

## • 药理与临床 •

芍药苷对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 SH-SY5Y 神经细胞损伤的保护作用郭春燕<sup>1</sup>, 罗强<sup>2</sup>, 孙黎<sup>2</sup>, 张丹参<sup>1,3\*</sup>, 张纪平<sup>1</sup>

1. 河北北方学院 药学系, 河北 张家口 075000
2. 河北北方学院 生命科学研究中心, 河北 张家口 075000
3. 河北科技大学, 河北 石家庄 050018

**摘要:** 目的 研究芍药苷对过氧化氢 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 诱导人神经瘤母细胞 (SH-SY5Y) 凋亡的保护作用及其机制。方法 制备 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的氧化应激损伤模型。相差显微镜观察 SH-SY5Y 细胞形态的变化; CCK-8 法测定细胞存活率; Hoechst 33258 染色法观察细胞凋亡; 碘化丙啶染色、流式细胞仪检测细胞周期; 2', 7'-二氯荧光素二乙酸盐 (DCFH-DA) 法检测细胞内活性氧 (ROS); INT 显色反应法测定乳酸脱氢酶 (LDH) 的量; ELISA 法检测 8-羟基脱氧鸟苷 (8-OHdG) 的量; caspase-3 催化特异性底物反应检测 caspase-3 活性。结果 与对照组相比, 200 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 SH-SY5Y 细胞 24 h, 使细胞存活力显著下降 ( $P < 0.01$ ), 细胞凋亡率上升 ( $P < 0.01$ ), 增殖指数 (PI) 降低 ( $P < 0.05$ ), 8-OHdG 的量上升 ( $P < 0.01$ ), LDH 释放量和细胞内 ROS 量增加 ( $P < 0.01$ ), caspase-3 活性增强 ( $P < 0.01$ )。与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组相比, 芍药苷终浓度为 20~40 μmol/L, 可浓度相关地减轻 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 SH-SY5Y 细胞上述指标的变化 ( $P < 0.05$ ); 芍药苷 10 μmol/L 组细胞 PI、LDH 和 8-OHdG 量未有明显改观, 但能显著减轻 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 SH-SY5Y 细胞毒性、ROS 和 caspase-3 活性 ( $P < 0.05$ )。结论 芍药苷对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 SH-SY5Y 细胞损伤具有显著保护作用, 该作用可能与其清除 ROS、减轻 DNA 氧化损伤、抑制细胞凋亡的 caspase 通路激活和调节细胞周期有关。

**关键词:** 芍药苷; SH-SY5Y 细胞; 过氧化氢; 细胞凋亡; 细胞周期; 氧化应激; caspase 通路

中图分类号: R282.710.5; R971 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)20-2864-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.20.014

## Protective effects of paeoniflorin against hydrogen peroxide-induced cell injury in SH-SY5Y nerve cells

GUO Chun-yan<sup>1</sup>, LUO Qiang<sup>2</sup>, SUN Li<sup>2</sup>, ZHANG Dan-shen<sup>1, 3</sup>, ZHANG Ji-ping<sup>1</sup>

1. Department of Pharmacy, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China
2. Life Science Research Center, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China
3. Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China

**Abstract: Objective** To investigate the neuroprotective effects of paeoniflorin (PF) against cell death induced by hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in human neuroblastoma cells and its mechanisms. **Methods** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was used to induce SH-SY5Y cell damages, and the cell survival rate was detected by CCK-8 assay; the cell morphologic changes were observed by inverted optical microscope; the apoptosis was tested using Hoechst 33258 staining; flow cytometer (FCM) and propidium iodide staining were used to analyze the apoptosis and cell cycle alteration; reactive oxygen species (ROS) production was determined by 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) fluorescence; lactic dehydrogenase (LDH) release was detected by reaction of diaphorase and INT; 8-OHdG production was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); caspase-3 activity was determined by caspase-3 catalyzing the specific substrate. **Results** Compared with control group, after the treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200 μmol/L) for 24 h, the viability and proliferation index of SH-SY5Y cells were significantly decreased ( $P < 0.01, 0.05$ ), the apoptosis rate and content of 8-OHdG were increased ( $P < 0.01$ ), the LDH release and ROS production were increased ( $P < 0.01$ ); the activity of caspase 3 was increased ( $P <$

收稿日期: 2013-04-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81274005); 河北省教育厅资助项目 (2007302)

作者简介: 郭春燕 (1968—), 女, 教授, 硕士, 研究方向为神经药理学。Tel: 18931316689 E-mail: guochy0311@163.com

\*通信作者 张丹参 Tel: (0311)81668106 E-mail: zhangds2011@126.com

0.01). Compared with  $H_2O_2$  injury group, PF (20—40  $\mu\text{mol/L}$ ) significantly ameliorated the changes in SH-SY5Y cells induced by  $H_2O_2$  in concentration-related manner ( $P < 0.05$ ). PF (10  $\mu\text{mol/L}$ ) did not significantly change the above indexes except the cell viability, ROS, and caspase-3 activity induced by  $H_2O_2$  ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** PF has the significant protective effect against the  $H_2O_2$ -induced cell injury, which may be related to eliminating ROS, alleviating DNA oxidative damage, regulation of cell cycle, and inhibition of apoptosis of caspase pathway activation.

**Key words:** paeoniflorin; SH-SY5Y cell; hydrogen peroxide; cell apoptosis; cell cycle; oxidative stress; caspase pathway

神经退行性疾病是一类由脑中特定区域神经元发生退变而引起的慢性进行性神经系统疾病, 严重危害人类健康。目前导致神经退行性疾病发生的确切机制尚未明确, 但氧化应激被认为是导致神经退行性疾病的主要原因之一, 其中活性氧(ROS)在神经退行性疾病的发病过程中的作用举足轻重<sup>[1-4]</sup>。氧化应激和线粒体损伤均参与神经退行性疾病的发生和发展<sup>[5-8]</sup>, SH-SY5Y细胞是于1970年一位神经母细胞瘤患者的转移骨瘤灶细胞SK-N-SH经3次克隆后的亚系(SK-N-SH → SH-SY → SH-SY5 → SH-SY5Y), 是一种分化程度较低的肿瘤细胞, 显示中等水平的多巴胺- $\beta$ -羟化酶活性, 细胞形态、生理及生化功能与正常神经细胞相似, 并具有明显的轴突<sup>[9]</sup>。过氧化氢( $H_2O_2$ )是体内氧化代谢的中间产物, 属于非自由基活性氧, 易穿透细胞膜, 与细胞内的还原型铁离子通过Fenton反应生成高度毒性的羟自由基, 对多种细胞(特别是脑组织神经元细胞)造成毒性, 引起细胞死亡<sup>[6,10-11]</sup>。

从天然产物中寻找具抗氧化作用的化合物并阐明其作用机制, 对预防此类疾病的发生有重要的现实意义。芍药苷(paeoniflorin, PF)是芍药的主要有效成分之一, 属单萜糖苷类化合物, 具有抗抑郁、抗自由基损伤等多种生物学效应<sup>[12-14]</sup>; 其也具有神经保护作用, 但是确切机制不明<sup>[15-16]</sup>。本研究芍药苷对 $H_2O_2$ 诱导的SH-SY5Y细胞氧化损伤的保护作用及其机制, 为其用于氧化应激相关的神经退行性疾病的治疗提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 药品与试剂

芍药苷(批号K120505), 上海源叶生物科技有限公司, 质量分数为99.9%;  $H_2O_2$ , 天津市科密欧化学试剂有限公司; DMEM/F12培养基、胎牛血清(FBS), 美国Gibico公司; 胰酶-EDTA溶液、磷酸盐缓冲液(PBS), 武汉博士德有限公司; 硫酸庆大霉素注射液(批号1301041.2), 新乡东升制药有限公司; L-谷氨酰胺(批号00201209102248), Sigma公司; CCK-8试剂盒、细胞凋亡Hoechst33258染色

试剂盒、细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒(碘化丙啶染色)、细胞裂解液、ROS检测试剂盒, 江苏省海门市碧云天试剂公司; 人8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)ELISA试剂盒, 上海欣美生物科技有限公司; 2', 7'-二氯荧光素二乙酸盐(DCFH-DA), 江苏省海门市碧云天试剂公司。

### 1.2 仪器

Spectra Max全自动荧光酶标仪, 美国分子仪器有限公司; ECLIPSE Ti-U倒置荧光显微镜, 日本Nikon公司;  $CO_2$ 培养箱, 美国Thermo Electron公司; SW-CJ-2FD型超净工作台, 苏净集团安泰公司制造; ME235S电子天平, 德国赛多利斯公司; TDL-40B型离心机, 上海安亭科学仪器厂; DK-8A型电热恒温水浴槽, 上海精宏实验设备有限公司。

### 1.3 细胞

SH-SY5Y细胞, 购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心, 经河北北方学院实验中心细胞室传代冻存。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

SH-SY5Y细胞用含10% FBS、100 U/mL庆大霉素、2 mmol/L L-谷氨酰胺的DMEM/F12培养液, 于37  $^{\circ}\text{C}$ 、饱和湿度、5%  $CO_2$ 细胞培养箱中培养。取对数生长期细胞进行实验。

### 2.2 $H_2O_2$ 诱导SH-SY5Y细胞凋亡所需浓度和时间的确定

采用CCK-8法定量检测细胞的活性。将细胞按 $2 \times 10^4$ /孔接种于96孔板。细胞分9组: 对照组常规加入完全培养基, 但不加 $H_2O_2$ ; 空白组不接种细胞也不加 $H_2O_2$ , 加入相同体积的培养基; 7个 $H_2O_2$ 损伤组, 每组6个复孔, 细胞培养至对数生长期后加入 $H_2O_2$ 至终浓度分别为12.5、25、50、100、200、400、800  $\mu\text{mol/L}$ , 孵育1、2、4、8、12、24 h后倒置显微镜观察细胞形态, 拍照后小心吸弃培养液, 加入新鲜基础培养液100  $\mu\text{L}$ 及CCK-8 10  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育2 h, 多功能酶标仪于450 nm处测定吸光度(A)

值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{H}_2\text{O}_2 \text{ 损伤}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

### 2.3 芍药苷给药浓度的确定

采用 CCK-8 法定量检测细胞的活性。将细胞按  $2 \times 10^4$ /孔接种于 96 孔板。细胞分 11 组: 对照组常规加完全培养基, 不加芍药苷; 空白组不接种细胞也不加芍药苷, 加相同体积的培养基; 9 个浓度芍药苷组, 每组 6 个复孔, 细胞培养至对数生长期后, 分别加入芍药苷至终浓度分别为 10、20、40、80、160、320、640、1 280、2 560  $\mu\text{mol/L}$ , 孵育 24 h 后小心吸弃培养液, 加入新鲜基础培养液 100  $\mu\text{L}$  及 CCK-8 10  $\mu\text{L}$ , 37  $^\circ\text{C}$  孵育 2 h, 多功能酶标仪于 450 nm 处测定  $A$  值, 计算细胞存活率。以对细胞无毒性的浓度范围作为实验用浓度范围。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{芍药苷}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

### 2.4 Hoechst 33258 染色法检测 SH-SY5Y 细胞凋亡

根据“2.2”和“2.3”项筛选结果, 将细胞分 5 组: 对照组,  $\text{H}_2\text{O}_2$  损伤模型组, 芍药苷低、中、高浓度组。SH-SY5Y 细胞按照“2.1”项方法培养后, 以每孔 900  $\mu\text{L}$  接种于内置无菌玻片的 24 孔板培养 24 h, 细胞贴壁后加入不同浓度的芍药苷 100  $\mu\text{L}$ , 使其终浓度分别为 10、20、40  $\mu\text{mol/L}$ , 对照组和  $\text{H}_2\text{O}_2$  组加入等量基础培养液。1 h 后除对照组外, 其他各组加入  $\text{H}_2\text{O}_2$  20  $\mu\text{L}$  (终浓度为 200  $\mu\text{mol/L}$ ), 培养 24 h, Hoechst 33258 染色, 激发波长 350 nm, 发射波长 460 nm, 倒置荧光显微镜 ( $\times 400$ ) 下观察、拍照。

### 2.5 碘化丙啶染色、流式细胞仪检测 SH-SY5Y 细胞凋亡和细胞周期

按照“2.4”项分组。细胞接种于 6 孔板, 密度为  $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5/\text{mL}$ , 细胞贴壁后, 芍药苷组加入芍药苷, 使其终浓度分别为 10、20、40  $\mu\text{mol/L}$ , 对照组和  $\text{H}_2\text{O}_2$  损伤模型组加入等量基础培养液。1 h 后除对照组外, 其他各组加入  $\text{H}_2\text{O}_2$  20  $\mu\text{L}$ , 使  $\text{H}_2\text{O}_2$  终浓度为 200  $\mu\text{mol/L}$ , 培养 24 h, 收集细胞, PBS 清洗 2 次。采用预冷的 70% 乙醇固定细胞, 4  $^\circ\text{C}$  过夜, 弃去乙醇, PBS 清洗 2 次, 加入碘化丙啶 0.50 mL 及 RNase 悬浮细胞, 避光孵育 30 min, 流式细胞仪检测样品, 采用 Cell Quest 软件 (Becton) 及 Modifit 软件分析细胞凋亡和细胞周期数据。

### 2.6 双抗体夹心法检测 8-OHdG 的量

用纯化的人 8-OHdG 抗体包被微孔板, 制成固相抗体, 向包被单抗的微孔中依次加入 8-OHdG, 再

与辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的 8-OHdG 抗体结合, 形成抗体-抗原-酶标抗体复合物, 经过彻底洗涤后加底物四甲基联苯胺 (TMB) 显色。TMB 在 HRP 酶的催化下转化成蓝色, 并在酸作用下最终转化成黄色。颜色的深浅和样品中 8-OHdG 的量呈正相关。用酶标仪在 450 nm 波长处测定  $A$  值, 通过标准曲线计算样品中 8-OHdG 的量。

### 2.7 DCFH-DA 法检测 SH-SY5Y 细胞内 ROS

按照“2.4”项分组, 各组细胞给予相应物质后孵育 24 h, 孵育结束前 30 min, 各孔加入 DCFH-DA, 使终浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$ , 于 37  $^\circ\text{C}$  继续孵育 30 min, 收集细胞, PBS 洗 2 次, 细胞计数, 将各组细胞制成相同浓度的细胞悬液。取 100  $\mu\text{L}$  细胞悬液检测荧光强度, 激发波长 485 nm, 发射波长 538 nm。以对照组荧光强度为 100%, 其余各组与对照组荧光强度相比较, 计算胞内 ROS 变化。

### 2.8 INT 显色反应法测定 LDH 的量

参照文献方法<sup>[17]</sup>, 略加改进。按照“2.4”项分组, 另设立空白对照组 (空白对照组不接种细胞), 各组细胞加入相应物质培养 24 h, 取各孔上清 120  $\mu\text{L}$  至新的 96 孔板中, 加 60  $\mu\text{L}$  配好的 LDH 检测工作液, 避光室温孵育 30 min, 在 490 nm 处用多功能酶标仪测定  $A$  值, 计算相对于对照管的 LDH 释放量百分率。

$$\text{LDH 释放率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

### 2.9 Caspase-3 催化特异性底物反应检测 caspase-3 的活性

Caspase-3 可以催化底物 Ac-DEVD-*p*NA (acetyl-Asp-Glu-Val-Asp *p*-nitroanilide) 产生黄色的 *p*NA, 在 405 nm 处有强吸收, 依据朗伯比尔定律, 通过检测  $A$  值可检测 caspase-3 的活性。按照“2.4”项分组, 细胞给予相应物质后孵育 24 h, 胰酶消化, 收集细胞, PBS 洗涤后加入细胞裂解液, 重悬沉淀, 在冰浴上裂解细胞 15 min, 4  $^\circ\text{C}$ 、6 000  $\times g$  离心 10 min, 转移上清至冰浴预冷的另一离心管中。移取少量样品用 Bradford 法测定蛋白, 按照试剂盒说明书测定 caspase-3 的活性。

一个酶活力单位定义为当底物饱和时, 在 37  $^\circ\text{C}$  可以剪切 1 nmol Ac-DEVD-*p*NA 产生 1 nmol *p*NA 的 caspase-3 的量。

### 2.10 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 组间比较采用单因素方差分析。

### 3 结果

#### 3.1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 SH-SY5Y 细胞损伤所需浓度和时间的确定

对照组 SH-SY5Y 细胞生长良好, 为梭型或椭圆形, 树枝状轴突明显, 细胞透亮。模型组 SH-SY5Y 细胞随培养时间的延长和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度的升高, 损伤程度逐渐加重, 细胞密度不同程度地降低, 轴突消失, 胞膜破裂, 细胞皱缩, 细胞间隙增大, 成片细胞间出现空白。结果见图 1。

除 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 12.5 μmol/L 组外, 与对照组相比, 其余各浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 SH-SY5Y 细胞 24 h 后, 细胞活力均显著下降 ( $P < 0.05, 0.01$ ); 200 μmol/L 作用细胞 24 h 后, 细胞增殖抑制率约 35%, 此时细胞受

损, 但无大量死亡, 因此 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 SH-SY5Y 细胞损伤的条件确定为 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 终浓度 200 μmol/L, 作用细胞 24 h。结果见表 1。

#### 3.2 芍药苷给药浓度的确定

芍药苷 10~2 560 μmol/L 作用于 SH-SY5Y 细胞, 在 10~40 μmol/L 对 SH-SY5Y 细胞无毒性 (图 2), 因此选择 10、20、40 μmol/L 进行以下实验。

#### 3.3 芍药苷对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的 SH-SY5Y 细胞活力的影响

与对照组相比, 模型组 SH-SY5Y 细胞经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后, 细胞活力显著减弱 ( $P < 0.01$ ), 细胞存活率为 65%。与模型组相比, 芍药苷 10、20、40 μmol/L 组 SH-SY5Y 细胞存活率显著提高, 分别为 80%、85%、86% ( $P < 0.05$ ), 提示芍药苷能剂量相关地改

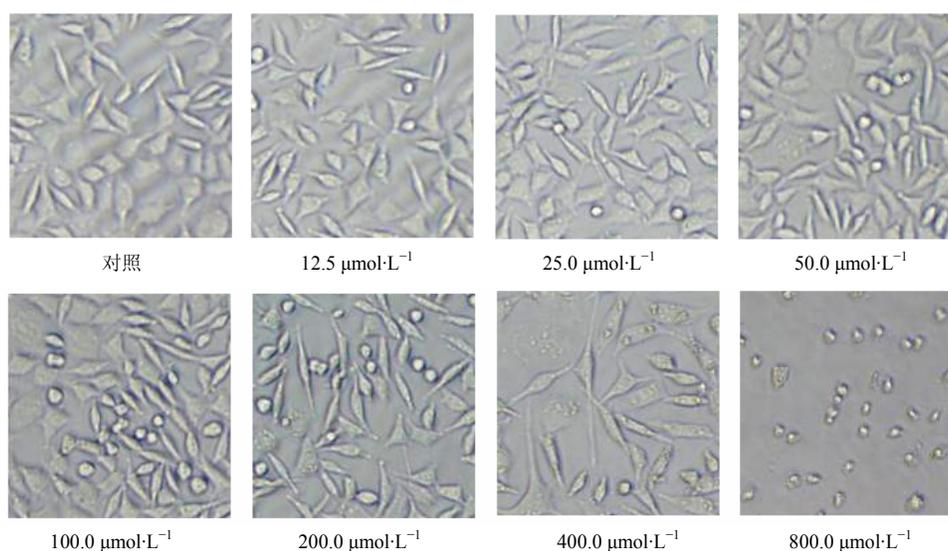


图 1 不同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对 SH-SY5Y 细胞形态的影响

Fig. 1 Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at different concentration on cell morphology in SH-SY5Y cells

表 1 不同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对 SH-SY5Y 细胞活力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 1 Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at different concentration on cell viability in SH-SY5Y cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	C / (μmol·L <sup>-1</sup> )	细胞存活率 / %					
		1 h	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h
对照	—	100.0 ± 1.0	100.0 ± 0.8	100.0 ± 0.7	100.0 ± 0.6	100.0 ± 0.8	100.0 ± 0.8
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	12.5	99.6 ± 0.5	99.1 ± 0.9	99.0 ± 0.9	98.0 ± 0.5	98.3 ± 0.6	98.4 ± 1.6
	25.0	99.3 ± 1.2	95.4 ± 1.1	95.1 ± 1.1	95.3 ± 0.6	96.0 ± 0.6	94.8 ± 0.7*
	50.0	97.0 ± 0.7	94.0 ± 0.9*	89.8 ± 1.2**	88.8 ± 1.2**	86.1 ± 1.0**	87.8 ± 1.2**
	100.0	95.0 ± 0.8	90.8 ± 0.9**	86.8 ± 1.8**	83.5 ± 1.2**	76.4 ± 0.9**	74.5 ± 1.1**
	200.0	93.6 ± 0.9**	80.4 ± 8.4**	79.5 ± 1.0**	78.2 ± 1.0**	66.8 ± 0.9**	65.3 ± 0.8**
	400.0	93.4 ± 0.8**	77.4 ± 1.1**	75.5 ± 0.8**	68.2 ± 0.8**	58.6 ± 1.6**	58.0 ± 1.4**
	800.0	92.4 ± 0.8**	69.7 ± 0.9**	66.7 ± 1.3**	61.5 ± 0.6**	39.4 ± 1.4**	39.5 ± 0.1**

与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs control group

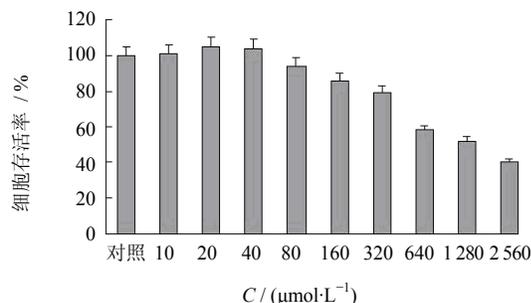


图2 不同浓度芍药苷对 SH-SY5Y 细胞活力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 2 Effect of PF at different concentration on cell viability in SH-SY5Y cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

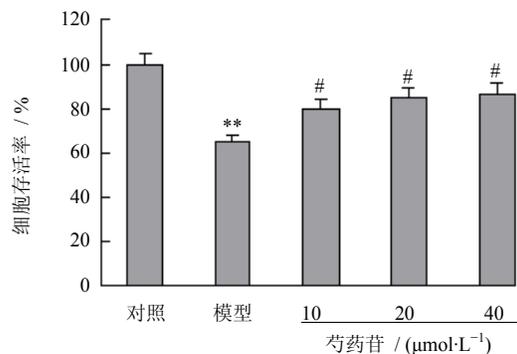
善 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对 SH-SY5Y 细胞增殖的抑制。结果见图 3。

### 3.4 芍药苷对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响

对照组 SH-SY5Y 细胞经 Hoechst 33258 染色后核出现弥漫均匀的低强度蓝色荧光。模型组 SH-SY5Y 细胞核则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。芍药苷各浓度组 SH-SY5Y 细胞固缩形态和颗粒状荧光显著减少，且呈浓度相关性，40 μmol/L 组 SH-SY5Y 细胞形态基本接近正常。结果见图 4。

### 3.5 芍药苷对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的 SH-SY5Y 细胞周期的影响

与对照组相比，模型组 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期 SH-SY5Y 细胞



与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$ , 图 6、7、8 同  
\*\* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.05$  vs model group, same as Figs. 6, 7, and 8

图3 芍药苷对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的 SH-SY5Y 细胞活力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 3 Effect of PF on cell viability in SH-SY5Y cells with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced injury ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

显著增加 ( $P < 0.05$ ), S、G<sub>2</sub>/M 期细胞数、PI 显著降低 ( $P < 0.05$ )。与模型组相比，芍药苷 20、40 μmol/L 组 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞显著减少 ( $P < 0.05$ ), S 期细胞、PI 显著增加 ( $P < 0.05$ ), 20 μmol/L 组 G<sub>2</sub>/M 期细胞、PI 显著增加 ( $P < 0.05$ ); 10 μmol/L 组 SH-SY5Y 细胞周期、PI 无显著变化。结果见表 2、图 5。提示芍药苷在 20~40 μmol/L 对 SH-SY5Y 细胞周期

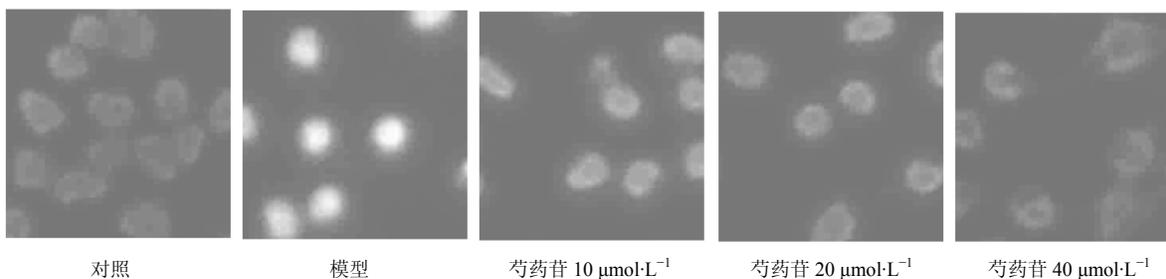


图4 各组 SH-SY5Y 细胞凋亡的 Hoechst 33258 染色观察

Fig. 4 Hoechst 33258 staining of apoptosis in SH-SY5Y cells in each group

表2 芍药苷对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的 SH-SY5Y 细胞周期的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effect of PF on cell cycle of SH-SY5Y cells with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced injury ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	C / (μmol·L <sup>-1</sup> )	细胞周期 / %			PI / %
		G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> 期	S 期	G <sub>2</sub> /M 期	
对照	—	34.7 ± 1.0	40.8 ± 1.4	24.5 ± 0.5	65.3 ± 2.9
模型	—	48.4 ± 2.6*	32.4 ± 2.1*	19.2 ± 0.5*	51.6 ± 5.1*
芍药苷	10	46.1 ± 1.2	33.6 ± 2.3	20.3 ± 1.2	53.9 ± 4.6
	20	42.2 ± 1.6#	36.6 ± 2.0#	21.4 ± 0.8#	58.0 ± 4.0#
	40	39.6 ± 2.1#	39.5 ± 1.4#	20.9 ± 0.8	60.4 ± 4.2#

与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$ , 图 9 同

\* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs model group, same as Fig. 9

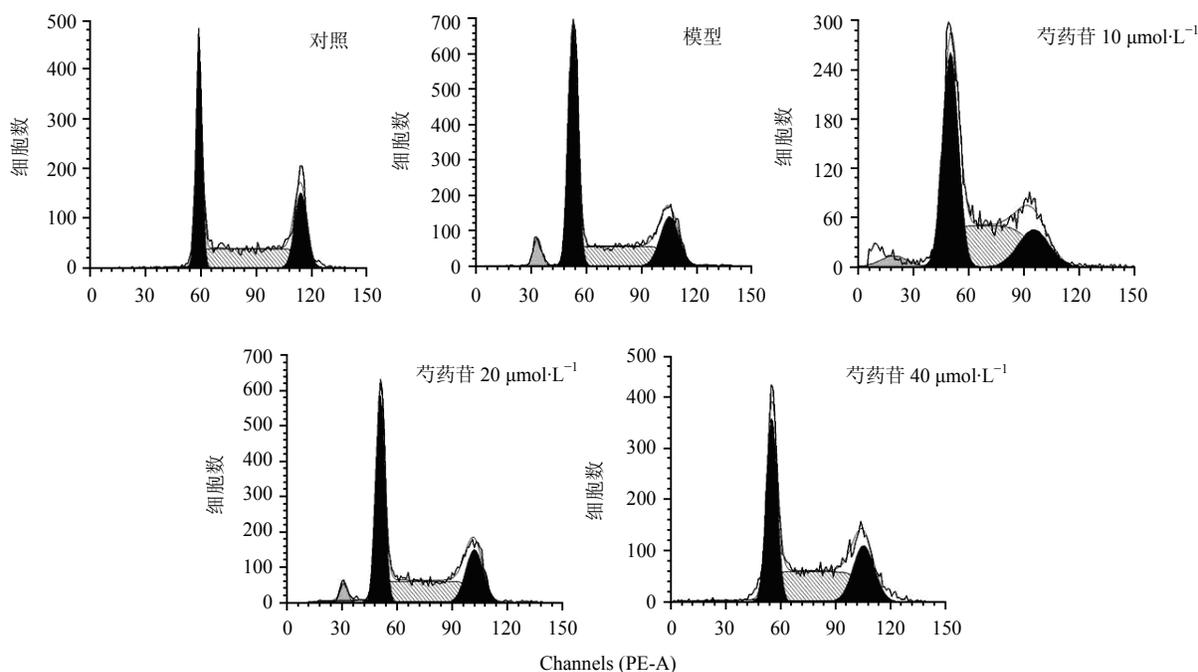


图5 芍药苷对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤的SH-SY5Y细胞周期的影响

Fig. 5 Effect of PF on cell cycle of SH-SY5Y cells with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced injury

的影响可能是其减轻 SH-SY5Y 细胞凋亡的原因之一。芍药苷 10 μmol/L 减弱 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 致 SH-SY5Y 细胞凋亡与 G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>、S 和 G<sub>2</sub>/M 期细胞数量无显著相关性。

### 3.6 芍药苷对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的 SH-SY5Y 细胞中 8-OHdG 的影响

8-OHdG 是 DNA 氧化损伤的特异产物,是公认的内源及外源性因素对 DNA 氧化损伤的生物标志物<sup>[10]</sup>。与对照组相比,模型组 SH-SY5Y 细胞培养液上清液中 8-OHdG 的量增加 ( $P < 0.01$ )。与模型组相比,芍药苷 20、40 μmol/L 组可显著减少 8-OHdG 量的增加 ( $P < 0.05$ ); 10 μmol/L 组 8-OHdG 的量则无显著差异。结果见图 6。

### 3.7 芍药苷对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的 SH-SY5Y 细胞内 ROS 量的影响

与对照组相比,模型组 SH-SY5Y 细胞经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 24 h 后,二氯荧光素 (DCF) 信号显著增强。与模型组相比,芍药苷 20、40 μmol/L 组 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 DCF 荧光信号增强得到显著抑制 ( $P < 0.05$ ),提示芍药苷可以显著抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 SH-SY5Y 细胞内 ROS 的增加。结果见图 7。

### 3.8 芍药苷对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的 SH-SY5Y 细胞 LDH 释放的影响

与对照组相比,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组 SH-SY5Y 细胞 LDH

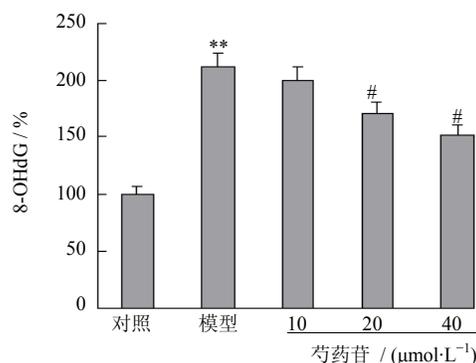


图6 芍药苷对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤的SH-SY5Y细胞8-OHdG释放的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Fig. 6 Effect of PF on 8-OHdG release in SH-SY5Y cells with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced injury ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

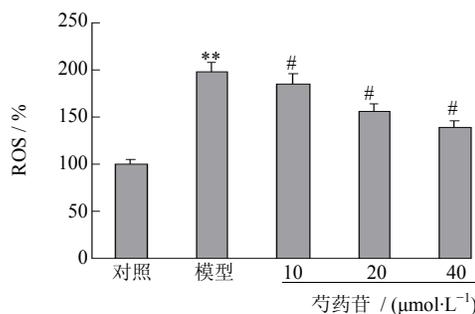


图7 芍药苷对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤的SH-SY5Y细胞ROS量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 7 Effect of PF on ROS level in SH-SY5Y cells with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced injury ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

释放量增加 60% ( $P < 0.01$ )。与模型组相比,芍药苷 20、40  $\mu\text{mol/L}$  组。SH-SY5Y 细胞 LDH 的释放量均显著减少 ( $P < 0.05$ ); 而 10  $\mu\text{mol/L}$  组的变化不明显。结果见图 8。

### 3.9 芍药苷对 $\text{H}_2\text{O}_2$ 损伤的 SH-SY5Y 细胞 caspase-3 活性的影响

与对照组相比,模型组 SH-SY5Y 细胞 caspase-3 的活性明显增强 ( $P < 0.05$ )。芍药苷 10~40  $\mu\text{mol/L}$  使 SH-SY5Y 细胞 caspase-3 的活性呈下降趋势 ( $P < 0.05$ ), 并呈浓度相关性。结果见图 9。

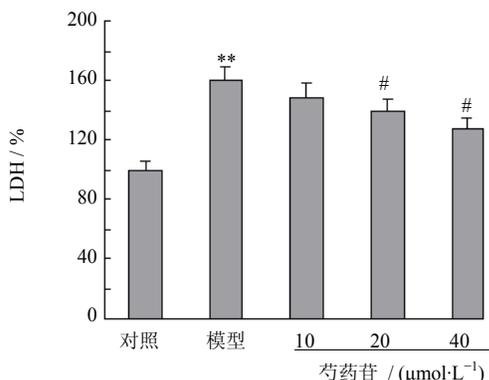


图 8 芍药苷对  $\text{H}_2\text{O}_2$  损伤的 SH-SY5Y 细胞 LDH 释放的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 8 Effect of PF on LDH release in SH-SY5Y cells with  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced injury ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

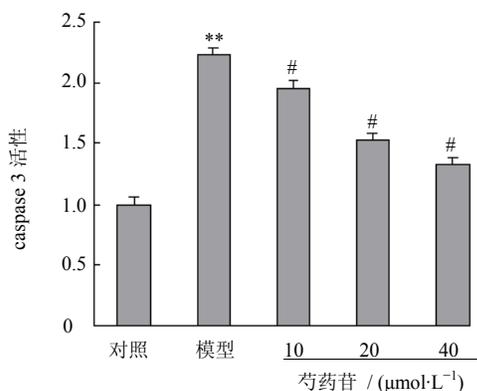


图 9 芍药苷对  $\text{H}_2\text{O}_2$  损伤的 SH-SY5Y 细胞 caspase-3 活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Fig. 9 Effect of PF on activities of caspase 3 in SH-SY5Y cells with  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced injury ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

## 4 讨论

活性氧介导的氧化应激损伤在神经退行性疾病中起重要作用<sup>[5]</sup>, 具有清除自由基活性的物质可以保护细胞免受氧化损伤<sup>[8]</sup>。  $\text{H}_2\text{O}_2$  是体内代谢产生的一种 ROS, 能够与多种生物靶标分子 (如 DNA、

蛋白、脂质) 反应, 可以透过细胞膜<sup>[8]</sup>, 因此本实验以  $\text{H}_2\text{O}_2$  作用于体外培养的 SH-SY5Y 细胞, 造成氧化损伤模型, 排除在体情况下缺氧伴发的酸中毒、高碳酸血症等诸多因素的影响。SH-SY5Y 细胞广泛用于研究氧化应激诱导的神经细胞损伤模型<sup>[19]</sup>。

本研究首先采用 CCK-8 试剂盒对  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤所需浓度和时间进行检测。结果表明,  $\text{H}_2\text{O}_2$  200  $\mu\text{mol/L}$  作用细胞 24 h 后, 对细胞活力的抑制率为 35%, 该浓度下有一定比例的细胞凋亡, 但非大量死亡, 所以选用 200  $\mu\text{mol/L}$  的  $\text{H}_2\text{O}_2$  造模。Caspase-3 活性在细胞凋亡中起关键作用, 可进一步诱导细胞凋亡; ROS 可引起细胞多靶点效应, 损伤 DNA, 引起细胞周期阻滞。加入  $\text{H}_2\text{O}_2$  前以芍药苷 10~40  $\mu\text{mol/L}$  预处理, 可明显减轻  $\text{H}_2\text{O}_2$  造成的 SH-SY5Y 细胞损伤, 减轻上述指标的变化, 其对 SH-SY5Y 细胞氧化损伤的保护作用可能与抗氧化、修复线粒体损伤、改变细胞周期构成比和抑制线粒体 caspase 凋亡通路激活有关。研究结果提示, 芍药苷对于氧化应激相关的神经退行性疾病可能具有治疗作用。

## 参考文献

- [1] Friedlander R M. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases [J]. *New England J Med*, 2003, 348(14): 1365-1375.
- [2] Beal M F. Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration [J]. *Ann Neurol*, 2005, 58(4): 495-505.
- [3] Li C R, Zhou Z, Zhu D, et al. Protective effect of paeoniflorin on irradiation-induced cell damage involved in modulation of reactive oxygen species and the mitogenactivated protein kinases [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39(2): 426-438.
- [4] 郭宏举, 史宁, 陈乾, 等. 褐藻多糖硫酸酯对  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导皮层神经元氧化应激损伤保护作用 [J]. *中草药*, 2012, 43(5): 962-964.
- [5] Abeliovich A. Parkinson's disease: Mitochondrial damage control [J]. *Nature*, 2010, 463(7282): 744-745.
- [6] Lin M T, Beal M F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases [J]. *Nature* 2006, 443(7113): 787-795.
- [7] ZHANG F J, Yang J Y, Mou Y H, et al. Oligomeric procyanidins induce generation of reactive oxygen species and collapse of mitochondrial membrane potential in glioblastoma cell lines [J]. *Chin Herb Med*, 2009, 1(1): 45-52.
- [8] 陈红艳, 耿淼, 胡亚卓. 过氧化氢对 SH-SY5Y 细胞

- 线粒体膜电位的影响 [J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(15): 1665-1667.
- [9] 冯波, 王蓉, 盛树力. 神经退行性疾病研究中拟神经细胞模型: 人神经母细胞瘤株 SH-SY5Y 的来源特性及应用 [J]. 临床康复, 2006, 10(6): 121-123.
- [10] Zhang H A, Gao M, Zhang L, *et al.* Salvianolic acid A protects human SH-SY5Y neuroblastoma cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced injury by increasing stress tolerance ability [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 421(3): 479-483.
- [11] Rhee S G. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a necessary evil for cell signaling [J]. *Science*, 2006, 312(5782): 1882-1883.
- [12] 宋丽, 张宁, 徐德生. 芍药苷在 Caco-2 细胞模型中吸收机制的研究 [J]. 中草药, 2008, 39(1): 41-44.
- [13] Mao Q Q, Tsai S H, Ip S P, *et al.* Antidepressant-like effects of peony glycosides in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 119(2): 272-275.
- [14] Cui G Z. Study on the antidepressant-like effect of paeoniflorin [J]. *Mod Pharm Clin*, 2009, 24(4): 231-233.
- [15] Xiao L, Wang Y Z, Liu J, *et al.* Effects of paeoniflorin on the cerebral infarction, behavioral and cognitive impairments at the chronic stage of transient middle cerebral artery occlusion in rats [J]. *Life Sci*, 2005, 78(4): 413-420.
- [16] Zhong S Z, Ge Q H, Li Q, *et al.* Peoniflorin attenuates Abeta (1-42)-mediated neurotoxicity by regulating calcium homeostasis and ameliorating oxidative stress in hippocampus of rats [J]. *J Neurol Sci*, 2009, 280(1/2): 71-78.
- [17] Cao B Y, Yang Y P, Luo W F, *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.
- [18] Ruffels J, Griffin M, Dickenson J M. Activation of ERK1/2, JNK and PKB by hydrogen peroxide in human SH-SY5Y neuroblastoma cells: Role of ERK1/2 in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death [J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, 483(2/3): 163-173.