

琐琐葡萄多糖对 PC12 细胞损伤的神经保护作用

袁芳, 张景萍, 马龙

新疆医科大学基础医学院, 乌鲁木齐 830011

摘要 体外培养 PC12 细胞, 采用 20 μ mol/L β 淀粉样蛋白 25-35(A β 25-35)作用 24h 诱导细胞损伤, 建立阿尔茨海默病 (AD) 细胞模型, 研究琐琐葡萄多糖 (VTP) 对 PC12 细胞损伤的神经保护作用。设立对照组、模型组和 VTP 保护组 (20, 40, 80 μ g/mL), CCK-8 法检测各组细胞的存活率, 乳酸脱氢酶 (LDH) 法检测细胞膜通透性及完整性, 化学比色法测定细胞内超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 含量, 流式细胞术检测细胞凋亡率。结果显示, 20, 40, 80 μ g/mL VTP 可提高 PC12 细胞存活率, 减少 LDH 渗漏, 增加 SOD 活力, 减少 MDA 含量, 降低细胞凋亡率, 与模型组比较有显著差异 ($P < 0.01$)。由此推论, VTP 对 A β 25-35 诱导的 PC12 细胞凋亡和氧化损伤具有明显的保护作用。

关键词 琐琐葡萄多糖; PC12 细胞; A β 25-35; 氧化损伤; 细胞凋亡

中图分类号 R965

文献标识码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2012.04.006

Protective Effects of Polysaccharide from *Vitis vinifera* L on A β 25-35 Induced Injury in PC12 Cells

YUAN Fang, ZHANG Jingping, MA Long

College of Basic Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

Abstract In order to investigate protective effects of polysaccharide from *Vitis vinifera* L on β -amyloidprotein 25-35(A β 25-35) induced neurotoxicity in PC12 cells, PC12 cells were treated with A β 25-35 in vitro for 24h to establish an Alzheimer's disease (AD) model. Control group, model group (20 μ mol/L A β 25-35), and different concentration of VTP groups (20, 40, 80 μ g/mL) were set up, and cellular morphological change was observed by using the inverted microscope. Cell viability of each group was assayed with Cell Counting Kit-8 (CCK-8) method; the penetration and completion of the cell membrane were detected by means of lactic acid dehydrogenase (LDH) method; the level of antioxidant enzymes (SOD) and malondialdehyde (MDA) were evaluated by using chromatometry; and apoptotic rates were detected by means of Annexin V-FITC and staining with PI. The results show that comparing with the model group, VTP groups could improve cell injury, the cell numbers of the VTP groups raise obviously, the morphological change of the cell improves significantly, the survival rate of PC12 cells increases; LDH percolation activity decreases, SOD activity increases, MDA level decreases, and the apoptotic rate reduces. In summary, VTP has the protective effects on both oxidative damage and apoptosis of PC12 cells induced by A β 25-35.

Keywords VTP; PC12 cells; A β 25-35; oxidative damage; apoptosis

0 引言

随着社会的老齡化, 阿尔茨海默病 (Alzheimer's Disease,

AD) 亦称老年性痴呆, 其发病率呈逐年上升趋势, AD 的病因及其病理机制仍未明确, 治疗手段十分有限。随着对 AD 研究

收稿日期: 2011-12-19; 修回日期: 2012-01-30

基金项目: 新疆医科大学博士研究生创新基金项目 (DC2010-1)

作者简介: 袁芳, 副教授, 研究方向为新疆特色药食兼用植物的开发应用, 电子信箱: yuanfang398@163.com; 马龙 (通信作者), 教授, 研究方向为新疆特色药食兼用植物的开发应用, 电子信箱: ml@xjmu.edu.cn

的深入, 中药及保健功能性食物预防和治疗 AD 的作用日益受到重视。琐琐葡萄(*Vitis vinifera* L)为葡萄科葡萄属植物山葡萄, 主产于新疆吐鲁番、和田、鄯善等地, 是医药文献如《神农本草经》、《维吾尔药志》等所记载的药用葡萄品种之一。以新疆医科大学马龙教授为首的课题组长期致力于琐琐葡萄医药保健功能的开发应用, 从琐琐葡萄提取了多糖、黄酮、三萜等活性物质, 研究其抗突变、抗氧化、抗肿瘤、抗衰老作用。其中多糖是由醛基和酮基通过糖苷键连接而成的高分子聚合物, 也是构成生命的四大基本物质之一。它毒性小、安全性高、功能广泛, 具有非常重要和特殊的生理活性, 从植物尤其是从中药中提取的水溶性多糖, 均具有显著的药效功能, 如增强免疫功能、降血糖、调血脂、抗肿瘤、抗氧化、抗衰老作用等^[1-2]。近年来研究表明, 葡萄中提取的原花青素、白藜芦醇具有防治老年痴呆的作用, 人参、枸杞、黄芪、灵芝等中药中提取的多糖对神经细胞有保护作用^[3-7], 但未见对琐琐葡萄多糖(VTP)神经保护作用的报道。前期研究发现 VTP 具有很强的抗氧化作用, 为了开发 VTP 的医药保健功能, 本试验采用 A β 25-35 诱导 PC12 细胞损伤, 制备 AD 体外细胞模型, 研究 VTP 对神经细胞的保护作用, 为将 VTP 开发为防治 AD 的药物提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

琐琐葡萄购自吐鲁番维吾尔药材市场, 为 *Vitis vinifera* L 的成熟干燥果实。分离、纯化提取 VTP, 培养液溶解, 0.22 μ m 尼龙滤膜过滤除菌, -20 $^{\circ}$ C 避光保存, 临用时稀释至所用浓度。

DMEM 培养液, 美国 Hyclone 公司; A β 25-35, Sigma 公司; 胎牛血清, 杭州四季青公司; CCK-8 检测试剂盒, 武汉博士德生物工程有限公司; 乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)检测试剂盒均购自南京建成生物研究所; Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(BioVision)。

1.2 细胞培养和分组

PC12 细胞(高分化)购自中国科学院上海细胞生物学研究所细胞库。细胞常规培养, DMEM 高糖培养液含 10% 灭活胎牛血清、100U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素, 置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度的恒温培养箱, 隔天换液, 3—4d 传代。每次实

验均分对照组, 模型组 (20 μ mol/L A β 25-35), VTP 保护组 (20, 40, 80 μ g/mL)。

1.3 细胞存活率的测定

CCK-8 试剂盒测定细胞存活率, 按照试剂盒说明书操作, 在酶标仪 450nm 测定吸光度, 计算各组 PC12 细胞存活率。每组设 5 个复孔, 实验重复 3 次。

1.4 LDH 活性的测定

A β 25-35 诱导 24h 后, 分别收集各组细胞上清液, 按 LDH 试剂盒说明书操作, 计算各组细胞上清液中 LDH 活性。酶标仪测定吸光度, 波长 450nm, 每组设 5 个复孔, 实验重复 3 次。

1.5 SOD 活性、MDA 含量的测定

按上述方法收集各组细胞上清液, 按照试剂盒说明书操作, 分光光度计测定吸光度, 每组设 5 个复孔, 实验重复 3 次。

1.6 细胞凋亡的检测

细胞接种于 6 孔板, 按上述方法分组并培养细胞, 将各组的细胞消化后收集, 1000r/min 离心 5min, 用冷 DMEM 洗涤 2 次, 结合缓冲液中重悬成单细胞悬液, 密度为 1 \times 10⁶/mL, 室温下加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L PI 染料, 轻轻振荡、混匀, 室温下避光孵育 15min, 流式细胞仪测定细胞凋亡率。

1.7 统计学处理与分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 16.0 软件进行统计处理。

2 结果与分析

2.1 VTP 对 PC12 细胞存活率的影响

倒置显微镜下观察细胞形态(图 1)。正常组细胞贴壁生长旺盛, 细胞间突起相互连接紧密; 模型组细胞数目显著减少, 细胞突起回缩, 部分细胞皱缩、变圆, 细胞间隙增大, 呈现明显损伤形态; VTP 保护组细胞数量增多, 细胞贴壁良好, 形态正常有突起, 脱落细胞减少, 受损程度明显减轻。CCK-8 结果显示(图 2), 与对照组相比, 模型组细胞生长受到抑制, 细胞存活率下降 ($P < 0.01$); VTP 保护组明显改善细胞损伤, 与模型组相比, 细胞存活率增加 ($P < 0.01$)。

2.2 VTP 对 PC12 细胞 LDH 的影响

LDH 活性测定结果表明, VTP 保护组细胞膜外 LDH 活性显著降低 ($P < 0.01$), 表明 VTP 能拮抗 A β 25-35 所致的细

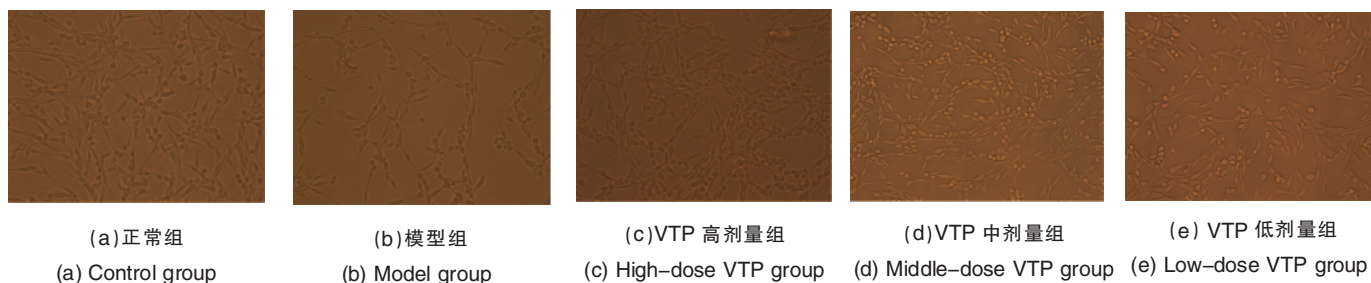


图 1 显微镜下观察各组细胞形态变化(200 \times)

Fig. 1 Cellular morphological changes of PC12 cells for different groups (200 \times)

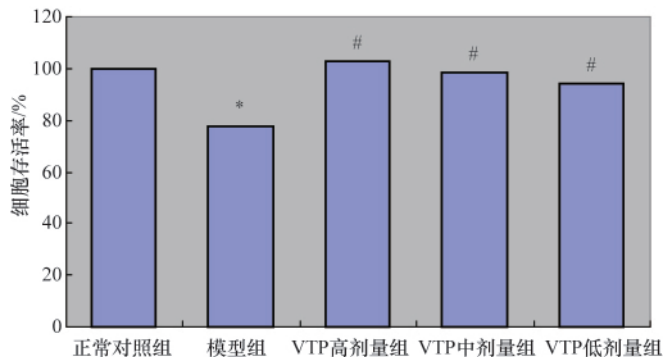


图2 琥珀葡萄多糖对Aβ25-35诱导的PC12损伤的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Fig. 2 Effects of VTP on cellular viability in PC12 cells induced by Aβ25-35 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

注: *与对照组相比 $P<0.01$; #与模型组相比 $P<0.01$ 。
Notes: * is compared with control group ($P<0.01$); # is compared with model group ($P<0.01$).

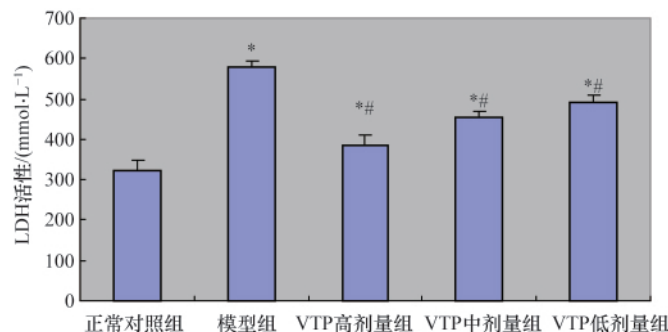


图3 VTP对Aβ25-35诱导的PC12损伤LDH的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Fig. 3 Effects of VTP on LDH release in PC12 cells injury induced by Aβ25-35 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

注: *与对照组相比 $P<0.01$; #与模型组相比 $P<0.01$ 。
Notes: * is compared with control group ($P<0.01$); # is compared with model group ($P<0.01$).

胞膜损伤(图3)。

2.3 VTP对PC12细胞SOD活性的影响

与对照组比较,模型组细胞的SOD活性显著下降($P<0.01$);与模型组相比,VTP保护组细胞SOD活性显著增加($P<0.05$),见图4。

2.4 VTP对PC12细胞MDA含量的影响

由图5可以看出,与对照组相比,模型组细胞的MDA含

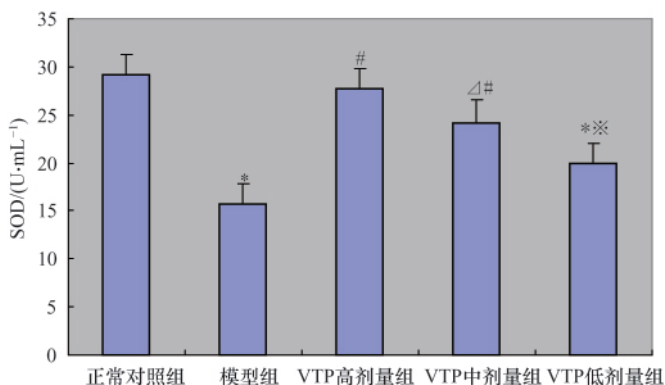


图4 VTP对Aβ25-35诱导的PC12 SOD活性的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Fig. 4 Effects of VTP on SOD activity in PC12 cells induced by Aβ25-35 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

注: *与对照组相比 $P<0.01$, $\Delta P<0.05$; #与模型组相比 $P<0.01$, * $P<0.05$ 。
Notes: * is compared with control group ($P<0.01$), $\Delta P<0.05$; # as compared with model group ($P<0.01$), * $P<0.05$.

量显著增高($P<0.01$);与模型组相比,VTP保护组细胞MDA含量显著降低($P<0.05$)。

2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡率

流式细胞仪检测细胞凋亡率结果显示,对照组细胞凋亡率为4.58%;模型组凋亡率为25.18%,两组间比较有显著性差异($P<0.01$);与模型组相比,VTP保护组显著降低细胞凋亡率($P<0.01$)(图6)。

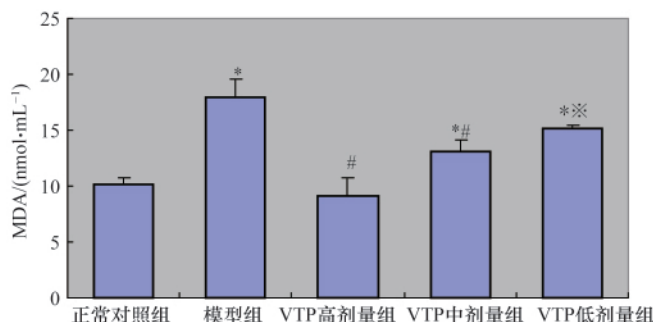


图5 VTP对Aβ25-35诱导的PC12 MDA含量的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Fig. 5 Effects of VTP on MDA content in PC12 cells induced by Aβ25-35 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

注: *与对照组相比 $P<0.01$; #与模型组相比 $P<0.01$, * $P<0.05$ 。
Notes: * is compared with control group ($P<0.01$); # is compared with model group ($P<0.01$), * $P<0.05$.

3 讨论

AD临床上表现为渐进性智力障碍和记忆力减退,随着

社会老龄化的发展,已成为老年医学迫切需要解决的疾病之一。AD发病机制复杂,特征性病理改变为β淀粉样蛋白在大

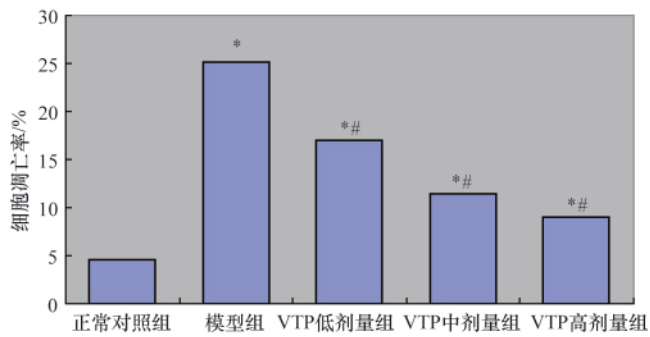


图6 VTP对A β 25-35诱导的PC12细胞凋亡率含量的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 6 Effects of VTP on apoptotic rates in PC12 cells induced by A β 25-35 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

注: *与对照组相比 $P<0.01$; #与模型组相比 $P<0.01$ 。

Notes: * is compared with control group ($P<0.01$); # is compared with model group ($P<0.01$).

脑内的沉积,可导致神经元及其突触的丢失,并最终导致痴呆。因此,国内外研究筛选抗痴呆药物多采用 β 淀粉样蛋白诱导神经细胞损伤模型^[8-9]。本研究采用20 $\mu\text{mol/L}$ A β 25-35作用于PC12细胞24h,构建AD体外模型,实验结果显示,模型组细胞存活率下降至77.61%,LDH活性显著增高($P<0.01$),表明此模型可以作为评价VTP保护作用的神经损伤体外模型。A β 25-35损伤细胞前加入20,40,80 $\mu\text{g/mL}$ 的VTP,相较于模型组,细胞存活率显著增加,细胞上清液中的LDH含量显著减少($P<0.01$),且随着VTP浓度增加,保护作用增强,表明VTP对A β 25-35诱导的神经细胞损伤具有保护作用。

A β 是各种原因诱发AD的共同通路,是AD病理机制的核心问题。在正常情况下,机体内自由基的产生和清除系统处于动态平衡状态,A β 可通过诱导产生氧自由基使脑细胞膜系统的脂质和蛋白被氧化修饰,使活性氧增加,促进氧化反应和过氧化物形成,诱导氧化应激损伤,降低抗氧化作用,自由基损伤是A β 发挥细胞毒性的方式之一。氧自由基也可促进生成A β ,二者具有相互促进效应。神经细胞丢失是AD的一个重要特征,细胞凋亡是丢失的重要前提,A β 能引起神经细胞的凋亡。MDA和SOD是反映自由基损伤最具有代表性指标。实验结果显示,A β 25-35诱导的模型组与正常组比较,细胞SOD活性明显降低,MDA含量显著增加,细胞凋亡率显著升高($P<0.01$),提示细胞损伤与脂质过氧化有关;与模型组比较,VTP各浓度保护组均可提高SOD活性、降低MDA含量($P<0.05$),细胞凋亡率减少($P<0.01$),提示VTP可能通过抗氧化、抗凋亡起到对神经细胞损伤的保护作用。

综上所述,本实验采用20 $\mu\text{mol/L}$ A β 25-35作用24h诱导PC12细胞损伤,构建AD细胞模型,A β 25-35损伤细胞前加入20,40,80 $\mu\text{g/mL}$ 的VTP干预,VTP能提高细胞存活率,减

少细胞释放的LDH含量,改善细胞膜的损伤,降低细胞凋亡率,VTP组细胞SOD活性增加、MDA含量降低,表现出抗氧化活性,具有潜在药用价值,本研究为维药琐琐葡萄防治老年痴呆等神经系统疾病提供科学依据,为促进维吾尔医药的理论发展,同时也为充分利用新疆丰富的葡萄资源,变资源优势为经济优势,研发安全、有效、价廉抗痴呆民族新药提供新思路。

4 结论

本研究表明,VTP对A β 25-35诱导的PC12细胞凋亡和氧化损伤具有保护作用,能够明显改善神经细胞的损伤,对防治老年痴呆等神经系统疾病具有潜在药用价值。

参考文献 (References)

- [1] Hong Y K, Wu H T, Ma T, et al. Effects of glycyrrhiza glabra Polysaccharides on immune and antioxidant activities in high-fat mice[J]. *Int J Biol Macromol*, 2009, 45(1): 61-64.
- [2] 施松善,王顺春. 多糖生物活性研究进展 [J]. *生命科学*, 2011, 23(7): 662-670.
Shi Songshan, Wang Shunchun. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2011, 23(7): 662-670.
- [3] 孙桂菊,左平国. 枸杞多糖功效研究及应用状况[J]. *东南大学学报: 医学版*, 2010, 29(2): 209-215.
Sun Guiju, Zuo Pingguo. *Journal of Southeast University: Medicine Science Edition*, 2010, 29(2): 209-215.
- [4] 曾克武,王学美,富宏,等. 加味五子衍宗方含药脑脊液对 β 淀粉样蛋白诱导海马神经元损伤的保护作用 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2010, 30(8): 851-855.
Zeng Kewu, Wang Xuemei, Fu Hong, et al. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine*, 2010, 30(8): 851-855.
- [5] 谈震,范守文. 灵芝多糖对 β 淀粉样蛋白诱导大鼠海马神经元细胞损伤的保护作用[J]. *药物生物技术*, 2010, 17(5): 430-433.
Tan Zheng, Fan Shouwen. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2010, 17(5): 430-433.
- [6] Wang J, Lap Ho, Zhao W, et al. Grape-derived polyphenolics prevent A β oligomerization and attenuate cognitive deterioration in a mouse model of Alzheimer's Disease[J]. *The Journal of Neuroscience*, 2008, 28(25): 6388-6392.
- [7] 曹霞飞,郑翔,吴俊,等. 白藜芦醇对甲醛诱导PC12细胞氧化损伤的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2011, 31(8): 3062-3065.
Cao Xiafei, Zheng Xiang, Wu Jun, et al. *Chinese Journal of Gerontology*, 2011, 31(8): 3062-3065.
- [8] Resende R, Pereira C, Agostinho P, et al. Susceptibility of hippocampal neurons to Abeta peptide toxicity is associated with perturbation of Ca²⁺ homeostasis[J]. *Brain Research*, 2007, 1143(0): 11-21.
- [9] 王文君,李大金,李君,等. 中药复方更年春含药血清及其主要单体对 β 淀粉样蛋白所致细胞损伤的保护作用 [J]. *中西医结合学报*, 2010, 8(1): 67-71.
Wang Wenjun, Li Dajin, Li Jun, et al. *Journal of Chinese Integrative Medicine*, 2010, 8(1): 67-71.

(责任编辑 吴晓丽)