

没食子酸丙酯对 H_2O_2 诱导 SH-SY5Y 细胞氧化损伤的影响及其作用机制

刘 斌(淮阴卫生高等职业技术学校, 江苏 淮安 223300)

摘要: **目的** 探讨没食子酸丙酯(propyl gallate, PG, 赤芍 801)对 H_2O_2 诱导人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)氧化损伤的影响及其作用机制。**方法** 将 SH-SY5Y 细胞均分为对照组、 H_2O_2 模型组、PG1 组、PG2 组和 PG3 组, 对照组常规加入 DMEM/F12 培养液培养; H_2O_2 模型组加入 H_2O_2 $200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; PG1 组加入 PG $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}+\text{H}_2\text{O}_2$ $200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; PG2 组加入 PG $40\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}+\text{H}_2\text{O}_2$ $200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; PG3 组加入 PG $80\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}+\text{H}_2\text{O}_2$ $200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。比较 5 组 SH-SY5Y 细胞的增殖活性, 细胞培养物上清中 8-OHdG, 细胞内 ROS、LDH 释放量, Hoechst 33258 染色结果、细胞周期变化情况及 Caspase-3 酶活性。**结果** H_2O_2 模型组细胞存活率显著低于对照组, 细胞培养物上清中 8-OHdG 水平显著高于对照组, ROS 水平显著高于对照组, LDH 释放量显著高于对照组, 具有非常显著性差异($P<0.01$); PG1 组、PG2 组和 PG3 组细胞存活率均显著高于 H_2O_2 模型组, 细胞培养物上清中 8-OHdG 水平均显著低于 H_2O_2 模型组, ROS 水平均显著低于 H_2O_2 模型组, LDH 释放量均显著低于 H_2O_2 模型组, 差异具有统计学意义($P<0.05$); PG 可显著改善 SH-SY5Y 细胞凋亡情况, 且具有剂量依赖关系; H_2O_2 模型组 G0/G1 期百分率显著高于对照组, S 期、G2/M 期和 PI 均显著低于对照组, 差异具有统计学意义($P<0.05$); PG2 组、PG3 组 G0/G1 期百分率显著低于 H_2O_2 模型组, S 期、G2/M 期和 PI 均显著高于 H_2O_2 模型组, 差异具有统计学意义($P<0.05$); H_2O_2 模型组 Caspase-3 酶活性显著高于对照组, 差异有统计学意义($P<0.05$); PG2 组和 PG3 组 Caspase-3 酶活性显著低于 H_2O_2 模型组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** PG 在一定剂量范围内对 H_2O_2 诱导的 SH-SY5Y 神经细胞损伤具有明显的保护作用, 其保护效应可能与清除 ROS, 减轻 DNA 氧化损伤, 抑制线粒体通路介导的细胞凋亡有关。

关键词: 没食子酸丙酯; H_2O_2 ; SH-SY5Y 细胞; 氧化损伤; 作用机制

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)05-0582-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.05.015

Effect of Propyl Gallate from Radix Paeoniae Rubra on Oxidative Damage in SH-SY5Y Cells Induced by Hydrogen Peroxide and Mechanism Evaluation

LIU Bin(Huaiyin Health Vocational-technical Higher School, Huai'an 223300 Jiangsu, China)

Abstract: **Objective** To explore the effects of propyl gallate(PG) from Radix Paeoniae Rubra on oxidative damage in SH-SY5Y cells induced by hydrogen peroxide(H_2O_2). **Methods** SH-SY5Y cells were divided into control group, H_2O_2 model group, PG1 group, PG2 group, and PG3 group. The control group were cultured with DMEM/F12 nutrient solution, H_2O_2 model group were cultured with DMEM/F12 nutrient solution and H_2O_2 $200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Based on the culture solution for H_2O_2 model group, PG1 group, PG2 group, and PG3 group were co-culture with PG 20, 40 and $80\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ respectively. The proliferation activity of SH-SY5Y cells, the release amount of 8-OHdG, ROS, LDH in the cell culture supernatant, the dyeing results of Hoechst 33258, the changes of cell cycle, and the enzyme activity of Caspase-3 were compared among the 5 groups. **Results** In H_2O_2 model group, the survival rate of SH-SY5Y cells was lower, the levels of 8-OHdG and ROS and the release amount of LDH in the cell culture

收稿日期: 2014-04-18

作者简介: 刘斌, 男, 副教授, 研究方向: 中药药理以及教育管理。Email: hywxlb@163.com。

supernatant were higher than the control group ($P < 0.01$). PG groups had higher survival rate of SH-SY5Y cells, and lower 8-OHdG, ROS and LDH levels than the H_2O_2 model group ($P < 0.05$). PG could improve the cell apoptosis of SH-SY5Y dose-dependently. The percentage of G0/G1 stage of the H_2O_2 model group was higher, while the percentages of S stage, G2/M stage and PI% were lower than the control group ($P < 0.05$). PG2 and PG3 groups had lower percentage of G0/G1 stage, and higher percentages of S stage and G2/M stage and PI than the H_2O_2 model group ($P < 0.05$). The activity of Caspase-3 of the H_2O_2 Model group was higher than the control group ($P < 0.05$), and then was decreased in PG2 group, PG3 group ($P < 0.05$ compared with H_2O_2 model group). **Conclusion** It is indicated that PG has neuroprotection against H_2O_2 -induced oxidative damage in certain dose range, and the protective mechanism is probably related with the elimination of ROS, the relief of DNA oxidative damage, and the inhibition of the apoptosis mediated by mitochondrial pathway.

Keywords: Propyl gallate (PG) from Radix Paeoniae Rubra; Hydrogen peroxide (H_2O_2); SH-SY5Y cells; Oxidative damage; Therapeutic mechanism

神经退行性疾病(neurodegenerative diseases, NDD)是指以特定脑部区域神经元退变为特征的慢性进行性神经系统疾病^[1]。目前, NDD 的发病机制尚无明确研究结果, 但大量研究指出氧化应激与 NDD 的发生有紧密联系^[2]。由天然产物中提取的具有抗氧化作用的化合物对防治该类疾病具有重要意义。没食子酸丙酯也叫赤芍 801 (propyl gallate, PG), 是从赤芍中分离提取的活性成分, 对脑血栓、冠心病、心绞痛及血栓性静脉炎等血栓性疾病具有防治作用^[3]。本研究通过建立氧化应激损伤模型, 对赤芍 801 的神经保护作用及其机制进行分析。

1 材料与方法

1.1 材料 人神经瘤母细胞(SH-SY5Y), 中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心; 赤芍 801(propyl gallate, PG, 含量 99.9 %), 上海源叶生物科技有限公司, 批号: 121093-200402。

1.2 分组 采用 CCK-8 法筛选 PG 无毒剂量, 单独作用于 SH-SY5Y, 从浓度 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ~ $1600 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内共设置 8 个浓度^[4]。结果显示, PG 单独作用于 SH-SY5Y 细胞, 在 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ~ $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内对 SH-SY5Y 细胞无毒性。因此, 设置 20, 40, 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 共 3 个剂量进行研究。将 SH-SY5Y 细胞均分为 5 组, 即对照组, H_2O_2 模型组, PG1 组、PG2 组和 PG3 组。

1.3 SH-SY5Y 培养 对照组常规加入 DMEM/F12 培养液(包括 10 %胎牛血清, $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 庆大霉素和 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 L-谷氨酰胺), 在 37°C 饱和湿度、5 % CO_2 保持饱和湿度培养, 2~3 d 传代 1 次^[5]; H_2O_2 模

型组在此基础上加入 H_2O_2 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 孵育 24 h; PG1 组加入 PG $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 预处理 1 h 后再加入 H_2O_2 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 继续孵育 24 h; PG2 组加入 PG $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 预处理 1 h 后再加入 H_2O_2 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 继续孵育 24 h; PG3 组加入 PG $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 预处理 1 h 后再加入 H_2O_2 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 继续孵育 24 h。

1.4 指标检测 记录 5 组 SH-SY5Y 细胞的增殖活性、细胞培养物上清中 8-羟基脱氧鸟苷(8-hydroxy deoxyguanosine, 8-OHdG)、细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)以及乳酸盐脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)释放量, 观察 5 组 SH-SY5Y 细胞 Hoechst 33258 染色结果, 并比较 5 组 SH-SY5Y 细胞细胞周期变化情况及 Caspase-3 酶活性。细胞的增殖活性采用 CCK-8 试剂检测^[6]; 8-OHdG 采用 ELISA 法检测; ROS 采用 ROS 敏感荧光探针 2', 7'-二氯二氢荧光素二乙酯(DCFH-DA)检测^[6]; 采用多功能酶标仪检测细胞毒性时释放的 LDH; 采用 Hoechst 33258 染色法观察 SH-SY5Y 细胞凋亡情况; 采用碘化丙啶染色流式检测 PG 对 H_2O_2 诱导 SH-SY5Y 细胞周期的影响^[7]; 利用 caspase-3 可以催化底物 Ac-DEVD-pNA 产生黄色的 p-nitroaniline(pNA)的特性, 通过测定吸光度来检测 caspase-3 的活性^[8]。

1.5 统计学处理方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示计量资料, 采用 t 检验。

2 结果

2.1 PG 对 H_2O_2 损伤 SH-SY5Y 细胞的增殖活性、细胞培养物上清中 8-OHdG、细胞内 ROS 以及 LDH 释放量的影响 H_2O_2 模型组细胞存活率显著低于对

照组($P<0.01$); PG1 组、PG2 组和 PG3 组细胞存活率均显著高于 H_2O_2 模型组, 差异具有统计学意义($P<0.05$); H_2O_2 模型组细胞培养物上清中 8-OHdG 水平显著高于对照组, 差异有显著性意义($P<0.01$); PG2 组和 PG3 组细胞培养物上清中 8-OHdG 水平均显著低于 H_2O_2 模型组, 差异具有统计学意义($P<0.05$); H_2O_2 模型组 ROS 水平显著高于对照组, 差异有显著性意义($P<0.01$); PG2 组和 PG3 组 ROS 水平均显著低于 H_2O_2 模型组, 差异具有统计学意义($P<0.05$); H_2O_2 模型组 LDH 释放量显著高于对照组, 具有非常显著性差异($P<0.01$); PG2 组和 PG3 组 LDH 释放量均显著低于 H_2O_2 模型组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

2.2 Hoechst 33258 染色分析 对照组细胞表现为弥

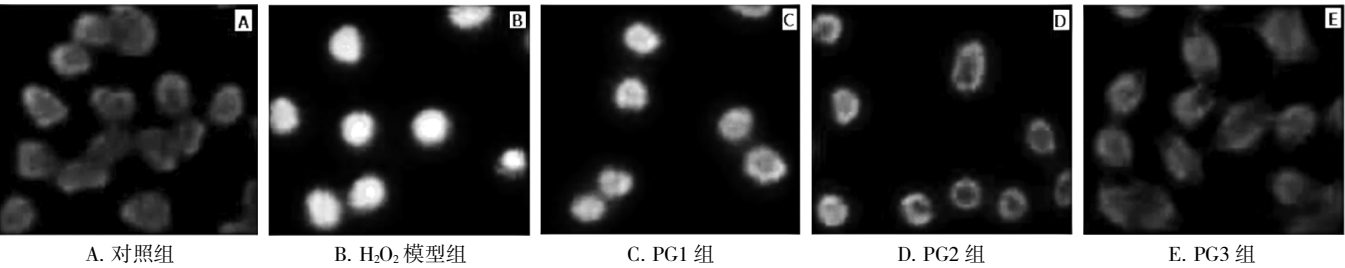


图 1 Hoechst 33258 染色结果
Figure 1 The dyeing results of Hoechst 33258

2.3 PG 对 H_2O_2 损伤的 SH-SY5Y 细胞周期的影响
 H_2O_2 模型组 G0/G1 期百分率显著高于对照组, S 期、G2/M 期和 PI 均显著低于对照组, 差异有统计学意义($P<0.05$); PG2 组和 PG3 组 G0/G1 期百分率显著低于 H_2O_2 模型组, S 期、G2/M 期和 PI 均显著高于 H_2O_2 模型组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 PG 对 H_2O_2 损伤的 SH-SY5Y 细胞周期的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	剂量 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	G0/G1 期	S 期	G2/M 期	PI/%
对照组	-	34.69 $\pm$ 1.01*	40.78 $\pm$ 1.40*	24.50 $\pm$ 0.49*	65.10 $\pm$ 2.19*
H_2O_2 模型组	-	48.42 $\pm$ 2.61	32.42 $\pm$ 2.11	19.18 $\pm$ 0.51	51.60 $\pm$ 5.11
PG1 组	20	45.10 $\pm$ 1.89	35.01 $\pm$ 1.61	19.90 $\pm$ 0.31	54.91 $\pm$ 3.88
PG2 组	40	43.21 $\pm$ 2.01*	35.09 $\pm$ 1.69*	21.79 $\pm$ 0.50*	56.92 $\pm$ 4.29*
PG3 组	80	40.79 $\pm$ 2.02*	35.79 $\pm$ 2.51*	23.51 $\pm$ 0.59*	59.31 $\pm$ 2.10*

注: 与 H_2O_2 模型组比较, * $P<0.05$ 。

2.4 PG 对 H_2O_2 诱导的 Caspase-3 酶活性的影响
 H_2O_2 模型组 Caspase-3 酶活性显著高于对照组, 差异有显著性意义($P<0.01$); PG2 组和 PG3 组 Caspase-3

表 1 PG 对 H_2O_2 损伤 SH-SY5Y 细胞的影响($\bar{x} \pm s$, $n=4$)
Table 1 Effect of PG on SH-SY5Y cell viability damaged by H_2O_2

组别	剂量 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞存活率/%	8-OHdG/%	ROS/%	LDH/%
对照组	-	100.00 $\pm$ 0.78**	100.00 $\pm$ 0.62**	100.00 $\pm$ 0.85**	100.00 $\pm$ 0.63**
H_2O_2 模型组	-	58.26 $\pm$ 0.62	219.26 $\pm$ 1.26	200.16 $\pm$ 1.55	162.16 $\pm$ 0.88
PG1 组	20	68.17 $\pm$ 0.65*	190.38 $\pm$ 0.89	181.06 $\pm$ 1.11	145.27 $\pm$ 0.80
PG2 组	40	70.27 $\pm$ 0.71*	168.17 $\pm$ 0.85*	148.33 $\pm$ 0.82*	138.22 $\pm$ 0.75*
PG3 组	80	74.08 $\pm$ 0.78*	139.78 $\pm$ 0.74*	125.26 $\pm$ 0.79*	118.77 $\pm$ 0.70*

注: 与 H_2O_2 模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

漫均匀的低强度蓝色荧光, 见图 1A; H_2O_2 模型组细胞核呈浓染致密的固缩形态和颗粒状荧光, 细胞核发生明显的凋亡变化, 见图 1B; PG1 组、PG2 组和 PG3 组固缩形态和颗粒状荧光显著减少, 细胞形态基本接近正常, 且具有剂量依赖关系, 见图 1C-E。

酶活性显著低于 H_2O_2 模型组, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

表 3 PG 对 H_2O_2 诱导的 Caspase-3 酶活性的影响($\bar{x} \pm s$, $n=4$)
Table 3 Effect of PG on activities of caspase-3 induced H_2O_2

分组	剂量 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Caspase-3 酶活性 / $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$
对照组	-	0.89 $\pm$ 0.06**
H_2O_2 模型组	-	1.39 $\pm$ 0.08
PG1 组	20	1.21 $\pm$ 0.03*
PG2 组	40	1.11 $\pm$ 0.03*
PG3 组	80	0.95 $\pm$ 0.03*

注: 与 H_2O_2 模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

3 讨论

临床研究^[9]表明, 活性氧介导的氧化应激损伤在 NDD 中有关键作用, 能够清除自由基活性的物质对细胞氧化受损具有保护作用。 H_2O_2 是体内代谢所产生的一种 ROS, 能够与 DNA、蛋白、脂质等多种生物靶标分子反应, 可以透过细胞膜^[10]。SH-SY5Y 临床上被广泛用作氧化应激诱导的神经细胞损伤模型。目前, 国内有多篇文献报道表明 PG 在神经系统中具有广泛的药理活性, 但对其在神经保护中的机制尚

无确切的研究结果^[11]。本研究采用 CCK-8 试剂盒对 H₂O₂ 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤浓度和时间进行了检测, 比较结果得出 H₂O₂ 造模的最佳浓度为 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 最佳孵育时间为 24 h。在该条件下, H-SY5Y 细胞活力抑制率为 42 %, 细胞存在一定比例的凋亡, 但又不会大量死亡, 是 H₂O₂ 模型复制的最佳条件, 与文献结果^[12]相符。同时, 再次采用 CCK-8 试剂盒检测 PG 单独用药对细胞无毒的剂量范围, 用以筛选合适的 PG 用药剂量。结果显示, 无毒性范围为 20~80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 因此, 设置 20, 40, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 共 3 个剂量进行研究。

本研究中 CCK-8 和 Heohest 33258 染色结果表明 PG 能够有效抑制 H₂O₂ 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡, 且呈剂量依赖性。进行碘化丙啶染色流式检测发现 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 H₂O₂ 能够提高 SH-SY5Y 细胞 DNA 的休止期和合成前期(G0/G1)比率, 降低合成期(S 期)和 G2/M 期比率, 诱导了双链 DNA 的断裂, 证实其对 SH-SY5Y 细胞具有毒性^[13]。而 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 两个剂量的 PG 能显著改善 H₂O₂ 诱导的 SH-SY5Y 细胞增殖活性的下降, 提示 PG 对 H₂O₂ 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤可能与减轻 H₂O₂ 诱导的 DNA 损伤有关。进一步进行 DNA 损伤的标志物 8-OHdG 检测后发现, H₂O₂ 诱导细胞损伤后 8-OHdG 较对照组显著升高, 提示 ROS 是造成 DNA 氧化损伤的主要原因之一。而 PG2 组和 PG3 组细胞培养物上清中 8-OHdG 水平均显著低于 H₂O₂ 模型组, 提示 PG 的保护作用与清除活性氧, 减轻 DNA 损伤有关^[14]。另外, LDH 在细胞损伤时可释放进入培养液, 是反应细胞损伤程度的重要指标^[15]。200 $\mu\text{mol/L}$ 的 H₂O₂ 可对 SH-SY5Y 细胞产生较大损伤, 因此, 细胞培养物上清液中 LDH 水平显著升高。而 PG2 组和 PG3 组 LDH 释放量均显著低于 H₂O₂ 模型组, 提示 PG 可有效保护细胞, 减少 H₂O₂ 诱导的损害。

总之, H₂O₂ 诱导 SH-SY5Y 细胞氧化应激, 造成细胞损伤, 导致 ROS、LDH 水平增加, 激活 caspase 通路, 提高 Caspase-3 酶活性, 促进细胞凋亡, 损伤 DNA, 引起细胞周期阻滞。而 PG 对 H₂O₂ 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤有保护作用, 其作用机制可能为清除 ROS、减轻 DNA 氧化损伤、抑制细胞凋亡、调节细胞周期以及阻碍 caspase 通路等^[16]。

参考文献:

- [1] Zhang W, Wang PJ, Li MH, et al. ¹H-MRS assessment of the therapeutic effect of bilateral intraventricular BDNF infusion into APP/PS1 double transgenic mice[J]. J Mol Neurosci, 2013, 50(3): 434-442.
- [2] Wang M, Zhang Z, Cheang LC, et al. Eriocaulon buergerianum extract protects PC12 cells and neurons in zebrafish against 6-hydroxydopamine-induced damage[J]. Chin Med, 2011, 28(6): 16.
- [3] 温新丽, 李世朋, 新吉乐, 等. 芍药苷对过氧化氢诱导 SH-SY5Y 细胞凋亡的保护作用[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(4): 828-830.
- [4] Qu ZQ, Zhou Y, Zeng YS, et al. Protective effects of a Rhodiola crenulata extract and salidroside on hippocampal neurogenesis against streptozotocin-induced neural injury in the rat[J]. PLoS One, 2012, 7(1): 29641.
- [5] Abeliovich A. Parkinson's disease: Mitochondrial damage control[J]. Nature, 2010, 463(11): 744-745.
- [6] 熊礼燕, 李丽月, 林励, 等. 沉香挥发油对 H₂O₂ 致 PC12 细胞氧化损伤的保护作用[J]. 中药新药与临床药理, 2014, 25(1): 28-32.
- [7] Crunkhorn S. Neurodegenerative disorders: restoring the balance[J]. Nat Rev Drug Discov, 2011, 10(8): 576.
- [8] 郭春燕, 罗强, 孙黎, 等. 芍药苷对 H₂O₂ 诱导 SH-SY5Y 神经细胞损伤的保护作用[J]. 中草药, 2013, 44(20): 2864-2871.
- [9] Cao BY, Yang YP, Luo WF, et al. Paeoniflorin, a potent natural compound, protects PC12 cells from MPP+ and acidic damage via autophagic pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2010, 131(1): 122-129.
- [10] Zhang HA, Gao M, Zhang L, et al. Salvianolic acid A protects human SH-SY5Y neuroblastoma cells against H₂O₂-induced injury by increasing stress tolerance ability[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 421(3): 479-483.
- [11] Chaturvedi RK, Beal MF. Mitochondria targeted therapeutic approaches in Parkinson's and Huntington's diseases[J]. Mol Cell Neurosci, 2013, 55: 101-114.
- [12] 张娴, 黄羽, 曾星. 甘草酸对 H₂O₂ 诱导小肠上皮细胞 DNA 损伤的保护作用[J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(3): 239-242.
- [13] Martin LJ. Mitochondrial and Cell Death Mechanisms in Neurodegenerative Diseases[J]. Pharmaceuticals (Basel), 2010, 3(4): 839-915.
- [14] Momb J, Lewandowski JP, Bryant JD, et al. Deletion of Mthfd11 causes embryonic lethality and neural tube and craniofacial defects in mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(2): 549-554.
- [15] 颜明, 刘洁婷, 李洪志, 等. 黄芩苷对 H₂O₂ 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用及其对 Trx 表达的影响[J]. 中国生化药物杂志, 2012, 33(5): 574-577.
- [16] Douarre C, Sourbier C, Dalla RI, et al. Mitochondrial topoisomerase I is critical for mitochondrial integrity and cellular energy metabolism[J]. PLoS One, 2012, 7(7): 41094.

(编辑: 宋威)