

加味五子衍宗方及其有效部位对 H₂O₂ 损伤 PC12 细胞的保护作用

王 斌, 王学美*

(北京大学第一医院中西医结合研究室, 北京 100034)

[摘要] 目的: 比较加味五子衍宗方及其有效部位总黄酮和总多糖对 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞损伤的影响。方法: 噻唑蓝 (MTT) 法和乳酸脱氢酶 (LDH) 法检测细胞存活率和细胞毒性, 酶标仪测定丙二醛 (MDA) 含量和超氧化物歧化酶 (SOD), 过氧化氢酶 (CAT) 的活性, 流式细胞仪检测细胞凋亡, 激光共聚焦显微镜检测细胞内 Ca²⁺ 的浓度。结果: 预先给予 500 μg·mL⁻¹ 加味五子衍宗方, 总黄酮和总多糖处理细胞 2 h, 可显著提高细胞存活率及 SOD 和 CAT 活性, 降低 LDH, MDA 水平; 加味五子衍宗方及总黄酮还可有效抑制凋亡的发生, 并可明显降低细胞内 Ca²⁺ 浓度, 总黄酮的效果强于五子衍宗方及总多糖。结论: 加味五子衍宗方能显著抑制 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞氧化应激状态及凋亡发生, 其主要活性成分是总黄酮, 其神经细胞保护作用可能与其降低细胞脂质过氧化水平, 提高抗氧化酶活力和抑制细胞内 Ca²⁺ 浓度升高有关。

[关键词] 加味五子衍宗方; 氧化应激; 细胞凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2009)08-0057-04

阿尔茨海默病 (AD) 是老年人中最常见的神经退行性疾病之一。AD 病因为多因素参与, 发病机制尚不完全清楚, 近年研究发现, 氧化损伤及其所造成的神经元凋亡是造成 AD 的重要原因之一^[1]。

五子衍宗方为常用的补益中药, 最早载于《悬解录》, 由枸杞子、菟丝子、覆盆子、五味子和车前子 5 味中药组成, 临床常用于不孕, 不育等症的治疗。加味五子衍宗方 (WYF) 是我研究室在五子衍宗方的基础上加淫羊藿组成。经体内实验证实, 它有良好的益智作用: 加味五子衍宗方及其有效部位总黄酮 (TF), 总多糖 (TP) 能显著提高轻度认知障碍患者 (MCI) 的记忆能力, 明显改善由东莨菪碱引起的小鼠记忆获得障碍^[2~3]。本研究拟用 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞建立 AD 氧化应激及凋亡模型, 观察加味五子衍宗方及其有效部位在细胞水平的作用, 并探讨其可能的作用机制, 为进一步确定其有效部位并分离纯化提供根据。

1 材料

1.1 加味五子衍宗方水提液 (WYF) 的制备 枸杞

子、菟丝子、覆盆子、五味子、车前子、淫羊藿购自北京同仁堂药店, 按照 8: 8: 4: 1: 2: 8 比例, 8 倍量的蒸馏水煮沸提取 1 h; 再加入 6 倍量的蒸馏水煮沸提取 1 h, 合并提取液, 减压浓缩, 4 ℃ 保存。

1.2 加味五子衍宗方总黄酮 (TF)、总多糖 (TP) 的提取分离和含量测定

1.2.1 总黄酮提取分离 6 种原药材按比例混合粉碎, (1) 95% 乙醇提取 3 遍, 每遍 1.5 h (10, 8, 6 倍体积), 石油醚萃取, 60 ℃ 减压蒸馏; (2) 大孔树脂柱分离: 分别用 10 倍柱体积 (10 BV) 10% 乙醇, 8 BV 30% 乙醇, 8 BV 50% 乙醇, 8 BV 70% 乙醇, 5 BV 95% 乙醇洗脱, 收集洗脱液。(3) 薄层色谱鉴定: 聚丙烯酰胺薄膜点板, 90% 乙醇展开, 三氯化铝乙醇溶液显色, 256 nm 紫外灯下观察, 黄酮类化合物主要集中在 50% 和 70% 乙醇的部分。

1.2.2 总多糖提取分离 提黄酮所剩残渣用 10 倍蒸馏水体积提取 3 遍, 每遍 1.5 h, 60 ℃ 减压浓缩, Savage 法去蛋白, 低温干燥。

1.2.3 总黄酮、总多糖的含量测定 方中总黄酮、总多糖的含量分别为 0.7%, 3.7%。

1.3 试剂及药品 RPMI 1640 液体培养基购自 Hyclone 公司; 小牛血清购于 Gibco 公司; 噻唑蓝 (MTT) 购于 Sigma 公司; 乳酸脱氢酶 (LDH), 丙二醛 (MDA), 超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化氢酶

[收稿日期] 2009-01-09

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (30672760)

[通讯作者] * 王学美, Tel: (010) 83572211-3053; E-mail: wangxuemeibjnu@163.com

(CAT) 检测试剂盒由南京建成生物公司提供; 细胞凋亡检测试剂盒(Annexin-V FITC/PI) 由宝赛公司提供; Fluor-3 AM 由 Biotium 公司提供。

2 方法

2.1 细胞培养 PC12 细胞株购于中科院上海细胞所, 在 37 °C, 5% CO₂ 孵箱内用培养瓶培养, 加入含 10% 小牛血清, 100 U·mL⁻¹ 链霉素和 100 U·mL⁻¹ 氨苄青霉素的 RPMI 1640 培养基。每 2~ 3 d 传代 1 次, 培养 24 h 后用于实验。

2.2 药物配制 加味五子衍宗方和总多糖溶于 RPMI 1640 培养液中, 总黄酮及 Vitamin E 溶于 DMSO 中, DMSO 在细胞培养液的终浓度小于 0.1%。

2.3 分组干预 (1) 正常对照组: 不加任何处理因素; (2) 模型组: 300 μmol·L⁻¹ H₂O₂ 作用于 PC12 细胞 6 h; (3) WYF 预处理组: WYF 作用 PC12 细胞 2 h 后, 加入 300 μmol·L⁻¹ H₂O₂ 共同作用 PC12 细胞 6 h; (4) TF 预处理组: TF 作用 PC12 细胞 2 h 后, 加入 300 μmol·L⁻¹ H₂O₂ 共同作用 PC12 细胞 6 h; (5) TP 预处理组: TP 作用 PC12 细胞 2 h 后, 加入 300 μmol·L⁻¹ H₂O₂ 共同作用 PC12 细胞 6 h; (6) Vitamin E (VE) 对照组: 150 μg·mL⁻¹ VE 作用 PC12 细胞 2 h 后, 加入 300 μmol·L⁻¹ H₂O₂ 共同作用 PC12 细胞 6 h。

2.4 MTT 法检测细胞存活率 PC12 细胞以 1 × 10⁴ 密度接种于 96 孔板, 加入相应的药物作用 2 h, 再加入 300 μmol·L⁻¹ H₂O₂ 共同作用 PC12 细胞 6 h 后, 每孔加入 10 μL MTT (终浓度 0.5 g·mL⁻¹), 继续培养 4 h, 弃孔内培养液, 加入 100 μL DMSO, 在 570 nm 处测定光密度 (OD) 值。

2.5 LDH 释放 MDA 含量 SOD 和 CAT 活性的测定 按试剂盒说明书进行。

2.6 蛋白测定 考马斯亮兰法进行蛋白定量。

2.7 细胞凋亡的检测 将 PC12 细胞接种到 6 孔板, 细胞数 1 × 10⁵/mL, 加入 500 μg·mL⁻¹ 的 WYF, TF, TP 或 150 μg·mL⁻¹ VE 作用 PC12 细胞 2 h, 再加入 300 μmol·L⁻¹ H₂O₂ 共同作用 PC12 细胞 6 h 后, 收集细胞, PBS 洗涤 2 次, 1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min 后重悬于结合缓冲液 200 μL 中, 加入 10 μL Annexin V-FITC, 轻轻混匀, 避光 4 °C 反应 30 min, 再加入结合缓冲液 200 μL 和 5 μL 碘化丙啶 (PI), 立即上机检测。

2.8 Ca²⁺ 浓度的检测 细胞处理后, 漂洗, 滴加 Fluor-3 AM 染液 (终浓度 5 μmol·L⁻¹), 37 °C 下避光孵

育 30 min, 洗去染液后加入平衡盐溶液 (mmol·L⁻¹: NaCl 130, KCl 5, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 1.0, HEPES 20, pH 7.4) 后用激光共聚焦显微镜进行扫描, 扫描频率为 30 s/幅, 共扫描 60 幅。检测条件设定为: 激发波长 488 nm, 检测波长 530 nm。荧光图像经计算机软件 (Zeiss Co.) 处理荧光强度。

2.9 统计学处理 采用 SPSS 12.0 统计学软件进行 *t* 检验及方差分析, *P* < 0.05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 加味五子衍宗方及总黄酮、总多糖对 H₂O₂ 损伤 PC12 细胞的细胞活性的保护作用 MTT 检测发现, H₂O₂ 作用于 PC12 细胞 6 h 后, 细胞的存活率显著降低 (与正常对照组比 *P* < 0.01), 而用不同浓度的 WYF (125~ 500 μg·mL⁻¹), TF (50~ 500 μg·mL⁻¹) 或 TP (500 μg·mL⁻¹) 预处理 2 h, 再加入 300 μmol·L⁻¹ 的 H₂O₂ 继续培养 6 h, 细胞的存活率明显增加。TF 的作用好于 WYF 和 TP, 结果见表 1。

表 1 WYF, TF, TP 对 H₂O₂ 所致 PC12 细胞损伤的保护作用 (OD 值, $\bar{x} \pm s$, *n* = 4)

| 组别 | 剂量 (μg·mL ⁻¹) | OD 值 |
|----------|------------------------------|---------------------------|
| 正常对照组 | — | 0.93 ± 0.03 ²⁾ |
| 模型组 | — | 0.52 ± 0.02 |
| VE 对照组 | 150 | 0.61 ± 0.51 ¹⁾ |
| WYF 预处理组 | 5 | 0.52 ± 0.02 |
| | 50 | 0.52 ± 0.02 |
| | 125 | 0.64 ± 0.02 ¹⁾ |
| | 250 | 0.68 ± 0.01 ¹⁾ |
| | 500 | 0.77 ± 0.03 ²⁾ |
| TF 预处理 | 5 | 0.52 ± 0.01 |
| | 50 | 0.59 ± 0.03 ¹⁾ |
| | 125 | 0.66 ± 0.04 ¹⁾ |
| | 250 | 0.74 ± 0.04 ²⁾ |
| | 500 | 0.82 ± 0.05 ²⁾ |
| TP 预处理组 | 5 | 0.51 ± 0.01 |
| | 50 | 0.51 ± 0.01 |
| | 125 | 0.53 ± 0.08 |
| | 250 | 0.54 ± 0.05 |
| | 500 | 0.62 ± 0.04 ¹⁾ |

注: 与模型组比较¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01 (下同)

3.2 加味五子衍宗方及总黄酮、总多糖对 H₂O₂ 损伤 PC12 细胞的 LDH 释放 MDA 含量、SOD 和 CAT

活性的影响 H₂O₂ 作用于 PC12 细胞 6 h 后, 细胞的 LDH, MDA 水平显著增加 ($P < 0.01$), SOD, CAT 活力显著降低 ($P < 0.01$)。而用 WYF (500 μg·mL⁻¹), TF (500 μg·mL⁻¹) 或 TP (500 μg·mL⁻¹) 预处理 2 h, 再加入 H₂O₂ 继续培养 6 h, 细胞 LDH, MDA 的水平明显降低, SOD, CAT 的活力显著增加, 见表 2。

3.3 加味五子衍宗方及总黄酮、总多糖对 H₂O₂ 损伤 PC12 细胞凋亡的影响 用 Annexin V-FITC 和 PI 双标记细胞, 流式细胞仪检测可得到正常活细胞、凋亡细胞和坏死细胞的百分率。正常对照组凋亡率是

6.24%; 300 μmol·L⁻¹ H₂O₂ 作用组凋亡率增加到 28.63% ($P < 0.01$); 而预先加入 500 μg·mL⁻¹ WYF 或 TF, 凋亡率分别为 21.83% 和 14.35% (与 H₂O₂ 组比 $P < 0.01$)。TP 对于凋亡影响没有统计学意义。

3.4 加味五子衍宗方及总黄酮、总多糖对 H₂O₂ 损伤 PC12 细胞内 Ca²⁺ 钙离子水平的影响 正常情况下, PC12 细胞内 Ca²⁺ 水平稳定, 但加入 300 μmol·L⁻¹ H₂O₂ 后, PC12 细胞内 Ca²⁺ 浓度显著升高 (与正常组比 $P < 0.01$),

表 2 WYF, TF, TP 对 H₂O₂ 损伤 PC12 细胞的 LDH, MDA, SOD 和 CAT 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

| 组别 | 剂量(μg·mL ⁻¹) | LDH(U·L ⁻¹) | MDA[nmol·(mg prot) ⁻¹] | SOD[U·(mg prot) ⁻¹] | CAT[U·(mg prot) ⁻¹] |
|----------|--------------------------|------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 正常对照组 | — | 203.80 ± 36.50 ²⁾ | 0.37 ± 0.05 ²⁾ | 44.30 ± 2.45 ²⁾ | 20.43 ± 1.48 ²⁾ |
| 模型组 | — | 413.77 ± 10.50 | 0.76 ± 0.03 | 23.37 ± 1.15 | 8.57 ± 0.65 |
| WYF 预处理组 | 500 | 365.43 ± 18.86 ¹⁾ | 0.59 ± 0.05 ¹⁾ | 30.13 ± 2.57 ¹⁾ | 12.23 ± 1.65 ¹⁾ |
| TF 预处理组 | 500 | 333.97 ± 18.44 ²⁾ | 0.45 ± 0.07 ²⁾ | 38.06 ± 1.70 ²⁾ | 13.37 ± 1.01 ¹⁾ |
| TP 预处理组 | 500 | 391.57 ± 9.36 ¹⁾ | 0.51 ± 0.03 ¹⁾ | 27.16 ± 1.51 ¹⁾ | 10.54 ± 0.93 ¹⁾ |
| VE 对照组 | 150 | 388.70 ± 2.90 ¹⁾ | 0.59 ± 0.11 ¹⁾ | 28.44 ± 1.61 ¹⁾ | 15.43 ± 1.35 ²⁾ |

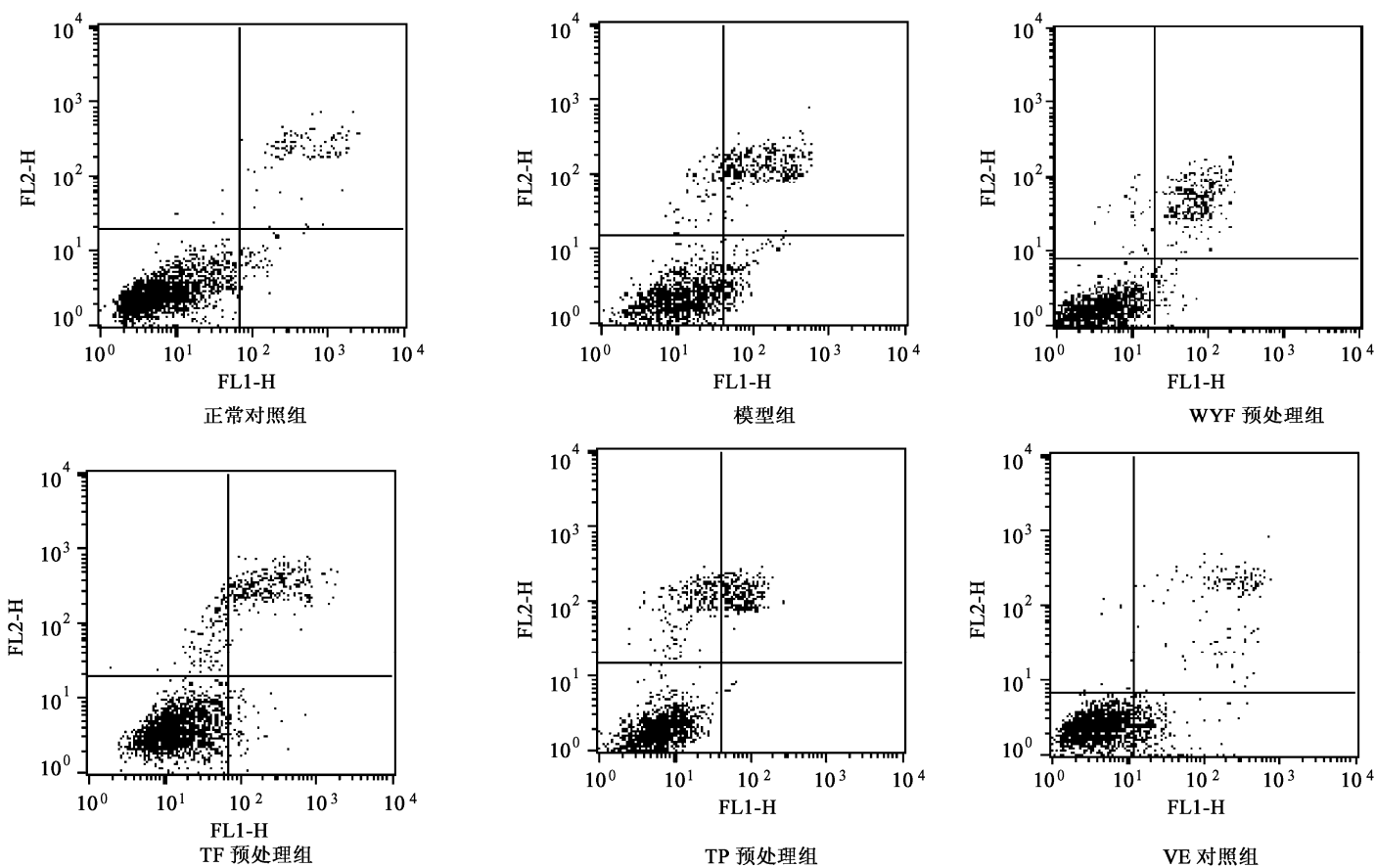


图 1 WYF, TF, TP 对 H₂O₂ 损伤 PC12 细胞凋亡的影响

而预先加入 500 μg·mL⁻¹ WYF 或 TF 后, 可以显著降低细胞内 Ca²⁺ 离子水平 ($P < 0.01$) (图 2)。

4 讨论

氧化应激在 AD 的形成过程中起着非常重要的作用, 自由基生成与清除之间的不平衡是诱发 AD 神经病理改变的主要原因之一。H₂O₂ 是氧化应激

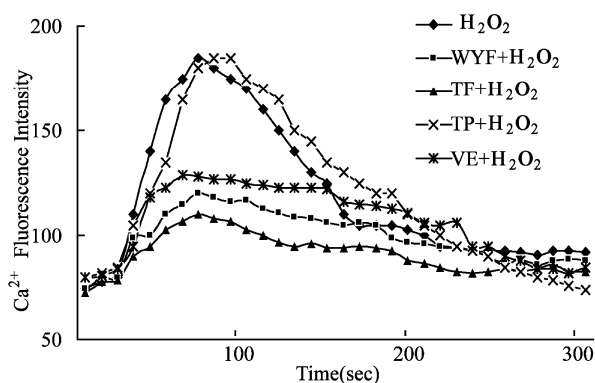


图 2 WYF、TF、TP 对 H₂O₂ 损伤 PC12 细胞内 Ca²⁺ 离子水平的影响

反应密切相关的活性氧之一,其主要产物 OH 可自由进入细胞,使抗氧化酶如 SOD, CAT 等活性下降,同时会损伤体内脂质、蛋白质和 DNA 等生物大分子,造成细胞内酶活力变化、代谢紊乱、DNA 损伤和细胞凋亡^[4]。

MTT 测试通过测定细胞线粒体脱氢酶活性借以判断活细胞数目,即 OD 值越大,表示存活的细胞越多,细胞损伤越小。LDH 是细胞内标志酶,当受损细胞膜通透性改变时,LDH 漏出量明显增大,其累计释放量与受损的细胞数量呈正相关^[5]。加味五子衍宗方及总黄酮、总多糖可使 PC12 细胞存活率显著升高,LDH 漏出明显减少,说明线粒体及其酶的功能得到改善,细胞膜结构和功能受到保护,从而维持了细胞的稳态。

MDA, SOD 和 CAT 活性不仅可反映细胞损伤的原因,还可以判断细胞损伤的程度^[6-7]。本研究表明, H₂O₂ 诱导组细胞内 MDA 含量明显升高,而 SOD 和 CAT 活性显著降低,提示 H₂O₂ 所致 PC12 细胞损伤与脂质过氧化有关。加味五子衍宗方及总黄酮、总多糖可显著提高 PC12 细胞 SOD 和 CAT 活性,降低 MDA 水平,说明其可能通过直接清除自由基,提高抗氧化酶活性,增强细胞抵御氧化损伤的能力,从而发挥保护细胞的作用。其中总黄酮效果强于五子衍宗方及总多糖。

自由基攻击细胞膜形成脂质过氧化物,从而使膜离子转运紊乱,导致膜 Ca²⁺ 通透性增高^[8]。Ca²⁺ 是细胞内一种重要的第二信使,既是凋亡信号转导分子,又是凋亡效应分子,细胞内钙超载被称为细胞损伤的“最后共同通路”^[9]。结果表明,加味五子衍宗方及总黄酮可以拮抗 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞内

Ca²⁺ 浓度的升高,减轻 Ca²⁺ 超载所致的损害,提示这可能是加味五子衍宗方及总黄酮抑制细胞凋亡的机制所在。总多糖对于凋亡及 Ca²⁺ 的影响没有统计学意义,可能与多糖类大分子及水溶性有关,难于通过脂溶性的细胞膜发挥作用。

总之,加味五子衍宗方及总黄酮、总多糖可提高细胞活力及抗氧化酶活性,降低 LDH 漏出,减轻脂质过氧化损伤。加味五子衍宗方及总黄酮还可抑制 Ca²⁺ 超载,降低细胞凋亡率,从而发挥细胞保护作用。其有效部位为总黄酮,下一步可进一步纯化并分离其中的有效成分,为其开发成为治疗 AD 的药物提供实验依据。

[参考文献]

- [1] 于德红,魏朝良,包永明,等.阿尔茨海默病与氧化应激[J].生物医学工程学杂志,2006,23(5):1142-1144.
- [2] 富宏,王学美,刘庚信,等.加味五子衍宗颗粒对轻度认知障碍患者记忆功能及海马体积的磁共振研究[J].中国中西医结合杂志,2006,26(12):1066-1069.
- [3] 褚松龄,刘庚信,王学美.加味五子衍宗方及其有效组分对记忆障碍小鼠空间行为的影响[J].中国中西医结合急救杂志,2005,12(5):271-274.
- [4] 徐先祥,夏伦祝,高家荣.中药皂苷类物质抗氧化作用研究进展[J].中国中医药科技,2004,11(2):126-128.
- [5] Kolla N, Wei Z, Richardson S, et al. Amitriptyline and fluoxetine protect PC12 cells from cell death induced by hydrogen peroxide [J]. Psychiat Neurosci, 2005, 30(3): 196-201.
- [6] 宋立群,肖洪彬,赵丹阳,等.安痢宁冲剂对小鼠癫痫模型脑组织中 MDA、SOD、ATP 酶的影响[J].中国实验方剂学杂志,2002,8(3):44-46.
- [7] 路航,王秋静,刘芬,等.血府逐瘀颗粒对麻醉犬急性心肌缺血的影响[J].中国实验方剂学杂志,2007,13(10):35-37.
- [8] Squier MKT, Miller ACK, Malkinson AM. Calpain activation in apoptosis [J]. J Cell Physiol, 1994, 159: 229-237.
- [9] Paschen W. Role of calcium in neuronal cell injury: which subcellular compartment is involved [J]. Brain Res Bull, 2001, 53(4):409-413.