

当药黄素对 H_2O_2 诱导 PC12 细胞损伤的保护作用

许晓燕,余梦瑶,江南,罗霞*

四川省中医药科学院菌类药材系统研究与开发实验室,成都 610041

摘要:研究当药黄素在 H_2O_2 诱导 PC12 细胞损伤中的作用。建立 H_2O_2 诱导的 PC12 细胞损伤模型,采用 MTT 法测定细胞活力,比色法测定细胞 MDA 和上清液 LDH 含量,以及 SOD、CAT 和 GSH-Px 酶活力,采用 DCFH-DA 荧光染色测定细胞 ROS 含量,JC-1 染色测定细胞线粒体膜电位。当药黄素能够提高 H_2O_2 诱导损伤的 PC12 细胞的细胞活力,增加细胞内 SOD、CAT 和 GSH-Px 活力,降低 MDA、LDH 含量,抑制细胞内 ROS 增加,稳定细胞线粒体膜电位。当药黄素对 H_2O_2 诱导的 PC12 细胞损伤有保护作用。

关键词:当药黄素;PC12 细胞;氧化损伤

中图分类号:R963

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.1.017

Protective Effects of Swertisin on Oxidative Damage of PC12 Cells Induced by H_2O_2

XU Xiao-yan, YU Meng-yao, JIANG Nan, LUO Xia*

Laboratory of Fungus Medicine Research and Exploitation, Chengdu 610041, China

Abstract: This study was conducted to investigate the protective effect of swertisin on damage PC12 cells induced by H_2O_2 , as well as its primary mechanism. The cell viability was measured by MTT assay. The activity of SOD, CAT and GSH-Px, the level of were measured by the colorimetric method. The cell reactive oxygen species (ROS) was detected by the reactive oxygen test kit. The cell mitochondrial membrane potential was detected by the mitochondrial membrane potential detection kit (JC-1). The investigation showed that swertisin can improve cell viability in damage PC12 cells induced by H_2O_2 , inhibit the releasing of MDA and LDH, enhance SOD, CAT and GSH-Px activities, inhibit intracellular ROS increase, and stable mitochondrial membrane potential. The results demonstrated that swertisin can suppress the oxidative damage in PC12 cells induced by H_2O_2 in multiple levels, which play a protective role in nerve cells.

Key words: swertisin; PC12 cell; oxidative damage

氧化应激是自由基在体内产生的一种负面作用,当机体处于氧化应激状态时会产生大量的活性氧(ROS)。在多种神经退行性疾病中,特定脑区的神经细胞受到 ROS 攻击,使细胞发生凋亡,进而恶化直至神经元网络功能紊乱,最终发生神经退行性疾病,氧化应激在神经退行性疾病细胞凋亡的发生发展中起着重要作用^[1]。近年来,从天然产物中寻找具有清除自由基活性的物质用于保护细胞免受氧化损失备受关注^[2]。

当药黄素(Swertisin)呈淡黄色粉末状,属于黄酮苷类化合物,化学式为 $C_{22}H_{22}O_{10}$,分子量 446,化学名 4H-1-苯并吡喃-4-酮-2,6- β -D-吡喃葡萄糖基-5-羟

基-2-(4-羟基苯基)-7-甲氧基,最大吸收波长为 273 nm。当药黄素广泛分布在各种植物中,具有抗炎、降血糖等作用^[3,4]。本研究采用 H_2O_2 诱导大鼠肾上腺髓质嗜铬瘤分化细胞株(PC12 细胞)损伤模型对当药黄素神经保护作用进行研究,并对其可能的保护作用机制进行了初步的探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

当药黄素,自制,纯度为 99%;PC12 细胞,购于中国科学院上海细胞所;活性氧检测试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)均购自碧云天生物技术研究;乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒、丙二醛(MDA)测定试剂盒、总超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒、过氧化氢酶(CAT)测定试剂盒和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)测定试剂盒均购自南京建成生物工程研

究所;RPMI 1640 培养基、马血清、胎牛血清均购自美国 Gibco 公司;氮乙酰半胱氨酸(NAC)、噻唑蓝(MTT)、十二烷基硫酸钠(SDS)均购自美国 Sigma 公司;过氧化氢(H_2O_2)为德国 Merck 公司产品;其余试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器

Eclipse TS100 型倒置荧光显微镜(日本 Nikon 公司);Heraeus BB16UV 型二氧化碳细胞培养箱(德国 Thermo Scientific 公司);AL104 型梅特勒·托利多精密天秤(瑞士梅特勒-托利多公司);ELx800NB 型多功能酶标仪(美国 Bio-Tek 公司)。

1.3 细胞培养

PC12 细胞培养于 RPMI 1640 培养基,内含 15% 马血清、2.5% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素,置 37 °C 5% CO_2 培养箱中培养,1:3 分瓶传代,每 4 d 传代 1 次,取对数生长期细胞用于试验。

1.4 细胞活力测定

细胞活力采用 MTT 比色法测定^[5]。取对数生长期的 PC12 细胞,按 5×10^4 个/孔接种于 96 孔细胞培养板中,于 37 °C 5% CO_2 的培养箱中培养过夜。试验分 6 组,每组 3 孔,即正常组、模型组、阳性对照组和当药黄素高、中、低剂量组。正常组和模型组均加入 20 μ L 磷酸盐缓冲液(PBS)(0.01 M, pH7.2),阳性对照组加入 NAC 20 μ L(终浓度为 100 μ g/mL),当药黄素高、中、低剂量组分别加入含当药黄素的 PBS 20 μ L(终浓度分别为 30、20、10 μ g/mL)。置 37 °C 5% CO_2 的培养箱中培养 6 h 后,正常组加入 20 μ L PBS,其余组加入 20 μ L H_2O_2 溶液(终浓度为 300 μ mol/L),继续培养 18 h。培养结束后,离心细胞板,小心吸去细胞培养液,加入 100 μ L PBS 和 5 μ L 5 mg/mL 的 MTT,培养 4 h,每孔加入 100 μ L 10% SDS 溶液(以 0.01 mol/L HCl 配置),孵育过夜后,用酶标仪测定 570 nm 处各孔吸光值,计算细胞活力。

细胞活力(%) = (实验组 OD 值/正常组 OD 值) \times 100

1.5 细胞内 MDA、LDH 含量和 SOD、CAT、GSH-Px 酶活力测定

采用比色法测定细胞内丙二醛(MDA)、乳酸脱氢酶(LDH)含量和总超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)酶活力。取对数生长期的 PC12 细胞,按 5×10^5 个/孔接

种于 24 孔细胞培养板中培养过夜。试验分 6 组,每组 3 孔,即正常组、模型组、阳性对照组和当药黄素高、中、低剂量组。细胞培养和处理方法同细胞活力测定实验。培养结束后,收集上清液按照乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒说明书测定 LDH 含量;细胞沉淀中加入 100 μ L 1% Triton 溶液,将细胞板置于 -80 °C 条件下,裂解细胞 1 h,得检测样品,按照丙二醛(MDA)测定试剂盒、总超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒、过氧化氢酶(CAT)测定试剂盒和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)测定试剂盒的说明书测定 MDA、SOD、CAT 和 GSH-Px 含量。

1.6 细胞内活性氧含量测定

采用 DCFH-DA 荧光染色测定细胞 ROS 含量。取对数生长期的 PC12 细胞,按 1.0×10^6 /孔接种到 24 孔细胞培养板中培养过夜。试验分 6 组,每组 3 孔,即正常组、模型组、阳性对照组和当药黄素高、中、低剂量组。细胞培养和处理方法同细胞活力测定实验。培养结束后,离心收集细胞,按照活性氧试剂盒的说明书,在多功能酶标仪上,使用激发波长 488 nm,发射波长 525 nm,测定细胞内 ROS 的荧光强度。

ROS 水平(%) = (实验组 OD 值 / 正常组 OD 值) \times 100

1.7 细胞线粒体膜电位测定

采用 JC-1 染色测定细胞线粒体膜电位。取对数生长期的 PC12 细胞,按 5×10^5 个/孔接种到 24 孔细胞培养板中培养过夜。试验分 3 组,每组 3 孔,即正常组、模型组和当药黄素高剂量组。细胞培养和处理方法同细胞活力测定实验。培养结束后,离心收集细胞,按照活性氧试剂盒的说明书,用 0.5 mL 细胞培养液重新悬浮细胞,然后加入 5 μ g/mL 的 JC-1 染料,于 37 °C 中反应 20 min,用 PBS 洗涤细胞 3 次。利用倒置荧光显微镜观察荧光。

1.8 数据分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 18.0 软件进行数据分析,多组间比较采用方差分析,两组间比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 实验结果

2.1 当药黄素对 H_2O_2 损伤的 PC12 细胞活力的影响

PC12 细胞经 300 μ mol/L H_2O_2 处理 18 h 后,细

胞出现明显的损伤。光镜下观察可见模型组细胞折光率下降,呈皱缩状态,而 NAC 组和当药黄素组细胞则饱满明亮,折光度较高。MTT 法测定细胞活力发现(图 1),模型组细胞活力仅有正常组的 61.9% ($P < 0.01$),而经 NAC 和当药黄素处理后,细胞活力均有增加,NAC 组的细胞活力为 86.2%,当药黄素高、中、低剂量组的细胞活力分别为 94.1%、87.3% 和 82.7%,与模型组相比显著增高($P < 0.01$)。

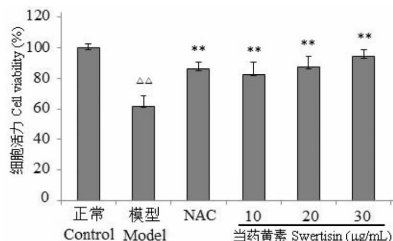


图 1 当药黄素对 H₂O₂ 损伤的 PC12 细胞活力的影响

Fig. 1 Effect of swertisin on PC12 cell viability injury induced by H₂O₂

注:与正常组比较:△△ $P < 0.01$;与模型组比较:** $P < 0.01$

Note:vs. normal group:△△ $P < 0.01$;vs. model group:** $P < 0.01$

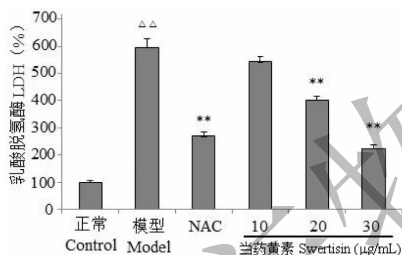


图 2 当药黄素对 PC12 细胞内 LDH 的影响

Fig. 2 Effect of swertisin on LDH level in H₂O₂ treated PC12 cells

注:与正常组比较:△△ $P < 0.01$;与模型组比较:** $P < 0.01$

Note:vs. normal group:△△ $P < 0.01$;vs. model group:** $P < 0.01$

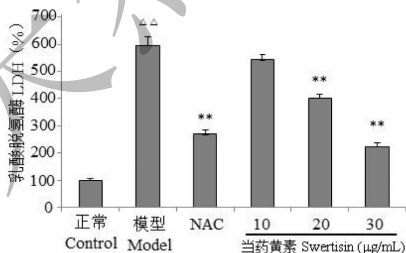


图 3 当药黄素对 PC12 细胞内 MDA 的影响

Fig. 3 Effect of swertisin on MDA level in H₂O₂ treated PC12 cells

注:与正常组比较:△ $P < 0.05$;与模型组比较:* $P < 0.05$

Note:vs. normal group:△ $P < 0.05$;vs. model group:* $P < 0.05$

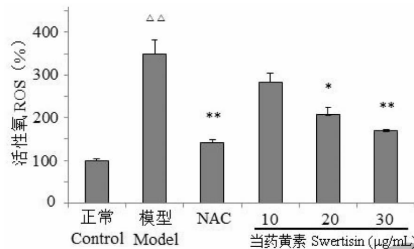


图 4 当药黄素对 PC12 细胞内 ROS 的影响

Fig. 4 Effect of swertisin on ROS level in H₂O₂ treated PC12 cells

注:与正常组比较:△△ $P < 0.01$;与模型组比较:* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note:vs. normal group:△△ $P < 0.01$;vs. model group:* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

2.2 当药黄素对细胞外 LDH 释放量和细胞内 MDA、ROS 含量的影响

与正常组相比,模型组 PC12 细胞 LDH 释放量和细胞内 MDA、ROS 含量明显升高,提示 H₂O₂ 可以诱导 PC12 细胞处于较强的氧化应激状态。与模型组比较,当药黄素能显著抑制由 H₂O₂ 损伤引起的细胞外 LDH 释放量以及细胞内 MDA 和 ROS 含量升高(图 2~4)。

2.3 当药黄素对细胞内 SOD、CAT 和 GSH-Px 含量的影响

与正常组相比,模型组 PC12 细胞内 SOD、CAT 和 GSH-Px 活性降低 ($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.01$),细胞处于较强氧化应激状态。与模型组比较,NAC 和当药黄素能显著提高细胞内 SOD、CAT 和 GSH-Px 活性,增强细胞抗氧化能力(图 5~7)。

2.4 当药黄素对细胞线粒体膜电位的影响

结果显示(图 8),正常组细胞中,红色荧光较

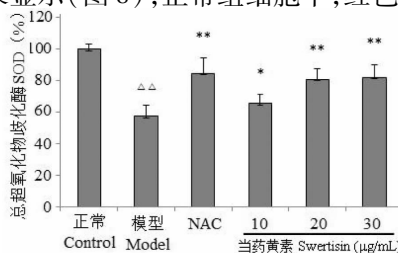


图 5 当药黄素对 PC12 细胞内 SOD 的影响

Fig. 5 Effect of swertisin on SOD level in H₂O₂ treated PC12 cells

注:与正常组比较:△△ $P < 0.01$;与模型组比较:* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note:vs. normal group:△△ $P < 0.01$;vs. model group:* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

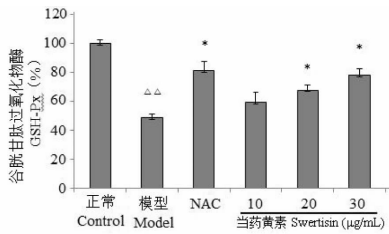


图6 当药黄素对PC12细胞内CAT的影响

Fig. 6 Effect of swertisin on CAT level in H₂O₂ treated PC12 cells

注:与正常组比较:△△*P* < 0.01;与模型组比较:^{*}*P* < 0.05, ^{**}*P* < 0.01

Note: vs. normal group: △△ *P* < 0.01; vs. model group: ^{*} *P* < 0.05, ^{**} *P* < 0.01

强,绿色荧光较弱,而模型组细胞几乎呈绿色荧光,只有个别细胞依稀可见黄色荧光,表明模型组细胞线粒体膜电位下降甚至丧失。与模型组相比,当

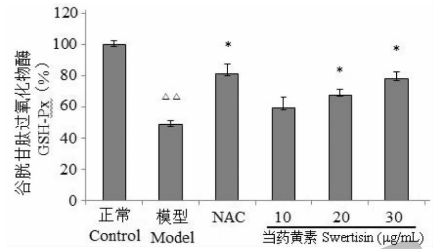


图7 当药黄素对PC12细胞内GSH-Px的影响

Fig. 7 Effect of swertisin on GSH-Px level in H₂O₂ treated PC12 cells

注:与正常组比较:△△*P* < 0.01;与模型组比较:^{*}*P* < 0.05

Note: vs. normal group: △△ *P* < 0.01; vs. model group: ^{*} *P* < 0.05

药黄素组中细胞内红黄色荧光比例增加,表明当药黄素具有阻止H₂O₂诱导的PC12线粒体膜电位下降的能力,能够通过稳定PC12细胞线粒体膜电位,达到保护PC12细胞免受H₂O₂氧化损伤的作用。

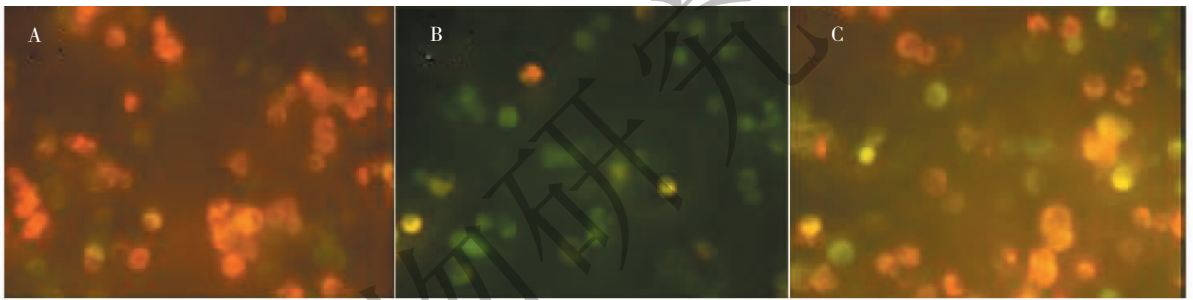


图8 正常组(A)、模型组(B)及当药黄素组(C)对PC12细胞线粒体膜电位的影响

Fig. 8 Effect of normal group (A), model group (B) and swertisin group (C) on mitochondrial membrane potential in H₂O₂ treated PC12 cells

3 讨论与结论

神经退行性疾病是一类以进行性神经细胞损伤和丢失,进而导致运动和认知功能障碍为特征的疾病,主要包括阿尔茨海默症(AD)、帕金森氏症(PD)、亨廷顿氏症(HD)等,发病率较高,危害大^[6]。大量研究表明,氧化压力在神经退行性疾病的发生、发展中具有十分重要的作用^[7]。如在AD中,N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDAR)的异常活化可导致ROS及活性氮(RNS)的生成,从而激活JNK/SAPK通路,导致tau蛋白过磷酸化和β-淀粉样蛋白(Aβ)诱导的细胞死亡^[8],同时Aβ可通过激活NADPH氧化酶而启动自由基的生成,并激活MAPK等下游通路,引起tau蛋白过磷酸化^[9]。因此,减少ROS生成,防止氧化压力导致的细胞损伤成为治疗神经退

行性疾病的重要策略之一^[10]。本研究表明,当药黄素在10~30 μg/mL剂量范围内,能够剂量依赖性地抑制H₂O₂引起的PC12细胞活力降低,减少LDH的生成,表明当药黄素对H₂O₂导致的细胞损伤有显著的保护作用,提示其在神经退行性疾病中治疗中具有较强的应用潜力。

细胞内的抗氧化防御系统可调节和清除ROS,从而维持细胞的稳定,其中SOD、CAT、GSH-Px在抗氧化防御系统中具有特别重要的作用,它们通过不同的酶促作用协同实现自由基的清除,维持细胞稳定^[11]。本研究表明,当药黄素能够剂量依赖性地恢复由H₂O₂导致的SOD、CAT和GSH-Px酶活力降低,同时对H₂O₂引起的MDA含量增加和ROS水平升高有显著地抑制作用,提示当药黄素可通过增加抗氧化相关酶活从而达到清除ROS、减轻氧化损伤

的作用。

线粒体是 ROS 产生的主要场所,又是 ROS 作用最敏感的部位。线粒体膜电位是线粒体维持正常三羧酸循环(TCA)和氧化磷酸化,产生能量的前体条件。维持线粒体膜电位对细胞正常生长具有重要的作用^[12]。ROS 介导的线粒体膜电位下降在氧化损伤导致的细胞凋亡中占有关键作用^[13]。本研究表明,当药黄素可有效维持 H₂O₂ 引起的线粒体膜电位下降,提示其能够抑制细胞凋亡。

以上结果说明,当药黄素能够保护 H₂O₂ 引起 PC12 细胞氧化损伤,其机制是通过提高胞内抗氧化酶活力,降低 ROS 水平,同时稳定线粒体膜电位而达到的。本研究结果表明,当药黄素作为一种天然来源的具有抗氧化作用的有效成分,能够在神经细胞氧化损伤保护中发挥显著的作用,可作为一种治疗神经退行性疾病的新的药物前体进行进一步深入研究。

参考文献

- 1 Friedlander RM. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases[J]. *N Engl J Med*,2003,348:1365-1375.
- 2 Kwon SH, Kim JA, Hong SI, *et al.* Loganin protects against hydrogen peroxide-induced apoptosis by inhibiting phosphorylation of JNK, p38, and ERK 1/2 MAPKs in SH-SY5Y cells[J]. *Neu Int*,2011,58:533-541.
- 3 S Aquila, RM Giner, MC Recio, *et al.* Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Cayaponiatayuya* roots[J]. *J Ethnopharmacol*,2009,121:333-337.
- 4 P Folador, LH Cazarolli, AC Gazola, *et al.* Potential insulin secretagogue effects of isovitexin and swertisin isolated from *Wilbrandia bracteata* roots in non-diabetic rats[J]. *Fitoterapia*,2010,81:1180-1187.
- 5 Zhao CY(赵承彦),Jing ZA(靖志安),Niu QX(牛青霞). Examination and analyses to the coloring reacting of MTT [J]. *Henan Med Res*(河南医学研究),2000,9:107-111.
- 6 Alzheimer's Association. 2016 Alzheimer's disease facts and figures[J]. *Alzheimer's Dementia*,2016,12:459-509.
- 7 Liu Z,Zhou T,Ziegler AC, *et al.* Oxidative stress in neurodegenerative diseases: From molecular mechanisms to clinical applications [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 2525967.
- 8 Patten DA, Germain M, Kelly MA, *et al.* Reactive oxygen species: stuck in the middle of neurodegeneration [J]. *J Alzheimers Dis*,2010,20:S357-S367.
- 9 Giraldo E, Lloret A, Fuchsberger T, *et al.* Abeta and tau toxicities in Alzheimer's are linked via oxidative stress-induced p38 activation: protective role of vitamin E [J]. *Redox Biology*,2014,2:873-877.
- 10 Nesi G, Sestito S, Digiacoimo M, *et al.* Oxidative stress, mitochondrial abnormalities and proteins deposition: multitarget approaches in Alzheimer's disease [J]. *Curr Top Med Chem*, 2017, 17:1568-0266.
- 11 Sindhi V, Gupta V, Sharma K, *et al.* Potential applications of antioxidants-a review [J]. *J Pharm Res*,2013,7:828-835.
- 12 Liu XT(刘晓婷),Wang YR(王延让),Zhang M(张明). Mitochondria-mediated apoptosis: a review of recent studies [J]. *J Environ Health*(环境与健康杂志),2013,30:182-185.
- 13 Yang LJ(杨联军),Zhu LX(朱立新),Dong WR(董为人), *et al.* Changes of ROS and mitochondrial transmembrane potential in oxidative stress-induced apoptosis in nucleus pulposus cells of rats [J]. *J Pract Med*(实用医学杂志), 2014,30:193-195.