

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.011.003
文章编号: 1005-8982 (2018) 011-0010-05

三七总皂苷对过氧化氢诱导 HT22 细胞 氧化损伤的保护作用 *

韩峰¹, 颜楠², 李侠¹, 费舟¹

[空军军医大学附属医院(西京医院) 1. 神经外科, 2. 检验科, 陕西 西安 710032]

摘要: 目的 研究三七总皂苷(PNS)对氧化氢(H₂O₂)损伤后海马神经元 HT22 细胞的保护作用。**方法** 采用 CCK-8 法检测作用 PNS 后 HT22 细胞后细胞生长活性的变化, 并用 H₂O₂ 刺激 HT22 细胞, 观察 PNS 对 HT22 细胞活性的影响及形态变化。采用乳酸脱氢酶检测细胞损伤情况, 流式细胞仪检测细胞的凋亡比例。**结果** PNS 在有效浓度范围内对 HT22 细胞无毒性, 且能增加细胞活性, 减轻 H₂O₂ 对其损伤程度。**结论** PNS 能通过增强细胞内抗氧化活性, 提高 HT22 细胞的存活率, 从而保护细胞抗氧化损伤。

关键词: 三七总皂苷; HT22 细胞; 氧化损伤

中图分类号: R739.41

文献标识码: A

Protective effect of panax notoginseng saponins on oxidative injury induced by hydrogen peroxide in HT22 cells*

Feng Han¹, Nan Yan², Xia Li¹, Zhou Fei¹

(1. Department of Neurosurgery, 2. Clinical Laboratory, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710032, China)

Abstract: Objective To study the protective effect of panax notoginseng saponins (PNS) on hippocampal neurons HT22 cells after injury by hydrogen peroxide (H₂O₂). **Methods** CCK-8 was used to detect the cell growth activity of HT22 cells after the action of PNS. After stimulation with H₂O₂, the effect of PNS on the activity and morphological changes of HT22 cells were observed. Cell damage was checked using LDH test. Flow cytometry was used to count the percentage of apoptotic cells. **Results** Panax notoginseng saponins had no toxic effect on HT22 cells in effective concentration range, and could enhance the cell vitality, significantly reduce the cell damage caused by H₂O₂. **Conclusions** Panax notoginseng saponins can enhance the intracellular antioxidant activity to enhance the survival rate of HT22 cells, thus protect the cells from oxidative damage.

Keywords: panax notoginseng saponins; HT22 cell; oxidative damage

创伤性脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 具有发生率高、致残率高、死亡率高、治愈率低的特点^[1-3]。TBI 严重威胁人类健康, 是影响人类幸福生活的重要原因。如今, 药物治疗 TBI 一直是国内外学者研究的

热点^[4-6]。三七是我国传统的中药, 始载于《本草纲目》, 因“其叶左三右四, 故名三七”而得名^[7-8]。三七的主要的活性成份是三七总皂苷 (panax notoginseng saponins, PNS)。研究表明, PNS 对神经元细胞损伤具

收稿日期: 2016-11-15

* 基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目 (No: 30930093)

[通信作者] 费舟, E-mail: feizhou@fmmu.com; Tel: 029-84775330

有保护作用^[9],但其具体作用机制还不是很清楚。本研究利用过氧化氢 H₂O₂ 刺激 HT22 细胞,建立体外神经细胞抗氧化刺激模型,研究 PNS 对 HT22 细胞的保护作用,阐明其抗氧化损伤的作用机制,为临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

1.1.1 试剂 PNS(成都华高药业有限公司),海马神经元 HT22 细胞株(空军军医大学附属医院全军神经外科研究所)。胎牛血清、1640 培养基、0.25% 胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司,CCK-8 试剂盒(批号:CK04-1000T)(日本 Dojindo 公司),青霉素、链霉素购自美国 Sigma 公司,乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)(南京建成生物工程研究所)。

1.1.2 仪器 微孔酶联检测仪(美国伯乐公司),Leica 倒置荧光显微镜(德国莱卡相机股份有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 HT22 细胞培养 HT22 细胞在含 10% 胎牛血清、1640 培养基中,置于 37℃、5% 二氧化碳 CO₂ 孵箱中培养,取对数生长期细胞,0.25% 胰蛋白酶消化传代培养,进行后续实验研究。

1.2.2 H₂O₂ 模型的建立 取培养对数期 HT22 细胞,胰酶消化,制备单细胞悬液,计数并接种细胞 1 × 10⁵ 个/ml 于 96 孔板,细胞贴壁后,分别加入 0、50、100、200、400 和 800 μmol/L H₂O₂ 溶液刺激 24 h,加入 CCK-8 10 μL/孔,37℃ 培养箱孵育 1 ~ 4 h。在酶联检测仪 450 nm 处读取光密度值(optical density, OD),实验重复 3 次。细胞活性(%)=[OD_{加药}-OD_{空白}]/[OD_{0加药}-OD_{空白}] × 100%。

1.2.3 PNS 对 HT22 的保护 接种细胞于 96 孔板,每组设 6 个复孔,贴壁后加入 0.00、0.01、0.10、1.00、10.00、100.00 mg/L PNS 作用 24 h 后进行 CCK-8 法检测,实验重复 3 次。

1.2.4 PNS 对氧化应激 HT22 细胞活性的影响 取培养对数期细胞,调整细胞密度至 1 × 10⁵ 个/ml,接种于 96 孔板。分别设空白对照组、对照组(正常细胞培养 HT22),模型组(H₂O₂ 500 μmol/L),同时模型组在分别加入不同浓度(0.00、0.01、0.10、1.00、10.00 和 100.00 mg/L) PNS 作用 2 h 后,再换 500 μmol/L H₂O₂ 作用 24 h,进行 CCK-8 法检测,在 450 nm 处读取 OD 值,实验重复 3 次。

1.2.5 细胞形态学观察 取对数生长期 HT22 细胞进行计数后接种于 6 孔板,当细胞密度汇合至 75% 时,加入 10 mg/L PNS 作用 2 h,加入 500 μmol/L H₂O₂ 损伤细胞,用相差显微镜观察并拍摄细胞形态。

1.2.6 LDH 的释放 收集细胞上清液,按 LDH 说明书进行操作,检测细胞损伤过程中细胞的凋亡和 LDH 的释放,而活细胞没有该功能。细胞 LDH 释放率(%)=细胞培养基中测定的酶活性单位/(细胞裂解液测定的酶活性单位+细胞培养基测定的酶活性单位) × 100%。数值越大,表明细胞活性越差,细胞损伤程度越高。

1.2.7 流式细胞术 分别设对照组、模型组(H₂O₂ 处理组)和 PNS+H₂O₂ 组,收集各组细胞悬液,调整细胞密度至 1 × 10⁶ 个/ml,磷酸盐缓冲溶液清洗 2 次。按照 Annexin V FITC 试剂盒说明书进行操作,分别加入 10 μl Annexin V - FITC 和 5 μl PI 轻柔振荡混匀,4℃ 避光反应 30 min,用流式细胞仪定量分析细胞凋亡水平。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 12.0 统计软件,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组比较用方差分析,方差齐则两两比较用 Dunnett-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 H₂O₂ 对 HT22 细胞生长活性的影响

各组 HT22 细胞生长活性比较,经方差分析,差异有统计学意义($F = 108.257, P = 0.0378$),不同浓度的 H₂O₂ 对 HT22 细胞增殖的影响不同。进一步两两比较经 Dunnett-*t* 检验,50 和 100 μmol/L H₂O₂ 对 HT22 细胞无明显抑制效应($P > 0.05$);200、400 和 800 μmol/L H₂O₂ 对 HT22 细胞诱导 24 h 后,损伤明显,抑制率分别达(16.277 ± 3.315)%(35.043 ± 4.342)%和(73.583 ± 3.403)%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 不同浓度 PNS 对 HT22 细胞活性的影响

各组 HT22 细胞生长活性比较,经方差分析,差异有统计学意义($F = 18.422, P = 0.025$),不同浓度 PNS 对 HT22 细胞均有保护作用,且伴随 PNS 浓度增加,HT22 细胞无明显依赖性。在 0.01 ~ 1.00 mg/L PNS 作用下,HT22 细胞增殖不明显($P > 0.05$),而

PNS 在 10.00 mg/L 浓度时, 能促进 HT22 细胞生长活性 ($P < 0.05$)。当 100.00 mg/L PNS 作用 HT22 细胞时, 具有抑制细胞增殖活性效应 ($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 PNS 对 H₂O₂ 损伤后 HT22 细胞活性的影响

HT22 细胞经 500 μmol/L H₂O₂ 作用后, 细胞生长受抑制。各组 HT22 细胞生长活性比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 31.970, P = 0.003$)。当 PNS 对 HT22 预保护 2 h 后, 发现 0.10 ~ 10.00 mg/L PNS 对 H₂O₂ 损伤均具有保护作用, 且浓度不同, 保护程度不同, 其中 10.00 mg/L PNS 的保护效果最显著 ($P < 0.05$)。而 PNS 在 100 mg/L 时, 对细胞无保护作用, 反而经 H₂O₂ 诱导后会加重细胞损伤, 降低细胞活性。见图 3。

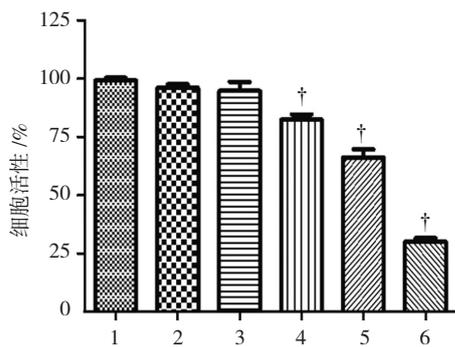
2.4 PNS 对 H₂O₂ 损伤后 HT22 细胞 LDH 含量的影响

H₂O₂ 损伤 HT22 细胞后, 出现大量的细胞裂解, 细胞活性降低, 导致 LDH 含量升高。不同浓度 PNS 对 HT22 细胞进行预保护后, 各组 LDH 含量比

较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 167.536, P = 0.008$), LDH 的释放均降低。与 PNS+H₂O₂ 组 (0.01 ~ 10.00 mg/L PNS) 比较, 随着 PNS 浓度增加, LDH 含量逐渐降低。LDH 检测结果显示, 对照组 LDH 含量较少, 模型组细胞中 LDH 含量是对照组的 7 ~ 8 倍 ($P < 0.05$)。实验结果证实, PNS 能提高 H₂O₂ 诱导下的 HT22 细胞存活率, 对 HT22 细胞具有保护作用。见图 4。

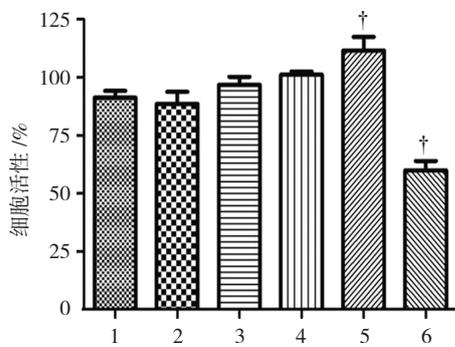
2.5 细胞形态学观察

通过倒置荧光显微镜观察 HT22 细胞形态变化, 发现对照组细胞形态完整, 多呈多边形, 折光性好。经 500 μmol/L H₂O₂ 作用 24 h 后, 细胞形态发生明显改变, 细胞密度降低, 细胞核皱缩。10.00 mg/L PNS 预处理 2 h 后, 加入 500 μmol/L H₂O₂ 作用 24 h 后发现, 与对照组相比细胞密度减少, 但细胞形态有伸展的梭



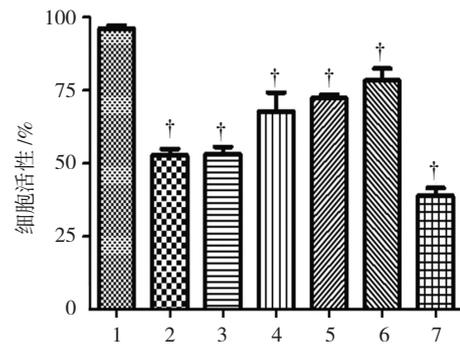
1: 对照组; 2: 50 μmol/L H₂O₂; 3: 100 μmol/L H₂O₂; 4: 200 μmol/L H₂O₂; 5: 400 μmol/L H₂O₂; 6: 800 μmol/L H₂O₂。† 与对照组比较, $P < 0.05$

图 1 不同浓度 H₂O₂ 对 HT22 细胞增殖活性的影响



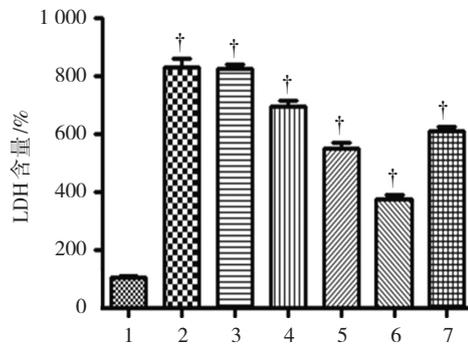
1: 对照组; 2: 0.01 mg/L PNS; 3: 0.10 mg/L PNS; 4: 1.00 mg/L PNS; 5: 10.00 mg/L PNS; 6: 100.00 mg/L PNS。† 与对照组比较, $P < 0.05$

图 2 PNS 对 HT22 细胞的保护效应



1: 对照组; 2: 500 μmol/L H₂O₂; 3: 500 μmol/L H₂O₂ + 0.01 mg/L PNS; 4: 500 μmol/L H₂O₂ + 0.10 mg/L PNS; 5: 500 μmol/L H₂O₂ + 1.00 mg/L PNS; 6: 500 μmol/L H₂O₂ + 10.00 mg/L PNS; 7: 500 μmol/L H₂O₂ + 100.00 mg/L PNS。† 与对照组比较, $P < 0.05$

图 3 PNS 对 H₂O₂ 损伤后 HT22 细胞活性的影响



1: 对照组; 2: 500 μmol/L H₂O₂; 3: 500 μmol/L H₂O₂ + 0.01 mg/L PNS; 4: 500 μmol/L H₂O₂ + 0.10 mg/L PNS; 5: 500 μmol/L H₂O₂ + 1.00 mg/L PNS; 6: 500 μmol/L H₂O₂ + 10.00 mg/L PNS; 7: 500 μmol/L H₂O₂ + 100.00 mg/L PNS。† 与对照组比较, $P < 0.05$

图 4 PNS 对 H₂O₂ 损伤后 HT22 细胞 LDH 含量的影响

形。见图 5。

2.6 细胞凋亡变化

流式细胞术检测发现, 对照组 HT22 细胞几乎没有凋亡, 而 500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用 24 h 后细胞凋亡率升高, 早晚期占 (36.313 \pm 3.623) %, 坏死率为

(4.043 \pm 1.261) %, 10.00 mg/L PNS 预处理 2 h 后, 加入 500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用 24 h, 细胞凋亡率递减, 早晚期占 (15.732 \pm 2.284) %, 坏死率为 (2.042 \pm 0.546) %, 表明 PNS 对 HT22 细胞具有保护作用, 能减轻 H_2O_2 对 HT22 细胞的损伤程度。见图 6。

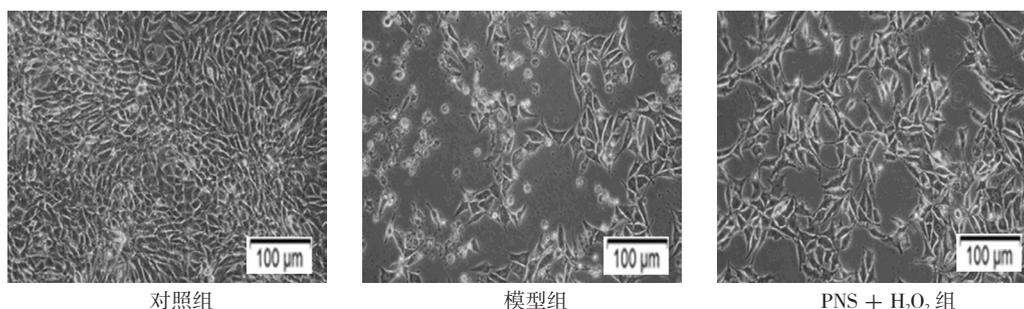


图 5 PNS 对 H_2O_2 损伤后 HT22 细胞形态变化的影响

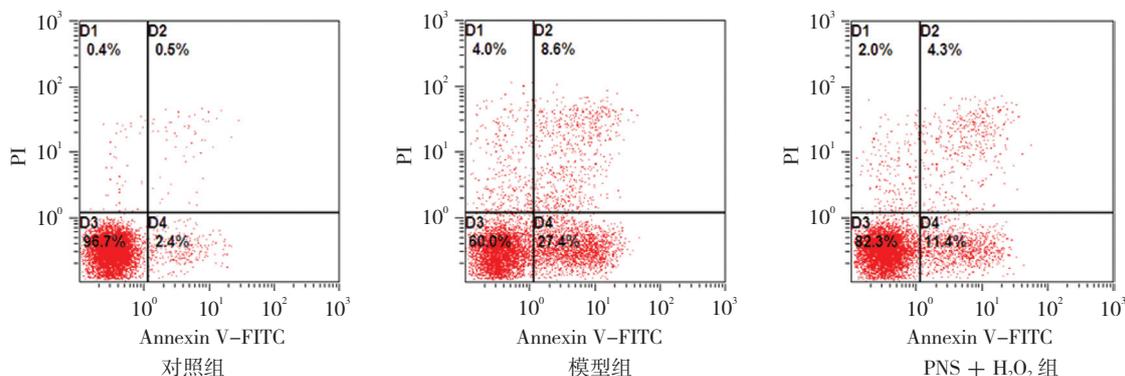


图 6 HT22 细胞凋亡情况

3 讨论

TBI 包括创伤部位的直接损伤和创伤后缺血缺氧、钙通道异常, 以及过氧化病理过程所介导的继发性损伤^[10]。TBI 治疗手段包括手术、亚低温和药物治疗等。目前, 中草药辅助治疗脑损伤已成为国内外研究的热点^[11], 但仍需要研究者不断研究与探讨, 使脑损伤患者能获得更佳的治疗效果。

PNS 具有多方面的药理功效, 不仅具有抗血小板凝聚、溶栓及提高纤溶酶原激活作用, 还能促进造血功能、抑制心肌收缩、扩张脑血管、耐缺氧和抗休克^[12-13]。如今, 三七在镇痛、抗炎、抗肿瘤、抗衰老、提高免疫调节功能方面研究得越来越多^[14-15]。本研究以 H_2O_2 对 HT22 细胞造成损伤, 成功建立缺血性损伤离体模型, 以 PNS 作用 H_2O_2 损伤后的 HT22 细胞, 结果证实 H_2O_2 对 HT22 细胞的损伤, 以及 PNS 对 HT22 细胞的保护。PNS 降低 H_2O_2 对 HT22 细胞的损伤, 以

此保护神经元细胞。

常用的细胞氧化损伤模型有 2 种: H_2O_2 损伤模型和过氧化脂损伤模型, 其中 H_2O_2 的应用最为广泛^[16]。同时 H_2O_2 和细胞的氧化应激 (oxidative stress, OS) 密切相关^[17]。OS 是机体遭受外界刺激后, 体内的氧化和抗氧化作用失衡, 导致体内高活性分子产生逐渐增多, 引起组织细胞损伤, 自由基在体内产生负面作用, 被认为是导致衰老和疾病的一个重要因素^[18]。脑外伤后, 损伤部位的脑组织会产生大量的自由基, 引起神经元水肿和坏死, 造成神经元氧化应激损伤, 是导致继发性脑损伤的重要原因。

总之, 在 HT22 细胞中, PNS 能缓解细胞抗氧化应激能力, 提高细胞内抗氧化酶活性; 而在 H_2O_2 介导的 PNS 中, HT22 细胞 LDH 的释放减少, 与模型组相比, PNS 介导的细胞损伤有所减轻。因此, PNS 能通过增强细胞内抗氧化酶活性, 保护细胞对抗氧化损伤。不断发现新的有效的自由基清除剂和阻断自由基的产

生, 保护受自由基攻击的靶细胞是治疗脑损伤的长期目标。

参 考 文 献:

- [1] 刘晓佳, 李维平, 张秋生, 等. 创伤性颅脑损伤的氧化损伤机制及抗氧化治疗研究进展 [J]. 浙江创伤外科, 2014, 19(2): 345-347.
- [2] 史保中, 江雷振, 曲智锋, 等. 创伤性脑损伤后低钠血症的危险因素分析 [J]. 中国神经精神疾病杂志, 2014, 40(6): 331-335.
- [3] JOHN C A, DAY M W. Central neurogenic diabetes insipidus, syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone, and cerebral salt-wasting syndrome in traumatic brain injury[J]. Crit Care Nurse, 2012, 32(2): e1-e7, e8.
- [4] 只达石, 张赛. 颅脑创伤药物治疗的新进展 [J]. 中华创伤杂志, 2005, 21(1): 50-52.
- [5] 江基尧. 脑保护药物治疗颅脑损伤的现状与展望 [J]. 中华创伤杂志, 2006, 22(4): 241-242.
- [6] 韦相兰, 黄李平, 李凯, 等. 颅脑损伤的中医药治疗进展 [J]. 中国中医急症, 2011, 20(1): 106-108.
- [7] 王海霞. 三七的药理研究与配伍应用 [J]. 家庭心理医生, 2014, 10(1): 169.
- [8] LAU A J, TOH D F, CHUA T K, et al. Antiplatelet and anticoagulant effects of Panax notoginseng: comparison of raw and steamed Panax notoginseng with Panax ginseng and Panax quinquefolium[J]. J Ethnopharmacol, 2009, 125(3): 380-386.
- [9] 夏星, 钟振国, 冯丹霞. 三七总皂苷保护 PC12 细胞对抗过氧化氢损伤的作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(4): 216-219.
- [10] BONDS B W, YANG S, HU P F, et al. Predicting secondary insults after severe traumatic brain injury[J]. Trauma Acute Care Surg, 2015, 79(1): 85-90.
- [11] 肖国民. 创伤性脑损伤多效神经保护药物治疗研究进展 [J]. 健康研究, 2011, 31(1): 54-57.
- [12] 陈英. 三七总甙的药理研究及临床应用进展 [J]. 广西医学, 1998, 20(6): 1109-1112.
- [13] GU Q, YANG X P, BONDE P, et al. Inhibition of TNF-alpha reduces myocardial injury and proinflammatory pathways following ischemia-reperfusion in the dog[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2006, 48(6): 320-328.
- [14] 江刘平, 焦林如. 三七总皂苷的药用生物学活性研究进展 [J]. 氨基酸和生物资源, 2013, 3: 17-21.
- [15] 苏萍, 王蕾, 杜仕静, 等. 三七皂苷对神经系统疾病药理作用机制研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(23): 4516-4521.
- [16] LI W G, MILLER F J, ZHANG H J, et al. H₂O₂-induced O₂ production by a non-phagocytic NAD(P)H oxidase causes oxidant injury[J]. J Biol Chem, 2001, 276(31): 29251-29256.
- [17] 李朝晖, 王芬, 刘水平, 等. 过氧化氢诱导 PC12 细胞损伤的模型的建立 [J]. 法医学杂志, 2007, 23(3): 191-192.
- [18] LI L, DU J, LIAN Y, et al. Protective effects of coenzyme Q10 against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in PC12 cell: the role of Nrf 2 and antioxidant enzymes[J]. Cell Mol Neurobiol, 2016, 36(1): 103-111.

(童颖丹 编辑)