

# 三七总皂苷保护 PC12 细胞对抗过氧化氢损伤的作用

夏星<sup>1</sup>, 钟振国<sup>2\*</sup>, 冯丹霞<sup>2</sup>

(1. 广州中医药大学中药学院, 广州 510405; 2. 广西中医药大学药学院, 南宁 530001)

**[摘要]** **目的:**考察三七总皂苷在 PC12 细胞中对过氧化氢引起损伤的细胞保护作用。**方法:**采用 MTT 法考察 0.01 ~ 100 mg·L<sup>-1</sup>三七总皂苷对正常 PC12 细胞活力的影响,并在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激的 PC12 细胞中考察 0.1 ~ 10 mg·L<sup>-1</sup>的三七总皂苷对细胞活力的影响,通过对细胞活力的考察选择三七总皂苷合适的实验剂量,测定三七总皂苷 0.1, 1 mg·L<sup>-1</sup>对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激的 PC12 细胞中活性氧水平、过氧化氢酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活力的影响以及对丙二醛(MDA)含量的影响。**结果:**三七总皂苷在 0.1 ~ 10 mg·L<sup>-1</sup>浓度能提高正常 PC12 细胞活力,并能显著提高 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激的 PC12 细胞活力( $P < 0.01$ )。0.1, 1 mg·L<sup>-1</sup>2 个剂量的三七总皂苷均能显著减少 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激的 PC12 细胞中活性氧水平,提高 SOD 活力( $P < 0.001$ )和 GSH-Px 活力( $P < 0.001$ ),并减少 MDA 生成( $P < 0.001$ )。**结论:**三七总皂苷能通过增强细胞内抗氧化酶活力,保护 PC12 细胞对抗氧化损伤。

**[关键词]** 三七总皂苷; PC12 细胞; 氧化损伤

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)04-0216-04

## Effect of *Panax notoginseng* Saponins Protect PC12 Cell Against Hydrogen Peroxide Induced Damage

XIA Xing<sup>1</sup>, ZHONG Zhen-guo<sup>2\*</sup>, FENG Dan-xia<sup>2</sup>

(1. School of Chinese Pharmaceutical Science, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;

2. School of Pharmaceutical Science, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the protective effect of *Panax notoginseng* saponins (PNS) on hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) induced oxidative damage in PC12 cell. **Method:** MTT method was employed to determine the viability in PNS (0.01-100 mg·L<sup>-1</sup>) treated PC12 cell and PNS (0.1-10 mg·L<sup>-1</sup>) plus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated PC12 cell. Thereafter, intracellular reactive oxygen species amounts, activity of SOD, GSH-Px, as well as MDA concentration were determined at optimal dosage of PNS selected based on MTT experiment. **Result:** PC12 cell viability was increased by PNS at 0.1-10 mg·L<sup>-1</sup>, and the viability of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated PC12 cell was increased by PNS at 0.1-10 mg·L<sup>-1</sup>. Furthermore, PNS at 0.1-1.0 mg·L<sup>-1</sup> significantly decreased intracellular reactive oxygen species levels, as well as enhanced SOD activity ( $P < 0.001$ ) and GSH-Px activity ( $P < 0.001$ ). But MDA concentration was decreased significantly ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** PNS can protect PC12 cell against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced damage via enhancement of intracellular antioxidant enzyme activity.

**[Key words]** *Panax notoginseng* saponins; PC12 cell; oxidative damage

**[收稿日期]** 20120819(011)

**[基金项目]** 中国博士后科学基金(20110490870);广西自然科学基金创新研究团队项目(2011 gXNSFF018006)

**[第一作者]** 夏星,副教授,广州中医药大学在站博士后,从事天然产物活性及作用机制研究, Tel: 15994391108, E-mail: xiaxing66@163.com

**[通讯作者]** \*钟振国,教授,博导, Tel: 0771-3945766, E-mail: zhongzg@gxtcmu.edu.cn

阿尔茨海默氏病 (Alzheimer's disease, AD) 为一种原发性神经元退行性疾病,是老年痴呆的最重要类型。AD 患者临床上表现为进行性的记忆、理解、判断等认知功能障碍,精神行为异常及生活能力减退等,严重影响老年人的生活质量。机体在新陈代谢过程中持续生成各种类型的氧自由基代谢产物,并且通过各种抗氧化酶将自由基进行清除,包括超氧化物歧化酶、过氧化氢酶及谷胱甘肽过氧化物酶等。此外,各种环境污染物、紫外线照射等也是氧自由基的重要来源<sup>[1]</sup>。机体的氧化损伤即机体内产生的氧自由基得不到及时清除,导致活性氧在体内堆积引起细胞毒性,是机体各组织老化的重要诱因。AD 病人体内自由基生成增加,尤其是脑组织中神经细胞的氧化应激是导致其脑结构和功能改变的原因之一<sup>[2]</sup>。三七 [*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen] 为我国常用中药,有散瘀止血,消肿定痛的功效,中医常用于止血、补血及治疗各种血瘀证。现代研究发现,三七还有显著的抗炎、抗衰老、抗氧化、免疫调节及降低血脂及胆固醇作用。三七总皂苷 (*Panax notoginseng* saponins, PNS) 为三七中主要的活性成分,经多方研究发现,三七总皂苷对痴呆症有明显的治疗作用<sup>[3-4]</sup>。但其具体的作用机制还不明确,本研究利用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激 PC12 建立体外神经细胞氧化应激模型,研究三七总皂苷对 PC12 细胞的保护作用,为阐明其对抗氧化损伤的作用机制及治疗 AD 的进一步应用提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 细胞** 大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤细胞株 PC12 细胞购买于北京北纳创联生物技术研究院。

**1.2 药品和试剂** 三七总皂苷 PNS 由云南玉溪维和制药厂生产 (批号 20100701)。DMEM/high glucose (赛默飞世尔生物化学制品有限公司,批号 NXB0566); 无支原体胎牛血清 (杭州四季清生物工程材料有限公司,批号 090603); MTT 及 Trypsin (Amersco 公司产品,批号 20110509,20110403); 二氯荧光素双酯 (DCFH-DA) 法活性氧 (ROS) 检测试剂盒 (批号 20110726),考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒 (批号 20120214),超氧化物歧化酶 (SOD) 测定试剂盒 (批号 20110721),丙二醛 (MDA) 测定试剂盒 (批号 20120112),谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 测定试剂盒 (批号 20120109) 均购于南京建成生物工程研究所。

**1.3 仪器** DLE560 超净工作台 (荷兰 ClearAir 公司),311 型二氧化碳培养箱 (美国 Thermo Forma),

Sorvall ST16R 超低温离心机 (Thermo Fisher),DML 3000B 倒置荧光显微镜 (莱卡仪器有限公司),EPOCH 酶标仪 (美国 Biotek 公司),JY92 超声波粉碎机 (宁波新芝生物科技股份有限公司)。

## 2 方法

**2.1 PC12 细胞培养** 用含 10% 胎牛血清和 5% 马血清的 DMEM 培养液,37 °C,5% CO<sub>2</sub> 条件下培养细胞,每 2 d 传代 1 次。待细胞增长至 80% 融合时,用 0.25% 胰酶消化细胞,调整细胞密度至 1 × 10<sup>5</sup> 个/mL 后传代或接种于细胞培养板进行各项指标测定。

**2.2 对 PC12 细胞生长的影响** 取对数生长期细胞,调整细胞数至 1 × 10<sup>5</sup> 个/mL 接种于 96 孔板。分别设正常组 (不加药物正常培养的细胞),三七总皂苷 100,10,1,0.1,0.01 mg·L<sup>-1</sup> 组,同时设无细胞的空白对照组,每组设 3 个复孔。细胞于接种 18 h 后,向培养液中加入相应药物处理 24 h。完成药物处理后以 MTT 法测定细胞活力,向各孔加入 5 g·L<sup>-1</sup> 的 MTT 继续培养 4 h,小心吸弃所有培养液,每孔加入 150 μL 二甲基亚砜 (DMSO) 振荡 10 min。在酶标仪上以 560 nm 波长测定各孔吸光度 (A)。按公式计算细胞相对活力。

$$\text{相对活力} = (\text{处理组平均 } A - \text{空白对照平均 } A) / (\text{正常组平均 } A - \text{空白对照组平均 } A) \times 100\%$$

**2.3 对氧化应激的 PC12 细胞活力的影响** 取对数生长期细胞,调整细胞密度至 1 × 10<sup>5</sup> /mL 接种于 96 孔板。分别设正常组 (不加药物正常培养的细胞),模型组 (不经药物处理,用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 400 μmol·L<sup>-1</sup> 处理),三七总皂苷 10,1,0.1,0.01 mg·L<sup>-1</sup> 组 (同模型组,并分别用三七总皂苷 10,1,0.1,0.01 mg·L<sup>-1</sup> 处理),同时设无细胞的空白对照组,每组设 3 个复孔。细胞于接种 18 h 后,向培养液中加入相应药物处理 24 h。之后按照文献方法诱导细胞的氧化应激<sup>[5]</sup>,除正常组外,均给予终浓度为 400 μmol·L<sup>-1</sup> 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤 1 h。经药物及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后,以 MTT 法测定细胞活力,向各孔加入 5 g·L<sup>-1</sup> 的 MTT 继续培养 4 h,小心吸弃所有培养液,每孔加入 150 μL 二甲基亚砜 (DMSO) 振荡 10 min。在酶标仪上以 560 nm 波长测定各孔 A。按 2.2 公式计算细胞相对活力。

**2.4 对氧化应激的 PC12 细胞中活性氧水平的影响** 取对数生长期细胞,调整细胞密度至 2 × 10<sup>5</sup> 个/mL 接种于 24 孔板。根据三七总皂苷对细胞活力的影响,选择 1,0.1 mg·L<sup>-1</sup> 组进行后续试验,其

余分组及处理同 3.3。完成给药及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后,吸弃所有上清,PBS 洗 3 遍,加入 PBS 配制的 10 μmol·L<sup>-1</sup> DCFH(1:1 000 稀释),37 °C 避光孵育 30 min,用倒置荧光显微镜观察细胞内活性氧(蓝色激发光,收集绿色荧光信号),拍照记录活性氧阳性细胞。

**2.5 对氧化应激的 PC12 细胞中抗氧化能力的影响** 取对数生长期细胞,调整细胞密度至 1 × 10<sup>5</sup>/mL 接种于 6 孔板。根据三七总皂苷对细胞活力的影响,选择 1,0.1 mg·L<sup>-1</sup> 组进行后续实验,其余分组及处理同 2.3。完成给药及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后,采用细胞刮彻底收集细胞,超声破碎细胞,4 °C 下 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,收集上清液按照试剂盒方法测定细胞匀浆中 SOD,GSH-Px 活力及 MDA 含量。

**2.6 统计分析** 实验数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,*t* 检验法比较各组间差异,*P* < 0.05 则认为组间差异显著。

### 3 结果

**3.1 对 PC12 细胞生长的影响** 不同浓度的三七总皂苷与 PC12 细胞共同孵育 24 h 后,0.1 mg·L<sup>-1</sup> 以上组的 PC12 细胞活力有明显增加,100 mg·L<sup>-1</sup> 组时活力有所下降。见表 1。

表 1 三七总皂苷对 PC12 细胞活力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/mg·L <sup>-1</sup>	A <sub>560</sub>	相对活力/%
正常	-	0.922 ± 0.077	100.00
三七总皂苷	100	0.849 ± 0.093	92.08
	10	1.106 ± 0.097	119.96
	1	1.087 ± 0.105	117.90
	0.1	1.123 ± 0.092 <sup>1)</sup>	121.80
	0.01	0.933 ± 0.086	101.19

注:与正常组比较<sup>1)</sup>*P* < 0.05(表 2~3 同)。

**3.2 对氧化应激的 PC12 细胞活力的影响** 模型组经 400 μmol·L<sup>-1</sup> 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤 1 h 后,细胞相对活力显著降低至 54.85% (*P* < 0.001)。三七总皂苷在 0.1~10 mg·L<sup>-1</sup> 内能显著提高 PC12 细胞活力,0.1 mg·L<sup>-1</sup> 的三七总皂苷对 PC12 细胞活力的促进作用最强。见表 2。

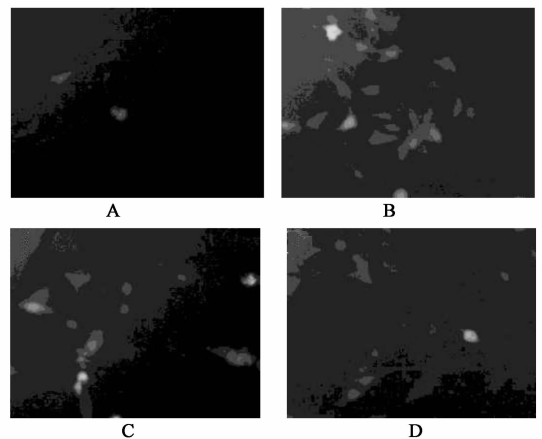
**3.3 对氧化应激的 PC12 细胞中活性氧水平的影响** 模型组经过氧化氢刺激后细胞内 ROS 增加,DCFH 染色阳性细胞数量明显多于正常组。0.1,1 mg·L<sup>-1</sup> 的三七总皂苷预处理均能减少 DCFH 染色阳性细胞。见图 1。

**3.4 对氧化应激的 PC12 细胞中抗氧化能力的影**

表 2 三七总皂苷对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的 PC12 细胞活力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/mg·L <sup>-1</sup>	A <sub>560</sub>	相对活力/%
正常	-	0.897 ± 0.071	100.00
模型	-	0.492 ± 0.022 <sup>2)</sup>	54.85
三七总皂苷	10	0.592 ± 0.058 <sup>3)</sup>	66.00
	1	0.697 ± 0.053 <sup>4)</sup>	77.70
	0.1	0.721 ± 0.086 <sup>4)</sup>	80.38

注:与正常组比较<sup>2)</sup>*P* < 0.001;与模型组比较<sup>3)</sup>*P* < 0.05,<sup>4)</sup>*P* < 0.001(表 3 同)。



A. 正常组;B. 模型组;C. 三七总皂苷 0.1 mg·L<sup>-1</sup> 组; D. 三七总皂苷 1 mg·L<sup>-1</sup> 组

图 1 荧光显微镜观察 PC12 细胞中活性氧水平(DCFH 染色 ×40)

响 与正常组相比,模型组 PC12 细胞的 GSH-Px 活性显著降低(*P* < 0.001),而 MDA 含量显著增加(*P* < 0.001),SOD 活力有升高的趋势。给予三七总皂苷后,PC12 细胞 SOD,GSH-Px 的活性均较模型组显著升高(*P* < 0.001),MDA 含量显著降低(*P* < 0.001)。见表 3。

表 3 三七总皂苷对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激的 PC12 细胞中 SOD,MDA 及 GSH-Px 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量 /mg·L <sup>-1</sup>	SOD /U·mg <sup>-1</sup>	MDA /mmol·mg <sup>-1</sup>	GSH-Px /U·mg <sup>-1</sup>
正常	-	45.91 ± 6.55	9.73 ± 0.64	69.38 ± 4.41
模型	-	52.08 ± 4.32	21.32 ± 1.77 <sup>2)</sup>	41.52 ± 3.27 <sup>2)</sup>
三七总皂苷	1	114.82 ± 9.85 <sup>4)</sup>	14.87 ± 1.78 <sup>4)</sup>	75.10 ± 7.22 <sup>4)</sup>
	0.1	97.31 ± 8.59 <sup>4)</sup>	12.34 ± 1.15 <sup>4)</sup>	93.55 ± 8.48 <sup>4)</sup>

### 4 讨论

机体的氧化损伤是加速组织老化进程的重要因素之一,过量的紫外线照射、接触各种化学污染物、吸烟和饮酒以及机体自身的新陈代谢能产生大量的

过氧化物,带来氧化损伤<sup>[1]</sup>。过氧化物及氧自由基可使生物膜脂质双层中的不饱和脂肪酸过氧化,形成脂质过氧化产物,继而使膜结构和功能发生障碍。AD 病人体内自由基生成增加,尤其是脑组织中神经细胞的氧化应激是导致其脑结构和功能改变的原因之一<sup>[2]</sup>。并且氧化应激能通过活化  $\beta$  内切酶从而增加 AD 患者脑中  $\beta$ -淀粉样蛋白的生成加速老年斑的形成,同时老年斑的出现也进一步增强了脑中的氧化损伤,加速的 AD 病情的发展<sup>[6]</sup>。我们的前期研究发现,三七总皂苷在 *D*-半乳糖腹腔注射合并鹅膏蕈氨酸损毁双侧大脑 Meynert 基底核建立的大鼠 AD 模型中能提高模型动物血清中的抗氧化酶水平<sup>[7]</sup>,并且金情政等<sup>[8]</sup>的研究表明三七总皂苷伍用淫羊藿苷能减轻血管性痴呆大鼠的脂质过氧化水平。本研究以在过氧化氢损伤的 PC12 细胞中同样发现,三七总皂苷能保护 PC12 细胞对抗氧化损伤,增强细胞活力,表明三七总皂苷在体外对 PC12 细胞也有抗氧化损伤的作用。

$H_2O_2$  是一种重要的活性氧,外源性  $H_2O_2$  极易通过细胞膜进入细胞,在细胞内过度金属存在时通过 Fenton 反应,形成高活性的自由基如单态氧、羟自由基等,进一步造成细胞损伤<sup>[9]</sup>。本研究发现,经  $H_2O_2$  处理的 PC12 细胞活力显著下降,细胞内有明显的活性氧堆积,并且细胞内抗氧化酶活力受损,脂质过氧化标志物 MDA 增加。使用三七总皂苷预处理能减少细胞内活性氧水平,显著增强细胞内抗氧化酶 SOD, GSH-Px 活力,减少 MDA 生成,提示三七总皂苷处理能改善 PC12 细胞的抗氧化能力。

总之,三七总皂苷能缓解氧化应激导致的 PC12 细胞活力下降,并能显著提高细胞内抗氧化酶活力,减少 MDA 的生成,因此三七总皂苷能通过增强细胞内抗氧化酶活力,保护细胞对抗氧化损伤。

## [参考文献]

- [1] Migliore L, Coppedè F. Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging [J]. *Mutat Res*, 2009, 674(1/2):73.
- [2] Zawia N H, Lahiri D K, Cardozo-Pelaez F. Epigenetics, oxidative stress, and Alzheimer disease [J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 46(9):1241.
- [3] 黄金兰,李霏,吴登攀,等.三七总皂苷对快速老化 SAMP8 小鼠大脑  $\alpha$ -分泌酶 mRNA 表达的影响[J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(14):2127.
- [4] 郭长杰,伍杰雄,李若馨.三七总皂苷对痴呆模型大鼠大脑皮质内神经递质含量的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2004, 13(3):150.
- [5] Crispo J A G, Piché M, Ansell D R, et al. Protective effects of methyl gallate on  $H_2O_2$ -induced apoptosis in PC12 cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 393(4):773.
- [6] Jo D G, Arumugam T V, Woo H N, et al. Evidence that gamma-secretase mediates oxidative stress-induced beta-secretase expression in Alzheimer's disease [J]. *Neurobiol Aging*, 2010, 31(6):917.
- [7] 屈泽强,谢智光,王乃平,等.三七总皂苷抗衰老作用的实验研究[J]. *广州中医药大学学报*, 2005, 22(2):130.
- [8] 金情政,郑彩霞.三七总皂苷伍用淫羊藿苷改善血管性痴呆大鼠空间学习记忆及抗脂质过氧化研究[J]. *中药药理与临床*, 2012, 2:49.
- [9] Li W G, Miller F J Jr, Zhang H J, et al.  $H_2O_2$ -induced superoxide anion production by a non-phagocytic NAD (P) H oxidase cause oxidant injury [J]. *J Biochem*, 2001, 276(31):29251.

[责任编辑 聂淑琴]