

连翘酯苷对 PC12 细胞增殖及其细胞损伤模型的保护作用

孙秀萍¹, 王忆杭², 王立为², 秦川¹, 刘新民^{2*}
(1. 中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京 100021;
2. 中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100193)

[摘要] 目的: 研究连翘酯苷对 PC12 细胞增殖及其损伤模型的影响。方法: 应用谷氨酸(20 mmol·L⁻¹)、低糖低血清培养基及 β 淀粉样蛋白₂₅₋₃₅ ($A\beta_{25-35}$, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 建立谷氨酸、低糖低血清及 $A\beta_{25-35}$ 致 PC12 细胞损伤模型, 观察连翘酯苷低、中、高浓度(0.1, 1, 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 剂量对上述模型细胞存活率的影响, 同时观察连翘酯苷低、中剂量对 $A\beta_{25-35}$ 致 PC12 细胞凋亡的影响。结果: 连翘酯苷可提高 PC12 细胞存活率, 提高谷氨酸、低糖低血清及 $A\beta_{25-35}$ 致 PC12 细胞损伤模型的存活率, 与模型组比较, 有显著性差异($P < 0.05$), 并呈现一定量效关系。连翘酯苷(0.1, 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 可降低 $A\beta_{25-35}$ 引起 PC12 细胞凋亡率($P < 0.05, P < 0.01$)。结论: 连翘酯苷在体外实验具有神经细胞保护作用。

[关键词] 连翘酯苷; PC12; 谷氨酸; β 淀粉样蛋白; 细胞凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)24-0197-04

[doi] 10.11653/syfj2013240197

Neuroprotective Effects of Forsythiaside on Glutamate, Low-glucose and Low Serum, $A\beta_{25-35}$ -induced Neurotoxicity in PC 12 Cell

SUN Xiu-ping¹, WANG Yi-hang², WANG Li-wei², QIN Chuan¹, LIU Xin-min^{2*}

(1. Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100021, China; 2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the neuroprotective effects of forsythiaside on glutamate, low-glucose and low-serum, amyloid beta₂₅₋₃₅ ($A\beta_{25-35}$)-induced neurotoxicity in PC12 cell. **Method:** The glutamate (20 mmol·L⁻¹), low-glucose and low serum and $A\beta_{25-35}$ induced (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) neurotoxicity models in PC12 cell were established and the neuroprotective effects of forsythiaside (0.1, 1, 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on above models were observed. **Result:** Forsythiaside could improve the proliferation on PC12 cell and significantly reduced cell death induced by glutamate, low-glucose and low-serum and $A\beta_{25-35}$. In addition, forsythiaside (0.1, 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) significantly inhibited cell apoptosis induced by $A\beta_{25-35}$. **Conclusion:** forsythiaside has neuroprotective effects on glutamate, low-glucose and low-serum and $A\beta_{25-35}$ -induced neurotoxicity in PC12 cell.

[Key words] forsythiaside; PC12 cell; glutamate; $A\beta$; apoptosis

连翘为木犀科植物的干燥果实, 具有清热解毒、消肿散结之功效。连翘酯苷为其主要活性成分, 具有抗菌、抗炎及体外抗氧化等药理作用^[1]。近年的

研究发现, 连翘酯苷可明显提高东莨菪碱、 β 淀粉样蛋白、SAMP8、脑缺血及自然衰老小鼠等痴呆动物模型的学习记忆能力, 表现出一定的神经保护作用。

[收稿日期] 20130422(020)

[基金项目] 航天医学基础与应用国家重点实验室研究基金项目(SMFA10K01); 全军医学科技“十二五”科研项目(BWS11J052); 对欧科技合作专项-保健品风险效益评估合作研究(1108)

[第一作者] 孙秀萍, 博士, 助理研究员, 从事精神神经药理研究, Tel: 010-67770093, E-mail: supering_sun@126.com

[通讯作者] *刘新民, 博士, 研究员, 从事精神神经药理研究, Tel: 010-57833245, E-mail: liuxinmin@hotmail.com

用^[2-5]。其机制可能与连翘酯苷抗氧化、抗炎等有关。本研究从体外实验的角度探讨连翘酯苷的神经细胞保护作用,为阐明其防治老年性痴呆的神经保护作用机制提供新的实验依据。

1 材料

1.1 药品与试剂 连翘酯苷由中国医学科学院药用植物研究所化学室制备,纯度 >95%。DMEM 低糖培养基(批号 1342967, Gibco 公司),胎牛血清(批号 NVJ031, Hyclone 公司),马血清(批号 AVJ8249, Hyclone 公司),甲基噻唑蓝四氮唑盐(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT, 批号 0793, Amresco 公司),二甲基亚砷(dimethyl sulfoxid, DMSO, 批号 30072492, 北京化学试剂公司),L-谷氨酸(批号 F20080714, 国药集团化学试剂有限公司), $A\beta_{25-35}$ (批号 29H49501, Sigma 公司),Annexin-FITC 凋亡检测试剂盒(上海宝赛公司)。

1.2 细胞系 PC12 细胞由中国医学科学院基础医学研究所细胞中心提供。

1.3 仪器 酶联免疫检测仪(Molecular Device 公司);流式细胞仪(美国 BD 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养及分组 将复苏后的 PC12 细胞接种于培养瓶,培养液为 DMEM 培养液,置于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养。当培养瓶下壁细胞铺满 70% ~ 80% 时,进行传代。采用对数生长期的细胞进行实验。实验分组如下:对照组、模型组,连翘酯苷低剂量组(1×10^{-7} mol·L⁻¹)组、连翘酯苷中剂量组(1×10^{-6} mol·L⁻¹)组、连翘酯苷高剂量组(5×10^{-6} mol·L⁻¹)。

2.2 细胞存活率检测 每孔加 5 g·L⁻¹ MTT 20 μ L,置于 37 °C, 5% 的 CO₂ 细胞培养箱中孵育 4 h,弃上清,每孔加入 DMSO 150 μ L,摇床均匀震荡 10 min,使蓝紫色结晶完全溶解,用酶标仪检测 570 nm 处吸光度(A)。

$$\text{细胞存活率} = (\text{实验组 A} - \text{空白孔 A}) / (\text{对照组 A} - \text{空白孔 A}) \times 100\%$$

2.3 对 PC12 细胞增殖作用 取对数生长期细胞按 1×10^8 个/L 密度接种于 96 孔培养板中,每孔 100 μ L,置培养箱中孵育 24 h 后,各给药组加入相应终浓度的含药培养液,对照组加入等量的空白培养液,每组设 6 个复孔。继续培养 24 h 后,MTT 比色法检测 PC12 细胞存活率。

2.4 对谷氨酸致 PC12 细胞损伤的影响 取对数生长期细胞按 1×10^8 个/L 密度接种至 96 孔板 24

h 后,药物组加入不同终浓度的连翘酯苷(0.1, 1, 5 μ mol·L⁻¹)预处理 1 h 后,模型组和药物组分别加入终浓度为 20 mmol·L⁻¹ 的谷氨酸,对照组加入等量培养液,每组设 6 个复孔。继续培养 24 h 后,MTT 比色法检测 PC12 细胞存活率。

2.5 对低糖低血清培养致 PC12 细胞损伤的影响 取对数生长期细胞按 1×10^8 /L 密度接种至 96 孔板 24 h 后,模型组以低糖低血清培养液替换原培养液,各给药组加入含药低糖低血清培养液,对照组加入 DMEM 完全培养液,继续培养 24 h 后,MTT 比色法检测 PC12 细胞存活率。

2.6 对 $A\beta_{25-35}$ 致 PC12 细胞损伤的影响 取对数生长期细胞按 1×10^8 /L 密度接种至 96 孔板 24 h 后,药物组加入不同终浓度的连翘酯苷(0.1, 1, 5 μ mol·L⁻¹)预处理 1 h,模型组和给药组再加入终浓度为 10 μ mol·L⁻¹ 的 $A\beta_{25-35}$,对照组加入 DMEM 培养液,继续培养 24 h 后,MTT 比色法检测 PC12 细胞存活率。

2.7 对 $A\beta_{25-35}$ 致 PC12 细胞凋亡的影响 PC12 细胞接种于 6 孔板 24 h 后,药物组加入不同终浓度的连翘酯苷(1, 0.1 μ mol·L⁻¹)预处理 1 h,模型组和给药组再加入终浓度为 10 μ mol·L⁻¹ 的 $A\beta_{25-35}$,对照组加入 DMEM 培养液。继续培养 24 h 后,收集细胞,调整细胞的密度为 1×10^9 /L。按试剂盒说明以碘化丙啶(PI)和 FITC 进行细胞的双染凋亡检测。将细胞重悬于 200 μ L 封闭液中,加入 10 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L 碘化丙啶(PI),轻轻混匀,避光室温反应 15 min。每个样品补充 300 μ L 封闭液,流式细胞仪检测。

2.8 统计学处理 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各組间差异显著性统计采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析,各組之间参数比较采用单因素方差分析检验, $P < 0.05$ 为显著性差异。

3 结果

3.1 对 PC12 细胞增殖作用的影响 如表 1 所示,连翘酯苷各给药组均能够显著提高 PC12 细胞存活率,与对照组相比,具有显著性差异($P < 0.05$)。

3.2 对谷氨酸致 PC12 细胞损伤模型细胞存活率影响 谷氨酸模型组与对照组相比 PC12 细胞存活率明显降低($P < 0.05$)。用连翘酯苷预处理后,各给药组能明显增加 PC12 细胞生存率,与模型组相比,具有显著性差异($P < 0.05$)。见表 2。

3.3 对低糖低血清培养基致 PC12 细胞损伤模型细胞存活率的影响 低糖低血清培养液模型组与对

表 1 连翘酯苷对 PC12 细胞增殖作用的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	A	细胞存活率/%
对照	-	0.470 ± 0.006	100
连翘酯苷	0.1	0.491 ± 0.014 ¹⁾	104
	1	0.504 ± 0.044 ¹⁾	107
	5	0.579 ± 0.021 ¹⁾	123

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

表 2 连翘酯苷对谷氨酸 20 mmol·L⁻¹致 PC12 细胞损伤模型细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	A	细胞存活率/%
对照	-	0.470 ± 0.005	100
谷氨酸	-	0.261 ± 0.017 ¹⁾	55
连翘酯苷	0.1	0.297 ± 0.011 ²⁾	63
	1	0.317 ± 0.037 ²⁾	67
	5	0.377 ± 0.024 ²⁾	80

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 3~4 同)。

对照组相比 PC12 细胞生存率明显降低 ($P < 0.05$)。用连翘酯苷预处理后,各给药组明显增加 PC12 细胞生存率与模型组相比,具有显著性差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 3。

表 3 连翘酯苷对低糖低血清培养液致 PC12 细胞损伤模型细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	A	细胞存活率/%
对照	-	0.676 ± 0.021	100
低糖低血清模型	-	0.529 ± 0.024 ¹⁾	78
连翘酯苷	0.1	0.567 ± 0.004 ²⁾	84
	1	0.749 ± 0.032 ²⁾	111
	5	1.212 ± 0.013 ³⁾	179

3.4 对 $A\beta_{25-35}$ 致 PC12 细胞损伤的细胞存活率影响 β -淀粉样蛋白模型组与对照组相比 PC12 细胞生存率明显降低 ($P < 0.05$)。用连翘酯苷预处理后, 1×10^{-7} , 1×10^{-6} , $5 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 给药组与模型组相比能明显增加 PC12 细胞生存率 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 4。

3.5 对 $A\beta_{25-35}$ 致 PC12 细胞凋亡的影响 PI 和 Annexin-FITC 双染检测结果表明,各实验组之间 PC12 凋亡率出现显著差别。连翘酯苷 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组凋亡细胞最少 (14.19 ± 1.04)%, 连翘酯苷 $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组次之 (24.01 ± 0.59)%, 与 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $A\beta_{25-35}$ 损伤模型组 (28.58 ± 1.80)% 相比,均显著降低 PC12 细胞凋亡率 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

表 4 连翘酯苷对 β 淀粉样蛋白致 PC12 细胞损伤的细胞存活率影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	A	细胞存活率/%
对照	-	0.464 ± 0.021	100
$A\beta_{25-35}$	-	0.383 ± 0.001 ¹⁾	82
连翘酯苷	0.1	0.403 ± 0.008 ²⁾	86
	1	0.468 ± 0.001 ²⁾	100
	5	0.499 ± 0.009 ²⁾	107

4 讨论

针对老年性痴呆的不同病因,人们在体外诱导和建立了多种神经细胞病理模型,如过氧化氢氧化应激损伤模型、谷氨酸损伤模型、淀粉样蛋白损伤模型及缺氧缺氧等损伤模型,它们具有简单快速、条件易控、便于重复等优点,已成为抗痴呆药物筛选及机制研究的常用模型^[5-8]。PC12 细胞为大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞克隆化的细胞株,具有较典型的神经内分泌细胞特征,广泛应用于神经系统疾病防治药物的筛选及作用机制方面的研究。

谷氨酸是中枢神经系统最主要的兴奋性氨基酸,对神经系统正常功能的维持具有重要的作用。在老年性痴呆等病理条件下,谷氨酸过度激活其突触后受体,介导大量钙离子内流,导致钙超载,引起神经元损伤^[9]。因此,谷氨酸引起的细胞损伤模型已成为老年性痴呆等中枢神经系统疾病研究的重要工具。本研究谷氨酸采用 $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,造成适度损伤模型。连翘酯苷各剂量组与模型组相比能明显增加 PC12 细胞存活率,并呈现量效关系。提示连翘酯苷对谷氨酸引起的兴奋性损伤具有一定保护作用。

神经细胞代谢活跃,对脑缺血、缺氧耐受较低,极易发生神经细胞能量代谢障碍,引起神经元凋亡或变性坏死,最终导致血管性痴呆等脑功能障碍性疾病^[10-11]。本实验采用低糖低血清培养液致 PC12 细胞损伤模型,模拟脑缺血状态下的神经细胞损伤,探讨连翘酯苷的保护作用。实验结果表明,低糖低血清模型显著降低 PC12 细胞存活率,连翘酯苷干预后,细胞存活率随连翘酯苷剂量的增加而升高,具有明显的量效依赖性。Kim 等报道连翘酯苷对沙土鼠脑缺血具有神经保护作用。综上,体内、体外实验结果提示连翘酯苷对脑缺血性损伤具有保护作用。

$A\beta$ 是脑组织中老年斑 (SP) 的主要成分,也是形成 SP 的重要因素。大量研究表明 $A\beta$ 引起的神经毒作用是阿尔茨海默病发病的共同通路^[12]。目前认为细胞凋亡是 $A\beta$ 神经毒作用的重要机制之

一^[13]。本研究建立 $A\beta_{25-35}$ 致 PC12 细胞损伤模型, 观察连翘酯苷对 $A\beta_{25-35}$ 致 PC12 细胞存活率和细胞凋亡的影响。实验结果显示连翘酯苷各剂量组可明显抑制 $A\beta$ 诱导的细胞损伤, 提高细胞存活率, 并能减轻 $A\beta_{25-35}$ 引起的细胞凋亡。王忆杭等报道连翘酯苷对 $A\beta$ 淀粉样蛋白小鼠模型具有神经保护作用。综上, 体内、体外实验结果提示连翘酯苷对 $A\beta$ 神经毒性损伤具有保护作用。

本文采用 PC12 细胞增殖、谷氨酸、低糖低血清和 $A\beta_{25-35}$ 损伤四种细胞模型, 研究连翘酯苷对神经细胞的保护作用。结果表明连翘酯苷促进 PC12 细胞增殖, 减轻 PC12 细胞谷氨酸、低糖低血清及 β 淀粉样蛋白损伤, 并呈现一定量效关系。上述保护作用可能是连翘酯苷促进 PC12 细胞增殖和拮抗各种损伤的双重作用体现。以上实验结果显示连翘酯苷在体外实验中具有神经细胞保护作用, 为连翘酯苷防治老年性痴呆的神经保护机制研究提供了新的实验依据。

[参考文献]

[1] 林丽美, 王智民, 王金华, 等. 金银花、连翘及银翘药对水煎剂的抗炎、解热作用研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(4): 473.

[2] Wang H M, Wang L W, Liu X M, et al. Neuroprotective effects of forsythiaside on learning and memory deficits in senescence-accelerated mouse prone (SAMP8) mice[J]. Pharmacol Biochem Behav, 2013, 105(2013): 134.

[3] 李长禄, 王红梅, 王立为. 连翘酯苷对拟 AD 动物模型学习记忆的改善作用[J]. 山东医药, 2012, 52(44): 4.

[4] 王忆杭, 肖培根, 刘新民. 连翘酯苷对拟 ad 复合动物模型小鼠学习记忆的改善作用及其机制研究[J]. 中国实验动物学报, 2011, 19(5): 423.

[5] 胡亚娥, 周爱玲, 茅家慧, 等. 脑益康药物血清对谷氨酸和过氧化氢诱导的 PC12 细胞损伤的保护作用[J]. 中国临床康复, 2006, 10(3): 45.

[6] 秦基倡. 还脑益聪方对 $A\beta_{(1-42)}$ 致阿尔茨海默病模型大鼠学习记忆、脑组织病理及 tau 蛋白磷酸化的影响[D]. 北京: 北京中医药大学, 2012.

[7] 王亚利, 王中卫, 宁潍, 等. $A\beta$ 诱导 PC-12 细胞凋亡建立阿尔茨海默病细胞模型[J]. 西安医科大学学报, 2002, 23(2): 129.

[8] 张甘霖, 李萍, 李玉洁, 等. 褐藻多糖硫酸酯通过溶酶体组织蛋白酶 D 调节过氧化氢诱导的 PC12 细胞凋亡[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(8): 1083.

[9] 孙旭莹. 兴奋性突触传递对 tau 蛋白表达和磷酸化的影响及其在阿尔茨海默病发病中的作用[D]. 武汉: 华中科技大学, 2012.

[10] Gu X M, Huang H C, Jiang Z F. Mitochondrial dysfunction and cellular metabolic deficiency in Alzheimer's disease [J]. Neurosci Bull, 2012, 28(5): 631.

[11] 张焱萍, 王蓉. 能量代谢障碍与阿尔茨海默病[J]. 中国老年学杂志, 2007, 27(17): 1729.

[12] Sery O, Povova J, Misek I, et al. Molecular mechanisms of neuropathological changes in Alzheimer's disease: a review[J]. Folia Neuropathol, 2013, 51(1): 1.

[13] Maiese K, Chong Z Z, Shang Y C, et al. Targeting disease through novel pathways of apoptosis and autophagy [J]. Expert Opin Ther Targets, 2012, 16(12): 1203.

[责任编辑 聂淑琴]