

芍药甘草汤对H₂O₂诱导的PC12细胞氧化应激损伤的保护作用

郑博丹, 吴斯敏, 陈 稚, 邢晓伟, 李宝红, 吴都督* (广东医科大学药学院, 广东东莞 523808)

摘 要: **目的** 研究芍药甘草汤(SGT)对H₂O₂诱导的PC12细胞氧化应激损伤的保护作用。**方法** 用100 μmol/L H₂O₂处理小鼠肾上腺嗜铬细胞瘤PC12细胞, 建立氧化应激损伤模型; 再用低(0.1 g/mL)、中(1.0 g/mL)、高剂量(5.0 g/mL)SGT处理, 检测细胞增殖及乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、Nrf-2表达。**结果** SGT各剂量组均能有效抑制H₂O₂损伤导致的细胞存活率下降($P<0.01$)、降低LDH、MDA水平($P<0.01$)、增加SOD活性($P<0.01$), 且高剂量SGT可上调损伤细胞中Nrf-2蛋白表达($P<0.01$)。**结论** SGT对H₂O₂诱导的PC12细胞氧化应激损伤有保护作用, 可能与增强Nrf-2蛋白表达有关。

关键词: 芍药甘草汤; PC12细胞; 氧化应激损伤

中图分类号: R 963

文献标识码: A

文章编号: 2096-3610(2017)06-0581-04

Protection of Shaoyao Gancao Tang on H₂O₂-induced oxidative stress injury in PC12 cells

ZHENG Bo-dan, WU Si-min, CHEN Zhi, XING Xiao-wei, LI Bao-hong, WU Du-du* (School of Pharmacy, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China)

Abstract: **Objective** To study the protective effect of Shaoyao Gancao Tang (SGT) on H₂O₂-induced oxidative stress injury in PC12 cells. **Methods** The oxidative stress injury model of mouse adrenal pheochromocytoma PC12 cells was established by 100 μmol/L H₂O₂ treatment. The proliferation and expression of lactic dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and Nrf-2 in PC12 cells were detected after addition of low (0.1 g/mL), moderate (1.0 g/mL) and high dose (5.0 g/mL) SGT. **Results** The different doses of SGT enhanced survival ($P<0.01$), decreased LDH and MDA levels ($P<0.01$), and increased SOD activity ($P<0.01$) in H₂O₂-treated PC12 cells. Furthermore, high dose SGT upregulated Nrf-2 expression in H₂O₂-treated PC12 cells ($P<0.01$). **Conclusion** SGT may protect the H₂O₂-induced oxidative stress injury in PC12 cells via upregulation of Nrf-2 protein expression.

Key words: Shaoyao Gancao Tang; PC12 cell; oxidative stress injury

细胞内自由基的清除平衡对细胞正常生存至关重要。氧化应激损伤是导致神经退行性疾病的重要原因。如阿尔茨海默症(Alzheimer disease, AD)和帕金森症(Parkinson disease, PD)这两类中老年人中常见的神经退行性疾病, 其发病机制主要与氧化应激、氧自由基消除失衡相关, 可通过给予抗氧化剂限制氧化应激损伤^[1-2]。芍药甘草汤(SGT)主要包括芍药和甘草, 能和气活血、镇痛消炎、补本虚、祛标实, 原方主治“伤寒伤阴、筋脉失濡、腿脚挛急、微恶寒、肝脾不和、脘腹疼痛”^[3]。研究发现, SGT有抗氧化、清除自由基等多种药理作用^[4-7]。其中甘

草含甘草次酸、甘草酸等主要成分, 具有明显的抗炎和镇痛作用; 芍药中的主要成分芍药苷具有解痉、镇痛、抗氧化等作用。两者合用可增强抗氧化作用, 消除体内过多的自由基。PC12细胞由于其本身特征常被用作氧化应激损伤模型^[8]。本研究通过探究SGT对PC12细胞增殖的作用, 观察损伤细胞前后各指标的变化情况, 并探讨其作用机制, 为神经退行性疾病的临床治疗提供指导。

1 材料和方法

1.1 材料

基金项目: 东莞市科技发展项目(No. 2015108101014), 广东省2015年建设中医药强省科研项目(No.20151257), 广东省医学科学技术研究基金项目(No. A2016355), 广东省自然科学基金项目(No. 2017A030310666, No.2017A030313079)

收稿日期: 2017-11-03; **修订日期:** 2017-12-02

作者简介: 郑博丹(1992-), 男, 在读硕士研究生。

***通信作者:** 吴都督(1981-), 男, 博士, 副教授, E-mail: wuducuz@126.com。

甘草、白芍(广东时珍制药有限公司);小鼠肾上腺嗜铬细胞瘤PC12细胞株(上海细胞库);CCK8试剂盒(日本同仁);0.25%胰蛋白酶(含EDTA)、DMEM高糖培养基、胎牛血清(GIBCO,美国);H₂O₂溶液(分析纯, Sigma),二甲基亚砜(索莱宝);细胞裂解液(RIPA, 碧云天);丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)测定试剂盒、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性测定试剂盒(南京建成生物工程公司);BCA法蛋白定量试剂盒(赛默菲);一抗兔抗鼠IgG(Santa Cruz公司);二抗荧光标记的山羊抗兔IgG(Santa Cruz公司)。

1.2 PC12细胞的培养

配成含体积分数为20%胎牛血清、100 kU/L青霉素和100 mg/L链霉素的DMEM(高糖)培养基,把PC12细胞放入细胞培养箱,常规胰蛋白酶消化传代,选取对数生长期的细胞做实验。

1.3 SGT对PC12细胞增殖的影响

按原方比例(甘草12 g,芍药12 g)称量药材,加5倍量75%乙醇,浸泡120 min,回流加热2 h后收集滤液;再加5倍量75%乙醇,回流2 h后收集。把两次滤液一起过滤并浓缩至生药质量浓度10 g/mL的SGT母液。采用CCK8法检测SGT对PC12细胞生存率的影响,将处于对数生长期的PC12细胞按6 000个/孔加入96孔培养板,每孔100 μ L,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂条件下培养24 h。将SGT溶于DMEM并稀释成0.1、1.0、5.0 g/mL低、中、高剂量,分别为SGT低、中、高剂量组,每组3个平行孔,在上述的条件下培养。对照组用DMEM做相同处理。培养24、48、72 h后,每孔加CCK8试剂10 μ L,37 $^{\circ}$ C反应1 h后,用酶标仪在450 nm处测OD值。取6孔的均数,细胞活力/%=(试验孔均值/对照孔均值) $\times$ 100%。

1.4 CCK8检测SGT对PC12细胞的保护

将PC12细胞以8 000个/孔种于96孔板中,每孔100 μ L,培养24 h后应用于实验。实验分为5组:对照组、H₂O₂损伤模型组(100 μ mol/L)、SGT+H₂O₂低剂量组(0.1 g/mL SGT+100 μ mol/L H₂O₂)、SGT+H₂O₂中剂量组(1.0 g/mL SGT+100 μ mol/L H₂O₂)及SGT+H₂O₂高剂量组(5.0 g/mL SGT+100 μ mol/L H₂O₂)。反应24 h后,加入CCK8试剂10 μ L,37 $^{\circ}$ C反应1 h后,采用酶标仪在450 nm下测OD值。细胞活力/%=(试验孔均值/对照孔均值) $\times$ 100%。

1.5 PC12细胞培养液中LDH、MDA和SOD的含量

测定

收集1.2.3处理后细胞培养液,按LDH、MDA及SOD测定试剂盒说明书进行操作,测定OD值,并计算其活性。

1.6 PC12细胞内SOD、MDA含量测定

在6孔板中培养PC12细胞,分别设置对照组、H₂O₂损伤模型组、SGT+H₂O₂低、中、高剂量组,细胞经药物处理后,细胞经超声破碎后离心,取上清液并按照MDA、SOD检测试剂盒说明书进行操作,测定OD值,并计算其活力。

1.7 SGT对PC12细胞的Nrf-2核蛋白表达水平的影响

取PC12细胞以3 $\times$ 10⁶个/mL接种于6孔板,分别设置对照组、H₂O₂损伤模型组、SGT+H₂O₂低、中、高剂量组。孵育24 h后,倒掉培养基并用冷PBS洗2次,吸水纸吸干,置于冰上。每孔加80 μ L蛋白裂解液并在冰上进行裂解30 min,用细胞刮将细胞碎片和裂解液刮至一侧,并转移到1.5 mL EP管中,在1.2 $\times$ 10⁴ r/min、4 $^{\circ}$ C离心10 min。取其中2.5 μ L上清液用于BCA法测定蛋白浓度,其余转移至1.5 mL EP管中并在-80 $^{\circ}$ C保存。50 μ g蛋白经10%SDS聚丙烯酰胺电泳分离后,转至PVDF膜上,并用脱脂奶粉进行封闭,加入相应的一抗,4 $^{\circ}$ C过夜。PBST洗膜,加入荧光二抗,室温反应2 h,用红外荧光成像系统显色。用Image J图像软件分析蛋白条带的灰度值。

1.8 统计学处理

采用SPSS 12.0软件进行统计学处理,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,进行单因素方差分析和Newman-keuls检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SGT对PC12细胞增殖的影响

处理24、48和72 h后的SGT低、中、高剂量组的细胞存活率均显著高于对照组,且随剂量增大,细胞存活率也增大($P<0.01$),但SGT各剂量组72 h的细胞存活率低于48 h,差异有统计学意义($P<0.01$ 或0.05)。详见表1。

2.2 CCK8检测SGT对PC12细胞的保护

100 μ mol/L H₂O₂可导致细胞存活率降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。SGT+H₂O₂低、中、高剂量组的细胞存活率明显高于H₂O₂损伤模型组,差异有统计学意义($P<0.01$)。详见表2。

2.3 PC12细胞培养液中LDH、MDA和SOD含量测定

表1 不同时间下SGT对PC12细胞存活率的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	24 h	48 h	72 h
对照组	100.00±0.01	100.00±0.02	100.00±0.01
SGT低剂量组	107.70±3.14 ^a	129.17±3.30 ^{ab}	115.56±4.88 ^{ac}
SGT中剂量组	126.80±2.76 ^a	145.53±5.06 ^{ab}	131.50±2.07 ^a
SGT高剂量组	142.07±2.20 ^a	172.77±3.35 ^{ab}	149.77±2.35 ^{ac}

同时段, 与对照组比较: ^a $P<0.01$; 同组, 与24 h比较: ^b $P<0.01$, ^c $P<0.05$ 。

表2 SGT对H₂O₂诱导损伤后的PC12细胞存活率的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	细胞存活率
对照组	100.00±0.00
H ₂ O ₂ 损伤模型组	57.27±2.61 ^a
SGT+H ₂ O ₂ 低剂量组	63.60±1.61 ^{ab}
SGT+H ₂ O ₂ 中剂量组	74.97±1.63 ^{ab}
SGT+H ₂ O ₂ 高剂量组	82.83±2.32 ^{ab}

与对照组比较: ^a $P<0.01$; 与H₂O₂损伤模型组比较: ^b $P<0.01$ 。

表3 SGT对H₂O₂诱导PC12损伤后细胞培养液中LDH、MDA和SOD含量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	LDH/(U/L)	MDA/(μ mol/L)	SOD/(U/L)
对照组	212.54±54.32	0.21±0.03	48.73±0.25
H ₂ O ₂ 损伤模型组	1 286.44±89.70 ^a	0.81±0.02 ^a	23.14±0.45 ^a
SGT+H ₂ O ₂ 低剂量组	1 196.49±58.64 ^{ab}	0.77±0.03 ^{ab}	25.71±0.62 ^{ab}
SGT+H ₂ O ₂ 中剂量组	792.47±62.42 ^{ab}	0.45±0.04 ^{ab}	40.84±0.33 ^{ab}
SGT+H ₂ O ₂ 高剂量组	689.22±46.52 ^{ab}	0.37±0.05 ^{ab}	46.55±0.23 ^{ab}

与对照组比较: ^a $P<0.01$; 与H₂O₂损伤模型组比较: ^b $P<0.01$ 。

2.4 PC12细胞内MDA和SOD含量测定

与对照组比较, H₂O₂损伤模型组的PC12细胞内MDA含量增大, 而SOD含量则减少, 差异有统计学意义($P<0.01$)。与H₂O₂损伤模型组比较, SGT各剂量组均可减少PC12细胞内MDA含量的降低, 同时使SOD活力升高($P<0.01$), 且随着SGT质量浓度的升高, MDA酶活性降低更明显, 而SOD酶活性则升高更显著, 差异均有统计学意义($P<0.01$)。详见表4。

表4 SGT对H₂O₂诱导PC12细胞内MDA和SOD含量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	MDA/(μ mol/g Pro)	SOD/(U/mg Pro)
对照组	31.24±4.04	224.31±9.62
H ₂ O ₂ 损伤模型组	165.72±3.24 ^a	104.21±5.53 ^a
SGT+H ₂ O ₂ 低剂量组	142.37±5.63 ^{ab}	121.31±7.14 ^{ab}
SGT+H ₂ O ₂ 中剂量组	83.24±4.12 ^{ab}	158.42±5.63 ^{ab}
SGT+H ₂ O ₂ 高剂量组	68.77±5.76 ^{ab}	186.45±6.82 ^{ab}

与对照组比较: ^a $P<0.01$; 与H₂O₂损伤模型组比较: ^b $P<0.01$ 。

与对照组相比, H₂O₂损伤模型组的细胞上清液中LDH、MDA含量增加, SOD的活力降低, 差异均有统计学意义($P<0.01$)。与H₂O₂损伤模型组比较, SGT低、中、高剂量组可降低损伤后的PC12细胞培养液中LDH和MDA含量的增高($P<0.01$), 同时能有效改善PC12细胞培养液中SOD的活力水平($P<0.01$), 且随着SGT质量浓度的升高, LDH、MDA酶活性降低更明显, 而SOD酶活性则升高更显著, 差异均有统计学意义($P<0.01$)。详见表3。

2.5 SGT对PC12细胞的Nrf-2核蛋白表达水平的影响

与对照组比较, SGT高剂量组Nrf-2蛋白水平明显增加($P<0.01$), H₂O₂损伤模型组中的Nrf-2蛋白水平则显著下降($P<0.01$)。而与H₂O₂损伤模型组相比, SGT+H₂O₂高剂量组可使H₂O₂损伤诱导的PC12细胞的Nrf-2蛋白在细胞核中的表达增加($P<0.01$)。SGT高剂量组的Nrf-2蛋白水平亦明显高于SGT+H₂O₂高剂量组, 差异有统计学意义($P<0.01$)。Nrf-2蛋白在各组中的表达情况详见表5和图1。

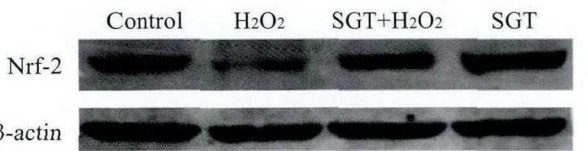
3 讨论

研究表明, 抗氧化能有效保护脑内神经细胞^[9]。H₂O₂在细胞损伤过程中, 会把胞内的LDH释放到胞外, 而在活的细胞中却无法释放, 因此通过检测胞外LDH的量, 可反映细胞的损伤程度。SOD在人体抗氧化系统中起到主要的作用, 尤其是在清除氧自由基这方面。MDA作为脂质过氧化程度的反映, 可

表5 SGT对PC12细胞的Nrf-2核转运的相对灰度值的影响 ($\bar{x}\pm s$, n=6)

组别	相对灰度值
对照组	1.084±0.056
H ₂ O ₂ 损伤模型组	0.667±0.041 ^a
SGT+H ₂ O ₂ 高剂量组	1.184±0.067 ^{bc}
SGT高剂量组	2.251±0.116 ^{acd}

与对照组比较: ^aP<0.01, ^bP<0.05; 与H₂O₂损伤模型组比较: ^cP<0.01; 与SGT+H₂O₂高剂量组比较: ^dP<0.01。



Control为对照组; H₂O₂为H₂O₂损伤模型组; SGT+H₂O₂为SGT+H₂O₂高剂量组; SGT为SGT高剂量组。

图1 SGT对PC12细胞Nrf-2核转运的影响

以反映清除氧自由基的能力^[10]。SGT作为一剂古方,已有明确的药理活性,本实验利用其抗氧化性,提高了细胞内酶的活性,能有效地清除自由基。本文采用H₂O₂诱导PC12细胞损伤,建立氧化应激损伤细胞模型,通过CCK8法、LDH、MDA和SOD等抗氧化酶的检测以及蛋白免疫印迹法,发现SGT能够提高经H₂O₂诱导损伤后PC12细胞的活性,增强上清液中LDH、MDA含量及胞内MDA的量,降低细胞上清液及细胞内的SOD活性。此结果表明SGT可明显增强各酶类的活力,从而起到抗氧化的作用。

在过去的研究中,通过启动Nrf-2通路治疗阿尔茨海默症和帕金森症等疾病已取得了显著成果^[11]。Nrf-2基因被认为是抗氧化防御系统的主控环节,可减少自由基的产生从而发挥抗氧化作用。正常状态下,Nrf-2活性主要由细胞质接头蛋白Keap1负性调节,在氧化应激状态下,Keap1构型发生改变,Nrf-2

与Keap1分离,Nrf-2向核中转运和活化,从而启动下游多种蛋白的表达和二相解毒酶的合成,如SOD、MDA等,减轻氧化应激引起的损伤。H₂O₂在诱导PC12细胞氧化应激模型中,SGT各剂量组核内Nrf2蛋白表达明显升高,表明SGT能有效促进Nrf-2的核转位,进一步说明SGT可能通过调节Nrf-2蛋白的表达,产生抗氧化应激损伤的作用。

参考文献:

[1] 薛小燕,郭小华,李敏,等.神经退行性疾病发病机制研究进展[J].中国老年学杂志,2015,35(11):3149-3152.

[2] 黄进,杨国宇,李宏基,等.抗氧化剂作用机制研究进展[J].自然杂志,2004,26(2):74-78.

[3] 郑继生,钱景莉.芍药甘草汤及其临床运用[J].河南中医,2012,32(8):966-968.

[4] 汪萌,闫永红,邹慧琴,等.芍药甘草汤功能与药效组分对应性研究[J].国际药学研究杂志,2015,42(1):101-106.

[5] 关炜,王洋,李韶妮,等.芍药甘草汤对支气管哮喘作用机理的研究[J].中国中医急症,2011,20(10):1625-1626.

[6] 张保国,刘庆芳.芍药甘草汤方剂学实验研究[J].中成药,2012,34(7):1354-1358.

[7] 蒋娜,许岩.芍药甘草汤临床应用综述[J].中国中医药现代远程教育,2012,10(3):156-157.

[8] 黎巍威,王学美.PC12细胞作为氧化应激细胞模型的研究进展[J].中国中西医结合杂志,2011,31(11):1575-1580.

[9] 张颖,柯尊记,杨坚,等.芍药甘草汤及其活性成分的脑保护作用机制研究概述[J].现代生物医学进展,2014,14(34):6773-6777.

[10] Wang S J, Zhao S J, Wang Y S, et al. Effects of estrogen intervention on the biomechanical characteristics of serum SOD, MDA, and middle cerebral artery in aged female rats [J]. Clin Exp Obstet Gynecol, 2015, 42(3): 295-299.

[11] 赵春阳,王晓良,彭英.Nrf2在神经退行性疾病中的作用及激活剂的研究进展[J].药学学报,2015,50(4):375-384.

(上接第580页)

Combination of stromal-derived factor-1alpha and vascular endothelial growth factor gene-modified endothelial progenitor cells is more effective for ischemic neovascularization[J]. J Vasc Surg, 2009, 50(3): 608-616.

[24] Hunsberger J G, Fessler E B, Wang Z, et al. Post-insult valproic acid-regulated microRNAs: potential targets for cerebral ischemia[J]. Am J Transl Res, 2012, 4(3): 316-332.

[25] Kalka C, Masuda H, Takahashi T, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic

neovascularization[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(7): 3422-3427.

[26] Seto S W, Chang D, Jenkins A, et al. Angiogenesis in ischemic stroke and angiogenic effects of Chinese herbal medicine[J]. J Clin Med, 2016, 5(6): 56.

[27] Arenillas J F, Sobrino T, Castillo J, et al. The role of angiogenesis in damage and recovery from ischemic stroke[J]. Curr Treat Options Cardiovasc Med, 2007, 9(3): 205-212.