

Cytoscape[J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2016, doi: 10.1101/pdb.prot077644.

[9] 刘 轲, 李建生, 高剑峰, 等. 脑脉通对老龄大鼠脑缺血/再灌注微血管生成及 VEGF/VEGFR 系统表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(12): 2088-2092.

[10] 方 建, 王 冬, 李建生, 等. 脑脉通及其拆方对局灶性脑缺血大鼠自由基代谢和细胞因子的影响[J]. 中国老年学杂志, 2006, 4(26): 490-492.

[11] 庞春红, 李澎涛, 朱晓磊. 脑缺血-再灌注相关细胞因子表达的 TNF- α 损伤机制及清开灵的作用[J]. 世界中医药, 2011, 6(4): 343-346.

[12] 付永锋, 樊廷俊. BCL-2 家族蛋白与细胞凋亡[J]. 生物化学与生物物理学报, 2002, 34(4): 389-394.

[13] Ouyang Y B, Giffard R G. Cellular neuroprotective mechanisms in cerebral ischemia: Bcl-2 family proteins and protection of mitochondrial function[J]. *Cell Calcium*, 2004, 36(3-4): 303-311.

[14] 杨 申. P38MAPK 抑制剂对血管性痴呆大鼠海马细胞凋亡、BCL-2、Caspase-3 表达及其学习记忆能力的影响[D]. 济南: 山东大学, 2013.

芝麻素对高糖损伤 SH-SY5Y 细胞的保护效果及机制

张 慧¹, 宋 宇^{1*}, 栗志勇², 张 婷³
(1. 新乡医学院药学院, 河南 新乡 453000; 2. 安阳市三医院外五科, 河南 安阳 455000; 3. 新乡医学院三全学院, 河南 新乡 453000)

摘要: **目的** 研究芝麻素(sesamin)对高糖所致人神经母细胞瘤(SH-SY5Y)细胞损伤的保护作用及其机制。**方法** SH-SY5Y 细胞接种于含 100 mmol/L 葡萄糖的培养基并与 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 芝麻素共同孵育 36 h, MTT 法测定细胞存活率, 比色法测定细胞培养液乳酸脱氢酶(LDH)水平, ELISA 检测 DNA 片段及半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)活性。2', 7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)探针法检测细胞中活性氧(ROS)的水平, 试剂盒检测细胞内丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和还原型谷胱甘肽(GSH)活性。光度法检测细胞烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶活性, 实时荧光定量检测 NADPH 氧化酶亚基 *p47phox* mRNA 表达。Western blot 法检测 p47phox 蛋白表达。**结果** 芝麻素可增加高糖作用下 SH-SY5Y 细胞的存活率, 抑制细胞 LDH 释放, 阻止高糖诱导的 DNA 断裂, 降低 Caspase-3 活性。同时芝麻素能够增加高糖作用下 SH-SY5Y 细胞内 SOD、CAT 和 GSH 的活性, 清除细胞内的 ROS, 抑制 NADPH 氧化酶活性及 p47phox mRNA 和蛋白的表达。**结论** 芝麻素对高糖诱导 SY5Y 细胞损伤具有保护作用, 其机制可能与抗氧化和抑制 NADPH 氧化酶活性有关。

关键词: 芝麻素(sesamin); 高糖; 人神经母细胞瘤(SH-SY5Y)细胞; 抗氧化; 活性氧; NADPH 氧化酶

中图分类号: 966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2016)08-1678-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.08.004

Protective effect of sesamin on high glucose-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells

ZHANG Hui¹, SONG Yu^{1*}, LI Zhi-yong², ZHANG Ting³
(1. College of Pharmacy, Xinxiang Medical University, Xingxiang 453000, China; 2. Department of the Fifth Surgery of the Third People's Hospital of Anyang City, Anyang 455000, China; 3. Sanquan Medical College, Xinxiang Medical University, Xingxiang 453000, China)

ABSTRACT: AIM To explore the effects of sesamin on cell proliferation and its protective role in cellular oxidative injury induced by high glucose to SH-SY5Y cell line. **METHODS** SH-SY5Y cell in 100 mmol/L glucose medium was incubated with 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ sesamin for 36 h. MTT assay was used to evaluate the cell proliferation.

收稿日期: 2016-02-14
基金项目: 新乡医学院博士科研启动项目(2010)
作者简介: 张 慧(1982—), 女, 硕士, 讲师, 主要从事中药活性成分及药效学研究。E-mail: zhanghui12070300@163.com
*** 通信作者:** 宋 宇(1979—), 男, 博士, 副教授, 主要从事中药活性成分及药效学研究。Tel: (0373) 3029101, E-mail: y3029101@sina.com

1678

eration of SH-SY5Y cells. In the meantime, the levels of lactate dehydrogenase (LDH), NADPH oxidase, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) as well as the levels of malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), intracellular reactive oxygen species (ROS), Caspase-3 activity and DNA fragmentation were measured with or without sesamin treatment. **RESULTS** The treatment of SH-SY5Y cells with sesamin was associated with a marked diminution in Caspase-3 expression, LDH level, DNA fragmentation, intracellular ROS and MDA levels. Additionally, the cell viability, GSH level, SOD and CAT activity were notably elevated by sesamin, whereas the activity of NADPH oxidase, the mRNA and the protein expression of NADPH oxidase subunit p47phox were attenuated. **CONCLUSION** Sesamin can attenuate the high glucose-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. Its protective effects may be related to its antioxidant action and the inhibition of NADPH oxidase.

KEY WORDS: sesamin; high glucose; SH-SY5Y; antioxidant function; reactive oxygen species; NADPH oxidase

葡萄糖是哺乳动物大脑的主要能量来源,同时也是维持正常脑功能必不可少的物质。但是葡萄糖比例的失衡又会引起很多感觉、运动和自主神经系统方面的问题。2 型糖尿病是根源于遗传因素,与生活方式密切相关的代谢性疾病。其中高血糖症是 2 型糖尿病导致神经病变和演化为不可控制的糖尿病的罪魁祸首^[1]。长期的暴露于高血糖的环境中会导致中枢神经系统的损伤^[2]。最新研究表明,糖尿病与神经退行性疾病例如帕金森病之间有密切的关系。流行病学显示,在众多引起帕金森发生的外源性原因中,2 型糖尿病的个体患帕金森病的风险是一般人的 2 倍^[3-4]。

高糖环境所诱发的持续的氧化应激,会导致细胞的凋亡。过多的活性氧 (reactive oxygen, ROS) 的生成会破坏细胞结构,进而在自由基的攻击下会加剧脂类,蛋白质, DNA 的损伤。同时高糖会促进线粒体过氧化物的产生,进而激活一氧化氮合酶,二者进而融合成强大的氧化剂-过氧亚硝酸盐^[5]。

芝麻素 (sesamin) 是从芝麻中提取的活性成份,具有降脂、降压和明显的抗氧化效果^[6]。芝麻素能纠正高脂、高糖诱导大鼠糖脂代谢异常,并抑制血压升高、改善血管重构^[7]。研究还发现芝麻素还具有神经保护作用,能对抗 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸 (NMDA) 所致原代培养小鼠皮层神经元损伤^[8]。芝麻素对酒精导致的肝损伤和鱼藤酮诱导的多巴胺神经元损伤都有保护作用^[9-10]。本实验利用高糖诱导的 SH-SY5Y 细胞模型,检测凋亡及氧化应激功能相关指标,探讨芝麻素的神经保护作用及其机制,期望能为糖尿病周围神经症的预防和治疗提供可能有效的方法。

1 材料和方法

1.1 细胞、试剂与仪器 芝麻素 (>98%) (上

海纯优生物科技有限公司,批号 141123, CAS 为 607-80-7); SH-SY5Y 细胞购自中国科学院上海细胞生物研究所; MTT 购自德国西格玛 (Sigma) 公司; Cell Death Detection ELISA^{plus} 购自瑞士罗氏公司; 细胞 NADPH 氧化酶活性检测光度法定量检测试剂盒购自上海一基实业有限公司; 活性氧、乳酸脱氢酶 (LDH) 细胞毒性、Caspase-3 活性检测试剂盒 (批号依次为 150320、150621、141017) 均购自碧云天生物技术有限公司; CAT、SOD、GSH、MDA 活性检测试剂盒购自南京建成生物技术研究所以 (批号依次为 20141120、20150421、20150312、20150223); Trizol (总 RNA 抽提试剂)、BeyoRT cDNA 第一链合成试剂盒 (RNase H) (批号依次为 150305、141121) 由碧云天生物技术研究所以提供; 热启动荧光定量 PCR 核心试剂盒购自上海闪晶分子生物技术研究所以; p47phox 抗体购自美国圣克鲁斯生物科技 (Santa Cruz) 公司; ABI 7300 Real-Time PCR System (美国应用生物系统 [ABI] 公司); 酶标仪 (Thermo Multiskun Mk3, 美国赛默飞世尔科技公司)。

1.2 细胞分组、活力测定及 LDH 检测 将 SH-SY5Y 细胞分为对照组 (无血清培养基培养细胞 36 h)、高糖组 (含 100 mmol/L 葡萄糖的无血清培养基培养 36 h)、药物组 (含 100 mmol/L 葡萄糖的无血清培养基与 10、20、40 μ mol/L 芝麻素共同孵育 36 h)。

细胞接种于 96 孔培养板,每孔 0.1 mL 培养基,24 h 后细胞贴壁,更换培养液,按上述分组,分别进行相应处理。每孔加 MTT (5 mg/mL) 20 μ L,4 h 后,吸净培养液,加入 DMSO 150 μ L,振荡 10 min,使结晶充分溶解,酶标仪测量 490 nm 波长的吸光度值 (*D*)。

LDH 检测采用乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒。各组细胞经相应处理后,吸取细胞培养上清液 120 μL ,加入到一新的 96 孔板相应孔中,各孔分别加入 60 μL LDH 检测工作液,室温(约 25 $^{\circ}\text{C}$),避光孵育 30 min,然后在 490 nm 处测定吸光度。

1.3 DNA 片段及 Caspase-3 活性检测 DNA 片段检测使用 Cell Death Detection ELISA^{plus}检测试剂盒,严格按试剂说明书操作。Caspase-3 检测应用 Caspase-3 活性检测试剂盒。药物处理细胞后,裂解细胞,取上清。Bradford 法测定蛋白质量浓度,调整蛋白质量浓度为 2 mg/mL。取待测样品 50 μL ,加入 Caspase-3 显色底物 Ac-DEVD-pNA 10 μL (2 mmol/L),检测缓冲液 40 μL 后混匀。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 120 min,测定 405 nm 处吸光度。

1.4 细胞内 ROS 水平检测 细胞内活性氧的水平检测应用活性氧检测试剂盒,依照说明书要求操作。SY5Y 细胞 (5×10^6) 与 10 $\mu\text{mol/L}$ 2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐 (DCFH-DA) 探针 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 35 min,然后 PBS 洗 3 遍洗去未结合的探针。DCFH-DA 进入细胞内后,可以被细胞内的酯酶水解生成二氯化荧光素 (DCFH),进而被细胞内的活性氧化生成有荧光的 2',7'-二氯荧光素 (DCF)。荧光分光光度计检测 DCF 的荧光可反映细胞内活性氧的水平。

1.5 细胞内 SOD、CAT、GSH、MDA 活性测定 6 孔板培养 SH-SY5Y 细胞,细胞经相应处理后收集,超声细胞破碎后离心,吸取上清 200 μL ,分别在 550、240、412、532 nm 波长下,按照 SOD、CAT、GSH、MDA 检测试剂盒说明书操作测定 D 值。

1.6 细胞 NADPH 氧化酶活性检测 使用细胞 NADPH 氧化酶活性检测光度法定量检测试剂盒,按试剂说明书操作。步骤如下:细胞裂解后,置冰浴 30 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 16 000 $\times g$ 离心 5 min,取上清液。使用 Bradford 法进行蛋白定量检测,调整样品蛋白质量浓度为 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。移取试剂盒内缓冲液、反应液、底物液到新的比色皿,30 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱静置 3 min,加入 100 μL 待测样品,上下倾倒数次,混匀(3 s 之内),即刻放入分光光度仪检测,此为样品总活性读数:(340 波长读数) 0 min - (340 波长读数) 5 min。

1.7 实时荧光定量检测 *p47phox* mRNA 表达 采用 Trizol 法提取细胞内总 RNA,使用 BeyoRT cDNA 第一链合成试剂盒将总 RNA 进行逆转录反应。以

转录后 cDNA 为模板,管家基因 *GAPDH* 为内参,使用 Hot Start Fluorescent PCR Core Reagent Kit 对 *p47phox* 基因进行荧光定量 PCR 扩增。反应体系: Hotstart Fluo-PCR mix ($1 \times$) 25 μL , PCR Forward Primer (25 pmol/ μL) 0.8 μL , PCR Reverse primer (25 pmol/ μL) 0.8 μL , cDNA 2 μL , 无菌去离子水 21.4 μL ,总体积 50 μL 。引物序列: *p47phox* 正向为 5'-GACACCTTCATCCGTCACATC-3',反向为 5'-GGAAGCTCGTAGATCTCGGTGAA-3'; *GAPDH* 正向为 5'-CCATGTTTCGTCATGGGTGTGAACCA-3',反向为 5'-GCCAGTAGAGGCAGGGATGATGTTC-3'。反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min; 变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 退火延伸 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 重复 35 个循环。实验重复 3 次。各基因相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 表示。

1.8 Western blot 法检测 *p47phox* 蛋白表达 细胞按 1×10^6 /孔接种于 6 孔培养板,细胞分组及处理同前。收集细胞, RIPA 裂解液裂解细胞, 12 000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min, 取上清, BCA 法进行蛋白定量。12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺 (SDS-PAGE) 电泳, 转膜, 5% 脱脂奶室温封闭 60 min。加入 *p47phox* 抗体 (1:400), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 洗膜后加入二抗室温孵育 1 h。ECL 显影。凝胶成像分析系统扫描后以 *p47phox* 与 β -Actin 条带灰度的比值表示 *p47phox* 的相对表达。

1.9 统计学处理 数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。统计分析采用 SPSS 19.0 软件, 组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 MTT 检测芝麻素对 SH-SY5Y 细胞的保护作用

MTT 结果显示高糖组 SH-SY5Y 的增殖较正常组明显降低 ($P < 0.01$)。而 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 芝麻素与高糖共同作用下的 SH-SY5Y 增殖活性显著高于高糖组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果见表 1。

2.2 芝麻素对培养液中 LDH 水平、DNA 片段及 Caspase-3 活性的影响 高糖组 LDH 水平、DNA 片段量和 Caspase-3 活性较正常组显著升高 ($P < 0.01$); 与高糖组比较, 芝麻素中、高剂量组 LDH 水平的含有量明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 但低剂量组作用不明显 ($P > 0.05$)。芝麻素低、中、高剂量组 DNA 片段量也明显减少, Caspase-3 活性也明显降低, 与高糖组相比有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果见表 1。

2.3 芝麻素对细胞内 ROS 的影响 与正常组相

表 1 芝麻素对细胞活力、DNA 片段、LDH 水平、Caspase-3 及 ROS 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 1 Effects of sesamin on cell viability, DNA fragmentation, LDH release, Caspase-3 activity and ROS generation in SH-SY5Y cells exposed to high glucose ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	剂量/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	D	DNA 片段/(% 正常组)	LDH/(% 正常组)	Caspase-3/(% 正常组)	ROS/(% 正常组)
正常组	—	0.59 ± 0.06	100	100	100	100
高糖组	—	0.32 ± 0.05 ^{##}	236.58 ± 39.35 ^{##}	289.37 ± 29.54 ^{##}	286.44 ± 28.32 ^{##}	234.32 ± 31.13 ^{##}
芝麻素低剂量组	10	0.41 ± 0.06 [*]	185.21 ± 27.35 [*]	247.34 ± 16.23	223.51 ± 29.41 [*]	189.24 ± 21.37 [*]
芝麻素中剂量组	20	0.47 ± 0.05 [*]	164.52 ± 21.52 [*]	211.42 ± 24.34 [*]	197.34 ± 19.21 [*]	178.33 ± 18.42 [*]
芝麻素高剂量组	40	0.54 ± 0.06 ^{**}	144.83 ± 19.23 ^{**}	156.78 ± 21.51 ^{**}	162.37 ± 16.52 ^{**}	136.43 ± 19.57 ^{**}

注：与高糖组比较，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ ；与正常组比较，^{##} $P < 0.01$

比，高糖组细胞内 ROS 活性显著升高 ($P < 0.01$)。而芝麻素低、中、高剂量组均能明显能减少高糖诱导的 ROS 表达 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果见表 1。

2.4 芝麻素对细胞内 GSH、SOD、MDA、CAT 的影响 与正常组比较，高糖组 MDA 的活性明显增强 ($P < 0.01$)，GSH、SOD、CAT 活性明显下降 ($P < 0.01$)。而芝麻素中、高剂量组能明显降低细胞内的 MDA 的活性 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，芝麻素低、中、高剂量组能明显增强 GSH、SOD、CAT 的活力 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，其中芝麻素高剂量组作用最强。结果见表 2。

表 2 芝麻素对细胞内 GSH、SOD、MDA、CAT 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 2 Effects of sesamin on GSH, CAT, SOD activity and the level of MDA in SH-SY5Y cells exposed to high glucose ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	剂量/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	MDA/ ($\text{nmol} \cdot \text{mg prot}^{-1}$)	GSH/ ($\text{mg} \cdot \text{g prot}^{-1}$)	SOD/ ($\text{U} \cdot \text{mg prot}^{-1}$)	CAT/ ($\text{U} \cdot \text{mg prot}^{-1}$)
正常组	—	0.247 ± 0.021	2.934 ± 0.424	19.823 ± 3.533	1.875 ± 0.431
高糖组	—	0.525 ± 0.024 ^{##}	1.497 ± 0.324 ^{##}	9.142 ± 1.386 ^{##}	0.864 ± 0.121 ^{##}
芝麻素低剂量组	10	0.423 ± 0.021	1.734 ± 0.223 [*]	11.468 ± 1.873 [*]	1.158 ± 0.156 [*]
芝麻素中剂量组	20	0.321 ± 0.026 [*]	2.256 ± 0.284 ^{**}	13.745 ± 2.116 [*]	1.367 ± 0.213 [*]
芝麻素高剂量组	40	0.294 ± 0.033 ^{**}	2.533 ± 0.453 ^{**}	16.386 ± 2.645 ^{**}	1.628 ± 0.244 ^{**}

注：与高糖组比较，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ ；与正常组比较，^{##} $P < 0.01$

2.5 芝麻素对 NADPH 氧化酶活性及 p47phox mRNA 和蛋白表达的影响 高糖组 NADPH 氧化酶活性、p47phox mRNA 及蛋白表达均较正常组显著升高 ($P < 0.01$)。与高糖组比较，芝麻素低、中、高剂量组均能明显能降低 NADPH 氧化酶活性并减少 p47phox mRNA 及蛋白的表达 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果见表 3。

表 3 芝麻素对 NADPH 氧化酶活性及 p47phox mRNA 和蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 3 Effects of sesamin on NADPH oxidase activity, p47phox mRNA and protein expression in SH-SY5Y cells exposed to high glucose ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	剂量/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	NADPH 活性/(% 正常组)	p47phox mRNA/(% 正常组)	p47phox/ β -Action
正常组	—	100	100	0.24 ± 0.05
高糖组	—	228.33 ± 28.22 ^{##}	186.35 ± 18.46 ^{##}	0.54 ± 0.08 ^{##}
芝麻素低剂量组	10	182.45 ± 29.34 [*]	151.75 ± 19.53 [*]	0.38 ± 0.06 [*]
芝麻素中剂量组	20	157.55 ± 24.53 [*]	138.76 ± 16.83 [*]	0.28 ± 0.06 ^{**}
芝麻素高剂量组	40	141.44 ± 17.28 ^{**}	126.55 ± 17.84 ^{**}	0.26 ± 0.07 ^{**}

注：与高糖组比较，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ ；与正常组比较，^{##} $P < 0.01$

3 讨论

本研究发现不同浓度的芝麻素能明显减少高糖诱导的 SH-SY5Y 细胞的凋亡，且具有浓度依赖性。乳酸脱氢酶 (LDH) 主要存在细胞内，属胞浆酶，细胞破裂时，LDH 释放到基质中，因此测定 LDH 活性可以推断细胞损伤程度。本研究发现高糖诱导 SH-SY5Y 损伤的模型组细胞培养液中 LDH 水平明

显增加，而经不同浓度芝麻素作用后细胞培养液中 LDH 水平明显减少，且存在浓度依赖性。由此可见，芝麻素可减轻高糖所致 SH-SY5Y 细胞损伤。Caspase-3 是凋亡的最终执行蛋白，诱导神经细胞凋亡。一旦 Caspase-3 被激活，细胞凋亡不可避免^[11]。本研究可见，高糖会引起 Caspase-3 的过度激活，促进 SH-SY5Y 细胞死亡。但是芝麻素处理

后, SH-SY5Y 细胞内 Caspase-3 表达量显著下降, 因此抑制 Caspase-3 的活性是芝麻素保护 SH-SY5Y 细胞的机制之一。DNA 碎片裂是晚期凋亡的重要特征。在本研究中, 高糖组 DNA 碎片量明显高于正常组, 芝麻素能明显阻止高糖诱导的 DNA 断裂进而对 SH-SY5Y 起到保护作用。

高血糖症可引起全身尤其神经元的氧化应激, 进而导致周围神经损伤。高糖诱导生成的 ROS 在糖尿病神经病变的发生发展中起着关键性的作用^[12]。ROS 能够使细胞膜上的脂类氧化, 产生 MDA, 从而造成细胞损伤并引发凋亡。为了减轻氧化应激所带来的压力, 细胞通常会利用抗氧化防御系统去清除 ROS。SOD、CAT 和 GSH 是很重要的内源性抗氧化酶, 能够直接清除 ROS。研究发现, 高糖处理组, 细胞内 ROS 的量明显增加, MDA 的量也相应上升, 而 SOD、CAT 和 GSH 的含有量下降。而芝麻素作用后, 细胞内 ROS 的量明显降低, MDA 的量也明显下降, SOD、CAT 和 GSH 的含有量明显增高。说明芝麻素能对抗高糖所致的氧化损伤, 这是芝麻素减少高糖诱导 SY5Y 细胞凋亡的重要机制。

本研究还发现高糖组 NADPH 氧化酶活性和 p47phox mRNA 及蛋白的表达均明显高于对照组 SH-SY5Y 细胞。NADPH 氧化酶是一个可诱导的电子传输系统, 能通过黄素类将还原当量从 NADPH 传递到氧分子, 进而生成活性氧^[13]。现已被证实高糖通过 NADPH 氧化酶依赖性活性氧产生引起氧化应激^[14]。p47phox 是 NADPH 氧化酶细胞质内的亚基。许多研究都证实它在糖尿病中起着重要作用。例如, p47phox 缺失可减轻糖尿病诱发的肾小球损伤和 β 细胞功能障碍^[15]。此外, 还发现缺失了 p47phox 亚基的小鼠及神经细胞, 其过氧化氢的生成和神经元的死亡都明显减少^[16]。本研究结果表明芝麻素可抑制 NADPH 氧化酶活性及 p47phox mRNA 和蛋白的表达, 这可能与芝麻素减少高糖诱导 SY5Y 细胞凋亡有密切关系。

综上所述, 芝麻素对高糖诱导 SY5Y 细胞损伤具有保护作用, 可增加高糖作用下 SY5Y 细胞的存活率, 抑制细胞 LDH 释放, 阻止高糖诱导的 DNA 断裂, 降低 Caspase-3 活性。同时芝麻素能够增加高糖作用下 SY5Y 细胞内 SOD、CAT 和 GSH 的活性, 清除细胞内的 ROS, 抑制 NADPH 氧化酶活性和 p47phox mRNA 的表达, 从而减少高糖所致氧化应激所诱导的 SY5Y 细胞的凋亡, 实现保护 SY5Y

细胞的效果。芝麻素对神经细胞的保护作用有望为糖尿病周围神经症的预防和治疗提供可能有效的方法。

参考文献:

- [1] Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications[J]. *Nature*, 2001, 414(6865): 813-820.
- [2] Tomlinson D R, Gardiner N J. Glucose neurotoxicity[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2008, 9(1): 36-45.
- [3] Hu G, Jousilahti P, Bidel S, *et al.* Type 2 diabetes and the risk of Parkinson's disease[J]. *Diabetes Care*, 2007, 30(4): 842-847.
- [4] Vanitallie T B. Parkinson disease; Primacy of age as a risk factor for mitochondrial dysfunction[J]. *Metabolism*, 2008, 57(Suppl 2): S50-S55.
- [5] Szabo C. Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity[J]. *Toxicol Lett*, 2003, 140-141: 105-112.
- [6] Zhang J X, Yang J R, Chen G X, *et al.* Sesamin ameliorates arterial dysfunction in spontaneously hypertensive rats via down-regulation of NADPH oxidase subunits and upregulation of eNOS expressions[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2013, 34(7): 912-920.
- [7] 周 勇, 杨解人. 芝麻素对高脂、高糖饲养大鼠血脂血糖及血管重构的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2008, 24(7): 1286-1291.
- [8] 郭红亮, 杜 芬, 潘智伟, 等. 芝麻素抑制 NMDA 诱导的小鼠皮层神经元损伤[J]. *现代生物医学进展*, 2015, 15(26): 17-18.
- [9] Akimoto K, Kitagawa Y, Akamatsu T, *et al.* Protective effects of sesamin against liver damage caused by alcohol or carbon tetrachloride in rodents[J]. *Ann Nutr Metab*, 1993, 37(4): 218-224.
- [10] Fujikawa T, Kanada N, Shimada A, *et al.* Effect of sesamin in *Acanthopanax senticosus* HARMS on behavioral dysfunction in rotenone-induced parkinsonian rats[J]. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28(1): 169-172.
- [11] Yeh J Y, Huang W J, Kan S F, *et al.* Effects of bufalin and cinobufagin on the proliferation of androgen dependent and independent prostate cancer cells[J]. *Prostate*, 2003, 54(2): 112-124.
- [12] Negi G, Kumar A, Joshi R P, *et al.* Oxidative stress and Nrf2 in the pathophysiology of diabetic neuropathy: old perspective with a new angle[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 408(1): 1-5.
- [13] Taye A, Saad A H, Kumar A H, *et al.* Effect of apocynin on NADPH oxidase-mediated oxidative stress-LOX-1-eNOS pathway in human endothelial cells exposed to high glucose[J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 627(1-3): 42-48.
- [14] Lee H S, Son S M, Kim Y K, *et al.* NAD(P)H oxidase participates in the signaling events in high glucose-induced proliferation of vascular smooth muscle cells[J]. *Life Sci*, 2003, 72(24): 2719-2730.

[15] Liu G C, Fang F, Zhou J, *et al.* Deletion of p47phox attenuates the progression of diabetic nephropathy and reduces the severity of diabetes in the Akita mouse [J]. *Diabetologia*, 2012, 55 (9): 2522-2532.

[16] Suh S W, Gum E T, Hamby A M, *et al.* Hypoglycemic neuronal death is triggered by glucose reperfusion and activation of neuronal NADPH oxidase [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117 (4): 910-918.

结合斑蝥素对人肝癌 HepG2 细胞增殖和凋亡的作用

刘 流¹, 郭 侃¹, 刘 云^{2,3}, 裴 显¹, 张 沛⁴, 李晓飞^{1,2*}
(1. 遵义医学院基础医学院, 贵州 遵义 563003; 2. 贵州省普通高等学校特色药物肿瘤防治特色重点实验室, 贵州 遵义 563003; 3. 遵义医学院医学与生物医学研究中心, 贵州 遵义 563003; 4. 贵州省柏强制药有限公司, 贵州 贵阳 550001)

摘要: **目的** 研究贵州罗甸地区南方大斑蝥 (*Mylabris phalerata* Pallas) 和黄黑小斑蝥 (*Mylabris cichorii* Linnaeus) 体内的结合斑蝥素 (conjugated cantharidin) 对人肝癌 HepG2 细胞增殖和凋亡的影响。**方法** 采用两种斑蝥三氯甲烷提取物的水浸液获取结合斑蝥素。运用磺酰罗丹明染色法 (SRB) 检测结合斑蝥素对 HepG2 细胞增殖的作用。利用 Annexin V-FITC/PI 双染法检测结合斑蝥素对 HepG2 细胞凋亡的影响。应用倒置相差显微镜、透射电子显微镜观察凋亡细胞的形态学变化。**结果** 两种结合斑蝥素对 HepG2 细胞的增殖均有显著的抑制作用, 呈剂量依赖性, 其半数抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 0.90、0.85 mg/L。流式细胞术结果显示, 以 0.90 mg/L 的南方大斑蝥结合斑蝥素和 0.85 mg/L 黄黑小斑蝥结合斑蝥素作用 HepG2 细胞 24 h 后, 细胞呈典型的凋亡形态特征, 凋亡率分别为 (10.5 ± 1.45)% 和 (12.8 ± 1.53)% ; **结论** 两种来源斑蝥体内结合斑蝥素均可抑制肝癌 HepG2 细胞的增殖并促进其凋亡。
关键词: 结合斑蝥素; 南方大斑蝥; 黄黑小斑蝥; 肝癌 HepG2 细胞; 增殖; 凋亡
中图分类号: R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2016)08-1683-06
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.08.005

Effects of conjugated cantharidin on the proliferation and apoptosis of hepatoma carcinoma HepG2 cells

LIU Liu¹, GUO Kan¹, LIU Yun^{2,3}, PEI Xian¹, ZHANG Pei⁴, LI Xiao-Fei^{1,2*}
(1. Preclinical Medicine School, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China; 2. Guizhou Provincial College-based Key Lab for Tumor Prevention and Treatment with Distinctive Medicines, Zunyi 563003, China; 3. Medical and Biological Research Center, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China; 4. Guizhou Baiqiang Pharmaceutical Co., Ltd., Guiyang 550001, China)

ABSTRACT: AIM To investigate the influence of conjugated cantharidin from *Mylabris phalerata* Pallas; *Mylabris cichorii* Linnaeus, collected from Luodian District, Guizhou Province, on the proliferation and apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. **METHODS** Conjugated cantharidin was obtained from water soluble matter of trichloromethane extracts of two sources of *Mylabris*. SRB assay was used to study the effects of conjugated cantharidin on the proliferation of HepG2 cells. Annexin V-FITC/PI staining was employed to detect the influence of conjugated cantharidin on the apoptosis of HepG2 cells. Morphological alteration of apoptotic cells was observed by phase con-

收稿日期: 2016-02-02
基金项目: 国家自然科学基金 (81260488); 贵州省科技厅中药现代化项目 (黔科合 ZY 字 [2013] 3012); 贵州省教育厅特色重点实验室建设项目 (黔教合 KY 字 [2014] 212)
作者简介: 刘 流 (1976—), 女, 硕士, 副教授, 从事昆虫资源开发与利用研究。Tel: (0851) 28609647, E-mail: 403365478@qq.com
* **通信作者:** 李晓飞 (1979—), 男, 教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事药用昆虫及昆虫毒素方面的研究工作。Tel: (0851) 28609647, E-mail: lixiaofei35@gmail.com