

(2): 109-120.

[12] Marimuthu M, Andiappan M, Wahab A, *et al.* Canonical Wnt pathway gene expression and their clinical correlation in oral squamous cell carcinoma[J]. *Indian J Dent Res*, 2018, 29 (3): 291-297.

[13] Khalil S, Tan G A, Giri D D, *et al.* Activation status of Wnt/ β -catenin signaling in normal and neoplastic breast tissues; relationship to HER2/neu expression in human and mouse[J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e33421.

[14] Kalvik T V, Arnesen T. Protein N-terminal acetyltransferases in cancer[J]. *Oncogene*, 2013, 32(3): 269-276.

[15] 潘泳岐, 高 原, 郝凤霞, 等. C-myc 参与 β -Catenin 介导的肺腺癌 A549/DDP 细胞的化疗耐药的实验研究[J]. 中华临床医师杂志 (电子版), 2013, 7(12): 5408-5414.

[16] 唐于平, 束晓云, 李伟霞, 等. 药对研究 (I) ——药对的形成与发展[J]. 中国中药杂志, 2013, 38 (24): 4185-4190.

芍药苷对氯化钴诱导 PC12 细胞氧化应激损伤的保护作用

雷 昌^{1,2}, 黄 丹^{1,2}, 向 韵^{1,2}, 张秀丽^{1,2}, 孟 盼^{1,2}, 邹蔓姝^{1,2}, 王宇红^{1,2}, 凌成利^{1,2*}

(1. 湖南中医药大学, 湖南省中药粉体与创新药物省部共建国家重点实验室培育基地, 湖南 长沙 410208; 2. 湖南中医药大学科技创新中心, 湖南 长沙 410208)

摘要: **目的** 研究芍药苷对氯化钴诱导 PC12 细胞氧化应激损伤的保护作用。**方法** 芍药苷预先处理 PC12 细胞 1 h, 再加入 CoCl₂ 共孵育 24 h。采用 MTT 法检测 PC12 细胞存活率, 利用 DCFH-DA 探针、Annexin FITC-V/PI 双染法、JC-1 探针检测芍药苷 (100、200 μ g/mL) 对 PC12 细胞 ROS 水平、细胞凋亡率及线粒体膜电位值 (MMP) 的影响。**结果** CoCl₂ 诱导 PC12 细胞 24 h 后, 其半数抑制浓度 (IC₅₀) 为 1.2 mmol/L。与模型组比较, 200 μ g/mL 芍药苷提高 CoCl₂ 诱导 PC12 细胞存活率 (*P*<0.05), 减少细胞内 ROS 水平 (*P*<0.05), 抑制细胞凋亡 (*P*<0.05), 提高 MMP (*P*<0.05)。**结论** 芍药苷对 CoCl₂ 诱导 PC12 细胞氧化应激损伤有显著保护作用。

关键词: 芍药苷; 脑卒中; 氧化应激; 凋亡

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2020)10-2605-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2020.10.012

Protective effects of paeoniflorin on CoCl₂-induced oxidative stress injury of PC12 cells

LEI Chang^{1,2}, HUANG Dan^{1,2}, XIANG Yun^{1,2}, ZHANG Xiu-li^{1,2}, MENG Pan^{1,2}, ZHOU Man-shu^{1,2}, WANG Yu-hong^{1,2}, LING Cheng-li^{1,2*}

(1. Training Bases of Hunan Province & National Ministry Co-founded Key Laboratory for Chinese Materia Medica Powder and Innovative Drugs, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 2. Science and Technology Innovation Center, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

ABSTRACT: AIM To study the protective effects of paeoniflorin on CoCl₂-induced oxidative stress injury of PC12 cells. **METHODS** PC12 cells previously subjected to 1h paeoniflorin pre-treatment were incubated with CoCl₂ for 24 h *in vitro*. PC12 cells had their survival rate detected by MTT method; and their ROS level, cell apoptosis rate and mitochondrial membrane potential (MMP) due to the effect of paeoniflorin (100, 200 μ g/mL)

收稿日期: 2020-02-21

基金项目: 湖南中医药大学中医学国内一流建设学科资助项目 (2018); 湖南中医药大学中医学一级学科开放性基金项目 (2018ZYX48)

作者简介: 雷 昌 (1988—), 男, 硕士, 助理研究员, 从事中药制剂研究。E-mail: 401583231@qq.com

* 通信作者: 凌成利 (1988—), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向为中药新制剂与新工艺。E-mail: 289632020@qq.com

determined by the DCFH-DA probe, Annexin FITC-V/PI double staining method, and JC-1 probe. **RESULTS** The IC₅₀ of PC12 cells was 1.2 mmol/L under 24 h CoCl₂ induction.. Compared with the model group, the group intervened with 200 μg/mL paeoniflorin shared increased survival rate of CoCl₂-induced PC12 cells ($P<0.05$), decreased intracellular ROS level ($P<0.05$), inhibited cell apoptosis ($P<0.05$), and increased MMP ($P<0.05$). **CONCLUSION** Paeoniflorin is significantly protective to CoCl₂-induced oxidative stress injury of PC12 cells.

KEY WORDS: paeoniflorin; ischemia stroke; oxidative stress; apoptosis

芍药苷来源于毛茛科种属，是从白芍和赤芍干燥根提取的主要活性成分，为一种单萜糖苷类化合物，具有抗氧化应激损伤、抗血栓、抗炎、抗高血压、镇痛、抗血小板聚集等作用^[1-2]。有文献表明芍药苷对大鼠缺血性脑卒中引起的细胞氧化应激损伤有显著疗效，可通过 Ca²⁺/CaMK II/CREB 信号通路降低炎症因子表达^[3]，同时也有文献阐述了芍药苷能降低血液黏度、抗血小板聚集、扩张血管、改善微循环、抗氧化、抗惊厥等多种作用效果^[4-5]，故芍药苷在动物体内对不同病理条件诱导的神经细胞损伤有保护作用。温新丽等^[6]揭示了芍药苷对过氧化氢诱导的 SH-SY5Y 细胞氧化应激损伤有显著保护效果，但具体机制不明。因此，本研究在 PC12 细胞存活率基础上，从活性氧自由基 (ROS)、细胞凋亡、MMP 不同机制考察芍药苷对 CoCl₂ 诱导高 PC12 细胞氧化损伤的保护作用，为后续进一步研发作铺垫。

1 材料

1.1 药物与试剂 芍药苷（纯度≥98%，批号 17041401）购自成都普飞德生物科技有限公司。氯化钴（Cobalt chloride, CoCl₂ · 6H₂O，批号 20180724）、ROS 试剂盒（DCFH-DA，编号 S0033）、细胞凋亡试剂盒（批号 100918190307）、线粒体膜电位试剂盒（批号 101118190416）均购自上海碧云天生物技术有限公司；二甲基亚砜（DMSO，批号 20130417）购自湖南汇虹试剂有限公司；MTT [3-（4，5-二甲基噻唑-2）-2，5-二苯基四氮唑溴盐，批号 1015D0510] 购自北京索莱宝科技有限公司；改良高糖细胞培养基（DMEM）和胎牛血清（FBS）均购自四季青生物工程材料有限公司（杭州）；其他试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器 CO₂ 培养箱（型号 3131）、多功能酶标仪（型号 3001-1758）均购自美国赛默飞世尔科技有限公司（上海）；高内涵成像分析系统（型号 operetta）购自美国珀金埃尔默股份有限公司。

2 方法

2.1 PC12 细胞培养 PC12 细胞购自中国科学院细胞库，采用含 10% 胎牛血清（FBS）的 DMEM 培养基，置于 5% CO₂、37 ℃ 培养箱中进行培养。以 1：2 或 1：3 比例进行细胞传代，向培养皿中加入 0.25% Trypsin-EDTA 1.5 mL，消化约 1 min 后在显微镜下观察，发现 PC12 细胞回缩、类圆形，开始脱落，立即加入 2 mL 培养基终止消化，选择对数生长期细胞进行实验。在药物处理阶段，各组（包括正常组）细胞均用不含 FBS 的 DMEM 培养基培养。

2.2 MTT 检测

2.2.1 不同浓度 CoCl₂、芍药苷对 PC12 细胞存活率的影响 将对数生长的 PC12 细胞以 3×10³/孔的浓度接种于 96 孔板上，每孔 0.1 mL，置于培养箱中培养 12 h，待贴壁后分别采用 CoCl₂（0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.5、2.0、3.0 mmol/L）和芍药苷（10、100、200、300、400、500、600、700、800 μg/mL）孵育 24 h，每孔加入 0.5 mg/mL MTT 20 μL，37 ℃ 避光孵育 4 h 后吸弃上清液，加 200 μL DMSO，避光振摇 10 min 使其充分溶解，在 570 nm 波长处测定光密度（OD），细胞存活率 = $\left[\left(OD_{\text{药物组}} - OD_{\text{空白组}} \right) / \left(OD_{\text{正常组}} - OD_{\text{空白组}} \right) \right] \times 100\%$ ，平行 6 个复孔。

2.2.2 芍药苷对 CoCl₂ 诱导的 PC12 细胞存活率的影响 细胞分为正常组（正常 PC12 细胞）、模型组（1.2 mmol/L CoCl₂ 诱导 PC12 细胞 24 h）、芍药苷组（不同浓度芍药苷预先处理 1 h，再加入 1.2 mmol/L CoCl₂ 共孵育 24 h），按“2.2.1”项下方法检测各组细胞存活率。

2.3 ROS 检测 根据 ROS 试剂盒测定细胞内 ROS 水平，荧光探针 DCFH-DA 按 1：1 000 比例用无血清培养基稀释至终浓度为 10 μmol/L。按“2.2.2”项下方法分组接种于 96 孔板内，培养 24 h 后，将培养液换成已稀释好的 DCFH-DA 探针溶液 0.1 mL，37 ℃ 避光孵育 30 min。PBS 洗涤 2 次去

除未进细胞内的荧光探针，采用高内涵成像分析系统检测平均荧光强度（激发波长 488 nm，发射波长 525 nm），各组随机选取 6 个视野，平行 3 个复孔。

2.4 细胞凋亡测定 利用 Annexin V-FITC/PI 双染色法凋亡试剂盒检测 PC12 细胞凋亡，按“2.2.2”项下方法分组接种于 96 孔板内，以凋亡试剂盒操作步骤进行实验，采用高内涵成像分析系统在 488、525 nm 波长下检测平均荧光强度。各组随机选取 6 个视野，计数细胞总数和凋亡细胞数，平行 3 个复孔，计算凋亡率 $[(\text{同一视野下凋亡细胞数}/\text{同一视野下总细胞数}) \times 100\%]$ 。

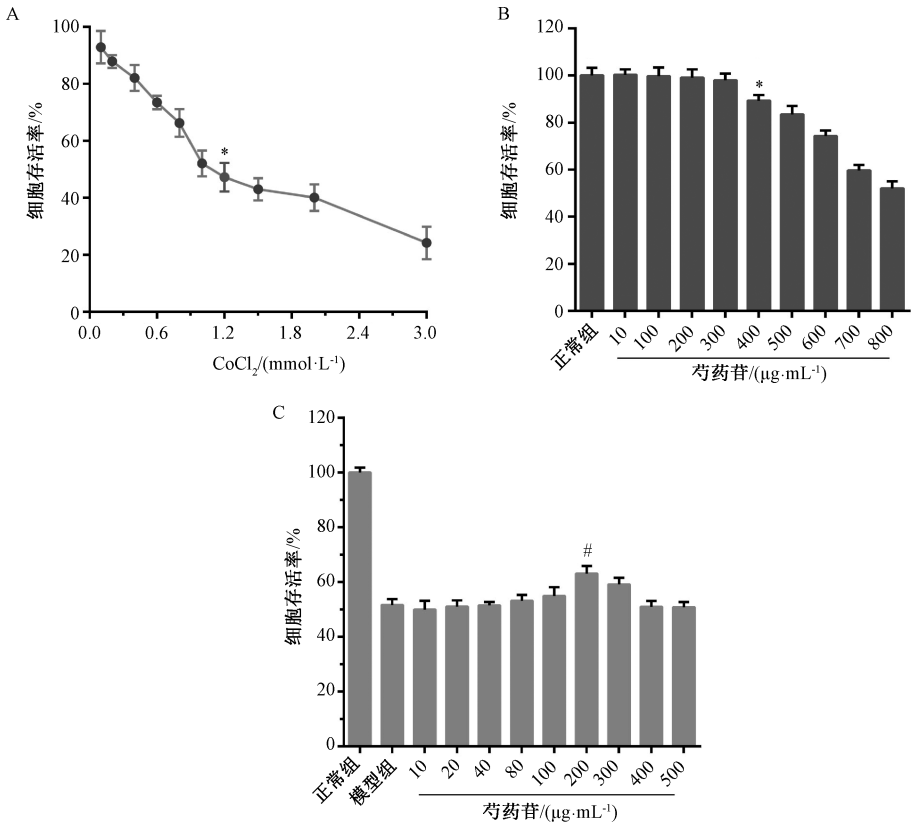
2.5 MMP 测定 取对数生长期 PC12 细胞，按“2.2.2”项下方法分组，按 MMP 试剂盒说明书进行操作。高内涵成像系统检测细胞平均荧光强度（激发波长 490 nm，发射波长 530 nm），各组随机选取 6 个视野，平行 3 个复孔。

2.6 统计学分析 通过 Graphpad Prsim 软件进行

处理，数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示，2 组间比较采用独立样本 t 检验，多组间比较采用单因素方差。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 不同浓度 CoCl_2 对 PC12 细胞存活率的影响 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.5、2.0、3.0 mmol/L CoCl_2 对应细胞存活率分别为 $(92.9 \pm 5.7)\%$ 、 $(87.9 \pm 2.3)\%$ 、 $(82.1 \pm 4.5)\%$ 、 $(73.5 \pm 2.3)\%$ 、 $(66.3 \pm 4.8)\%$ 、 $(52.1 \pm 4.5)\%$ 、 $(47.3 \pm 5.0)\%$ 、 $(43.0 \pm 3.9)\%$ 、 $(40.1 \pm 4.6)\%$ 、 $(24.2 \pm 5.6)\%$ 。图 1A 表明，与正常组 $(100\% \pm 3.2)\%$ 相比， CoCl_2 (0.6~3.0 mmol/L) 可降低 PC12 细胞存活率，减少细胞活性，其浓度为 1.2 mmol/L 时，细胞存活率接近 50% ($P < 0.05$)，即为半数抑制浓度 (IC_{50})。因此，采用 1.2 mmol/L CoCl_2 诱导 PC12 细胞 24 h，作为 PC12 细胞氧化应激损伤的最佳条件。



注：与正常组比较， $\#P < 0.01$ ；与模型组比较， $*P < 0.05$ 。
图 1 芍药苷对 CoCl_2 诱导 PC12 细胞存活率的影响

Fig. 1 Effect of paeoniflorin on the survival rate of CoCl_2 -induced PC12 cells

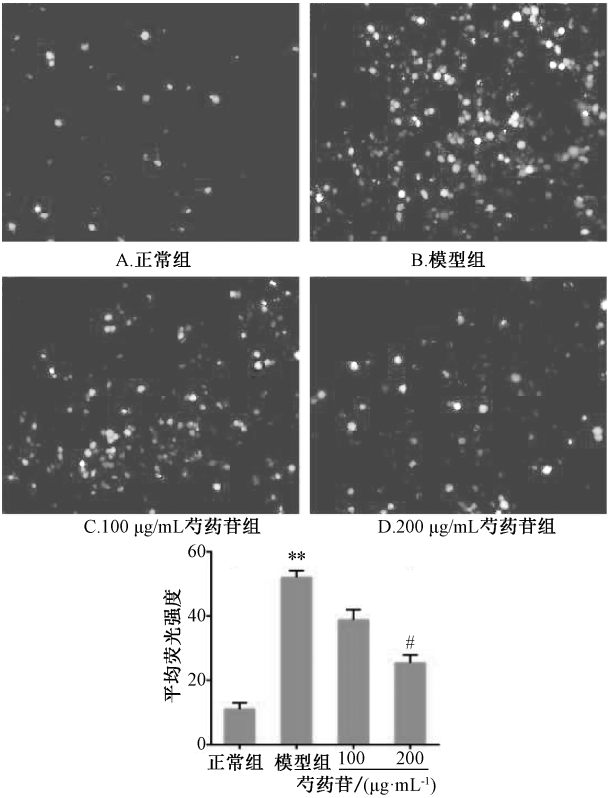
3.2 不同浓度芍药苷对 PC12 细胞存活率的影响 由图 1B 可知，10、100、200、300、400、500、600、700、800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 芍药苷处理 PC12 细胞

24 h，细胞存活率分别为 $(100.3 \pm 2.3)\%$ 、 $(99.7 \pm 3.6)\%$ 、 $(99.1 \pm 3.4)\%$ 、 $(97.9 \pm 2.8)\%$ 、 $(89.3 \pm 2.4)\%$ 、 $(83.5 \pm 3.5)\%$ 、 $(74.2 \pm 2.3)\%$ 、 $(59.6 \pm$

2.6)%、(52.0±3.0)%,其浓度在600 μg/mL以上时对PC12细胞有强烈毒副作用,在400、500 μg/mL时可降低细胞存活率($P<0.05$),有轻微毒性,故芍药苷毒性浓度应在400 μg/mL以下。

3.3 不同浓度芍药苷对CoCl₂诱导PC12细胞存活率的影响 如图1C所示,与模型组比较,100、200、300 μg/mL芍药苷对CoCl₂诱导的PC12细胞存活率分别为(54.9±3.1)%、(63.0±2.7)%、(59.1±2.3)%,其浓度在10~500 μg/mL范围内未呈浓度依赖性,而在200 μg/mL时可增加CoCl₂诱导的PC12细胞存活率($P<0.05$)。由此表明,200 μg/mL芍药苷对CoCl₂诱导PC12细胞所引起的氧化应激损伤有显著保护作用。

3.4 芍药苷对CoCl₂诱导PC12细胞内ROS的影响 如图2所示,与正常组(11.0±2.0)比较,模型组PC12细胞内平均荧光值增加(52.0±2.1, $P<0.05$),表明细胞内ROS增加;与模型组比较,200 μg/mL芍药苷组PC12细胞内平均荧光值降低(25.4±2.5, $P<0.05$),表明芍药苷可明显抑制CoCl₂诱导PC12细胞内ROS的生成。



注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$ 。
图2 芍药苷对CoCl₂诱导PC12细胞生成ROS的影响
Fig.2 Effect of paeoniflorin on the ROS production of CoCl₂-induced PC12 cells

3.5 芍药苷对CoCl₂诱导PC12细胞凋亡的影响 如图3所示,正常组PC12细胞早期和晚期凋亡分布有低强度绿色和红色荧光(绿色荧光代表凋亡早期,红色代表凋亡晚期和死亡细胞);经CoCl₂诱导后,模型组出现高强度绿色和红色荧光,且胞核变小,浓缩,呈细胞凋亡的形态特征;加入芍药苷预处理后,绿色、红色荧光强度降低,细胞核逐渐恢复正常形态。与正常组[活细胞比例(93.2±2.6)%,凋亡细胞比例(6.8±1.7)%]比较,模型组活细胞比例[(20.3±3.0)%]降低,细胞凋亡比例[(79.7±2.8)%]增加($P<0.05$),其中200 μg/mL芍药苷组活细胞比例为(57.4±2.4)%,细胞凋亡比例为(42.6±3.3)%,与模型组比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。

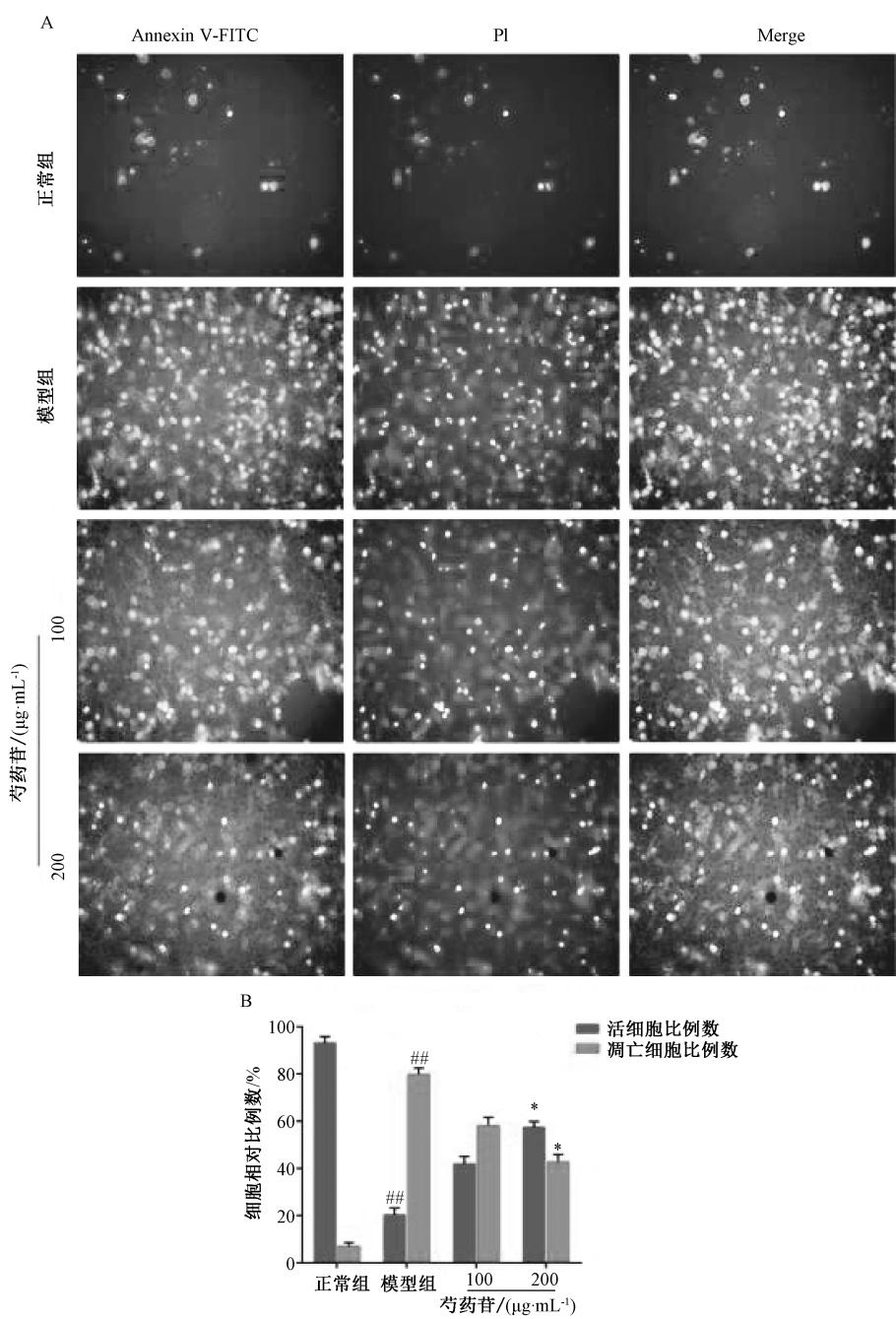
3.6 芍药苷对CoCl₂所诱导PC12细胞MMP的影响 如图4所示,与正常组比较(平均荧光值为237.6±10.3),模型组PC12细胞绿色平均荧光值为39.8±11.2,荧光强度降低($P<0.05$),即线粒体膜电位下降。200 μg/mL芍药苷组PC12细胞绿色平均荧光值为221.7±9.5,荧光强度升高($P<0.01$),说明芍药苷能提升MMP,保护PC12细胞免受CoCl₂诱导所致的损伤。

4 讨论

脑缺血病理机制主要包括能量代谢障碍与梗死灶周围缺氧去极化、兴奋性氨基酸(EAA)毒性、氧化应激损伤、炎症反应等^[7],其中氧化应激损伤是其主要机制之一。氧化应激损伤(oxidative stress)是指有机体在遭受各种有害刺激或诱导时,细胞内产生的ROS超过自身清除的ROS,导致ROS细胞内蓄积及细胞凋亡与MMP变化,细胞引发毒性损伤的过程^[8]。目前大量研究认为,ROS、细胞凋亡及MMP变化是氧化应激损伤的主要指标。

CoCl₂是一种化学性氧化应激诱导模拟剂,可引起神经细胞氧化应激损伤和凋亡,其机制是钴通过细胞内离子置换使亚铁螯合酶失活,从而抑制细胞对氧的利用,最终达到常氧下诱导细胞缺氧导致氧化应激的效果^[9],由于使用方便、理化性质稳定而成为诱导神经细胞氧化应激损伤的首选药物,但在体外细胞上研究较少。课题组首次采用CoCl₂诱导PC12细胞模型模拟神经细胞氧化应激损伤而出现的脑缺血病理状态,具有效果理想、可重复性好及操作简便的优势。

近年来,芍药苷在细胞损伤方面的作用受到越



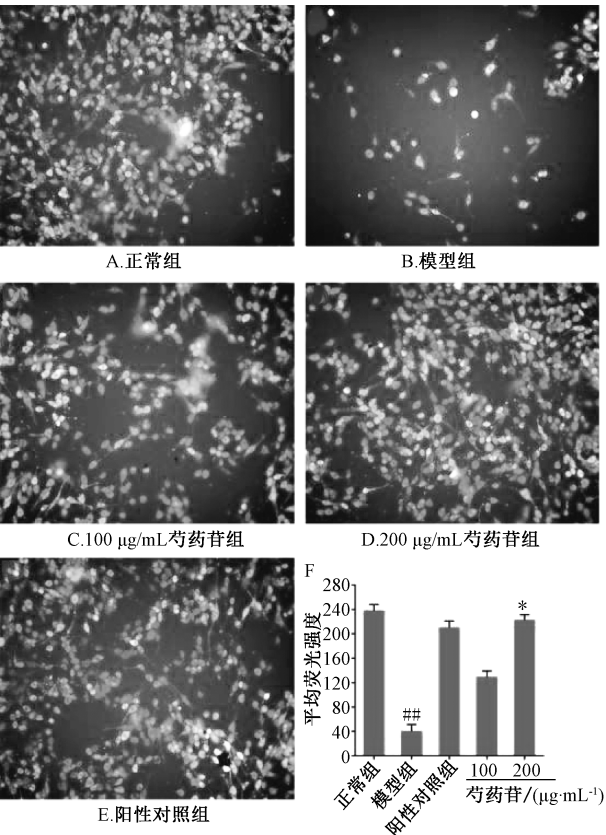
注：与正常组比较，^{##}*P*<0.01；与模型组比较，^{*}*P*<0.05。

图 3 芍药苷对 CoCl₂ 诱导 PC12 细胞凋亡的影响

Fig. 3 Effect of paeoniflorin on the apoptosis of CoCl₂-induced PC12 cells

来越多的关注。芍药苷在白芍单萜类成分中含有量最高，也是最有效成分^[10]，具有抗神经细胞氧化、抗自由基损伤、抑制细胞内钙超载，抗细胞凋亡、促进神经生长等作用^[11]。有文献研究发现，芍药苷通过 NO（硝普钠）诱导 PC12 细胞可直接发挥抗细胞凋亡作用^[12]。理论上，芍药苷具有抗细胞氧化应激损伤作用，本实验结果表明，在 CoCl₂ 诱导 PC12 细胞损伤模型中，100、200 μg/mL 芍药苷

可清除细胞内 ROS 产生、减少细胞凋亡和提高 MMP，但 200 μg/mL 的细胞保护作用大于 100 μg/mL，其原因可能是促线粒体凋亡蛋白的表达程度不同。Wang 等^[13]研究发现，神经细胞损伤与凋亡蛋白的表达有关，凋亡相关基因表达促进 p38 MAPK 磷酸化程度，加剧细胞凋亡损伤。除了线粒体凋亡通路之外，核因子转录蛋白（NF-κB）信号通路和促分裂素原活化蛋白激酶（MAPK）信



注：与正常组比较，^{##}*P*<0.01；与模型组比较，^{*}*P*<0.05。

图 4 芍药苷对 CoCl₂ 诱导 PC12 细胞膜电位的影响

Fig. 4 Effect of paeoniflorin on the membrane potential of CoCl₂-induced PC12 cells

号通路也在脑缺血神经细胞损伤中发挥着重要的作用^[14-15]，是否参与了芍药苷的神经保护机制有待于今后进一步的研究。

参考文献：

[1] Wu W L, Qiu C, Feng X, *et al.* Protective effect of paeoniflorin on acute cerebral infarction in rats[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2020; 21(8): 702-709.

[2] Zhai A L, Zhang Z, Kong X. Paeoniflorin alleviates H₂O₂-induced oxidative injury through down-regulation of microRNA-135a in HT-22 cells [J]. *Neurochem Res*, 2019, 44 (12): 2821-2831.

[3] Zhang Y Q, Qiao L F, Xu W, *et al.* Paeoniflorin attenuates cerebral ischemia-induced injury by regulating Ca²⁺/CaMK II/CREB signaling pathway[J]. *Molecules*, 2017, 22(3): 359.

[4] 崔虹, 朱佳茜, 冯秋芳, 等. 中药白芍化学成分及生物活性研究进展[J]. *海峡药学*, 2017, 29(9): 1-5.

[5] 张利. 白芍的药理作用及现代研究进展[J]. *中医临床研究*, 2014, 6(29): 25-26.

[6] 温新丽, 李世朋, 新吉乐, 等. 芍药苷对过氧化氢诱导 SH-SY5Y 细胞凋亡的保护作用[J]. *时珍国医国药*, 2013, 24(4): 828-830.

[7] Xu S, Zhong A, Ma H, *et al.* Neuroprotective effect of salvanolic acid B against cerebral ischemic injury in rats via the CD40/NF-κB pathway associated with suppression of platelets activation and neuroinflammation[J]. *Brain Res*, 2017, 1661: 37-48.

[8] Flores-Alvarado L J, Gabriel-Ortiz G, Pacheco-Mois F P, *et al.* Pathogenic mechanisms of neuronal damage in multiple sclerosis [J]. *Invest Clin*, 2015, 56(2): 201-214.

[9] 韩苗苗, 叶丹蕾, 吴玉兰, 等. 化学低氧诱导剂二氯化钴对 PC12 细胞自噬的影响[J]. *合肥工业大学学报 (自然科学版)*, 2019, 10: 1411-1414.

[10] Tanaka T, Kanaoka M, Tsuboi N, *et al.* New monoterpene glycoside esters and phenolic constituents of *Paeoniae radix*, and increase of water solubility of proanthocyanidins in the presence of paeoniflorin [J]. *Chem Pharm Bull*, 2000, 48(2): 201-207.

[11] 王成龙. 基于白芍养血柔肝功效的芍药苷、芍药内酯苷药理作用研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.

[12] 孙蓉, 武栋栋, 刘国卿. 一氧化氮诱导 PC12 细胞凋亡及芍药苷的保护作用[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2005, 11: 1266-1269.

[13] Wang L X, Zeng J P, Wei X B, *et al.* Effects of scutellarin on apoptosis induced by cobalt chloride in PC12 cells[J]. *Chin J Physiol*, 2008, 50(6): 301-307.

[14] Ma X H, Duan W J, Mo Y S, *et al.* Neuroprotective effect of paeoniflorin on okadaic acid-induced tau hyperphosphorylation via calpain/Akt/GSK-3β pathway in SH-SY5Y cells[J]. *Brain Res*, 2018, 1690: 1-11.

[15] She Y, Shao L, Zhang Y, *et al.* Neuroprotective effect of glycosides in Buyang Huanwu Decoction on pyroptosis following cerebral ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 242: 112051.