

柴胡加龙骨牡蛎汤对H₂O₂损伤PC12细胞保护作用的研究

许 训¹, 刘 薇², 刘 昆², 袁康瑞², 叶晓梅², 刘小柳³, 吴都督², 陈 稚^{2*} (广东医科大学 1. 动物中心; 2. 药学院, 广东东莞 523808; 3. 广东省深圳市罗湖区人民医院医学检验科, 广东深圳 518000)

摘要: **目的** 观察柴胡加龙骨牡蛎汤(CLM)对H₂O₂氧化损伤PC12细胞的保护作用。**方法** 采用CCK8法检测柴胡加龙骨牡蛎汤对PC12细胞增殖的影响,用200 μmol/L H₂O₂处理小鼠PC12细胞,建立氧化应激损伤模型;分别用低(1.0 g/mL)、中(10.0 g/mL)、高(50.0 g/mL)剂量CLM处理PC12细胞,测定细胞培养液中的乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)的含量及超氧化物歧化酶(SOD)的活性。**结果** 与对照组相比,CLM低、中、高剂量组对PC12细胞的增殖率均明显增加($P<0.01$),且以CLM高剂量组最为显著($P<0.01$)。与对照组比较,H₂O₂模型损伤组PC12细胞的存活率、SOD酶活性与核因子E2相关因子2(Nrf-2)蛋白水平明显降低($P<0.01$),细胞LDH和MDA含量明显增高($P<0.01$)。与H₂O₂模型损伤组比较,CLM低、中、高剂量组细胞存活率、SOD酶活性与Nrf-2蛋白水平均明显提高($P<0.01$),LDH和MDA含量明显降低($P<0.01$),且以CLM高剂量组最为显著($P<0.01$)。**结论** CLM能促进PC12细胞的增殖和对H₂O₂诱导的细胞损伤有保护作用,其作用机制可能与增强了核内Nrf-2蛋白水平的表达有关。

关键词: 柴胡加龙骨牡蛎汤; PC12细胞; 细胞增殖; 氧化损伤

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610(2021)04-0385-04

Study on the protective effect of Chaihu and Longgu Muli Decoction for H₂O₂-induced PC12 cell injury

XU Xun¹, LIU Wei², LIU Kun², YUAN Kang-ru², YE Xiao-mei², LIU Xiao-liu³, WU Du-du², CHEN Zhi^{2*} (1. Animal Center; 2. Institute of Pharmacy, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China; 3. Department of Medical Laboratory, Luohu People's Hospital, Shenzhen 518000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the protective effect of Chaihu and Longgu Muli Decoction (CLM) for H₂O₂-induced PC12 cell injury. **Methods** The CCK8 method was used to detect the impact of CLM on the proliferation of PC12 cells. PC12 cells of mice were treated with 200 μmol/L H₂O₂ to establish oxidative stress injury model. PC12 cells were treated with low-dose (1.0 g/mL), medium-dose (10.0 g/mL) and high-dose CLM (50.0 g/mL) respectively to determine the content of lactate dehydrogenase (LDH), malondialdehyde (MDA) and the activity of superoxide dismutase (SOD) in cell culture medium. **Results** Compared with the Control Group, the proliferation rate of PC12 cells in the Low-Dose, Medium-Dose, and High-Dose CLM Group was significantly increased ($P<0.01$), and the High-Dose CLM Group showed the most significant increase ($P<0.01$); Compared with the Control Group, the survival rate, SOD enzyme activity and Nrf-2 protein level of PC12 cells in the H₂O₂ Injury Group were significantly reduced ($P<0.01$), and the LDH and MDA contents in the cells in the H₂O₂ Injury Group were significantly increased ($P<0.01$). Compared with the H₂O₂ Injury Group, the cell survival rate, SOD enzyme activity and Nrf-2 protein level in the Low-Dose, Medium-Dose and High-Dose CLM Group were significantly increased ($P<0.01$), and the LDH content and MDA content in the Low-Dose, Medium-Dose and High-Dose CLM Group were significantly reduced ($P<0.01$), and the High-Dose CLM Group showed the most significant reduction ($P<0.01$). **Conclusion** CLM can promote the proliferation of PC12 cells and protect against H₂O₂-induced cell injury, and its mechanism may be related to the enhancement of Nrf-2 protein expression.

Key words: Chaihu and Longgu Muli Decoction; PC12 cells; cell proliferation; oxidative injury

基金项目: 广东省自然科学基金(No.2017A030310666, No.2018A030307003), 广东省中医药局科研项目(No.20212100), 广东医科大学南海海洋生物医药资源研发公共服务平台开放式基金项目(No.2HC18013, No.2HC18016)

收稿日期: 2021-02-09; **修订日期:** 2021-04-30

作者简介: 许 训(1986-), 男, 在读硕士研究生; 刘 薇(1996-), 女, 在读硕士研究生, 共同第一作者

通信作者: 陈 稚(1979-), 女, 副教授, 博士, 硕士生导师, E-mail: cz122@126.com

氧化应激和抗氧化防御的失衡与阿尔兹海默症(AD)等多种疾病密切相关^[1-3]。近年来,中药用于AD的治疗受到国内外学者的重视^[4-9]。柴胡加龙骨牡蛎汤(CLM)源于仲师之《伤寒论》,其方药由小柴胡汤去甘草加桂枝、茯苓、龙骨、牡蛎、铅丹、大黄而成,具有化饮理肝、阴阳调和之功效^[10]。现代药理学研究表明,CLM具有抗氧化、衰老、抗炎等作用^[11],在治疗抑郁、癫痫、痴呆等疾病方面也有较好的疗效^[12-13],如肖慧琼等^[14]发现CLM能降低颞叶癫痫患者血清中的MDA含量,增加SOD活性,抑制脂质过氧化反应。因此,本研究探讨CLM对氧化应激导致的神经元损伤的保护作用及其机制。

1 材料和方法

1.1 材料与制作

柴胡、龙骨、生姜、人参、去皮桂枝、茯苓、洗半夏、黄芩、铅丹、大黄、牡蛎、擘大枣(广东时珍制药有限公司),按原方比例即柴胡62 g,龙骨、生姜、人参、去皮桂枝、茯苓各23 g,洗半夏20 g,黄芩16 g,铅丹23 g,大黄31 g,熬牡蛎23 g,擘大枣6枚称取定量的药材,再量取5倍量的75%乙醇,将药材浸泡120 min之后,加热回流,收集滤液;再重复一次上述过程,收集滤液。将两次的滤液收集于同一烧杯中,过滤、浓缩,制成浓度为10 g/mL CLM母液。小鼠肾上腺嗜铬细胞瘤PC12细胞株(上海细胞库);二甲基亚砜(索莱宝);DMEM高糖培养基,0.25%胰蛋白酶(含EDTA),胎牛血清(GIBCO,美国);H₂O₂溶液(AR)(Sigma);细胞裂解液(RIPA)(碧云天);超氧化物歧化酶(SOD)活性测定试剂盒(南京建成生物工程公司),乳酸脱氢酶(LDH)测定试剂盒;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 方法

1.2.1 PC12细胞的培养 先在超净台配制含有20%胎牛血清、100 kU/L青霉素和100 g/mL链霉素的DMEM(高糖)培养基,用胰蛋白酶消化传代在细胞培养箱中培养一定时间后的PC12细胞,选取对数生长期的细胞进行实验。

1.2.2 CLM对PC12细胞增殖的影响 采用CCK8法检测CLM对PC12细胞生存率的影响,用胰蛋白酶消化处于对数生长期的PC12细胞,将其进行离心,用细胞计数板计数,按5 000个细胞/孔加入96孔培养板,每孔100 μ L,在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的条件下培养24 h。将

CLM溶于DMEM中,并通过梯度稀释的方法,配制0.1、1.0、5.0 g/mL的低、中、高剂量组,每组浓度分别设置3个平行孔,放置上述条件的培养箱中培养。空白对照组用DMEM做相同处理。培养24、48及72 h后,每孔加入10 μ L CCK8试剂,摇匀,在37 $^{\circ}$ C条件下避光孵育2 h,采用酶标仪在450 nm处测OD值。取3孔的均数,细胞活力(%)=(试验孔均值/对照孔均值) $\times$ 100%。

1.2.3 CCK8检测CLM对PC12细胞的保护 将PC12细胞以5 000个/孔的密度将PC12细胞种于96孔板中,每孔100 μ L。置于孵箱中培养24 h。实验分为5组:空白对照组、H₂O₂损伤模型组(200 μ mol/L)、CLM低剂量组:CLM(0.1 g/mL)+H₂O₂(200 μ mol/L)、CLM中剂量组:CLM(1.0 g/mL)+H₂O₂(200 μ mol/L)及CLM高剂量组:CLM(5.0 g/mL)+H₂O₂(200 μ mol/L)。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%。

1.2.4 PC12细胞培养液中LDH、MDA与SOD含量测定 PC12细胞在H₂O₂的损伤过程中,细胞内的LDH释放到胞外,由于在活细胞中无法释放,因此通过检测细胞外LDH的量,因此可以间接反映细胞的损伤程度。收集1.2.3处理后的培养液,严格按照LDH、MDA与SOD测定试剂盒说明书进行处理,测定细胞培养液中LDH、MDA与SOD各酶的OD值并计算相应活性。

1.2.5 CLM对PC12细胞的核因子E2相关因子2(Nrf-2)表达水平的影响 将PC12细胞接种于6孔板,接种密度为3 $\times$ 10⁶个/mL,共设置5组,依次为对照组、损伤模型组、CLM低、中、高剂量组。孵箱孵育24 h后弃置培养基,PBS洗2次后用吸水纸吸干,放置于冰上。每孔加80 μ L蛋白裂解液,并置于冰上裂解,时间为30 min。将细胞碎片与裂解液用细胞刮刮至一侧,并转至1.5 mL EP管(1.2 $\times$ 10⁴ r/min、4 $^{\circ}$ C)离心10 min。取其中2.5 μ L上清液用BCA法测定其蛋白浓度,剩下液体转移至1.5 mL EP管中-80 $^{\circ}$ C下保存备用。取50 μ g蛋白,使用10%SDS聚丙烯酰胺电泳进行分离后,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。

1.3 统计学处理

用SPSS 20.0软件包分析数据,各项实验每组均

重复8次,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CLM对PC12细胞增殖的影响

与对照组比较,CLM低、中、高剂量组对PC12细胞的增殖率均明显增加($P < 0.01$),且以CLM高剂量组最为显著($P < 0.01$),CLM低、中、高剂量组间两两比较差异均有统计学意义($P < 0.01$),见表1。

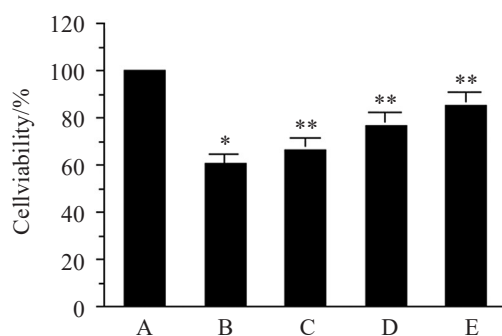
表1 CLM对PC12细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	12 h	24 h	48 h
对照组	100.00±0.01	100.00±0.02	100.00±0.02
CLM低剂量组	113.19±0.75 ^a	118.60±1.02 ^a	117.40±0.94 ^a
CLM中剂量组	119.04±1.12 ^{ab}	127.38±1.40 ^{ab}	125.75±1.53 ^{ab}
CLM高剂量组	128.62±1.39 ^{abc}	135.72±2.05 ^{abc}	135.11±2.37 ^{abc}

与对照组比较:^a $P < 0.01$;与CLM低剂量组比较:^b $P < 0.01$;与CLM中剂量组比较:^c $P < 0.01$

2.2 CLM对PC12细胞存活率的影响

与对照组比较,H₂O₂损伤组PC12细胞的存活率明显降低($P < 0.01$);与H₂O₂模型损伤组比较,CLM低、中、高剂量组细胞存活率均明显提高($P < 0.01$),且以CLM高剂量组最为显著($P < 0.01$),见图1。



A: 对照组; B: H₂O₂损伤模型组; C: CLM低剂量组; D: CLM中剂量组; E: CLM高剂量组。与对照组比较: * $P < 0.01$;与H₂O₂损伤模型组比较: ** $P < 0.01$

图1 CLM对H₂O₂诱导损伤后的PC12细胞存活率的影响

2.3 PC12细胞培养液中LDH、MDA和SOD含量测定

与对照组比较,H₂O₂损伤模型组细胞中的LDH和MDA的含量增大,SOD酶活性明显下降($P < 0.01$)。经CLM干预后,与H₂O₂损伤模型组相比,不同浓度的CLM组均能有效降低细胞培养液中的LDH含量和MDA含量($P < 0.01$),以CLM高剂量组更为显著($P < 0.01$),见表2。

2.4 CLM对PC12细胞形态的影响

由图2所示,与对照组相比,H₂O₂损伤模型组的

PC12细胞胞质不饱满、边缘不清晰、透光性差且生长缓慢,而CLM给药组随着浓度增加,细胞形态逐渐恢复正常,且浓度越高,细胞状态越好。

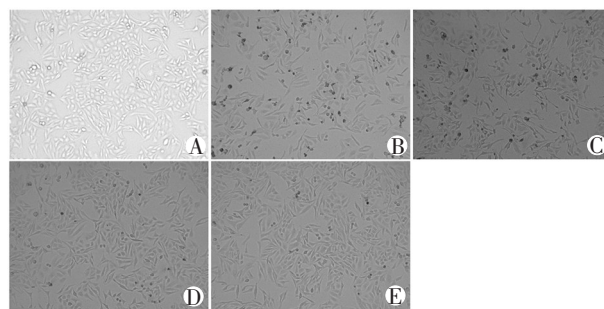
2.5 CLM对PC12细胞的Nrf-2核蛋白表达水平的影响

与对照组相比,H₂O₂损伤模型组中的Nrf-2蛋白水平明显下降,用不同剂量CLM处理后,Nrf-2蛋白水平有所提高,且以CLM高剂量组更明显($P < 0.01$)。见表3。

表2 CLM对H₂O₂诱导PC12损伤后细胞培养液中LDH、MDA和SOD含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	LDH/(U/L)	MDA/(μmol/L)	SOD/(U/L)
对照组	342.54±28.23	0.21±0.02	56.64±0.25
H ₂ O ₂ 损伤模型组	994.43±49.07 ^a	0.76±0.02 ^a	28.14±0.18 ^a
CLM低剂量组	742.29±36.60 ^{ab}	0.63±0.04 ^{ab}	29.72±0.21 ^{ab}
CLM中剂量组	661.08±35.24 ^{abc}	0.41±0.03 ^{abc}	42.32±0.22 ^{abc}
CLM高剂量组	518.31±26.15 ^{abcd}	0.32±0.05 ^{abcd}	50.47±0.30 ^{abcd}

与对照组比较:^a $P < 0.01$;与H₂O₂损伤模型组比较:^b $P < 0.01$;与CLM低剂量组比较:^c $P < 0.01$;与CLM中剂量组比较:^d $P < 0.01$



A: 对照组; B: H₂O₂损伤模型组; C: CLM低剂量组; D: CLM中剂量组; E: CLM高剂量组

图2 CLM对H₂O₂损伤的PC12细胞形态的影响

表3 CLM对PC12细胞的Nrf-2核转运的灰度值的影响

($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	相对灰度值
对照组	1.00±0.08
H ₂ O ₂ 损伤模型组	0.45±0.03 ^a
CLM+H ₂ O ₂ 低剂量组	0.62±0.05 ^{ab}
CLM+H ₂ O ₂ 高剂量组	0.71±0.06 ^{abc}

与对照组比较:^a $P < 0.01$;与H₂O₂损伤模型组比较:^b $P < 0.01$;与CLM低剂量组比较:^c $P < 0.01$

3 讨论

根据现代临床研究进展,CLM对神经系统、心血管系统、消化系统、妇科病等均有较好的治疗作用。CLM治疗各种类型的抑郁症如肿瘤后抑郁、帕金森伴发抑郁等疗效显著,对室性早搏和心绞痛等心血管

疾病也有较好的治疗效果^[10]。CLM的抗氧化作用也是如今研究的热点。本研究在观察CLM对PC12细胞增殖的影响中,结果显示,与对照组相比,CLM低、中、高剂量组对PC12细胞的增殖率均明显增加($P < 0.01$),且以CLM高剂量组最为显著($P < 0.01$),表明不同浓度的CLM对PC12细胞的增殖均有促进作用,且随着浓度的增加,CLM对PC12细胞增殖的促进作用增强。在观察细胞存活率中,经CLM干预后,与 H_2O_2 损伤模型组相比,不同浓度的CLM组均能有效降低细胞培养液中的LDH含量和MDA含量($P < 0.01$),以CLM高剂量组更为显著($P < 0.01$),也表明CLM能有效抑制 H_2O_2 损伤导致的细胞存活率下降,提高PC12细胞的存活率,对由于过氧化损伤的神经元具有保护作用。

SOD作为系统中至关重要的抗氧化酶,对于氧化平衡系统有着举足轻重的作用。因此,SOD可以作为细胞内抗氧化能力的指标^[16]。MDA能反映脂质过氧化的程度及清除氧自由基的能力^[17]。经 H_2O_2 损伤的PC12细胞,出现胞膜脂质过氧化反应、胞内MDA累积、自由基水平升高,作为自由基清除剂的SOD消耗增加。本研究结果显示不同浓度的CLM处理PC12细胞后,MDA含量下降、SOD活性增加,表明CLM可以在一定程度上对抗 H_2O_2 导致的过氧化损伤。

Nrf-2是细胞中抗氧化转录因子,在机体内起到重要的抗氧化作用。它可对抗神经炎症,抑制氧化应激反应发生,从而起到缓解神经退行性疾病的作用。有研究表明,转录因子Nrf-2在细胞质中受到Kelch样ECH相关蛋白1(Keap1)的严格调控,在无应激的情况下,Keap1有效地介导Nrf-2的多泛素化,导致其被泛素-蛋白酶体降解系统(UPS)降解。Nrf-2是细胞抗炎和抗氧化防御基因的主要转录调节因子,Nrf-2信号的选择性激活,可有效抑制神经胶质细胞中炎症因子的释放^[18]。在 H_2O_2 诱导的PC12细胞氧化应激模型中,发现CLM各浓度组核内Nrf-2蛋白表达明显升高,表明CLM能有效促进Nrf-2的核转位,CLM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。

综上所述,CLM对由 H_2O_2 诱导损伤的PC12细胞具有保护作用,其机制可能与CLM降低LDH、MDA含量,增强SOD酶活性以及调节核内Nrf-2蛋白水平的表达有关。本实验的研究可为CLM作为抗氧化剂抑制PC12细胞的过氧化损伤,进行神经退行性疾病的治疗提供实验基础。

参考文献:

- [1] MAXWELLS R, SIMON R J. Prospects for the use of antioxidant therapies[J]. *Drugs*, 1995, 49(3):345-361.
- [2] 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.
- [3] 孙磊, 杨莹, 窦彩艳. 阿尔兹海默病治疗的研究进展[J]. *医学信息(中旬刊)*, 2010, 5(7):1969-1970.
- [4] 高德义, 黄贾生, 何宏文. 当归芍药散治疗老年性痴呆36例临床研究[J]. *中国全科医学*, 2004, 7(11):782-783.
- [5] 冀宏. 当归芍药散治疗血管性痴呆的临床研究[J]. *山西中医*, 2000, 16(2):10-11.
- [6] 张敏, 张卫珍. 六味地黄汤加味治疗血管性痴呆36例[J]. *陕西中医*, 2001, 22(2):85-85.
- [7] 董晓红, 贾佩华, 张正一, 等. 补阳还五汤对AD模型小鼠血脑屏障及MMP-2、MMP-9的影响[J]. *中医药学报*, 2020, 48(12):12-16.
- [8] 万茜淋, 吴新民, 刘淑莹, 等. 人参皂苷参与调控神经系统功能的研究进展[J]. *中药药理与临床*, 2020, 36(6):230-235.
- [9] 黄雄峰, 汪建民. 葛根素的神经保护作用机制研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(4):224-230.
- [10] 范东东. 柴胡加龙骨牡蛎汤证治规律研究[D]. 北京中医药大学, 2018.
- [11] 陈琪, 杨德爽, 李诗梦, 等. 柴胡加龙骨牡蛎汤研究进展[J]. *医学综述*, 2016, 22(17):3441-3444.
- [12] 张有志, 聂惠民, 张德昌, 等. 柴胡加龙骨牡蛎汤等经方治疗抑郁症的动物行为学研究[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2001, 7(7):30-32.
- [13] 刘亚东, 瞿融, 李秀敏, 等. 柴胡加龙骨牡蛎汤抗癫痫作用及对癫痫大鼠脑组织内MDA、SOD、ATP酶的影响[J]. *中药药理与临床*, 2008, 24(5):5-7.
- [14] 肖慧琼, 杨萍, 彭红莉. 柴胡加龙骨牡蛎汤对颞叶癫痫患者SOD、MDA的影响[J]. *中国医师杂志*, 2018, 20(3):357-359, 363.
- [15] SHAFER T J, ATCHISON W D. Transmitter, ion channel and receptor properties of pheochromocytoma (PC12) cells: a model for neurotoxicological studies[J]. *Neurotoxicology*, 1991, 12(3):473-492.
- [16] 杜秀敏, 殷文璇, 张慧, 等. 超氧化物歧化酶(SOD)研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2003, 23(1):48-50, 74.
- [17] 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 Clinical*, 2015, 42(3):295-299.
- [18] BUENDIA I, MICHALSKA P, NAVARRO E, et al. Nrf2-ARE pathway: An emerging target against oxidative stress and neuroinflammation in neurodegenerative diseases[J]. *Pharmacol Ther*, 2016, 157:84-104.