

白花蛛毛苣苔中苯乙醇苷类化合物 对 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞损伤的保护作用研究

白小荣 徐建平 马 岩 张九春
(锡林郭勒职业学院 内蒙古 锡林浩特 026000)

【摘要】目的: 探讨在 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞氧化损伤模型中, 白花蛛毛苣苔中苯乙醇苷类化合物 Caleolarioside B、Paraboside B 和 Glutinoside B 是否具有保护作用。方法: 采用 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞建立氧化应激损伤细胞模型, Real-time Cell Analysis (RTCA) 多功能实时细胞功能分析技术研究 Caleolarioside B、Paraboside B 和 Glutinoside B 的保护作用, 采用酶标法检测乳酸脱氢酶 (LDH) 的释放量和超氧化物歧化酶 (SOD) 的水平。结果: 浓度为 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H₂O₂ 时, PC12 细胞产生明显损伤, 为最佳造模浓度。不同浓度 Caleolarioside B、Paraboside B 和 Glutinoside B 能降低 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞凋亡, 提高细胞内 SOD 活力, 降低 LDH 活性。结论: Caleolarioside B、Paraboside B 和 Glutinoside B 对 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞损伤具有保护作用。

【关键词】 Caleolarioside B; Paraboside B; Glutinoside B; PC12 细胞; 苯乙醇苷类化合物

【Abstract】Objective: To investigate whether benzethanoides Caleolarioside B, Paraboside B and Glutinoside B are protective in the oxidative damage induced by H₂O₂ in PC12 cells. Methods: H₂O₂ induced PC12 cells, Real-time Cell Analysis (RTCA) multifunctional real-time cell function analysis studied the protective effects of Caleolarioside B, Paraboside B and Glutinoside B, and measured the release of lactate dehydrogenase (LDH) and the level of superoxide dismutase (SOD). Results: At the concentration of 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H₂O₂, PC12 cells produced the best mold concentration. Different concentrations of Caleolarioside B, Paraboside B, and Glutinoside B reduced H₂O₂-induced apoptosis in PC12 cells, increased intracellular SOD viability, and decreased LDH activity. Conclusion: Caleolarioside B, Paraboside B and Glutinoside B are protective against H₂O₂ induced damage in PC12 cells.

【Key words】 Caleolarioside B; Paraboside B; Glutinoside B; PC12 cells; benzethanoides

许多神经退行性疾病, 如帕金森病、癫痫、阿尔茨海默病等^[1-4]的重要发病机制为氧化应激, 氧化应激水平的升高能够损伤细胞甚至使细胞死亡。活性氧 (ROS) 是细胞内氧化应激的重要因素之一, 例如过氧化氢 (H₂O₂) 和单线态氧 (O₂)^[5]。而 SOD、CAT 等抗氧化酶能够保护并修复氧化损伤的细胞^[6]。

白花蛛毛苣苔 [Paraboea martinii (Levl.) Burt] 是苦苣苔科蛛毛苣苔属植物, 为我国特有植物资源, 分布于广西、贵州、云南等地。民间用药历史悠久, 且疗效显著, 当地主要用于治疗痢疾, 骨折和跌打损伤。Caleolarioside B, Paraboside B 和 Glutinoside B 是王晓琴教授首次从白花蛛毛苣苔 (Paraboea martinii) 植物中提取分离得到的苯乙醇苷类化合物^[7]。研究表明苯乙醇苷类成分具有显著的抗氧化活性^[8-11]。本研究初步探讨 Caleolarioside B, Paraboside B 和 Glutinoside B 对 H₂O₂ 所致 PC12 细胞损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 细胞系来源、仪器与试剂

实验细胞株: PC12 细胞 (中国科学院上海细胞生物研究所

细胞库)。

Caleolarioside B, Paraboside B 和 Glutinoside B 是王晓琴教授从白花蛛毛苣苔中提取分离得到, 经 EI-MS、¹H-NMR、¹³C-NMR 等光谱法确定结构, HPLC 峰面积归一化法测得纯度均 >98%。(如下表 1)

1.2 细胞培养

PC12 细胞培养于含 10% 胎牛血清、5% 马血清、1% 青霉素链霉素双抗的 DMEM 完全培养基中, 置于 37℃、5%CO₂ 恒温培养箱中。选取对数生长期的 PC12 细胞进行实验。

1.3 确定 PC12 细胞最适接种浓度

采用 Real-time Cell Analysis (RTCA) 多功能实时细胞功能分析技术确定最适接种浓度。调整细胞浓度为 2.0×10⁵ 个/mL, 1.0×10⁵ 个/mL, 5.0×10⁴ 个/mL 和 2.5×10⁴ 个/mL, 接种于 E-Plate 16 孔板, 每个浓度设置 3 个复孔。利用 xCELLigence RTCA 监测并记录细胞指数值 (cell index, CI), 以时间为横坐标, CI 值为纵坐标, 绘制细胞生长曲线。

1.4 确定建立过氧化氢模型的最佳条件

根据 1.3 项下的结果, 将最适浓度的 PC12 细胞接种于

表 1 仪器与试剂来源

仪器与试剂	来源	仪器与试剂	来源
Gen Pure 超纯水系统、Thermo311 CO ₂ 培养箱	美国 Thermo 公司	XB. K. 25 血球计数板	上海市求精生化试剂仪器有限公司
xCELLigence RTCA 实时细胞功能分析仪	艾森生物 - 杭州有限公司	10、20、100、200 和 1000 μL E4 XLS 移液器	德国 RAININ 公司
BSC-11A2 生物安全柜	上海上净净化设备有限公司	胎牛血清	浙江天杭生物科技有限公司
ME204 型万分之一天平	梅特勒 - 托利多仪器上海有限公司	DMEM 高糖培养基、马血清	美国 Gibco 公司
HVE-50 型高压灭菌锅	上海博讯实业有限公司	过氧化氢	天津富宇试剂有限公司
SW-CJ 超净台	上海新苗医疗器械制造有限公司	多聚赖氨酸	美国 Sigma 公司
101-2-型电热恒温鼓风干燥箱	上海乔枫实业有限公司	PBS、DMSO、青霉素和链霉素	海克隆生物化学制品 (北京) 有限公司
XDS-1B 倒置显微镜	上海比目仪器厂	SOD 测定试剂盒、LDH 试剂盒	南京建成生物工程研究所

E-Plate 16 孔板, 培养 12 h 贴壁生长后, 弃去原培养基, 实验分组为: 空白对照组和模型组。模型组加入不同浓度的 H_2O_2 ($50 \mu mol \cdot L^{-1}$ 、 $100 \mu mol \cdot L^{-1}$ 、 $200 \mu mol \cdot L^{-1}$ 和 $400 \mu mol \cdot L^{-1}$) 溶液, 每个浓度设置 3 个复孔; 空白对照组加入 $100 \mu L$ DMEM 完全培养基。记录 CI 值, 连续检测 33 h。采用与 1.3 项下同样的方法, 绘制不同浓度 H_2O_2 致 PC12 细胞损伤曲线。

1.5 RTCA 检测苯乙醇苷类化合物的保护作用

细胞分组为: 空白对照组、模型组及给药组。弃去给药组的原培养液, 加入不同浓度的 Caleolarioside B, Paraboside B 和 Glutinoside B ($50 \mu mol \cdot L^{-1}$ 、 $25 \mu mol \cdot L^{-1}$ 、 $12.5 \mu mol \cdot L^{-1}$ 、 $6.25 \mu mol \cdot L^{-1}$ 、 $3.125 \mu mol \cdot L^{-1}$) 溶液, 每个浓度设置 3 个平行。预处理 12 h, 将所有组的培养液弃掉, 加入 $100 \mu L$ 最佳浓度的 H_2O_2 溶液。数据采集及曲线绘制方法与 1.3 项相同。

1.6 检测 LDH 的释放量及 SOD 的水平

收集细胞及细胞上清液, 按试剂盒说明书步骤进行操作, 利用酶标仪比色法测定上清中 LDH 水平和细胞内 SOD 活力。

1.7 统计学处理

采用 SPSS17.0 进行统计学处理数据, 结果用均数 (Mean) $\pm$ 标准差 (SEM) 即 $\bar{x} \pm s$ 表示, 所有实验每组均重复 3 次, 采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 对各组间差异进行比较, $p < 0.05$ 为对比组之间差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 PC12 细胞最适接种浓度的确定

根据曲线显示的各浓度细胞生长状态以及进入对数生长期的时间, 确定最适接种浓度。PC12 细胞在 12 h 前生长比较平稳; 12 h-53 h 期间, 浓度为 5.0×10^3 个/孔、 1.0×10^4 个/孔、 2.0×10^4 个/孔的 PC12 细胞进入对数生长期, 其中 2.0×10^4 个/孔的 PC12 细胞的细胞指数值相对较高, 有利于实验的进行。故本实验选择浓度为 2.0×10^4 个/孔进行后续实验。

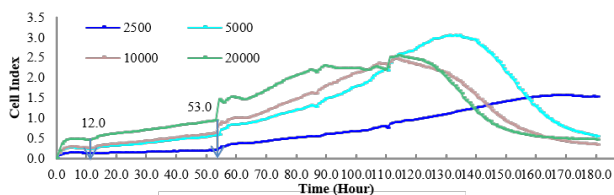


图1 RTCA监测PC12细胞增殖曲线

2.2 确定建立氧化应激模型的最佳条件

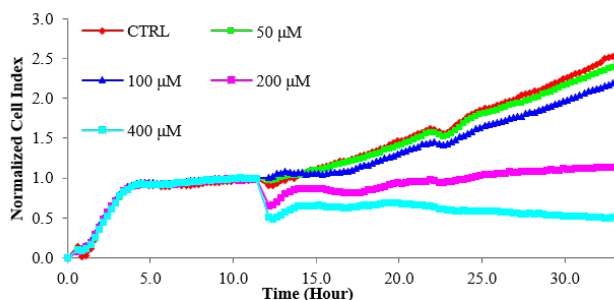


图2 RTCA监测不同浓度 H_2O_2 致PC12细胞损伤程度

与空白对照组相比, H_2O_2 组的细胞 CI 值降低, 浓度为 $400 \mu mol \cdot L^{-1}$ 时细胞 CI 值最低; H_2O_2 浓度为 $50 \mu mol \cdot L^{-1}$ 和 $100 \mu mol \cdot L^{-1}$ 时, 对 PC12 细胞的氧化损伤不明显, 呈现一定剂量依

赖性。 $200 \mu mol \cdot L^{-1}$ 和 $400 \mu mol \cdot L^{-1} H_2O_2$ 作用于 PC12 细胞 2-6 h 内, 对细胞的氧化损伤趋于平稳, 本实验确定 $200 \mu mol \cdot L^{-1} H_2O_2$ 作用 6 h 为氧化应激模型。

2.3 RTCA 检测苯乙醇苷类化合物的保护作用

与 H_2O_2 模型组相比, 通过加入不同浓度的 Caleolarioside B, Paraboside B 和 Glutinoside B, 可增加细胞存活率, 提高细胞指数值。Caleolarioside B 的浓度在 $3.125 \mu mol \cdot L^{-1}$ - $50 \mu mol \cdot L^{-1}$ 之间时, 能够明显改善 H_2O_2 对 PC12 细胞的氧化损伤, 除 $12.5 \mu mol \cdot L^{-1}$ 外, 呈现浓度依赖性, 在药液浓度为 $50 \mu mol \cdot L^{-1}$ 时对 PC12 细胞损伤的保护作用最强 (图 3-A)。Paraboside B 的浓度在 $3.125 \mu mol \cdot L^{-1}$ - $12.5 \mu mol \cdot L^{-1}$ 间呈现浓度依赖性, 随着浓度增加, 其对 PC12 细胞损伤的保护作用有所下降 (图 3-B)。 $12.5 \mu mol \cdot L^{-1}$ Glutinoside B 的保护作用最强 (图 3-C)。

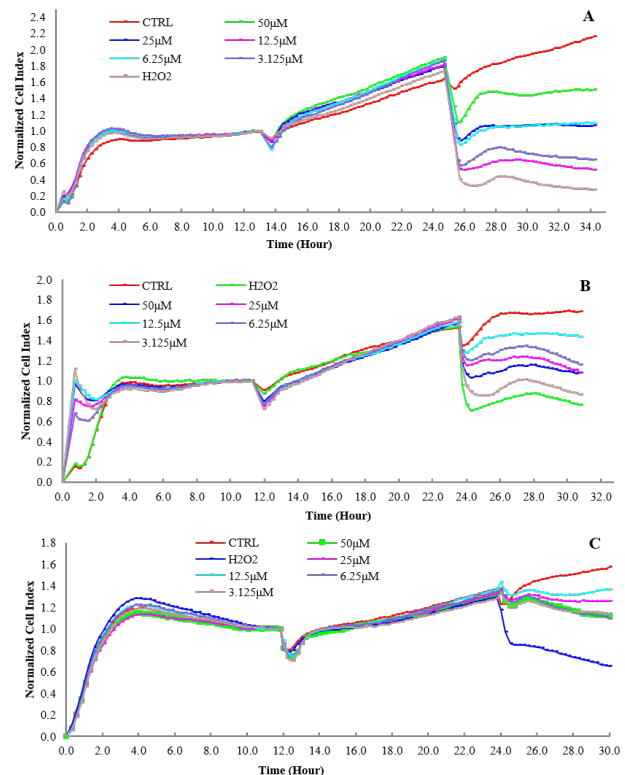


图3 苯乙醇苷类化合物对PC12细胞增殖活性的影响

2.4 LDH 的释放量及 SOD 的水平

与空白对照组相比, H_2O_2 模型组细胞培养液中 LDH 含量明显增加 ($p < 0.05$), SOD 活性明显降低 ($p < 0.05$)。与 H_2O_2 模型组相比, $3.125 \mu mol \cdot L^{-1}$ 和 $50 \mu mol \cdot L^{-1}$ 的 Caleolarioside B, Paraboside B 和 Glutinoside B 可降低 H_2O_2 所致 PC12 细胞 LDH 释放, 除 Caleolarioside B 的 $3.125 \mu mol \cdot L^{-1}$ 组 ($p < 0.05$) 外, 差异无统计学意义 ($p > 0.05$)。均可提高 PC12 细胞培养液中 SOD 活性 ($p < 0.05$), 差异均具有统计学意义 (表 2)。

3 讨论

人口老龄化是当今世界各国都面临的严重问题。与衰老有关的许多疾病如阿尔茨海默病 (AD) 和帕金森病 (PD) 已经成为当今社会严重威胁老年人身体健康的因素。活性氧已被当作神经退行性疾病的主要因素, 而具有抗氧化性能的药物治疗帕金森病已成为重要研究方向 [12]。

表2 LDH的释放量及SOD的水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	药物浓度 ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	LDH(U/L)	SOD(U/mgprot)
正常组	—	452.09 $\pm$ 136.12 Δ *	297.13 $\pm$ 15.54*
模型组	400	635.02 $\pm$ 81.96 Δ	178.91 $\pm$ 9.66 Δ
Caleolarioside B	3.125	593.25 $\pm$ 4.67 Δ *	192.84 $\pm$ 37.14*
	50	615.97 $\pm$ 64.10 Δ	183.31 $\pm$ 4.81*
正常组	—	419.78 $\pm$ 66.11*	297.13 $\pm$ 15.54*
模型组	400	607.30 $\pm$ 90.85 Δ	178.91 $\pm$ 9.66 Δ
Paraboside B	3.125	568.72 $\pm$ 87.58	189.44 $\pm$ 45.42*
	50	507.76 $\pm$ 178.22	181.19 $\pm$ 10.13*
正常组	—	479.24 $\pm$ 107.90*	157.35 $\pm$ 24.48*
模型组	400	766.22 $\pm$ 91.27 Δ	118.83 $\pm$ 6.27 Δ *
Glutinoside B	3.125	580.64 $\pm$ 350.44	174.09 $\pm$ 28.26*
	50	654.50 $\pm$ 185.31	187.15 $\pm$ 16.40*

注：* 与 H2O2 模型组比较 $p < 0.05$ ； Δ 与空白对照组比较 $p < 0.05$

PC12 细胞为小鼠肾上腺嗜铬细胞瘤克隆化的细胞株，被广泛认为是一种理想的研究神经退行性疾病相关神经细胞生理学和病理学的体外细胞模型^[13]。H₂O₂ 是一种重要的活性氧，极易透过细胞膜与铁离子形成高活性的自由基，易于获得，性质相对稳定^[14]，本研究 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞建立氧化应激损伤细胞模型。

苯乙醇苷类化合物具有显著的抗氧化和抗衰老活性，是因为结构中含有多个酚羟基。本研究初步研究了白花蛛毛苣苔中苯乙醇苷类化合物 Caleolarioside B, Paraboside B 和 Glutinoside B 对 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞氧化损伤的保护作用。结果提示，H₂O₂ 可明显造成 PC12 细胞损伤，降低细胞存活率，而 Caleolarioside B, Paraboside B 和 Glutinoside B 可使 PC12 细胞死亡率明显降低。

SOD、CAT 和 GSH 是体内重要的抗氧化剂，能够清除 H₂O₂、过氧化脂质和超氧阴离子自由基，防止 ROS 水平过高对细胞和组织造成的损害^[12]。研究结果显示，H₂O₂ 模型组 SOD 活性降低，采用 Caleolarioside B, Paraboside B 和 Glutinoside B 预处理则显著升高 PC12 细胞中 SOD 活性。当细胞发生损伤时，细胞膜结构破坏导致 LDH 从细胞内释放，因此 LDH 含量作为细胞损伤指标之一^[15]。实验结果显示，Caleolarioside B, Paraboside B 和 Glutinoside B 可降低 PC12 细胞上清液中 LDH 含量。

综上所述，白花蛛毛苣苔中苯乙醇苷类化合物 Caleolarioside B, Paraboside B 和 Glutinoside B 能降低 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞损伤，提示其可能对神经退行性疾病存在潜在的神经保护作用，有待进一步深入的研究。

参考文献:

- [1] Kennedy G, Spence VA, McLaren M, et al. Oxidative stress levels are raised in chronic fatigue syndrome and are associated with clinical symptoms[J]. Free Radic Biol Med, 2005, 39(5): 584–9.
- [2] Mu X, He G, Cheng Y, et al. Baicalein exerts neuroprotective effects in 6-hydroxydopamine-induced experimental parkinsonism in vivo and in vitro[J]. Pharmacol Biochem Behav, 2009, 92(4): 642–8.
- [3] Baluchnejadmojarad T, Roghani M, Mafakheri M.

Neuroprotective effect of silymarin in 6-hydroxydopamine hemiparkinsonian rat: involvement of estrogen receptors and oxidative stress[J]. Neuro sci Lett, 2010, 480(3): 206–10.

[4] 吕丽娟, 任凯, 那木汗, 李旻辉. 尖叶假龙胆有效成分的活性追踪分离及对 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞氧化损伤的保护作用研究[J]. 中草药, 2017, 48(10): 1957–1963.

[5] Cash TP, Pan Y, Simon MC. Reactive oxygen species and cellular oxygen sensing[J]. Free Radic Biol Med, 2007, 43(9): 1219–25.

[6] Ailton M, Larissa M, Lima R, et al. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: Mechanisms and Therapeutic Perspectives[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2011, 2011(3): 467180.

[7] Xiaoqin Wang, Li Li, Zhenfang Bai, et al. Five new phenylpropanoid glycosides of Paraboea glutinosa (Gesneriaceae). Journal of Natural Medicines, 2011, 65(2): 301–306.

[8] 李丽, 时东方, 桂语歌, 等. 肉苁蓉中苯乙醇苷类化合物的抗氧化活性研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 32: 15835–15836.

[9] 李丽, 刘质净, 时东方, 等. 车前草中苯乙醇苷类化合物的抗氧化活性研究[J]. 江苏农业科学, 2010, 01: 275–277.

[10] Ismailoglu U B, Saracoglu I, Harput U S, et al. Effects of phenylpropanoid and iridoid glycosides on free radical-induced impairment of endothelium-dependent relaxation in rat aortic rings[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2002, 79(2): 193–197.

[11] 木合布力·阿布力孜, 毛新民, 热娜·卡斯木, 等. 肉苁蓉总苷在 HL-60 细胞中的抗氧化活性研究[J]. 中国药理学通报, 2008, 03: 362–364.

[12] 熊珮, 陈忻, 张楠. 帕金森病病理机制及中药防治帕金森病实验研究进展[J]. 中国中药杂志, 2012, 05: 686–691.

[13] 孙涛, 邓婷, 秦涛, 等. 山楂叶黄酮通过 Nrf-2/ARE 信号通路对 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞氧化应激损伤的保护作用研究[J]. 中药药理与临床, 2021, 37(04): 47–55.

基金项目: 黄芩提取物对脂多糖诱导小鼠炎症反应的保护作用(QN-2019-01); 蒙药多叶棘豆有效成分含量测定及资源普查(QN-2021-04)