

## 比较丹参两种水溶性成分 对谷氨酸诱导 PC12 细胞兴奋毒的保护作用

袁海建<sup>1\*</sup>, 印文静<sup>2</sup>, 安益强<sup>3</sup>, 陈宜刚<sup>1</sup>, 王卉<sup>1</sup>

(1. 泰州职业技术学院, 江苏 泰州 225300; 2. 泰州市第四人民医院, 江苏 泰州 225300;  
3. 徐州医科大学, 江苏 徐州 221004)

**[摘要]** **目的:**比较丹参素、丹酚酸 B 对谷氨酸诱导的 PC12 细胞兴奋性毒的保护作用。**方法:**以 PC12 细胞为研究对象, 将培养的细胞分为 5 组, 分别为空白组, 谷氨酸处理组(模型组), 丹酚酸 B 组, 丹参素组, 维生素 E 组(20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 除空白组外和模型组外, 丹酚酸 B, 丹参素和维生素 E 预处理 1 h 后加谷氨酸共同孵育 24 h。采用噻唑蓝(MTT)法检测细胞活性, 乳酸脱氢酶(LDH)法检测乳酸脱氢酶的漏出率, 流式细胞术检测细胞内活性氧的含量。**结果:**与空白组比较, 丹参素、丹酚酸 B 能够明显抑制谷氨酸诱导的 PC12 细胞的神经毒性、阻止 LDH 的漏出( $P < 0.05$ ), 在 50, 100, 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  剂量呈一定的量效关系, 在 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  剂量浓度下, 丹参素在抑制 PC12 细胞内活性氧(ROS)的堆积、减弱相对荧光强度方面, 略好于丹酚酸 B (约为 12.5%), 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  剂量下, 丹参素对 PC12 细胞的保护作用强于丹酚酸 B。**结论:**在选择实验模型和剂量条件下, 丹参素、丹酚酸 B 均有潜在的保护谷氨酸损伤的 PC12 细胞的作用, 且丹参素药效略强于丹酚酸 B。

**[关键词]** 作用比较; 丹参素; 丹酚酸 B; PC12 细胞

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)11-0148-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016110148

### Comparison of Two Water-soluble Components in Salvia Radix et Rhizoma on Protective Effect for Glutamate-induced Excitotoxicity in PC12 Cells

YUAN Hai-jian<sup>1\*</sup>, YIN Wen-jing<sup>2</sup>, AN Yi-qiang<sup>3</sup>, CHEN Yi-gang<sup>1</sup>, WANG Hui<sup>1</sup>

(1. Taizhou Polytechnic College, Taizhou 225300, China;  
2. Taizhou Fourth People's Hospital, Taizhou 225300, China;  
3. Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To compare the protective effect of tanshinol and salvianolic acid B on glutamate-induced excitotoxicity in PC12 cells. **Method:** With PC12 cells as the study objects, the cultured cells were divided into blank group, glutamic acid treatment group (model group), salvianolic acid B group, tanshinol group, and vitamin E group (20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). The cells in all the other groups except blank group and model group were treated with additional glutamic acid for co-incubation for 24 h after pre-treatment with salvianolic acid B, tanshinol and vitamin E respectively for 1 h. The cell activity was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method; lactic dehydrogenase (LDH) method was used to detect the leakage rate of lactate dehydrogenase, and the content of intracellular reactive oxygen was detected by the flow cytometry. **Result:** As compared with the blank group, tanshinol and salvianolic acid B could significantly inhibit the glutamate-induced neurotoxicity in PC12 cells and prevent the leakage of LDH ( $P < 0.05$ ), showing a dose-response relationship in 50, 100, 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  dose. At 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  concentration, tanshinol was slightly better than salvianolic acid B in inhibiting reactive oxygen species (ROS) accumulation in PC12 cells and reducing the relative fluorescence

**[收稿日期]** 20150608(004)

**[基金项目]** 江苏省高等学校创新创业训练计划项目(20151206001Y);泰州市科技局项目(1828666KY4);江苏省青蓝工程项目(2016)

**[通讯作者]** \*袁海建, 讲师, 从事中药新剂型与新技术研究, Tel:0523-86668793, E-mail: yuanjian8101@163.com

intensity (about 12.5%). At the same dose condition, tanshinol was superior to salvianolic acid B in the protective effect on PC12 cells. **Conclusion:** Under the selective research models and concentrations, both tanshinol and salvianolic acid B had the potential effects on protecting glutamate-induced injury in PC12 cells, and the protective effect of tanshinol was slightly better than that of salvianolic acid B.

[**Key words**] comparison of the effects; tanshinol; salvianolic acid B; PC12 cells

丹参素、丹酚酸 B 是丹参中的主要水溶性成分<sup>[1-2]</sup>,对心脑血管疾病有较好的治疗作用。谷氨酸在维持神经元信号传递、参与突触信息的贮存<sup>[3]</sup>、神经细胞迁移、分化和死亡中都起到重要作用<sup>[4]</sup>,是中枢神经系统比较重要的氨基酸之一。

已有文献报道丹酚酸 B 对大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞株(PC12)兴奋毒保护作用<sup>[5]</sup>,研究报道也指出丹参素保护心肌、保护神经、抗炎和提高免疫的药理活性明显<sup>[6]</sup>,但比较丹参中丹参素和丹酚酸 B 保护 PC12 兴奋毒的研究尚未见相关报道。本研究将以谷氨酸诱导 PC12 损伤细胞为模型,采用噻唑蓝(MTT)法检测细胞活性,乳酸脱氢酶(LDH)法检测乳酸脱氢酶的漏出率,流式细胞术检测细胞内活性氧的含量,比较丹参素、丹酚酸 B 两种成分对谷氨酸所致 PC12 细胞损伤的作用,为进一步研究此类药物的作用机制以及合理使用丹参水溶性有效成分提供数据支持。

## 1 材料

**1.1 细胞株** PC12 细胞(南京凯基生物科技有限公司)。

**1.2 药物及试剂** 丹参素、丹酚酸 B 对照品(南京广润生物制品有限公司,纯度均 $\geq 98\%$ ),MTT(美国 Sigma 公司),谷氨酸(BIOSHARP,批号 207405),维生素 E(上海哈灵生物科技有限公司,批号 20130521),乳酸脱氢酶(LDH)测定试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司,货号 KGT02448),组织氧化应激活性氧(ROS)测定试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司,货号 KGTY4681),细胞裂解液(南京建成生物工程研究所)。

**1.3 仪器** MCO-18M 型 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(日本 Sanyo 公司),DSX500i 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司),ZW-A 型微量振荡器(常州中捷实验仪器制造有限公司),5430R 型冷冻离心机(德国艾本德公司),酶标仪(TECAN 公司),Millipore-Q 型纯水系统(美国 Millipore 公司),CytoFLEX 型流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** 参考文献[5]方法,PC12 细胞在

37 °C 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养箱中,用含 10% 小牛血清的 DMEM 高糖培养液,常规传代培养,每 2~3 d 换液 1 次,3~4 d 传代 1 次,选择对数生长期细胞开展实验。

**2.2 建立模型** 取生长状态良好的 PC12 细胞加入胰酶消化,使其脱壁。用含 10% 小牛血清的 DMEM 高糖培养液吹打细胞,调整细胞密度为  $7 \times 10^3$  个/mL,制成细胞悬液,接种于 96 孔培养板。放入细胞培养箱中培养 24 h 后细胞完全贴壁,弃去原培养液,换含有不同浓度谷氨酸的 DMEM 高糖培养液,另设阳性药组(维生素 E,浓度为  $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )和空白组,每个药物浓度设置 6 个复孔,于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 24 h 之后,除去培养孔中培养液,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  含 10% MTT 的空白培养基( $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  MTT),继续培养 4 h 后终止,除去孔内培养基,每孔加 100  $\mu\text{L}$  二甲亚砜,置微量振荡仪上振荡 10 min,使结晶充分溶解,放入酶标仪测定其吸光度 A,检测波长为 590 nm。计算存活率,重复 3 次。

**2.3 实验分组** 取生长状态良好的 PC12 细胞接种于 96 孔培养板,放入细胞培养箱中培养 24 h 后细胞完全贴壁,弃去原培养液。将细胞分为 5 组分别为正常组(不含谷氨酸的完全培养基),谷氨酸处理组(完全培养基+谷氨酸),丹酚酸 B 处理组(完全培养基+丹酚酸 B+谷氨酸),丹参素处理组(完全培养基+丹参素+谷氨酸),维生素 E( $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )处理组(完全培养基+维生素 E+谷氨酸),丹酚酸 B、丹参素和维生素 E 预处理 1 h 后加谷氨酸共同孵育 24 h。之后除去培养孔中培养液,每孔加入含 10% MTT 的空白培养基( $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  MTT) 100  $\mu\text{L}$ ,继续培养 4 h 后终止,除去孔内培养基,每孔加二甲亚砜 100  $\mu\text{L}$ ,置微量振荡仪上振荡 10 min,使结晶充分溶解,放入酶标仪测定其 A,检测波长为 470 nm 与 590 nm。按下式计算细胞生长抑制率:

$$\text{细胞抑制率} = \left( 1 - \frac{A_{570\text{用药物}} - A_{490\text{用药物}}}{A_{570\text{空白组}} - A_{490\text{空白组}}} \right) \times 100\%$$

**2.4 乳酸脱氢酶(LDH)活性测定** 取生长状态良好的 PC12 细胞接种于 96 孔培养板,放入细胞培养箱中培养 24 h 后细胞完全贴壁,弃去原培养液。将

细胞按上述分为 5 组并用相应药物进行处理。24 h 后, 每组移取 6 个复孔各培养上清液 100  $\mu\text{L}$ , 按 LDH 试剂盒说明书检测各组细胞上清 LDH 活性。

**2.5 细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 测定** 取生长状态良好的 PC12 细胞接种于 96 孔培养板, 放入细胞培养箱中培养 24 h 后细胞完全贴壁, 弃去原培养液。将细胞按上述分为 5 组并用相应药物进行处理。24 h 后去除细胞上清液, 用胰酶消化收集细胞。按照 ROS 试剂盒操作说明书进行实验, 向装有细胞的离心管中加入含有 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 2', 7'-二氯荧光黄双乙酸盐 (DCFH-DA) 的无血清 DMEM 培养基中, 置于 37  $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  条件下培养箱中培养 (细胞染色) 30 min 后, 用流式细胞检测仪检测 (激发波长 488 nm, 发射波长 525 nm)。

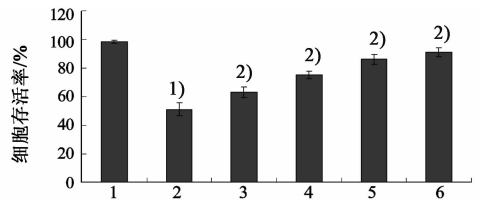
**2.6 统计学分析** 采用 SPSS 19.0 统计学软件进行分析, 数据显著性分析比较用独立样本  $t$  检验, 所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 谷氨酸对 PC12 细胞毒性作用** 10 ~ 45  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  谷氨酸对 PC12 细胞的生长有明显的抑制作用, 有一定的量效关系, 其中 30  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  谷氨酸对细胞生长的抑制率接近 50%, 因此选择该浓度作为造模浓度开展后续实验。

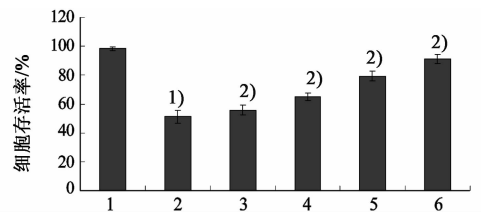
**3.2 丹参素、丹酚酸 B 不同剂量组对谷氨酸抑制 PC12 细胞生长的影响** 分别设置实验分为正常组、谷氨酸 (30  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 模型组, 维生素 E (20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 阳性药组, 丹参素和丹酚酸 B 高 (200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 中 (100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 低 (50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 剂量组。与空白组比较, 模型组的细胞存活率明显降低 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 丹参素和丹酚酸 B 高、中、低剂量组均明显升高细胞存活率 ( $P < 0.05$ )。丹参素对抑制谷氨酸诱导的 PC12 细胞损伤、提高损伤细胞的存活率等方面, 略强于丹酚酸 B, 丹参素的药效强度比丹酚酸 B 稍强。见图 1, 2。

**3.3 丹参素、丹酚酸 B 不同剂量组对 PC12 细胞 LDH 释放的影响** 与空白组比较, 模型组用谷氨酸作用 PC12 细胞后, 各组细胞上清的 LDH 漏出率明显增高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 丹参素、丹酚酸 B 不同剂量作用细胞 24 h 后, 细胞 LDH 漏出率有不同程度的降低 ( $P < 0.05$ )。丹参素和丹酚酸 B 均能减少谷氨酸致 PC12 神经细胞损伤 LDH 释放, 丹参素比丹酚酸 B 在减少 LDH 漏出率、维持细胞的活性上略显优势。见图 3, 4。



1. 空白组; 2. 模型组; 3. 丹参素 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组; 4. 丹参素 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组; 5. 丹参素 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组; 6. 维生素 E 组 (图 3 同); 与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$  (图 2 ~ 5 同)

图 1 丹参素对谷氨酸抑制的 PC12 细胞生长的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )  
Fig. 1 Effects of tanshinol on glutamate induced growth inhibition in PC12 cells observed under inverted microscope ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )



1. 空白组; 2. 模型组; 3. 丹酚酸 B 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组; 4. 丹酚酸 B 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组; 5. 丹酚酸 B 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组; 6. 维生素 E 组 (图 4 同)  
图 2 丹酚酸 B 对谷氨酸诱导的 PC12 细胞损伤的保护作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

图 2 Protective effects of salvianolic acid B on glutamate induced growth inhibition in PC12 cells observed under inverted microscope ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

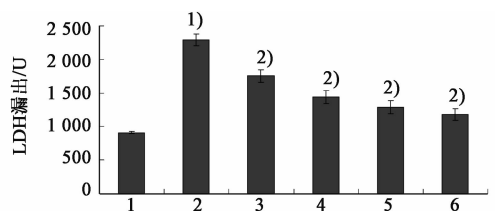


图 3 丹参素对谷氨酸致 PC12 神经细胞损伤 LDH 释放的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

图 3 Effects of tanshinol on glutamate-induced LDH release in PC12 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

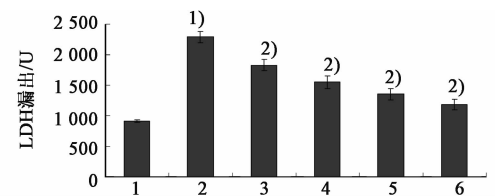
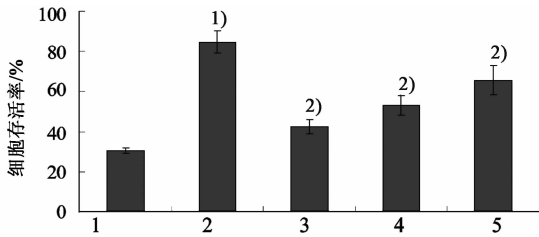


图 4 丹酚酸 B 对谷氨酸致 PC12 神经细胞损伤 LDH 释放的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

图 4 Effects of salvianolic acid B on glutamate-induced LDH release in PC12 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

**3.4 丹参素、丹酚酸 B 对 PC12 细胞 ROS 表达的影响** 按 2.5 项下操作, 根据预实验细胞染色后荧光成像效果, 选择空白组、谷氨酸 (30  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 模型组, 维生素 E (20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 组, 丹参素 (100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )

组,丹酚酸 B( $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )组进行实验,测定两药物对 PC12 细胞 ROS 表达的影响。与空白组比较,模型组 PC12 细胞受到谷氨酸损伤后,细胞内 ROS 生成明显增多,相对荧光强度明显升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,维生素 E、丹酚酸 B 和丹参素组细胞内 ROS 明显减少,相对荧光强度明显减少( $P < 0.05$ )。见图 5。



1. 空白组;2. 谷氨酸组;3. 维生素 E 组;4. 丹参素  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组;  
5. 丹酚酸 B  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组

图 5 丹参素、丹酚酸 B 对 PC12 细胞 ROS 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )  
Fig. 5 Effects of tanshinol and salvianolic acid B on ROS expression in PC12 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

#### 4 讨论

PC12 细胞有神经内分泌细胞的一般特征,并具有可传代的特点,在神经生理和药理学研究中广泛被应用。报道称谷氨酸对神经元兴奋性呈时间和剂量依赖性,本实验证实  $10 \sim 45 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  谷氨酸对 PC12 细胞的生长有明显的抑制作用,实验选择细胞生长抑制率接近 50% 的浓度作为实验浓度<sup>[3]</sup>。从实验结果来看,该实验浓度可以满足实验需求。丹参素和丹酚酸 B 作为丹参中的主要水溶性成分,其对心脑血管具有保护作用的效果是相对明确的,本研究主要探讨二者对谷氨酸诱导的 PC12 细胞兴奋毒保护作用的强弱,在选用的实验模型及条件下可以初步看出,丹参素对 PC12 细胞兴奋毒所产生的保护作用略强于丹酚酸 B。

糖代谢中 LDH 发挥重要作用,是细胞能量代谢的关键酶,几乎存在于所有组织中,故测定 LDH 的活性可用直接反映细胞代谢活性情况,而 LDH 漏出率越高在细胞内越少,细胞的活性越低。本研究取生长状态良好的 PC12 细胞,采用 LDH 试剂盒检测各组细胞上清 LDH 活力,结果显示实验组高、中、低 3 个剂量组均能减少谷氨酸致 PC12 神经细胞损伤 LDH 释放,且在高、中、低 3 个剂量浓度下,丹参素略强于丹酚酸 B。在细胞增殖、分化和凋亡的众多相关信号通路中,ROS 的调控作用不容忽视。有研究报道证实镧促使大鼠大脑皮层神经元存活率降低的原因与细胞内 ROS 浓度升高有关<sup>[7]</sup>。因此,本研

究选择 ROS 的测定作为检测项目,在细胞染色后,用流式细胞检测仪检测上述两实验组的相对荧光强度分别为( $53.2 \pm 4.8$ )% 和 ( $65.7 \pm 7.5$ )%,与模型组相比具有显著性差异,表明在相同剂量浓度 ( $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 下,丹参素在抑制 PC12 细胞内的 ROS 生成、减弱相对荧光强度略好于丹酚酸 B,丹参素在减少 ROS 生成而对细胞产生的保护作用稍强于丹酚酸 B。

Caspase-3 是天冬氨酸特异性酶切半胱氨酸蛋白酶的重要一员,该蛋白酶在神经元细胞凋亡中起到重要的作用:既是神经细胞凋亡的执行人,也与神经退行性疾病的致病机理有关<sup>[8]</sup>。因此进一步研究诸如 Caspase-3, B 淋巴细胞瘤-2 基因 (Bcl-2) 和 Bcl 相关 X 蛋白 (Bax) 等蛋白<sup>[6,9]</sup> 的表达,有助于进一步比较丹参中 2 个主要水溶性成分保护 PC12 细胞的强弱,从而为阐明其作用机制提供数据支持,而这也是后续深入研究的努力方向。

#### [参考文献]

- [1] 刘静,戴忠,王钢力,等. 丹参活性成分及相关分离分析方法研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(11):288-295.
- [2] 袁海建,安益强,陈宜刚. 丹参素、丹酚酸 B 与不同血浆蛋白结合率的测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(21):136-139.
- [3] 曾可斌,胡长林,陈阳美. 谷氨酸对原代培养海马神经元的兴奋特性[J]. 中国应用生理学杂志,2009,21(4):381-383.
- [4] Luo W B, Wang Y P. Magnesium lithospermate B inhibits hypoxia-induced calcium influx and nitric oxide release in endothelial cells[J]. Acta Pharmacol Sin, 2001, 22(12): 1135-1140.
- [5] 王训翠,朱国旗. 丹酚酸 B 对谷氨酸诱导的 PC12 细胞兴奋毒保护作用的研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(3):353-357.
- [6] 王冰瑶,吴晓燕,樊官伟. 丹参素保护心血管系统的药理作用机制研究进展[J]. 中草药,2014,45(17):2571-2575.
- [7] 吴洁,刘秋芳,杨敬华,等. 镧对原代神经元存活率和细胞内活性氧含量的影响[J]. 毒理学杂志,2009,23(1):425-427.
- [8] 张亚辉,李佳,周忠良. Caspase-3: 治疗神经退行性疾病的新靶点[J]. 生物化学与生物物理进展,2003,30(2):175-179.
- [9] Yin Y, Guan Y, Duan J, et al. Cardioprotective effect of Danshensu against myocardial ischemia/reperfusion injury and inhibits apoptosis of H9c2 cardiomyocytes via Akt and ERK1/2 phosphorylation [J]. Eur J Pharmacol, 2013, 699(1):219-226.

[责任编辑 周冰冰]