

• 基础研究 •

松果菊苷对 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞氧化应激损伤的保护作用福建中医药大学附属第二人民医院 (福州 350001) 章尤权 陈旭征¹ 林 瑶²

【摘要】目的 探讨松果菊苷 (Echinacoside, ECH) 对 1-甲基-4-苯基吡啶离子 (MPP⁺) 诱导的人神经母细胞瘤细胞 (SH-SY5Y) 细胞氧化应激损伤的影响及机制。**方法** 选取对数生长期的 SH-SY5Y 细胞分为对照组 (正常培养, 不给予任何试剂干预)、MPP⁺ 组 (500 $\mu\text{mol/L}$ MPP⁺ 处理细胞 24 h)、ECH 组 (1、3、10、30 $\mu\text{mol/L}$ ECH 预处理细胞 24 h 后加 500 $\mu\text{mol/L}$ MPP⁺ 处理细胞 24 h)。CCK8 检测细胞存活率, 倒置相差显微镜观察细胞形态, Hoechst33342 荧光染色法观察凋亡细胞, 化学比色法检测抗氧化酶 SOD、CAT 活力以及脂质过氧化物丙二醛 MDA 含量。**结果** 与对照组相比, MPP⁺ 组细胞存活率显著下降; 细胞生长状态明显变差; 细胞内抗氧化酶 SOD 和 CAT 活力显著下降, MDA 含量显著升高; 出现明显细胞凋亡现象。松果菊苷预处理 SH-SY5Y 细胞 24 h 后, 与 MPP⁺ 组比较, 细胞存活率显著上升; 细胞生长状态明显好转; 细胞内 SOD、CAT 活力显著上升, MDA 含量明显减少; 细胞凋亡现象明显缓解。**结论** 松果菊苷对 MPP⁺ 诱导氧化应激损伤的 SH-SY5Y 细胞具有保护作用, 可通过增强细胞内源性抗氧化酶的活力、抑制脂质过氧化物的生成来抑制细胞凋亡。

【关键词】 松果菊苷; 氧化应激; 细胞凋亡; 帕金森病

【中图分类号】 R741 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2021)04-0126-03

Protective effect of Echinacoside on oxidative stress injury induced by MPP⁺ in SH-SY5Y cells ZHANG You-quan, CHEN Xuzheng, LIN Yao. *The Second People's Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350122, China*

【Abstract】Objective To investigate the effects of Echinacoside (ECH) on oxidative stress injury induced by MPP⁺ in SH-SY5Y cells and its mechanism. **Methods** SH-SY5Y cells in logarithmic growth phase were divided into control group (normal culture, without any reagent intervention), MPP⁺ group (500 $\mu\text{mol/L}$ MPP⁺ treated cells for 24 h), and ECH group (1, 3, 10, 30 $\mu\text{mol/L}$ ECH pretreated cells for 24 h and 500 $\mu\text{mol/L}$ MPP⁺ treated cells for 24h). The survival rate of cells was determined by CCK8, and cell morphology was observed by inverted phase contrast microscope. The activities of antioxidant enzymes SOD and CAT and the content of lipid peroxide malondialdehyde (MDA) were determined by chemical colorimetry. The apoptotic cells were observed by Hoechst33342 fluorescence staining. **Results** Compared with the control group, the survival rate of MPP⁺ group was significantly decreased; the cell growth status was significantly worse. The activities of SOD and CAT in cells were significantly decreased, while the content of MDA was significantly increased. There was obvious apoptotic phenomenon. The survival rate of SH-SY5Y cells pretreated with ECH for 24 h was significantly higher than that of MPP⁺ group. The cell growth state was improved obviously. The activities of SOD and CAT increased significantly, while the content of MDA decreased significantly. Apoptosis was significantly alleviated. **Conclusion** ECH could protect SH-SY5Y cells from oxidative stress injury induced by MPP⁺, and inhibit cell apoptosis by enhancing the activity of endogenous antioxidant enzymes and inhibiting the generation of lipid peroxides.

【Key words】 echinacoside; oxidative stress; apoptosis; Parkinson's disease

松果菊苷 (ECH) 是从传统中药肉苁蓉中提取的一种苯乙醇苷类化合物, 是肉苁蓉中最主要的活性成分, 含量可达 30%。肉苁蓉主要分布于陆地和热荒漠, 有补阳、益精血、润肠通便、延缓衰老、提高免疫力等功效, 被誉为“沙漠人参”^[1]。现代药理学研究已证实 ECH 在肉苁蓉的诸多药用功能中发挥了重要作用, 包括抗氧化、抗衰老、抗炎、抗肿瘤、改善学习记忆以及免疫调节等作用^[2]。本实验采用被广泛使用的 1-甲基-4-苯基吡啶离子 (MPP⁺) 诱导人神经母

细胞瘤 SH-SY5Y 细胞氧化应激损伤为帕金森病 (PD) 细胞模型, 探讨 ECH 对神经细胞氧化损伤的保护作用及其机制, 为寻求预防和控制 PD 的天然药物提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料: SH-SY5Y 细胞株, 购自中国科学院上海细胞生物研究所。ECH (货号 HY-N0020, 美国 MCE); MPP⁺ (货号 D048, 美国 Sigma); 高糖 DMEM 培养基 (货号 C11995500BT)、胎牛血清 (货号 10099-141C)、胰酶 (货号

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (81804156); 福建省自然科学基金项目 (2018J01882)

1 福建中医药大学中西医结合研究院 福建省中西医结合老年性疾病重点实验室; 2 通信作者, 福建中医药大学中西医结合学院, Email: 55380098@qq.com

25200056) 均购自美国 Gibco 公司; 双抗 (货号 SV30010, Hyclone); CCK8 (货号 AMJ-KT0001, 艾美捷科技); 超氧化物歧化酶测定试剂盒 (货号 A001-1-1)、过氧化氢酶测定试剂盒 (货号 A007-1-1)、丙二醛测定试剂盒 (货号 A003-1-1) 均购自南京建成生物工程研究所; Hoechst33342 染色液 (货号 C1026, 碧云天)。CO₂ 培养箱 (型号 3111, 美国 Thermo Fisher Scientific); 荧光倒置相差显微镜 (型号 DFC425, 德国 LEICA); Countstar 自动细胞计数仪 (型号 IC1000, 上海睿钰生物技术有限公司); 低速台式离心机 (型号 TDZ4A-WS, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); 酶标仪 (型号 Multiskan FC, 美国 Thermo Fisher Scientific); 超净工作台 (型号 SW-CJ-1FD, 苏净集团苏州安泰空气技术有限公司)。

1.2 方法:

1.2.1 细胞培养与分组: SH-SY5Y 细胞置于含 15% 胎牛血清、1% 青链霉素的高糖 DMEM 培养液中, 在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱培养, 细胞汇合到 80% 时进行传代, 选取对数生长期的细胞进行实验。将细胞分为对照组 (正常培养, 不给予任何试剂干预)、MPP⁺ 组 (500 μmol/L MPP⁺ 处理细胞 24 h)、ECH 组 (1、3、10、30 μmol/L ECH 预处理细胞 24 h 加 500 μmol/L MPP⁺ 处理细胞 24 h)。倒置相差显微镜观察细胞形态。

1.2.2 CCK8 检测细胞存活率: 调整细胞密度为 1×10^5 / mL 接种于 96 孔板, 每孔 100 μL 细胞悬液, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 24 h 后, 各组给予相应药物处理。每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 在培养箱孵育 2 h, 用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度值 (A 值), 按公式细胞存活率 % = $[A_{(实验组)} - A_{(调零)}] / [A_{(对照组)} - A_{(调零)}] \times 100\%$ 计算细胞存活率。

1.2.3 Hoechst33342 染色观察细胞凋亡: 将 SH-SY5Y 细

胞接种于 6 孔板, 分组处理后每孔加入 1 mL 4% 多聚甲醛固定 10 min。弃 4% 多聚甲醛, PBS 清洗两遍, 随后每孔加入少许 Hoechst33342 染色液覆盖住细胞, 37 °C 避光孵育 15 min。弃染色液, PBS 清洗两遍, 荧光显微镜下观察。

1.2.4 化学比色法检测细胞内 SOD、CAT 活力和 MDA 含量: 将 SH-SY5Y 细胞接种于 6 孔板, 分组处理后收集并裂解细胞, 离心取上清液。按照相应的试剂盒说明书操作测定细胞内超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 活力和丙二醛 (MDA) 含量。

1.3 统计学分析: 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 组间两两比较采用最小显著性差异法检验。显著性水平 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 ECH 预处理可以增加 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞的存活率: SH-SY5Y 细胞经 500 μmol/L MPP⁺ 处理 24 h 后, 细胞活力从 $(100.00 \pm 4.71)\%$ 显著下降到 $(73.51 \pm 3.91)\%$, ($P < 0.01$)。1 μmol/L ECH 预处理后, 细胞活力无显著性变化 [$(73.51 \pm 3.91)\%$ vs. $(76.41 \pm 8.83)\%$, $P > 0.05$]; 而当给药浓度上升到 3、10、30 μmol/L 时, SH-SY5Y 细胞活力分别上升到 $(91.29 \pm 3.67)\%$ 、 $(93.47 \pm 6.36)\%$ 和 $(97.35 \pm 9.03)\%$, 具有一定的浓度依赖性。选取浓度为 3 μmol/L 的 ECH 进入下游试验。

2.2 ECH 预处理能改善 MPP⁺ 诱导氧化损伤的 SH-SY5Y 细胞的形态: 如图 1 所示, 对照组细胞呈三角形或棱形, 贴壁细胞数量较多, 细胞突起明显, 细胞间衔接紧密; MPP⁺ 处理后, 贴壁细胞数量明显减少, 突起结构回缩, 细胞皱缩呈圆形或椭圆形, 细胞间距增加; 3 μmol/L 的 ECH 预处理后, 贴壁细胞数量比 MPP⁺ 组明显增高, 细胞突起明显, 细胞间衔接增加, 形态与对照组相似。

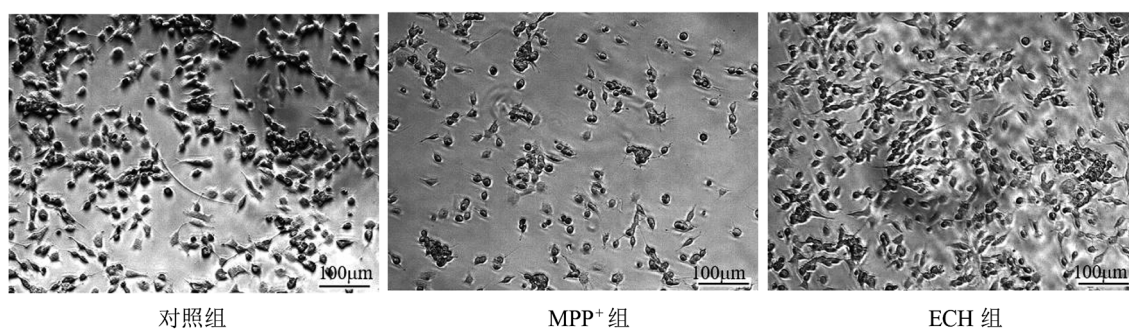


图 1 倒置显微镜观察各组细胞形态学特征 (明场观察 $\times 200$)

2.3 ECH 预处理可以增加 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞的 SOD、CAT 活力, 降低 MDA 含量: 如表 1 所示, 与对照组相比, MPP⁺ 诱导 SH-SY5Y 细胞氧化损伤后, 细胞中抗氧化酶 SOD 活力、CAT 活力显著降低 ($P < 0.05$), 脂质过氧化产物 MDA 含量显著升高 ($P < 0.05$); ECH 干预后, 细胞内的 SOD 活力、CAT 活力均显著升高 ($P < 0.05$), MDA 含量显著降低 ($P < 0.05$)。

2.4 ECH 预处理可以减轻 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡: 如图 2 (见封四) 所示, Hoechst33342 染色后可见对照组细胞核呈弥漫均匀的低强度蓝色荧光, 表明细胞没有发生显著的凋亡现象; MPP⁺ 组细胞染色不均匀, 可见许多浓染致密的颗粒及块状高强度蓝色荧光, 提示出现明显的细胞核固缩、碎裂的凋亡特征性改变; ECH 预处理后, 浓染致密的颗粒荧光及块状荧光减少, 提示凋亡现象有所缓解。

表 1 ECH 对 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞的 SOD、CAT 和 MDA 含量的影响

组别	SOD	CAT	MDA
对照组	549.3±22.73	12.40±3.59	5.46±3.16
MPP ⁺ 组	375.7±55.06 *	5.82±2.42 *	11.46±4.09 *
3 μm ECH 组	620.3±211.1	6.93±5.36	6.84±0.72 #
10 μm ECH 组	639.5±220.6 #	10.97±6.57	4.09±3.20 △
30 μm ECH 组	605.0±158.9	16.65±2.37 #	4.52±2.64 △

注：与对照组相比，* $P < 0.05$ ；与 MPP⁺ 组相比，# $P < 0.05$ ，△ $P < 0.01$ 。

3 讨论

氧化应激 (OS) 是细胞内氧化和抗氧化失衡而导致机体出现的应激损伤状态。在 PD 进展过程中，胶质细胞中的单胺氧化酶 B 增加并生成过氧化氢，过氧化氢可进入邻近的多巴胺能神经元，与中脑黑质致密部高浓度的铁离子反应形成羟基自由基造成 OS，从而降低细胞内源性抗氧化酶如超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 的活性，导致细胞氧化损伤^[3]。

本研究利用 MPP⁺ 建立经典的 SH-SY5Y 细胞氧化损伤模型，分析 ECH 对 SH-SY5Y 细胞氧化损伤的保护作用。实验发现，ECH 可以升高 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞内抗氧化酶活性，减少脂质过氧化物生成，减轻细胞的 OS 水平以及细胞凋亡，维持细胞的正常形态，提示 ECH 可以作为天然抗氧化剂抵抗 OS 引起的细胞损伤。此结果与 Ni, Tao^[4-5] 等学者的研究结论一致。

目前，对 PD 的治疗主要是通过口服西药左旋多巴来补充减少的多巴胺，但这种治疗方案并不修复受损的神经细

胞。随着病程的进展，神经细胞丢失越来越多，导致长期口服左旋多巴治疗效果并不理想，且用药后期也易出现开关现象等并发症。因此，结合 PD 的发病机制和治疗现状，在祖国中药中寻找天然抗氧化剂靶向治疗来预防或减轻神经细胞 OS 水平、保护神经细胞是预防和控制 PD 发生发展的重要策略。

本研究表明，ECH 可有效缓解 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞 OS 损伤，具有潜在预防由 OS 引起的神经退行性疾病如 PD 的应用价值。ECH 具体是否激活某种关键蛋白或者某条信号通路，有待进一步研究证实。

参考文献

- [1] 薛海燕, 焦婵媛, 姚军. 肉苁蓉总苷药理作用的研究现状 [J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34 (4): 486-488.
- [2] Tian X Y, Li M X, Lin T, et al. A review on the structure and pharmacological activity of phenylethanoid glycosides [J]. Eur J Med Chem, 2021, 209: 112563.
- [3] Vera D, Eunsung J, Maral M. The role of oxidative stress in Parkinson's disease [J]. J Parkinsons Dis, 2013, 3 (4): 461-491.
- [4] Ni Y J, Deng J, Liu X, et al. Echinacoside reverses myocardial remodeling and improves heart function via regulating SIRT1/FOXO3a/MnSOD axis in HF rats induced by isoproterenol [J]. J Cell Mol Med, 2021, 25 (1): 203-216.
- [5] Tao Z, Zhang L H, Wu T, et al. Echinacoside ameliorates alcohol-induced oxidative stress and hepatic steatosis by affecting SREBP1c/FASN pathway via PPARα [J]. Food Chem Toxicol, 2021, 148: 111956.

• 基础研究 •

可溶性环氧化物水解酶抑制剂对小鼠内皮祖细胞分泌血管内皮生长因子及缺氧诱导因子-1α 的促进作用

厦门大学附属第一医院心内科 (厦门 361003) 王振河 姜德谦¹ 许丹焰¹ 李卫华 谢 强

【摘要】目的 探讨可溶性环氧化物水解酶抑制剂 (t-AUCB) 能否促进小鼠来源内皮祖细胞 (EPCs) 分泌内皮生长因子 (VEGF) 和缺氧诱导因子-1α (HIF-1α)，及可能的相关机制。**方法** 提取小鼠长骨骨髓，离心分离培养，取得高纯度 EPCs，不同浓度可溶性环氧化物水解酶抑制剂 (t-AUCB) 和过氧化体增殖物激活型受体 γ (PPAR-γ) 阻断剂 GW9662 单独或联合干预 EPCs，Western blot 检测上述 EPCs 体外分泌 VEGF 及 HIF-1α 情况。**结果** 从 0~100 μmol/L，t-AUCB 呈浓度依赖性增强 EPCs 体外分泌 VEGF、HIF-1α 能力，而 5 μmol/L t-AUCB 阻断剂 GW9662 可抑制 EPC 上述功能。1、10、50、100 μmol/L t-AUCB 促进 EPCs 分泌 VEGF、HIF-1α 能力与 0 μmol/L t-AUCB 相比，差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)；GW9662+100 μmol/L t-AUCB 与 100 μmol/L t-AUCB 比较，差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)，与 0 μmol/L t-AUCB 比较，差异也具有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** t-AUCB 可促进 EPCs 分泌 VEGF 及 HIF-1α，其机制可能与激活 PPAR-γ 通路有关。

【关键词】 可溶性环氧化物水解酶抑制剂；t-AUCB；过氧化体增殖物激活型受体 γ；血管内皮生长因子；缺氧诱导因子-

基金项目：福建省卫生厅青年科研课题 (2013-2-84)

1 中南大学湘雅二医院心内科 (410011)