

吴磊, 司传领, 陈铭, 等. 荷叶总黄酮对 H_2O_2 诱导 PC12 细胞损伤的保护作用[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(9): 272–275.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.09.077

荷叶总黄酮对 H_2O_2 诱导 PC12 细胞损伤的保护作用

吴磊^{1,2}, 司传领¹, 陈铭², 薛琪², 罗海青², 朱翠玲², 胡卫成², 王毓宁³

(1. 天津科技大学材料科学与化学工程学院, 天津 300457; 2. 淮阴师范学院江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室, 江苏淮安 223300;

3. 江苏省农业科学院农产品加工研究所, 江苏南京 210014)

摘要:为了探讨荷叶总黄酮对 H_2O_2 诱导的 PC12 细胞损伤的保护作用及机制, 建立以 H_2O_2 诱导大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞(PC12)为氧化应激损伤模型, 通过四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法检测正常细胞的存活率与损伤程度, 用试剂盒测定不同浓度荷叶总黄酮对 H_2O_2 刺激 PC12 细胞中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活力、丙二醛(MDA)、蛋白质羰基含量的影响并检测 Caspase-3 活力的变化; Real Time PCR 检测胞浆内 Bcl-2 与 Bax 的基因 mRNA 的表达。结果表明荷叶总黄酮能显著提高 H_2O_2 损伤的 PC12 细胞存活率, 显著减少 H_2O_2 刺激的 PC12 细胞中 MDA 与蛋白质羰基的生成, 显著提高 CAT 活性, 但对提高 SOD 活性不显著。PC12 细胞损伤可增加凋亡相关蛋白 Bax mRNA 的表达, 加入荷叶总黄酮后有降低作用; 同时 H_2O_2 使 Bcl-2 mRNA 的表达降低, 加入荷叶总黄酮后有提高作用。荷叶总黄酮在给药浓度较低的情况下, 对 H_2O_2 损伤的 PC12 细胞发挥着明显的保护作用, 其作用机制可能与抑制线粒体途径的细胞凋亡有关。

关键词:荷叶总黄酮; 氧化应激; 过氧化氢(H_2O_2); PC12 细胞; Caspase-3 活力

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)09-0272-04

神经系统疾病(阿尔茨海默病、帕金森病和中风)的病理机制大多是由于氧化应激损伤神经元细胞造成的^[1]。众所周知, 生物体在维持生命活动时, 会产生必要的氧自由基, 但是过量的氧自由基在体内堆积往往会造成脂质过氧化、蛋白质和 DNA 的氧化, 以及防御系统如 SOD、CAT 和 GPX 等变化, 这就会加速细胞的损伤或死亡。由于脑神经细胞膜通透性较高且富含多种不饱和脂肪酸, 其氧化速率极高, 最终就会引起其抗氧化能力差, 因此脑组织更易遭受自由基的损伤。

收稿日期: 2015-09-17

基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金[编号: CX(14)4060]。

作者简介: 吴磊(1985—), 男, 山东济宁人, 博士, 主要从事植物活性成分的研究。E-mail: wulei858196@163.com。

通信作者: 王毓宁, 硕士, 副研究员, 主要从事果蔬保鲜与加工技术研究。E-mail: wyn705@163.com。

菌渣固态发酵菌体蛋白饲料工艺。试验结果表明, 影响蛋白质含量的主次因素依次为基质配比、发酵时间、温度、水料比。在酵母菌接种量 13% 条件下, 菌渣: 麸皮质量比为 8:2、水料比 1 mL:2.5 g、30℃ 下培养 96 h, 发酵物的粗蛋白含量可达峰值(18.43%)。

本试验所用菌渣是金顶侧耳菌菇多糖提取后的废料, 具有一定水分, 易腐烂发臭, 不易保存, 如果直接排放会造成环境污染。菌渣含有比较丰富的营养物质^[5]。试验前测得未经固体发酵的菌渣粗蛋白质含量约为 7.8%, 条件优化后蛋白含量升高到 18.43%。因而, 以菌渣作为发酵的主料, 再添加一些辅料, 采用酵母菌协同固态发酵技术, 可将菌残渣转化为蛋白含量较高的饲料, 能大幅提高饲料的营养价值, 从而建

寻找具有抗氧化应激作用的天然药物对于治疗神经系统疾病具有重要的临床意义^[2-4]。目前神经元细胞模型的建立大多采用大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞(PC12)损伤模型, 这是因为 PC12 细胞无论在形态、结构和功能上, 都具有与神经元细胞相似的诸多特征, 且能与原代培养的神经细胞说明一致的问题^[5]。

荷叶为睡莲科多年生水生草本植物莲(*Nelumbo nucifera* Gaertn.)的叶子。之前的研究表明, 荷叶在食用和药用两方面都具有较广泛的应用, 尤其作为一种减肥茶深受人们的喜爱, 荷叶含有的黄酮类化合物为其主要的有效成分。荷叶总黄酮在生命现象中参与多种细胞活动, 对其研究多集中在荷叶黄酮具有降脂减肥、抗自由基、抗氧化、抑菌、抗病毒、防衰老等多种生理活性上^[6-10], 对其神经系统的保护作用未见报道。本研究以 H_2O_2 诱导的 PC12 细胞为模型, 研究荷叶总黄酮对 PC12 细胞抗凋亡效果, 探讨荷叶总黄酮在氧化损伤相

立高效的资源循环再利用系统。

参考文献:

- [1] 孔平涛. 我国饲料蛋白原料现状与发展需求[J]. 饲料广角, 2003, 23(18): 15–18.
- [2] 李志香, 王一鸣. 废菌渣开发饲料蛋白质替代源的菌种筛选与多菌共同发酵[J]. 中国畜牧兽医, 2007, 34(4): 19–22.
- [3] 王淑军, 吕明生, 王永坤. 混菌发酵提高甘薯渣饲用价值的研究[J]. 食品与发酵工业, 2002, 28(6): 40–45.
- [4] 赵凤敏, 李树君, 方宪法, 等. 中心组合设计法优化马铃薯渣固态发酵工艺[J]. 农业机械学报, 2006, 37(8): 45–48.
- [5] 马纯艳, 王升厚. 菌糠单细胞蛋白饲料生产技术的研究[J]. 食用菌, 2005, 27(3): 56–58.

关疾病,如 AD 治疗中应用的可能性,为更好地开发利用荷叶资源提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

荷叶于 2013 年采摘于江苏省金湖县,经中国医学科学院药用植物研究所吴海峰博士鉴定为睡莲科植物莲(*Nelumbo nucifera* Gaertn.)上的叶。

原大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤细胞株 PC12 细胞,购买于美国典型培养物保藏中心(ATCC);RPMI-1640 培养基、马血清、胎牛血清购于 Gibco 公司;二甲基亚砜、台盼蓝、甲氨唑蓝(MTT)购自 Sigma 公司;超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(Ann Arbor,MI)、过氧化氢酶(CAT)试剂盒(碧云天)、蛋白质羰基含量测定试剂盒(Sigma-Aldrich)均购于碧云天生物研究所;过氧化氢(质量分数 30%)为国药集团化学试剂有限公司提供。

1.2 主要仪器设备

CO₂ 培养箱,日本 SANYO 公司;Infinite M200 Pro 型酶标仪,瑞士 Tecan 公司;超速冷冻离心机,Eppendorf 公司;净化工作台;倒置显微镜及照相系统等。

1.3 荷叶总黄酮提取及含量的测定^[11]

1.3.1 荷叶总黄酮提取 采摘新鲜荷叶室温阴干、粉碎后,称取 200 g 荷叶粉末,按料液比 1:30,加入体积分数 75% 的乙醇水溶液热回流提取,提取温度为 60 ℃,每次浸提 2 h,共 3 次,提取液过滤后减压浓缩定容至 50 ml,此为荷叶总黄酮供试液。

1.3.2 芸香苷标准曲线的制作^[11] 用乙醇配制不同浓度的芸香苷标准溶液(0.0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/mL),各吸取 1 mL 后加入 5% 亚硝酸钠 0.3 mL,摇匀,避光反应 5 min,依次加入 10% 硝酸铝 0.3 mL,4% 氢氧化钠 2 mL,混匀放置 15 min 后,在波长 510 nm 处测定其吸光值。以芸香苷浓度为横坐标,吸光值为纵坐标,绘制芸香苷标准曲线。

1.3.3 荷叶总黄酮含量的测定 取供试液 1 mL,按照标准曲线的测定方法,在 510 nm 处测定吸光度。根据回归方程计算荷叶中总黄酮提取率:

$$\text{总黄酮提取率} = \frac{C \times N \times V}{m} \times 100\%。$$

式中:*C* 为总黄酮质量浓度,mg/mL;*V* 为提取液体积,mL;*N* 为稀释倍数;*m* 为荷叶质量,g。

1.4 PC12 细胞培养

用含 5% 胎牛血清、10% 马血清、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养液,37 ℃、5% CO₂ 条件下培养细胞,观察细胞生长状态,每 3 d 传代 1 次。待细胞生长至融合率达 80% 时,用 0.25% 胰酶消化细胞,调整适当的细胞密度接种于细胞培养板进行各项指标测定。

1.5 荷叶总黄酮单独给药对正常 PC12 细胞的影响

取对数生长期细胞,计数后调整细胞数至 5×10^4 个接种于 96 孔板,培养 16 h。加入不同浓度的荷叶总黄酮样品 0、20、40、80 g/mL 组,每组设 3 个复孔。处理 6 h 后,吸去上清,每个孔加入 20 μL 的 MTT 工作液,于二氧化碳培养箱内培养 4 h,加入 100 μL MTT 终止液,完全溶解后,使用酶标仪于

550 nm 处测定吸光度,计算细胞生长率。

1.6 荷叶总黄酮对 PC12 细胞凋亡率的影响

取对数生长期细胞,计数后调整细胞数至 5×10^4 个接种于 96 孔板,培养 16 h。分别设正常组(不加药物正常培养的细胞),石榴籽油 0.5、1、2、4 mg/mL 组,同时设无细胞的空白对照组,每组设 3 个复孔。细胞接种 0.5 h 后,加入 H₂O₂ 0.5 mmol/L。处理 6 h 后,吸去上清,每个孔加入 20 μL 的 MTT 工作液,于二氧化碳培养箱内培养 4 h,加入 100 μL MTT 终止液,完全溶解后,使用酶标仪于 550 nm 处测定吸光度,计算细胞生长率。

1.7 荷叶总黄酮对氧化应激的 PC12 细胞中 SOD、CAT 活力以及 MDA、蛋白质羰基含量的影响

取对数生长期 PC12 细胞,计数后每孔接种 6×10^5 个细胞于 6 孔板,培养 16 h 后,加入不同浓度的样品溶液,0.5 h 后,加入 H₂O₂ 处理 6 h,吸去上清,完成给药及 H₂O₂ 处理后,采用细胞刮彻底收集细胞,用预冷的 PBS 洗涤,超声破碎细胞,4 ℃ 下 8 000 r/min 离心 15 min,收集上清液按照试剂盒方法测定细胞匀浆中 SOD、CAT 活力及 MDA、蛋白质羰基含量。

1.8 Caspase-3 活力检测

取对数生长期 PC12 细胞,每孔接种 1×10^6 个细胞于 6 孔板,培养 16 h 后,倒掉旧培养基,加入不同浓度的样品溶液,0.5 h 后,加入浓度为 0.5 mmol/L H₂O₂ 处理 6 h,吸去上清,采用预冷的 PBS 冲洗细胞并将细胞刮入离心管中,4 ℃ 下 10 000 r/min 离心 10 min,将上清弃掉,收集的细胞按照试剂盒方法测 Caspase-3 活力。

1.9 PC12 细胞 *Bax* 和 *Bcl-2* mRNA 表达变化检测(real time RT-PCR)

取对数生长期 PC12 细胞,接种 3×10^6 个细胞于 4 mL 培养基中,培养 16 h 后,倒掉旧培养基,设置空白组、对照组,向样品组加入不同浓度的样品溶液,放入培养箱培养 30 min 后,加入浓度为 0.5 mmol/L H₂O₂ 培养 6 h,按照 TRIzol 法提取细胞总 RNA 进行浓度测定, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 鉴定纯度,跑 RNA 胶看是否降解。取 2 μg RNA 反转录成 cDNA 后 PCR 扩增。*Bax* 的引物序列为上游:5'-CTGCAGAGGATGATTGCTGA-3',下游:5'-GAGGAAGTCCAGTGTCCAGC-3';*Bcl-2* 引物序列为上游:5'-ATCTTCCTCTCCAGCCTGA-3',下游:5'-TGCAGCTGACTGGACATCTC-3';GAPDH 的引物序列为上游:5'-CACTCACGGCAAATTCACGGCA-3',下游:5'-GACTCCACGACATACTCAGCAC-3'。反应体系及条件:25 μL 预混合 Ex Taq, cDNA 4 μL,1 μL 荧光染料,上、下游引物各 1 μL 以及 9 μL 蒸馏水混合后置于 96 孔板中。94 ℃ 预变性 10 min;94 ℃ 变性 15 s,55 ℃ 复性 15 s,72 ℃ 延伸 30 s,扩增 30 个循环;72 ℃ 延伸 1 min 后,进行光密度积分值分析,与内参照 GAPDH 产物的光密度积分值之比作为相对含量值。

1.10 统计学分析

所有试验均重复 3 次,各试验数据均以平均值 ± 标准差表示,数据采用 SPSS 10.0 软件进行处理。

2 结果与分析

2.1 荷叶总黄酮含量测定

荷叶中除了含有碳水化合物、脂质、蛋白质等常规成分

外,还富含大量的黄酮类化合物,根据芸香苷标准曲线 $y=0.003x-0.0139$, $r=0.9999$,求得荷叶中总黄酮提取率为 5.64% (干荷叶)。这比叶思平报道的超声提取荷叶所得总黄酮的得率为 10.55% 要低^[12],可能是和提取时间与提取方式有关。

2.2 荷叶总黄酮单独给药对正常 PC12 细胞的影响

荷叶总黄酮各剂量组 (20、40、80 $\mu\text{g/mL}$) 预孵育 6 h 后细胞存活率分别为 (103.21 \pm 11.65)%、(98.12 \pm 9.23)% 和 (95.43 \pm 13.65)%, 正常对照组细胞存活率为 (100 \pm 17.36)%, 各给药组与对照组相比没有显著性差异 ($P > 0.05$), 如图 1 所示, 表明荷叶总黄酮本身对正常 PC12 细胞没有损伤。

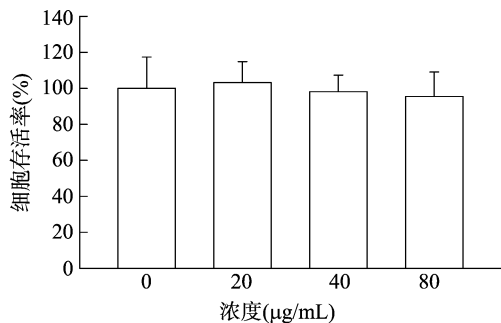


图1 荷叶总黄酮对 PC12 细胞存活率的影响($n=3$)

2.3 不同浓度荷叶总黄酮对 PC12 细胞凋亡率的影响

如图 2 所示, 与正常对照组相比, H_2O_2 模型组细胞存活

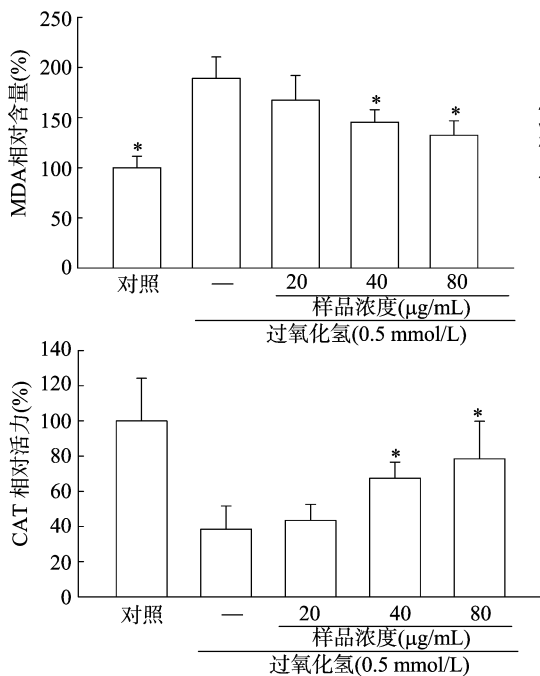


图3 荷叶总黄酮对 SOD、CAT 活力以及 MDA、蛋白质羰基含量的影响($n=3$)

2.5 荷叶总黄酮对 H_2O_2 损伤 PC12 细胞 Caspase-3 活性的影响

试验结果表明, 与对照组相比, 模型组中活化的 Caspase-3 水平升高; 与模型组相比, 荷叶总黄酮 (20、40、80 $\mu\text{g/mL}$) 试验组的 Caspase-3 水平均有不同程度的降低, 且荷叶总黄酮对 Caspase-3 活性降低的作用具有剂量依赖性

率为 (38.45 \pm 13.21)%, 加入 20、40、80 $\mu\text{g/mL}$ 的荷叶总黄酮后, 其细胞存活率分别为 (43.45 \pm 9.12)%、(67.43 \pm 9.12)% 和 (78.45 \pm 21.34)%. 结果表明, 与模型组相比受试药组细胞凋亡比明显降低, 且存在剂量依赖关系, 荷叶总黄酮具有抑制 H_2O_2 诱导 PC12 细胞损伤的作用。

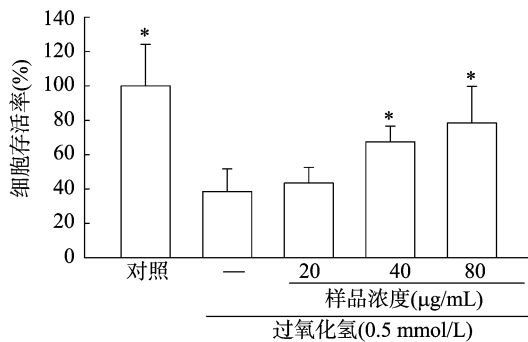
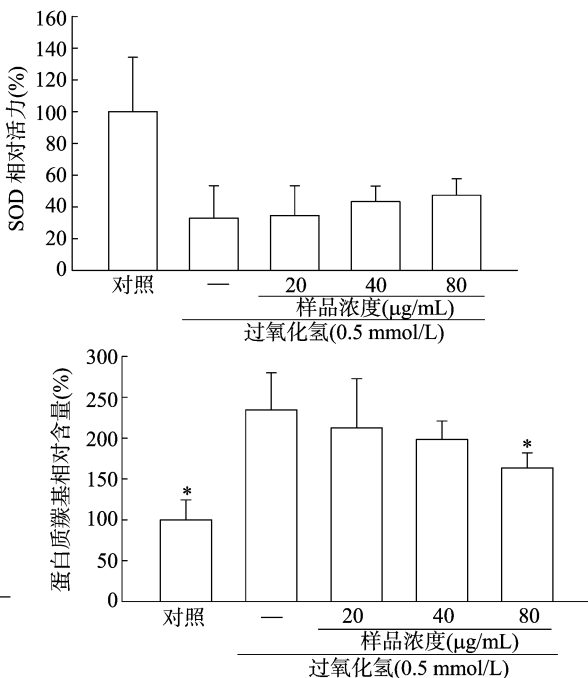


图2 荷叶总黄酮对过氧化氢引起细胞毒性的保护作用($n=3$)

2.4 荷叶总黄酮对过氧化氢损伤的 PC12 细胞中 SOD、CAT 活力以及 MDA、蛋白质羰基含量的影响

由图 3 可见, 加入 H_2O_2 后, 与空白对照组相比, 细胞培养液中 MDA 与蛋白质羰基含量明显升高, CAT 与 SOD 活性降低, 细胞存活率降低, 荷叶总黄酮处理后, CAT 活性随着给药浓度的增大而升高。MDA 与蛋白质羰基含量随着给药浓度的升高而降低, 但是 SOD 活性随着给药浓度的升高变化不大。说明荷叶总黄酮达到保护过氧化氢损伤细胞的作用可能与 CAT 有关。



(图 4)。试验结果表明, 荷叶总黄酮抗凋亡作用可能与其调节 Caspase 级联反应的激活有关。

2.6 荷叶总黄酮对 H_2O_2 损伤 PC12 细胞 Bax 和 Bcl-2 mRNA 表达的影响

以 GAPDH 为内参照, 正常对照组 Bax 和 Bcl-2 mRNA

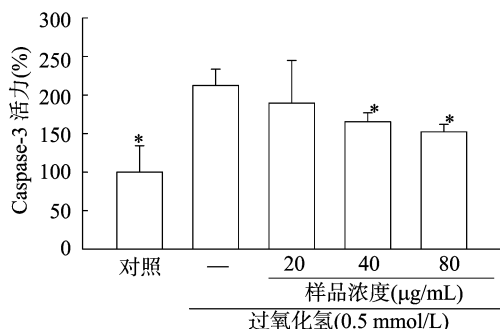


图4 荷叶总黄酮对 H_2O_2 损伤 PC12 细胞 Caspase-3 活性的影响($n=3$)

的表达为 100%，其他各组与其比较得百分比。结果表明， H_2O_2 损伤组 PC12 细胞 *Bcl-2* mRNA 的表达水平比正常对照组降低。预先不同浓度荷叶总黄酮保护后 *Bcl-2* mRNA 的表达较 H_2O_2 损伤组增加，而 *Bax* mRNA 的表达为 H_2O_2 损伤组比正常对照组升高，给药保护后 *Bax* mRNA 的表达显著减小。

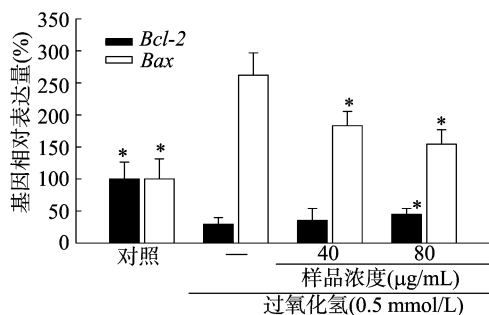


图5 荷叶总黄酮对 H_2O_2 损伤 PC12 细胞 *Bax* 和 *Bcl-2* mRNA 表达的影响($n=3$)

3 结论

本研究中，PC12 细胞经过 H_2O_2 处理后，细胞存活率下降，MDA 与蛋白质羰基含量明显升高，CAT 与 SOD 活性降低；经过荷叶总黄酮预处理后各项指标均有逆转，细胞存活率提高，MDA 与蛋白质羰基含量降低，CAT 活性提高，表明荷叶总黄酮对 H_2O_2 诱导的 PC12 细胞损伤具有明显的保护作用。经过给药处理后，其 SOD 活性并无显著变化，这就不能有效地清除自由基，可以推测荷叶总黄酮活性组分进入细胞后阻止 H_2O_2 介导的氧化损伤所起的作用不显著。

研究表明，氧化应激能够触发线粒体通路的细胞凋亡，*Bcl-2* 家族中的蛋白在此通路中发挥着重要的作用。其中包括促凋亡蛋白 *Bax*、抗凋亡蛋白 *Bcl-2*。*Bcl-2/Bax* 的比例被认为是确定细胞是存活还是死亡的关键因素，包括 PC12 细胞。已经被证实 *Bcl-2* 与 *Bax* 可能通过控制线粒体膜通透性变化，从而促进细胞色素 *c* 的释放，最终导致 Caspase-3 的级联反应引起细胞的凋亡^[13-14]。本试验研究表明，用 H_2O_2 处理后能够降低抗凋亡蛋白 *Bcl-2* 表达量而提高促凋亡蛋白 *Bax* 表达量，而加入荷叶总黄酮后，其变化正好相反，即 *Bcl-2/Bax* 二者比例较之模型组提高，说明荷叶总黄酮通过调节 *Bcl-2* 和 *Bax* 的表达来实现对 H_2O_2 损伤 PC12 细胞凋亡的保护作用，同时进一步证明荷叶总黄酮对 PC12 细胞保护作用与细胞凋亡线粒体通路相关。

细胞凋亡过程与一系列的生物化学变化有关，这其中包

括 Caspase 家族蛋白的激活，Caspase-3 作为细胞凋亡程序中最下游的调控蛋白，对细胞凋亡起着关键的作用^[15]。本研究中发现模型组中 H_2O_2 能够提高 Caspase-3 活性程度，但是当加入不同浓度的荷叶总黄酮后，Caspase-3 活性明显降低。这充分说明了荷叶总黄酮通过抑制 Caspase-3 的活化而最终达到对 H_2O_2 损伤的 PC12 细胞的保护作用。

综上所述，荷叶总黄酮可能通过提高抗凋亡蛋白 *Bcl-2* 表达，降低促凋亡蛋白 *Bax* 表达，最终导致 Caspase-3 的级联反应有效地抑制 H_2O_2 诱发的 PC12 细胞凋亡，产生良好的神经元保护作用。本研究为揭示荷叶总黄酮的作用靶点提供了思路，为进一步的研究阐明了其作用机制。

参考文献:

- [1] Liu S C, Han Y G, Zhang T, et al. Protective effect of trifluoperazine on hydrogen peroxide-induced apoptosis in PC12 cells [J]. Brain Research Bulletin, 2011, 84(2): 183-188.
- [2] 温旭敏, 魏涛, 白利萍, 等. 川芎嗪对 H_2O_2 诱导 PC12 细胞凋亡的保护作用研究 [J]. 中国药物与临床, 2013, 13(1): 25-27.
- [3] 陈伟强, 赵宇红, 罗少洪, 等. 大豆异黄酮活性组分对 H_2O_2 诱导的 PC12 细胞损伤的影响 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2005, 10(4): 443-446.
- [4] Shokoohinia Y, Rashidi M, Hosseinzadeh L, et al. Quercetin-3-O-D-glucopyranoside, a dietary flavonoid, protects PC12 cells from H_2O_2 -induced cytotoxicity through inhibition of reactive oxygen species [J]. Food Chemistry, 2015, 167: 162-167.
- [5] 孔艳, 罗涛, 蒋威, 等. 西红花酸对 H_2O_2 诱导 PC12 细胞损伤的保护作用 [J]. 解剖学研究, 2012, 34(5): 25-27.
- [6] 杨冀艳, 胡磊, 许杨. 荷叶黄酮类化合物的研究进展 [J]. 食品科学, 2007, 28(8): 554-558.
- [7] 孔文琦, 李严巍. 荷叶活性化学成分及药理研究进展 [J]. 中药研究与信息, 2005, 7(6): 22-24, 44.
- [8] 闫明珠, 钟雨, 刘新民, 等. 荷叶提取物的镇静催眠作用 [J]. 食品科学, 2015, 36(5): 168-171.
- [9] 王福刚, 曹娟, 刘斌, 等. 荷叶的化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(9): 2339-2340.
- [10] 梁树才, 宗自卫, 于海英, 等. 荷叶总黄酮对小鼠酒精肝损伤的保护作用 [J]. 营养与保健, 2014, 35(9): 347-350.
- [11] Jia Z S, Tang M C, Wu J M. The determination of flavonoid content in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals [J]. Food Chemistry, 1999, 64(4): 555-559.
- [12] 叶思平. 荷叶黄酮的提取纯化及其特性研究 [D]. 广州: 仲恺农业工程学院, 2013: 5.
- [13] Liu B M, Jian Z, Li Q, et al. Baicalein protects Human melanocytes from H_2O_2 -induced apoptosis via inhibiting mitochondria-dependent caspase activation and the p38 MAPK pathway [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2012, 53(2): 183-193.
- [14] Rao Y K, Shih H N, Lee Y C, et al. Purification of kavalactones from *Alpinia zerumbet* and their protective actions against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in PC12 cells [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2014, 118(6): 679-688.
- [15] Si C L, Shen T, Jiang Y Y, et al. Antioxidant properties and neuroprotective effects of isocampneoside II on hydrogen peroxide-induced oxidative injury in PC12 cells [J]. Food and Chemical Toxicology, 2013, 59: 145-152.