 14.025, P < 0.001$ ]。此外,模型组较对照组 SOD 和 GSH-Px 活力明显降低;而延龄草苷(5、10、20 μM)不同程度的升高 SOD

和 GSH-Px 的活性[  $F(5, 12) = 65.717, P < 0.001$ ;  $F(5, 12) = 213.147, P < 0.001$  ] (见图 4)。

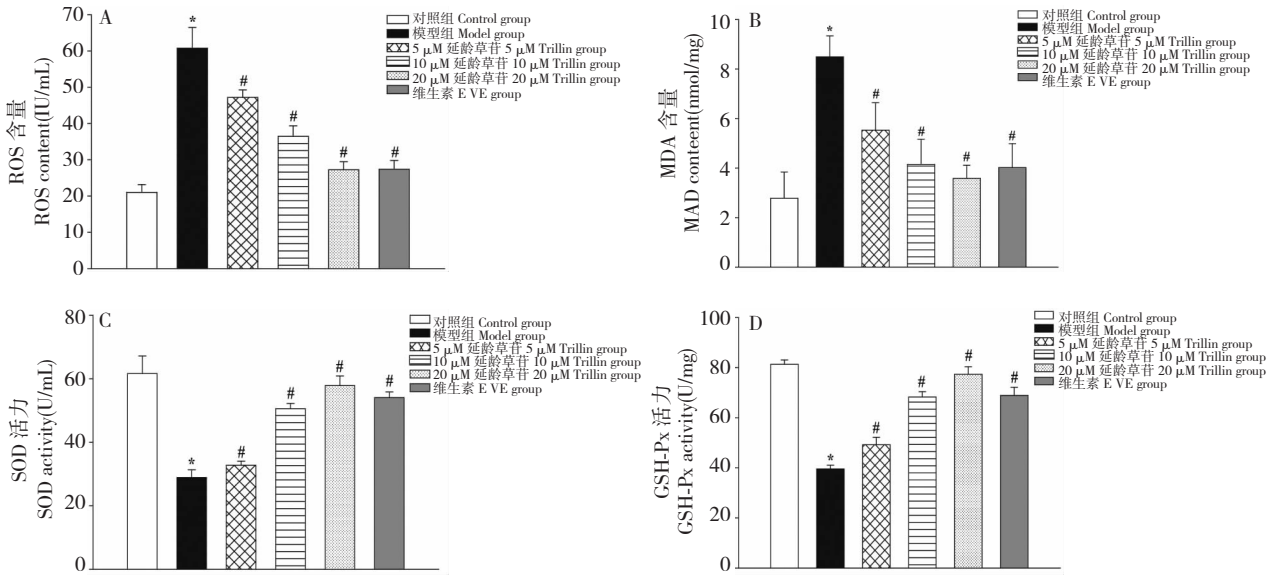


图 4 不同浓度延龄草苷对 ROS(A)、MDA(B)含量和 SOD(C)、GSH-Px(D)活力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 4 Effects of different concentrations of trillin on contents of ROS(A), MDA(B) and SOD(C), GSH-Px(D) activities in PC12 cells treated with  $H_2O_2$  ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

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

Note: Compared with control group, \*  $P < 0.05$ ; Compared with model group, #  $P < 0.05$

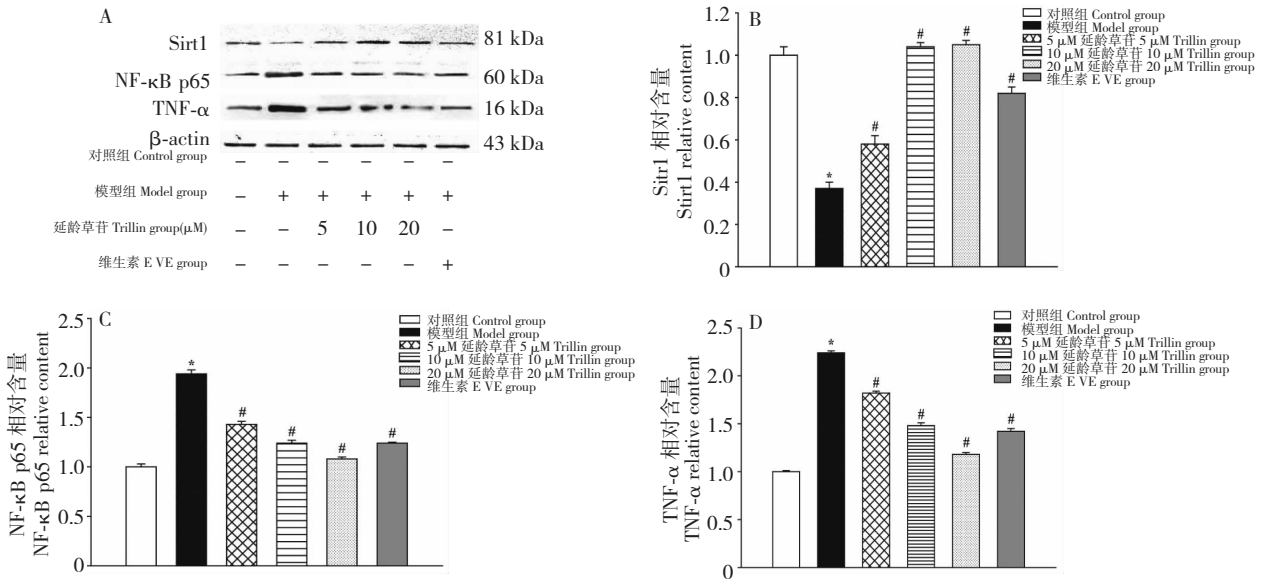


图 5 延龄草苷对  $H_2O_2$  损伤的 PC12 细胞中 Sirt1、NF-κB 和 TNF-α 蛋白相对表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 5 Effects of trillin on expression of Sirt1, NF-κB and TNF-α protein in PC12 cells treated with  $H_2O_2$  ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

注:A:延龄草苷对  $H_2O_2$  损伤的 PC12 细胞中 Sirt1、NF-κB 和 TNF-α 表达的代表性条带;B:Sirt1 相对表达;C:NF-κB 相对表达;D:TNF-α 相对表达;与空白组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与模型组比较, #  $P < 0.05$

Note:A:Representative sample of effect of trillin on expression of Sirt1, NF-κB and TNF-α protein in PC12 cells treated with  $H_2O_2$ ; B:Relative expression of Sirt1; C:Relative expression of NF-κB; D:Relative expression of TNF-α; Compared with control group, \*  $P < 0.05$ ; Compared with model group, #  $P < 0.05$

### 3.4 延龄草苷对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的 PC12 细胞中 Sirt1、NF- $\kappa$ B 和 TNF- $\alpha$ 蛋白表达的影响

Western blot 实验结果表明, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组 Sirt1 蛋白表达显著减少, NF- $\kappa$ B 和 TNF- $\alpha$  蛋白表达明显增加。而延龄草苷不同程度增加 Sirt1 蛋白表达, 减少 NF- $\kappa$ B 和 TNF- $\alpha$  蛋白表达。[  $F(5, 12) = 69.292, P < 0.001$ ;  $F(5, 12) = 87.965, P < 0.001$ ;  $F(5, 12) = 177.133, P < 0.001$  ] (见图 5)。

## 4 讨论与结论

氧化应激损伤在中枢神经系统退行性疾病中发挥了重要作用, 主要由于 ROS 的产生超过内源性抗氧化系统的清除能力, 进而损伤神经细胞。过量的 ROS 可诱导脂质过氧化反应和细胞氧化损伤, 导致细胞结构与功能发生不可逆的损害, 最终导致细胞衰老与死亡<sup>[7,8]</sup>。MDA 是 ROS 大量产生导致脂质过氧化反应的终产物, 其含量可反映机体内脂质过氧化程度。SOD 是重要的抗氧化酶之一, 可清除过多的 ROS, 阻止其诱导的氧化应激的产生。GSH-Px 是依赖还原型谷胱甘肽代谢 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的另一种抗氧化酶, 在清除自由基的过程中发挥重要的作用<sup>[9]</sup>。研究结果表明延龄草苷能够通过提高抗氧化系统能力发挥保护神经细胞氧化损伤的作用。

近年来研究表明, 在炎症反应过程中会伴有大量 ROS 产生, 持续的氧化应激将诱发或加重慢性炎症, 进而损伤机体组织、使器官功能异常, 导致神经退行性疾病的发生。氧化应激与炎症关系密切能够诱导促炎细胞因子 NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$  的表达与生成<sup>[10]</sup>。NF- $\kappa$ B 的活化是炎症反应的一个中心环节。NF- $\kappa$ B 是由 p50 和 p65 两个蛋白亚基组成的二聚体。NF- $\kappa$ B p65 的乙酰化水平调控 NF- $\kappa$ B 的转录活性, 进而增加 TNF- $\alpha$  炎症因子的表达<sup>[11]</sup>。我们前期研究结果表明 Sirt1 与抗氧化关系密切, 同时, SIRT1 可使 NF- $\kappa$ B 亚单位 p65 去乙酰化, 进而抑制其转录活性, 减少炎症因子的产生, 在炎症损伤中发挥保护作用<sup>[12,13]</sup>。本研究结果显示 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 导致 Sirt1 蛋白表达下降, 抑制 NF- $\kappa$ B p65 去乙酰化, TNF- $\alpha$  蛋白表达升高, 与文献报道一致。延龄草苷能够上调 Sirt1 蛋白表达, 抑制 NF- $\kappa$ B p65 的乙酰化水平, 进而减少 TNF- $\alpha$  炎症因子的产生, 发挥抗氧化和抗炎症损伤的作用。

综上所述, 延龄草苷对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 PC12 细胞氧化损伤具有保护作用并降低炎症因子的产生, 其

作用与提高抗氧化酶系统, 调控 Sirt1 信号通路有关。为临床进一步应用延龄草苷防治氧化应激导致的神经系统退行性疾病提供药理学依据。

### 参考文献

- 1 Liu GA(刘国安), Dong H(董欢), Zhang JJ(张佳佳), et al. Protective effect of Barley extracts on oxidative damage of Astrocytes. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26:2062-2065.
- 2 Draheim T, Lessem A, Scheld M, et al. Activation of the astrocytic Nrf2/ARE system ameliorates the formation of demyelinating lesions in a multiple sclerosis animal model. *Glia*, 2016, 64:2219-2230.
- 3 Zhan GJ(詹光杰), Xiao B(肖本), Yang NA(杨年安). The protective effects and mechanisms of *Trillium tachonoskii* Maxim on rats' liver damage induced by lipopolysaccharide. *Chin J Appl Physiol*, 2016, 32:373-377.
- 4 Yang HY(杨红云), Guo H(郭虹), Chai LJ(柴丽娟), et al. Inhibition of trillin on inflammation of microglia cells induced by lipopolysaccharides. *Drug Evalu Res*, 2014, 37:218-221.
- 5 Gao M(高苗), Liu JJ(刘娟娟), Wang D(王栋). Trillin can enhance the anti-cancer effect of fluorouracil on cervical cancer cells. *Tumor*, 2014, 34:1005-1009.
- 6 Cui Y(崔勇), Wang YJ(王艳杰), Zhao DY(赵丹玉), et al. Effects of crocin on Bcl-2, Bax and Caspase-3 expression of PC12 cells injured by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2015, 27:411-415.
- 7 Du F, Wang X, Shang B, et al. Gastrodin ameliorates spinal cord injury via antioxidant and anti-inflammatory effects. *Acta Biochim Pol*, 2016, 63:589-593.
- 8 Gao JM(高健美), Lei M(雷鸣), Linghu L(令狐浪), et al. Base on ROS/GSK-3 $\beta$  pathway to investigate protective effect and mechanism of icariside II on hydrogen peroxide-induced SH-SY5Y cell injury. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 2016, 23(5):23-27.
- 9 Jin YP(金银萍), Hou W(侯微), Gao W(高薇), et al. Protective effect of *Schisandra chinensis* fructus on hydrogen peroxide-induced oxidative stress injury in HaCaT Cells. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2015, 27:1967-1971.
- 10 Xiong C, Li Q, Chen C, et al. Neuroprotective effect of crude polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Morchella importuna* against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced PC12 cell cytotoxicity by reducing oxidative stress. *Biomed Pharmacother*, 2016, 83:569-576.