

## 原花青素对 $H_2O_2$ 致 PC12 细胞氧化损伤作用的保护研究

蒋国军<sup>1</sup>, 路明珠<sup>2</sup>, 伊佳<sup>2</sup> (1. 浙江萧山医院药剂科, 浙江 杭州 311201; 2. 第二军医大学长征医院药学部, 上海 200433)

**摘要** 目的: 探讨原花青素对  $H_2O_2$  致 PC12 细胞氧化损伤的保护作用。方法: 使用  $H_2O_2$  造成 PC12 细胞损伤, MTT 法测细胞活性, 流式细胞仪检测细胞凋亡率, 免疫组化法检测细胞中 Bax 与 Bcl-2 的蛋白表达。结果: 原花青素能提高  $H_2O_2$  损伤后细胞的活性; 能减少细胞凋亡; 能够增加 Bcl-2 蛋白表达, 减少 Bax 蛋白表达。结论: 原花青素对  $H_2O_2$  致细胞损伤具有保护作用, 能够减少细胞凋亡, 其机制可能与其增加 Bcl-2 蛋白表达, 减少 Bax 蛋白表达有关。

**关键词** 原花青素; PC12 细胞; 细胞凋亡

中图分类号: R931.71, R965

文献标识码: A

文章编号: 1006-0111(2009)06-0414-04

### Protective effect of procyanidine on PC12 cells injury induced by $H_2O_2$

JIANG Guo-jun<sup>1</sup>, LU Ming-Zhu<sup>2</sup>, YI Jia<sup>2</sup> (1. Department of Pharmacy, Zhejiang Xiaoshan Hospital, Hangzhou 311201, China; 2. Department of Pharmacy, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the protective effect of procyanidine on the injury of PC12 cells induced by  $H_2O_2$ . **Methods:** The PC12 cells were injured induced by  $H_2O_2$ . The cell activity was determined by MTT. The cell apoptosis rate were detected by flow cytometry. Proteins of Bcl-2 and Bax were detected by immunohistochemistry. **Results:** Procyanidine increased the survival rate and decreased the apoptotic rate of PC12 induced by  $H_2O_2$ . Procyanidine increased Bcl-2 expression and decreased of Bax expression in PC12 induced by  $H_2O_2$ . **Conclusion:** Procyanidine can inhibit the apoptosis of PC12 induced by  $H_2O_2$ , which might be correlated with increasing Bcl-2 expression and decreasing Bax expression

**KEY WORDS** Procyanidine; PC12 cells; cell apoptosis

原花青素主要存在于植物的果实、种子、花和皮中, 是一类在植物界中广泛存在的多酚化合物, 由不同数量的儿茶素或表儿茶素或儿茶素与表儿茶素缩合而成, 其药理作用广泛, 包括抗氧化、抗炎、抗突变等<sup>[1,2]</sup>。我们的前期研究证明, 原花青素对脑缺血再灌注损伤大鼠的学习记忆障碍有明显的改善作用。为了探讨其治疗血管性痴呆的机制, 我们利用  $H_2O_2$  损伤 PC12 细胞, 观察原花青素对细胞化学性氧化损伤的保护作用。

### 1 实验材料

葡萄籽原花青素 (上海康九化工有限公司, 纯度 95%); PC12 细胞 (中国科学院上海细胞生物学研究所);  $H_2O_2$  (国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20070111); Annex in V-ITC/P kit 试剂盒 (南京凯

基生物科技发展有限公司, 090225); MTT (上海伯光生物科技发展有限公司 (分装)); 胰蛋白酶 (Sigma 公司); DMEM 培养基, 胎牛血清 (Gibco 公司); 318 酶标仪 (上海三科仪器有限公司); 流式细胞仪 (BD FACSCalibur)。

### 2 实验方法

**2.1  $H_2O_2$  诱导 PC12 细胞损伤模型及药物作用** 参照 Mewer LD 等的方法<sup>[3]</sup>进行  $H_2O_2$  诱导 PC12 细胞损伤模型制备。常规方法培养 PC12 细胞。细胞分为 5 组即对照组、模型组及原花青素高、中、低剂量组, 给药前细胞无血清培养 24 h, 然后受试药组给予原花青素, 终浓度分别为 200、100、50  $\mu\text{g/mL}$ , 药物孵育 12 h 后, 向除对照组外的各组加入  $H_2O_2$ , 使其终浓度为 100 mmol/L, 继续培养 18 h, 进行各项检测。

**2.2 MTT 法检测细胞活性**<sup>[4]</sup>  $H_2O_2$  损伤 18 h 后, 向 96 孔培养板内每孔加入 MTT 溶液 (5 mg/mL) 20  $\mu\text{L}$ , 孵育 4 h, 小心吸弃每孔内培养上清液, 再向每孔加入 150  $\mu\text{L}$  二甲基亚砜 (DMSO), 室温下振荡

基金项目: 杭州市科技发展计划社会发展科研攻关项目 (20070733B09)。

作者简介: 蒋国军 (1971-), 男, 硕士, 副主任药师。E-mail: jiangguojun999@163.com。

通讯作者: 伊佳。E-mail: ydyjyz@tom.com。

10 min,使紫色结晶物充分溶解,酶标仪 570 nm 波长处测定吸光度 (A)值。

**2.3 Annexin V-PIIIC/P法检测细胞凋亡率** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤 18 h后,细胞先用不含 EDTA 的胰酶消化,再用 PBS终止消化并洗涤 2次;2 000 r/min离心 5 min,收集细胞到 2.5 mL小离心管中,弃去上清液,加入 500 μLBinding-buffer 悬浮细胞,加入 5 μLAnnexin-FIIIC混匀,再加入 5 μLPropidium iodide混匀,室温避光反应 10 min,流式细胞仪检测。

**2.4 Bcl-2和 Bax表达检测** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤 18 h后,吸去培养基,细胞用 PBS漂洗 2次,滴入多聚甲醛固定 15 min,吸弃多聚甲醛,加入 PBS,在上海长海医院病理科进行相应检测。

**2.5 统计学处理** 结果用  $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS13.0进行单因素方差分析处理。

### 3 结果

**3.1 MTT法检测细胞活性结果** 由表 1可见,给予 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤后,模型组与正常组相比,吸光度值存在显著性差异,表明 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤细胞模型成立;给与不同浓度的原花青素后,细胞相对数明显增加,且具有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。

表 1 原花青素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤后细胞活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量 (μg/mL)	OD值
空白对照组	-	1.750 ± 0.246 <sup>1)</sup>
模型组	-	0.126 ± 0.013 <sup>2)</sup>
原花青素		
低剂量组	50	0.736 ± 0.031 <sup>1)2)</sup>
中剂量组	100	1.262 ± 0.084 <sup>1)2)</sup>
高剂量组	200	1.368 ± 0.122 <sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ,与模型组比较; <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ,与空白组比较

**3.2 细胞凋亡检测结果** Annexin V-PIIIC/P I法检测细胞凋亡率:在流式细胞术参数散点图上,左下象限显示活细胞;右下象限为早期凋亡细胞;右上象限为晚期凋亡细胞;左上象限是非活细胞,即坏死细胞。模型组细胞凋亡率明显高于对照组;与模型组比较,药物组细胞凋亡率明显降低 ( $P < 0.05$ ),且随着药物剂量增加凋亡率降低,结果见表 2,图 1。

表 2 原花青素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤后细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量 (μg/mL)	存活率 (%)	凋亡细胞 (%)
空白对照组	-	86.08 ± 4.61 <sup>1)</sup>	8.21 ± 3.89 <sup>1)</sup>
模型组	-	33.41 ± 6.16	45.53 ± 9.03
原花青素			
低剂量组	50	51.58 ± 10.12 <sup>1)2)</sup>	28.76 ± 7.77 <sup>1)2)</sup>
中剂量组	100	70.50 ± 8.46 <sup>1)2)</sup>	7.82 ± 4.48 <sup>1)2)</sup>
高剂量组	200	84.16 ± 5.85 <sup>1)</sup>	6.39 ± 4.43 <sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,与模型组比较; <sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ,与空白组比较

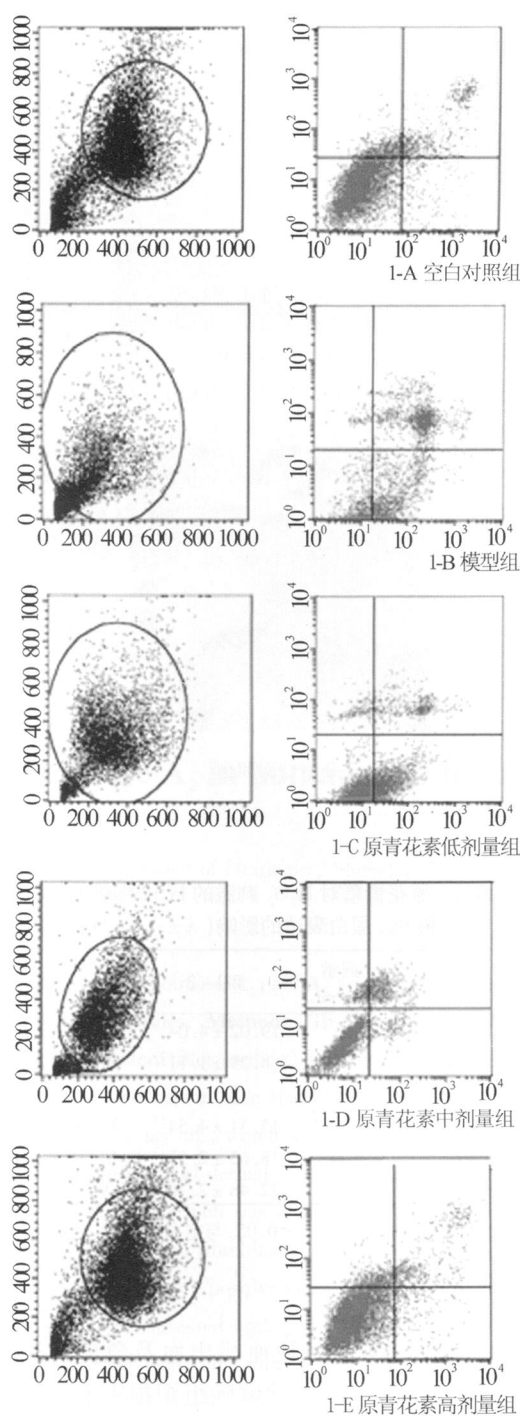


图 1 细胞凋亡流式细胞仪典型图

**3.3 Bcl-2和 Bax表达检测结果** 胞浆显示棕黄色颗粒的细胞为阳性表达细胞。结果显示,模型组 Bcl-2蛋白表达强度显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ), Bax蛋白表达强度显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。而原花青素组 Bcl-2蛋白表达明显高于模型组 ( $P < 0.05$ ), Bax蛋白表达明显低于模型组 ( $P < 0.05$ ),且随着原花青素剂量增加 Bcl-2表达增加,而 Bax表达减少,结果见表 3,图 2。

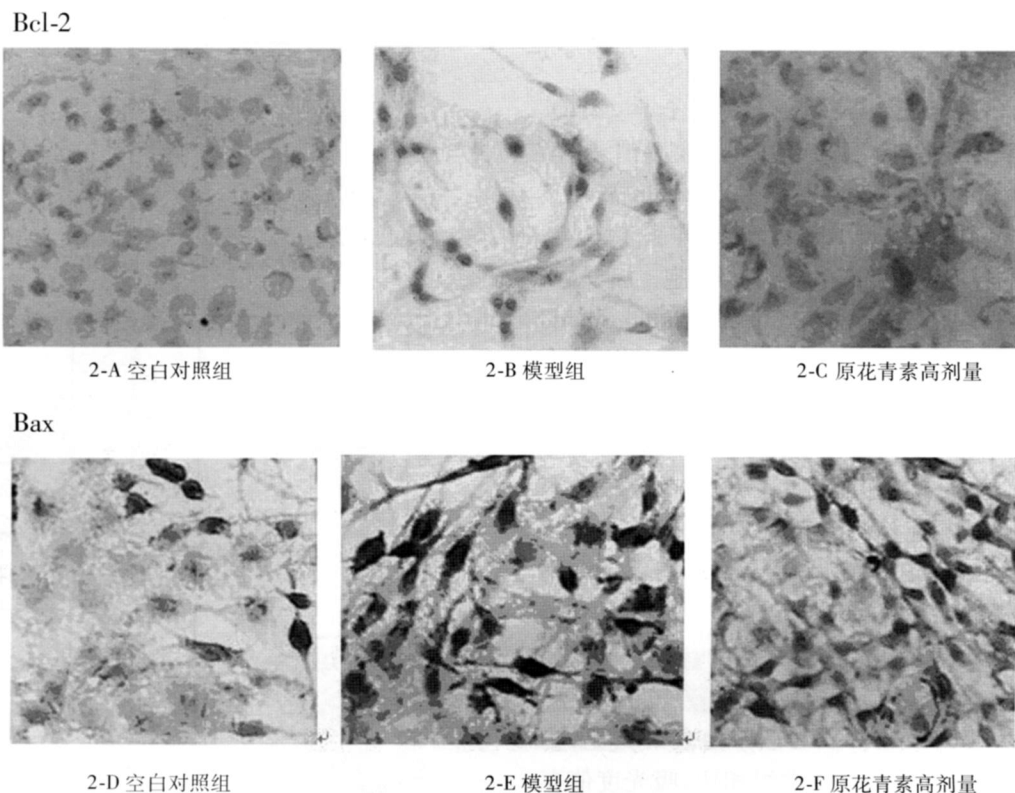


图2 免疫组化结果典型图

表3 原花青素对  $H_2O_2$  刺激的 PC12细胞 Bcl-2 和 Bax蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量 ( $\mu\text{g/mL}$ )	Bcl-2	Bax
空白对照组	-	19.02 $\pm$ 4.04 <sup>1)</sup>	8.23 $\pm$ 0.91 <sup>1)</sup>
模型组	-	8.29 $\pm$ 1.11 <sup>2)</sup>	21.17 $\pm$ 2.32 <sup>2)</sup>
原花青素			
低剂量组	50	15.31 $\pm$ 4.54 <sup>1)</sup>	19.60 $\pm$ 2.85
中剂量组	100	18.65 $\pm$ 2.53 <sup>1)</sup>	15.75 $\pm$ 2.20 <sup>1)2)</sup>
高剂量组	200	22.48 $\pm$ 2.76 <sup>1)</sup>	9.83 $\pm$ 1.60 <sup>1)2)</sup>

<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , 与模型组比较; <sup>2)</sup>  $P < 0.05$ , 与空白组比较

#### 4 讨论

血管性痴呆,是由缺血或出血及急慢性缺氧性脑血管病等脑血管因素导致脑组织损害而引起的获得性智能减退为临床特征的退行性疾病,血管性痴呆患者脑组织缺血、缺氧、能量消耗、神经元代谢异常,极大影响患者的生活质量<sup>[5]</sup>。而  $H_2O_2$  是脑缺血引起脑损伤和水肿的原因之一<sup>[6]</sup>,在  $Fe^{3+}$ 和氧自由基  $O_2^-$ 的存在下,  $H_2O_2$ 可转化为羟基自由基,具有更强的毒性。我们研究表明葡萄籽中提取的原花青素具有改善血管性痴呆小鼠学习记忆功能的作用,与其抗氧化作用有一定关系。

PC12细胞是从大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤中分离的细胞系,功能上具有典型的神经细胞特征,而且易培养传代,能确保量化评估药效,被广泛地用于神经细胞凋亡、氧传感器机制及神经细胞分化等研

究<sup>[7,8]</sup>。本研究采用 PC12细胞模拟神经细胞的反应,以  $H_2O_2$ 诱导细胞氧化损伤,观察原花青素的神经保护作用。MTT法检测细胞活性结果显示,原花青素 3个剂量能够明显抵抗因  $H_2O_2$ 损伤导致的细胞活性降低 ( $P < 0.01$ ),其中高剂量组的细胞存活率与空白对照组无明显差异 ( $P < 0.05$ )。流式细胞仪测试结果显示,原花青素 3个剂量与模型组比较,细胞的存活率明显增加,凋亡率明显减少,均有显著性差异 ( $P < 0.05$ ),表明原花青素能够抵抗因  $H_2O_2$ 氧化损伤导致的细胞凋亡。

细胞凋亡受相关基因调控。凋亡相关基因按其功能分为两类:一类是抗凋亡基因,另一类是促凋亡基因。Bcl-2与 Bax是具有 21%同源性的同源基因,是重要的凋亡调控基因,Bcl-2具有抑制细胞凋亡的作用,通过抗氧化途径阻止细胞凋亡<sup>[9]</sup>,Bax具有促进细胞凋亡的作用,Bax可与 Bcl-2结合,抑制后者的抗凋亡作用,两者在脑缺血损伤的发生发展中起一定的作用<sup>[10]</sup>。我们的免疫组化实验结果显示,  $H_2O_2$ 作用于 PC12细胞,模型组的 Bcl-2阳性率明显降低 ( $P < 0.05$ ),而 Bax阳性率明显升高 ( $P < 0.05$ )。而原花青素给药 3个剂量组细胞的 Bcl-2阳性率明显高于模型组 ( $P < 0.05$ ),原花青素中、高剂量组细胞的 Bax阳性率明显低于模型组 ( $P < 0.05$ )。我们得出结论,原花青素可能是通过上调

(下转第 420页)

HaCaT细胞和真皮成纤维细胞相比,恶性黑色素瘤 A375细胞具有 sPLA<sub>2</sub> 的高分泌。Western Blotting 结果显示,恶性黑色素瘤 A375细胞裂解液中 sPLA<sub>2</sub> / GAPDH的灰度比值,分别是人表皮 HaCaT细胞和成纤维细胞的 4.85和 22.68倍。这提示,与表皮 HaCaT细胞和真皮成纤维细胞相比,恶性黑色素瘤 A375细胞内具有 sPLA<sub>2</sub> 的高表达。

免疫组化结果显示,人黑色素瘤组织的细胞间质和细胞胞浆内,呈现大量的典型 sPLA<sub>2</sub> 阳性信号,而在健康人的表皮和真皮组织中并未见到上述 sPLA<sub>2</sub> 阳性信号。这提示,与健康人表皮和真皮相比,黑色素瘤组织的细胞内外具有 sPLA<sub>2</sub> 的高表达和高分布。

综上所述,从细胞学和组织学水平,证实了黑色素瘤组织的细胞内外,较健康人皮肤细胞和组织,均具有 sPLA<sub>2</sub> 的高表达和高分布。

本课题组前期利用药物 磷脂酰胆碱共聚物的 sn<sub>2</sub> 构型能特异性地被 sPLA<sub>2</sub> 酶解代谢出活性药物的原理,以及基于疗效确切的 5-氟尿嘧啶无法有效到达皮肤黑色素瘤病灶区的临床用药现状,创新地设计并合成出了治疗皮肤黑色素瘤的双重靶向前体药物——5-氟尿嘧啶-sn<sub>2</sub> 磷脂酰胆碱共聚物。而本研究证实了黑色素瘤组织的细胞内外,均较健康人皮肤细胞和组织,具有 sPLA<sub>2</sub> 的高表达和高分布,为研究该前体药物的酶解动力学提供了理论基础。同时,这也进一步提示, sPLA<sub>2</sub> 有可能成为皮肤黑色素瘤靶

向给药的新靶点。

#### 参考文献:

- [1] 杨银治,夏时海. 磷脂酶 A<sub>2</sub> 在炎症反应中的作用 [J]. 世界华人消化杂志, 2006, 14 (8): 795.
- [2] Michael K, Gerhard KES. Drug-phospholipid conjugates as potential prodrugs: synthesis, characterization, and degradation by pancreatic phospholipase A<sub>2</sub> [J]. Chem Phys Lipid, 2000, 107: 143.
- [3] Dahan A, Duvdevani R, Shapiro I, et al. The oral absorption of phospholipid prodrugs: in vivo and in vitro mechanistic investigation of trafficking of a lecithin-valproic acid conjugate following oral administration [J]. J Control Rel, 2008, 126: 1.
- [4] El Maghraby GM. Skin delivery of 5-fluorouracil from lutradeformable and standard liposomes in vitro [J]. J Pharm Pharmacol, 2001, 53: 1069.
- [5] Jensen SS, Thomas LA, Davidsen J, et al. Secretory phospholipase A<sub>2</sub> as a tumor-specific trigger for targeted delivery of a novel class of liposomal prodrug anticancer etherlipids [J]. Mol Cancer Ther, 2004, 3 (11): 1451.
- [6] Kim S, Kim Y, Lee Y, et al. Cholesterol inhibits MMP-9 expression in human epidermal keratinocytes and HaCaT cells [J]. FEBS Lett, 2007, 581 (20): 3869.
- [7] Cario-Andrie M, Pain C, Gauthier Y, et al. In vivo and in vitro evidence of dermal fibroblasts influence on human epidermal pigmentation [J]. Pigment Cell Res, 2006, 19 (5): 434.
- [8] Papoutsis M, Othman-Hassan K, Christ B, et al. Development of an arterial tree in C6 gliomas but not in A375 melanomas [J]. Histochem Cell Biol, 2002, 118 (3): 241.

收稿日期: 2009-10-25

(上接第 416页)

Bcl-2基因表达,下调 Bax基因表达起到抑制细胞凋亡作用的。

#### 参考文献:

- [1] Merfort I, Heilmann J, Weiss M, et al. Radical scavenging activity of three flavonoid metabolites studied by inhibition of chemiluminescence in human PMNs [J]. Planta Med, 1996, 62 (4): 289.
- [2] 曾繁典,谢笔钩,张晓辉,等. 原花青素的药理研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2002, 18 (1): 9.
- [3] Mewer LD, Kelly BL, Home MK, et al. Dietary polyphenols protect dopamine neurons from oxidative insults and apoptosis: investigations in primary rat mesencephalic cultures [J]. Biochem Pharmacol, 2005, 69 (2): 339.
- [4] Tang XQ, Feng JQ, Chen J, et al. Protection of oxidative preconditioning against apoptosis induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PC12 cells: mechanisms via MMP, ROS, and Bcl-2 [J]. Brain Res, 2005, 1057 (1-2): 57.

- [5] 王春菊,许沛然. 血管性痴呆的基础性研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2008, 4 (10): 142.
- [6] Mak II, Boehme P, Weglicki WB. antioxidant effect Antioxidant effects of calcium channel blockers against free radical injury in endothelial cells [J]. Circ Res, 1992, 70: 1099.
- [7] Hirose M, Takatori M, Kuroda Y, et al. Effect of synthetic cell penetrating peptides on TrkA activity in PC12 cells [J]. J Pharmacol Sci, 2008, 106 (1): 107.
- [8] Xu W, Zha RP, Wang WY, et al. Effects of scutellarin on PKC in PC12 cell injury induced by oxygen and glucose deprivation [J]. Acta Pharmacol Sin (中国药理学报), 2007, 28 (10): 1573.
- [9] Won SI, Kim DY, Gwag BJ. Cellular and molecular pathways of ischemic neuronal deaths [J]. J Biochem Mol Biol. 2002; 35 (1): 67.
- [10] 李桂兰,于哩哩,白丽亚. 调控基因 Bcl-2, Bax在脑缺血再灌注损伤细胞凋亡的表达的实验研究 [J]. 基础研究, 2007, 4 (21): 118.

收稿日期: 2009-07-08