

麦胚肽 (RVF) 对人神经瘤细胞 SH-SY5Y 损伤模型的保护作用

程云辉¹, 吕兆良¹, 孙威¹, 唐季清¹, 许宙¹, 文李¹, 俞惠新², 张莉²

(1. 长沙理工大学化学与生物工程学院, 湖南长沙 410114) (2. 江苏省原子医学研究所, 江苏无锡 214063)

摘要: 本文研究了麦胚肽 (RVF) 对人神经瘤细胞 SH-SY5Y 损伤的保护作用。采用体外细胞培养法, 以人神经瘤细胞 SH-SY5Y 为材料, 建立了饥饿损伤和 H₂O₂ 损伤模型。结果表明: 在 40 个不同浓度与作用时间的组别中, 对 SH-SY5Y 细胞具有显著营养功能的只有无血清饥饿模型中 200 μmol/L RVF 作用 12 h 与含 1% 血清饥饿模型中 500 μmol/L RVF 作用 24 h 两个组别, 且不具有剂量与时间依赖性。在 H₂O₂ 诱导的细胞氧化损伤模型中, 200 μmol/L 的 RVF 将细胞存活率分别提高了 25.05% (MTT 法) 和 21.90% (SRB 法); 200 μmol/L RVF 预孵育时间延长至 12 h 时, RVF 极显著地提高了细胞存活率, 且具有剂量与时间依赖性; 细胞形态检测结果表明 RVF 干预后, SH-SY5Y 细胞也逐渐由皱缩、细长恢复到梭形或多角形, 粘附性增强。在本研究建立的两种损伤模型中, RVF 仅对 H₂O₂ 损伤模型具有显著保护作用。

关键词: 麦胚肽; SH-SY5Y; 饥饿; 氧化损伤

文章编号: 1673-9078(2016)1-13-21

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.1.003

Protective Effect of Wheat Germ Peptide on Cultured SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line in an *in vitro* Cell Injury Model

CHENG Yun-hui¹, LV Zhao-liang¹, SUN Wei¹, TANG Ji-qing¹, XU Zhou¹, WEN Li¹, YU Hui-xin², ZHANG Li²

(1.College of Chemistry and Biology Engineering, Changsha University of Science and Technology, Changsha 410114, China) (2.Jiangsu Institute of Nuclear Medicine, Wuxi 214063, China)

Abstract: The protective effects of wheat germ peptide (RVF) on the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line were investigated in this study. Starvation- and hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced injury models were established by *in vitro* cell culturing of an SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. The SH-SY5Y cells were treated with 40 RVFs at different concentrations and incubation times. The results showed significant nutritional functions only in the group pre-incubated with 200 μmol/L RVF for 12 h in a no-serum starvation-induced injury model and the group treated with 500 μmol/L RVF for 24 h in the 1% serum starvation-induced injury model, and no dose- or time-dependent relationships were found. In the H₂O₂-induced injury model, treatment with 200 μmol/L RVF increased cell survival rates by 25.05 and 21.90% in the methyl-tetrazolium (MTT) and sulforhodamine B (SRB) assays, respectively, in a time- and dose-dependent manner. The cell morphological analysis indicated that after RVF treatment, the SH-SY5Y cells gradually resumed a spindle or polygonal shape from a wrinkled, shrunken, and elongated shape, with enhanced cell adhesion. In the two injury models investigated in this study, RVF only showed a significant protective effect in the H₂O₂-induced injury model.

Key words: wheat germ peptide; SH-SY5Y; starvation; oxidative injury

活性氧自由基由细胞代谢产生, 并在细胞凋亡、基因表达和离子运输中扮演重要角色。过多活性氧自由基易与核酸、蛋白质的氨基酸侧链和不饱和脂肪酸的碳链发生不良化学反应, 并引起细胞氧化损伤^[1]。

收稿日期: 2015-12-21

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31171627, 31071523); “十二五” 国家科技支撑计划 (2012BAD34B02)

作者简介: 吕兆良 (1987-), 男, 在读硕士研究生

通讯作者: 程云辉 (1964-), 女, 博士, 教授

已有研究证实麦胚肽具有一定的抗氧化活性, 但目前文献报道大多集中在基于化学方法的体外抗氧化活性检测或简单的动物实验方面^[2], 在细胞、生物体内分子水平层次的研究报道不多。细胞试验非常适合应试物作用机理的前期研究。将细胞试验与整体试验有机结合, 从不同角度分析应试物的作用和机理, 能起到相互补充、相互印证的效果, 可有效弥补传统体外化学试验方法和动物体内试验方法的缺陷。

为了应对氧化应激, 人体需要从外界摄取具有抗

氧化功能的物质来维持体内自由基的平衡。因此,如果在日常膳食中能够摄取一定量的食源性抗氧化剂,将可重建机体组织细胞内的氧化/抗氧化平衡,并有效地降低患神经退行性疾病与心脑血管疾病的风险。本课题前期研究表明麦胚肽 RVF 可以降低 H_2O_2 诱导的 SH-SY5Y 细胞内活性氧 (ROS) 含量,并提高细胞存活率和细胞内总抗氧化能力、降低乳酸脱氢酶 (LDH) 释放率、抑制脂质过氧化反应、维持线粒体跨膜电位和 Ca^{2+} 稳态,从细胞形态学观察 RVF 对 SH-SY5Y 细胞也具有一定的保护作用^[3]。但是作为一种食源性植物活性肽,其营养功能是不可忽视的^[4,5]。因此,本研究拟首先建立饥饿诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤模型^[6],探讨 RVF 的营养保护作用;然后进一步考察 RVF 对 H_2O_2 诱导 SH-SY5Y 细胞氧化损伤的影响、建立 H_2O_2 诱导的细胞氧化损伤模型继续考察 RVF 的抗氧化作用。拟进一步探讨在抑制 H_2O_2 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡中, RVF 所发挥的究竟是抗氧化功能还是营养功能^[7]? 以更深入地考察 RVF 对 H_2O_2 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤的保护机理,为其在缓解氧化应激、预防神经退行性疾病等领域的应用提供重要的理论依据,同时也为麦胚蛋白的综合利用提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料试剂与仪器

1.1.1 材料与试剂

人神经母细胞瘤细胞株 SH-SY5Y,江苏省原子医学研究所;麦胚抗氧化肽 RVF (纯度 $\geq 98\%$),上海吉尔生化有限公司;3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 (MTT),2,4-二硝基苯肼 (DB0148),二甲基亚砜 (DMSO),上海生物工程研究所;MEM 培养基,美国 gibco 公司;青霉素钠与硫酸链霉素,华北制药;胎牛血清,浙江天杭生物科技有限公司;磺酰罗丹明 (SRB),Sigma 公司;荧光探针,BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型),碧云天生物技术研究所;其它试剂均为 AR 级。

1.1.2 仪器与设备

血球计数板, XDS-1A 型倒置相差显微镜,上海精密仪器技术公司; Milli-Q Advanta 超纯水系统,美国 MILLIPORE (密理博)公司; TH4-200 型荧光倒置显微镜,日本 Olympus 光学仪器公司; SW-CT-2FD 型双人单面净化工作台,苏州净化设备有限公司; 2111 型二氧化碳培养箱,美国 Thermo Epectron Corporation 公司; 0.22 μm 微孔滤膜,上海摩速科学器材有限公司; FACS 流式细胞仪,美国 Becton Dickinson 公司;

μ Quant 型全自动酶标分析仪,美国 Bio-Tek 公司; 恒温水浴锅,江苏金坛市宏华仪器厂; 75 cm^2 培养瓶,美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 100 mm 细胞培养皿,6 孔细胞培养板,美国 Corning 公司; 超低温冰箱 ($-80\text{ }^\circ C$, $-40\text{ }^\circ C$),日本三洋电器公司, C-5415R 型高速冷冻离心机,德国 Eppendorf 仪器公司。

1.2 实验方法

1.2.1 相关试剂的配制

(1) MEM 培养基:向 900 mL 的 Milli-Q 水中加入 10 g MEM 粉末,再称取 2.2 g $NaHCO_3$ 加入后,室温搅拌 4 h 至完全溶解,分别加入青霉素钠和硫酸链霉素至终浓度为 100 U/mL,再用 1 mol/L HCl 调 pH 至 7.2-7.4,定容至 1000 mL,搅拌均匀,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,在 $4\text{ }^\circ C$ 冰箱中保存备用。在使用前须加入终浓度为 10% (V/V) 的胎牛血清。

(2) 磷酸盐缓冲液 (PBS):称取 0.2 g KCl、8.0 g NaCl、0.2 g KH_2PO_4 、2.89 g $NaHPO_4 \cdot 12H_2O$,溶于 900 mL Milli-Q 水中,将 pH 调节至 7.4,定容至 1000 mL,搅拌均匀,通过 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, $4\text{ }^\circ C$ 冰箱保存。

(3) 细胞消化液:称取 0.08 g $NaHPO_4 \cdot 12H_2O$ 、0.35 g $NaHCO_3$ 、0.4 g KCl、0.06 g KH_2PO_4 、8.0 g NaCl、胰酶 2.5 g、乙二胺四乙酸钠 0.2 g 溶于 900 mL Milli-Q 水中,将 pH 调整为 7.4,定容至 1000 mL,搅拌均匀,再用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,置于 $4\text{ }^\circ C$ 冰箱保存。

(4) 10 mM 肽溶液配制:2.38 mL Milli-Q 水溶解 10 mg RVF,再使用 0.22 μm 滤膜过滤除菌,分装后保存于 $-20\text{ }^\circ C$ 冰箱,使用前用相应培养基稀释至所需浓度(一般有效期为一周)。

(5) MTT 溶液:称取 20 mg MTT 粉,于 10 mL PBS 中充分溶解,置于 $4\text{ }^\circ C$ 冰箱,避光保存(两周有效期)。

(6) 10 mM Tris 溶液:称取 Tris 粉 0.12 g,加入到 100 mL Milli-Q 水中,搅拌均匀,置于 $4\text{ }^\circ C$ 冰箱中。

(7) 1%冰醋酸:取冰醋酸 10 mL,加入到 1 L Milli-Q 水中充分溶解,搅拌均匀,置于 $4\text{ }^\circ C$ 冰箱中。

(8) 0.4% SRB 溶液:称取 SRB 粉 0.4 g,加入到 100 mL 1%冰醋酸中充分溶解,搅拌均匀,置于 $4\text{ }^\circ C$ 冰箱中,避光保存。

1.2.2 SH-SY5Y 细胞饥饿模型的建立

待细胞生长至对数期,消化、收集细胞,96 孔培养板中接种细胞密度为 5×10^4 个/mL,每孔 100 μL 细胞液,置于 $37\text{ }^\circ C$ 、5% (V/V) CO_2 培养箱中过夜培养后,吸去培养基,用 PBS 清洗 2 遍,加入新鲜培养基

(无血清), 每组 6 个平行复孔, 分别培养 12 h、24 h、48 h 和 72 h 后, 采用 MTT 法检测各组细胞存活率, 向 96 孔板每孔中加入 2 mg/mL MTT 溶液 40 μ L, 于培养箱内继续孵育 4 h, 小心吸走上清, 每孔中加入 100 μ L 的 DMSO, 振荡 10 min, 使结晶紫完全溶解, 酶标仪 490 nm 处检测吸光度值, 按公式 (1) 计算细胞存活率:

$$\text{细胞存活率 (\%)} = \frac{\text{实验组 OD 值}}{\text{对照组 OD 值}} \times 100\% \quad (1)$$

细胞饥饿后, 存活率达到 IC₅₀ 所使用的时间为模型时间。

1.2.3 RVF 在细胞饥饿损伤模型中的营养功能

待细胞生长至对数期, 消化、收集细胞, 96 孔培养板中接种细胞密度为 5×10^4 个/mL, 每孔 100 μ L 细胞液, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% (V/V) CO₂ 培养箱中过夜培养后, 吸去培养基, 用 PBS 清洗 2 遍, 加入新鲜培养基 (分别含 0%、1%、3% 的血清), 同时分别加入浓度为 100 μ M、200 μ M、300 μ M、400 μ M、500 μ M 的 RVF。每组设置 6 个平行复孔, 分别作用 12 h、24 h、48 h 和 72 h 后, MTT 法检测细胞存活率, 采用谷胱甘肽 (GSH) 作为阳性对照。

1.2.4 SH-SY5Y 细胞氧化损伤模型的建立

(1) MTT 法

待细胞生长至对数期, 消化、收集细胞, 96 孔板中接种细胞密度为 1×10^5 个/mL, 每孔 100 μ L 细胞液, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% (V/V) CO₂ 培养箱中培养 12 h 后, 向每组细胞 (6 复孔) 中加入用 10% FBS 的 MEM 培养基稀释的 H₂O₂, 使每组复孔中 H₂O₂ 终浓度分别为 50、100、200、300 μ mol/L, 作用时间为 24 h。药物作用细胞后, 采用 MTT 法检测各组测细胞存活率, 方法同 2.2, 按公式 1.1 计算细胞存活率, 50% 致死率的细胞组所对应的 H₂O₂ 浓度即为目标浓度。

(2) SRB 法

待细胞生长至对数期, 细胞处理同上。药物作用细胞后, 采用 SRB 法检测各组细胞存活率, 吸出培养液后再向每孔中加入 10% TCA 溶液 200 μ L, 室温静置 5 min, 移至 4 $^{\circ}$ C 冰箱静置 1 h 后弃去溶液, Milli-Q 水洗涤三遍, 空气干燥, 每孔加入 0.4% SRB 溶液 100 μ L, 将细胞置于培养箱内, 继续孵育 30 min, 弃去染色液, 再用 1% 冰醋酸洗涤三遍, 空气干燥, 每孔中再加入 10 mM Tris 溶液 150 μ L 振荡 30 s, 酶标仪检测 565 nm 处的吸光度值, 计算公式如 (1.1)。

1.2.5 RVF 在细胞氧化损伤模型中的保护作用

1.2.5.1 细胞培养与分组

待细胞生长至对数期, 消化、收集、计数, 调节

细胞密度分别为 1×10^5 个/mL (96 孔板) 和 3×10^6 个/mL (6 孔板), 分别接种至 96 孔板 (细胞存活率测定) 和 6 孔板中, 分组处理如下:

(1) 对照组: 加入含有 10% 新生牛血清的 MEM 培养基;

(2) 损伤模型组: 加入含 H₂O₂ 的 MEM 培养基;

(3) 麦胚抗氧化肽 RVF 保护组: 先加入含有 RVF 的 MEM 培养基, 再加入含 H₂O₂ 的 MEM 培养基, 使得 RVF 终浓度分别为 50、100、200 μ mol/L;

(4) 谷胱甘肽 (GSH) 阳性对照组: 先加入含有 GSH 的 MEM 培养基, 再加入含 H₂O₂ 的 MEM 培养基, 使得 GSH 终浓度为 100 μ mol/L;

放入培养箱 (37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂) 中培养 24 h 后测定细胞存活率。

1.2.5.2 细胞存活率的测定

待细胞生长至对数期, 消化、收集细胞, 96 孔板中接种细胞, 每孔 100 μ L 细胞液, 分组, 药物作用结束后, 于相差显微镜观察细胞形态, 采用 MTT 和 SRB 法检测细胞存活率。

1.2.6 数据统计与分析

实验数据均来自 3 次以上独立实验, 结果以平均值 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示。组间差异采用 Student's *t*-test 比较, $p < 0.05$ 表示具有显著性差异, $p < 0.01$ 表示具有极显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 饥饿模型下 RVF 对 SH-SY5Y 细胞的营养功能

2.1.1 饥饿诱导 SH-SY5Y 细胞损伤模型的建立

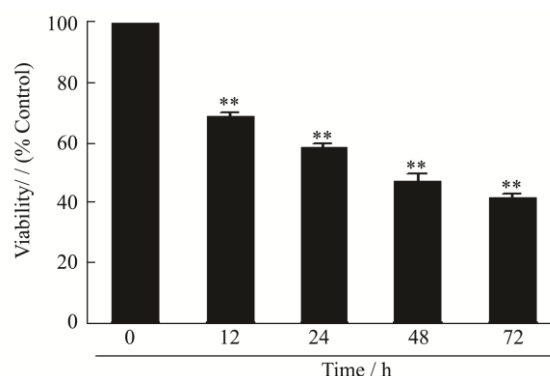


图 1 饥饿时间对 SH-SY5Y 细胞存活率的影响

Fig.1 Effects of starvation time on SH-SY5Y cell viability

注: **: $p < 0.01$ 与对照组相比具有极显著差异。

胎牛血清含有细胞培养所需的全部营养成分和

因子,最主要的蛋白质成分包括白蛋白(35~45 g/L)、 α_1 抗胰蛋白酶(1.4~2.8 g/L)、转铁蛋白(2.10~4.55 g/L)与 Ig 类抗体(9.0~15.5 g/L); 并有含量不等的如 α_2 巨球蛋白、 α_1 和 β_1 脂蛋白、胆固醇、纤维结合蛋白、胆红素等成分; 除主要成分外,血清中还含有微量元素、脂肪酸、特殊离子、维生素和激素等,这些物质在细胞存活、酶促反应以及细胞分裂等生物反应中起着重要作用^[8-10]。在血清剥夺饥饿模型中,激活磷酸腺苷活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK),可通过调节多种外周组织的代谢来控制整个机体的能量平衡,如葡萄糖和脂类的代谢等^[4-6]; 同时,细胞因营养缺失会引发凋亡和自噬^[7],从而可使细胞增殖受到抑制。不同饥饿时间对 SH-SY5Y 细胞存活率的影响如图 1 所示。由图 1 可知,随着饥饿时间的延长,SH-SY5Y 细胞活力逐步下降,且饥饿 48 h 后,细胞活力可下降到 50.00%左右。

2.1.2 无血清条件下 RVF 对饥饿诱导 SH-SY5Y 细胞损伤模型的保护作用

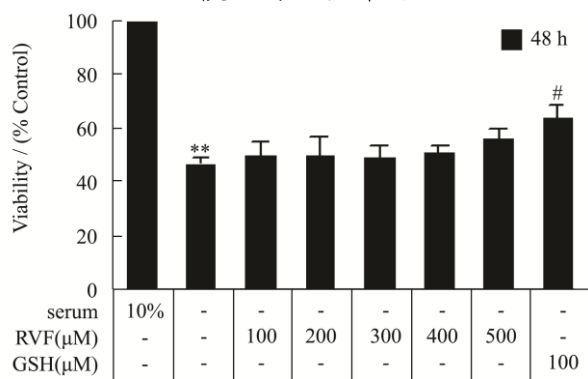


图 2 无血清时, RVF 作用 48 h 对 SH-SY5Y 细胞存活率的影响

Fig.2 Effects of 48-h RVF treatment with no serum on SH-SY5Y cell viability

注: **: $p < 0.01$ 与对照组相比具有极显著差异; #: $p < 0.05$ 与 H_2O_2 组相比具有显著差异。

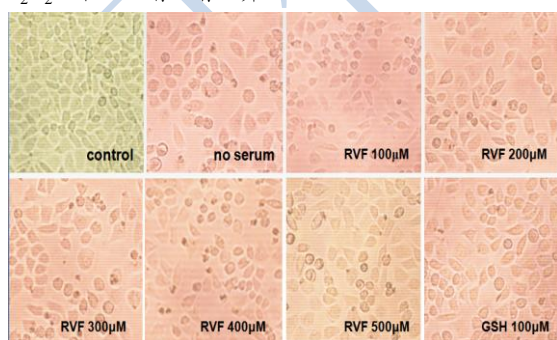


图 3 无血清时, RVF 作用 48 h 对 SH-SY5Y 细胞形态变化的影响

Fig.3 Effects of 48-h RVF treatment with no serum on morphological alterations in SH-SY5Y cells

为考察 RVF 是否具有营养功能,本研究先将细胞在无血清条件下同时加入 RVF,饥饿 48 h 后再考察细

胞存活率与形态变化,结果如图 2~3 所示。从图 2 可知,在无血清饥饿 48 h 后, RVF 并没有明显的营养保护作用; 而阳性对照组经 100 μ M GSH 作用 48 h 后,可将细胞存活率由 48.20 \pm 2.10% ($p < 0.01$) 提升至 62.80 \pm 3.90% ($p < 0.05$)。从图 3 可知,无血清作用组的细胞明显皱缩、黏性降低、数目明显减少; 100、200、300、400、500 μ mol/L RVF 干预后,细胞形态并未发生明显改变; 而 GSH 作用组的细胞不仅数目增多,且形态由圆形变为多角形,说明 RVF 对饥饿诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤无保护作用。

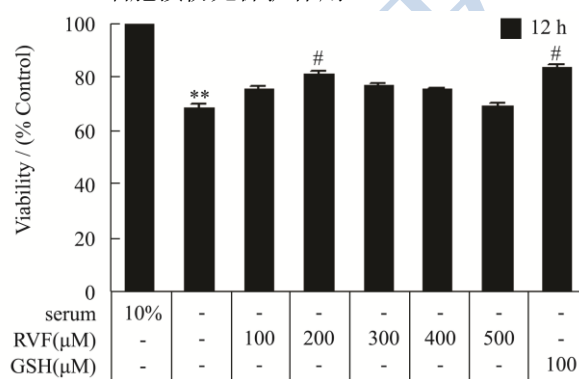


图 4 无血清时, RVF 作用 12 h 对 SH-SY5Y 细胞存活率的影响

Fig.4 Effects of 12-h RVF treatment with no serum on SH-SY5Y cell viability

注: **: $p < 0.01$ 与对照组相比具有极显著差异; #: $p < 0.05$ 与 H_2O_2 组相比具有显著差异。

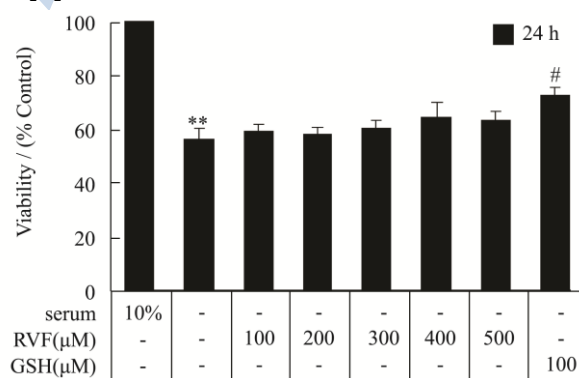


图 5 无血清时, RVF 作用 24 h 对 SH-SY5Y 细胞存活率的影响

Fig.5 Effects of 24-h RVF treatment with no serum on SH-SY5Y cell viability

注: **: $p < 0.01$ 与对照组相比具有极显著差异; #: $p < 0.05$ 与 H_2O_2 组相比具有显著差异。

为考察细胞饥饿不同时间及 RVF 孵育不同时间对细胞存活率的影响,本研究将细胞在无血清条件下同时加入 RVF,分别饥饿 12 h、24 h、72 h 后再测定细胞存活率,其结果如图 4~6 所示。从图 4~6 可知,在无血清存在时,只有经 200 μ M RVF 作用 12 h 时,才可将细胞存活率由 68.30 \pm 2.60% ($p < 0.01$) 提升至 81.30 \pm 2.50% ($p < 0.05$),其他饥饿时间和浓度的 RVF

对细胞的保护效果并无显著差异；而阳性对照组经 100 μM GSH 作用 12 h、24 h 后，可分别将细胞存活率提升 15.30% ($p < 0.05$)、14.50% ($p < 0.05$)，但作用 72 h 后，细胞存活率并无显著差异。以上研究结果表明在无血清饥饿模型中，除 200 μM/L RVF 作用 12 h 试验组可将细胞存活率显著提高外 ($p < 0.01$)，RVF 并没有明显的营养功能。

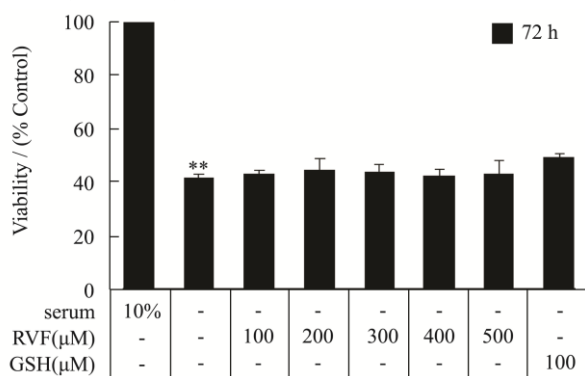


图 6 无血清时，RVF 作用 72 h 对 SH-SY5Y 细胞存活率的影响

Fig.6 Effects of 72-h RVF treatment with no serum on SH-SY5Y cell viability

注: **: $p < 0.01$ 与对照组相比具有极显著差异。

2.1.3 有血清条件下 RVF 对饥饿诱导 SH-SY5Y 细胞损伤模型的保护作用

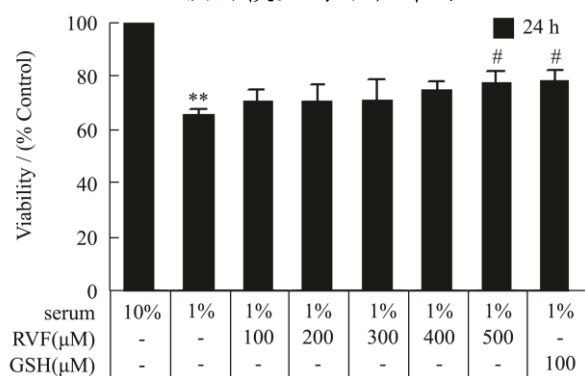


图 7 1%血清存在时，RVF 作用 24 h 对 SH-SY5Y 细胞存活率的影响

Fig.7 Effects of 24-h RVF treatment for with 1% serum on SH-SY5Y cell viability

注: **: $p < 0.01$ 与对照组相比具有极显著差异; #: $p < 0.05$ 与 H₂O₂ 组相比具有显著差异。

考虑到 RVF 只是一个仅含 3 个氨基酸的寡肽，在完全没有血清的条件下，细胞所需要的生长因子等营养物质得不到保障，所以本研究分别将细胞在 1%、3% 血清存在的条件下同时加入 RVF，饥饿 24 h、48 h、72 h 后考察细胞存活率，结果如图 7~10 所示。

由图 7~9 可知，在 1% 的血清中，除 500 μmol/L 的 RVF 作用 24 h 可将细胞存活率由 66.10±2.60% ($p < 0.01$) 提高至 78.20±2.40% ($p < 0.05$) 外，其他组

别并没有显著性差异，即 RVF 并没有起到明显的保护作用。考虑到饥饿时间为 48 h 和 72 h 时，因时间太久可能导致 RVF 失效，所以实验中每隔 24 h 换一次新鲜培养基（含 1% 血清）和 RVF，但发现细胞存活率不但未提高反而下降。其原因之一可能是换液时原培养液中细胞分泌的细胞因子被移走，原因之二可能是细胞在饥饿状态时自身分泌细胞因子的能力下降。且公认为在生物体内抗氧化活性较强的谷胱甘肽，在饥饿模型中也没有起到明显的保护作用。其原因可能是血清提供了多种维持细胞生长所需的激素、结合蛋白、多肽类细胞因子、微量元素铜、锌、钴、铝和硒等^[8-10]，虽然 GSH 有较强的抗氧化作用，但是并不能提供血清中细胞生长所需的全部营养因子。因此，在无血清和少量血清的饥饿模型中，GSH 也没有起到明显的保护作用。

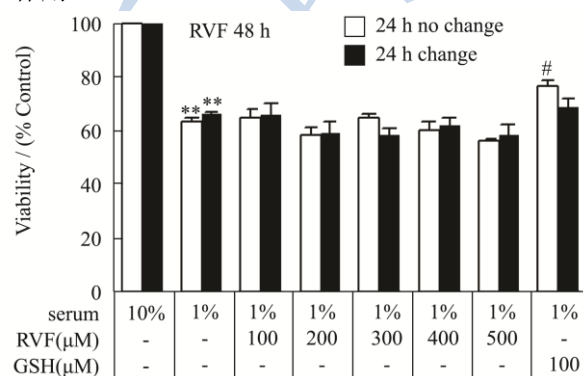


图 8 1% 血清存在时，RVF 作用 48 h 对 SH-SY5Y 细胞存活率的影响

Fig.8 Effects of 48-h RVF treatment with 1% serum on SH-SY5Y cell viability

注: **: $p < 0.01$ 与对照组相比具有极显著差异; #: $p < 0.05$ 与 H₂O₂ 组相比具有显著差异。

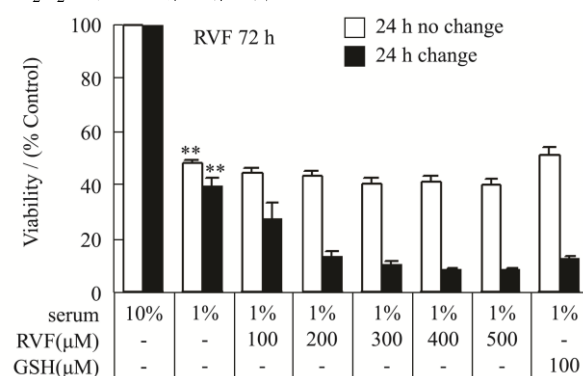


图 9 1%血清存在时，RVF 作用 72 h 对 SH-SY5Y 细胞存活率的影响

Fig.9 Effects of 72-h RVF treatment with 1% serum on SH-SY5Y cell viability

注: **: $p < 0.01$ 与对照组相比具有极显著差异。

而由图 10 可知，在 3% 血清存在条件下 100-500

μmol/L RVF 作用 72 h, 对细胞也没有明显的保护作用。综上所述, 在无血清饥饿模型中 200 μmol/L 的 RVF 作用 12 h 可将细胞存活率由 68.30±2.60% (p<0.01) 提升至 81.30±2.50% ((p<0.05), 在含 1% 血清的饥饿模型中 500 μmol/L 的 RVF 作用 24 h 可将细胞存活率由 66.10±2.60% (p<0.01) 提高至 78.20±2.40% (p<0.05), 而在含 3% 血清的饥饿模型中 500 μmol/L 的 RVF 并没有将细胞存活率显著性地提升。结果表明在 40 个不同浓度与作用时间的组别中, 对 SH-SY5Y 细胞具有显著营养功能的只有无血清饥饿模型中 200 μmol/L RVF 作用 12 h 与含 1% 血清饥饿模型中 500 μmol/L RVF 作用 24 h 两个组别, 与细胞模型中有无血清没有必然关系, 且不具有剂量与时间依赖性。

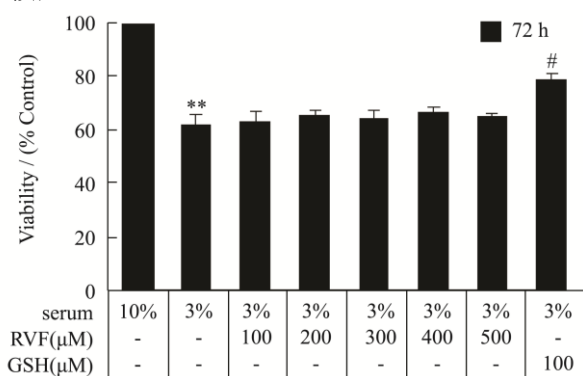


图 10 3%血清存在时, RVF 作用 72 h 对 SH-SY5Y 细胞存活率的影响

Fig.10 Effects of 72-h RVF treatment with 3% serum on SH-SY5Y cell viability

注: **: p<0.01 与对照组相比具有极显著差异; #: p<0.05 与 H2O2 组相比具有显著差异。

2.2 氧化损伤模型下 RVF 对 SH-SY5Y 细胞的

抗氧化功能

2.2.1 H₂O₂ 诱导 SH-SY5Y 细胞氧化损伤模型的建立

H₂O₂ 对细胞膜渗透能力强, 在细胞内可与过渡金属离子发生反应, 生成活性更强、危害更大的 OH, 进而导致细胞蛋白质、核酸损伤及细胞凋亡或坏死。由于人神经母细胞瘤株 SH-SY5Y 培养周期短, 且生长繁殖快, 常被用作研究神经元损伤的载体。已有采用 H₂O₂ 诱导 SH-SY5Y 细胞建立氧化应激损伤模型报道^[11~13], 且研究表明自由基正是引起 NDs 的主因之一^[14~18]。因此, 本研究亦采用 H₂O₂ 作为氧化应激的诱导剂, 建立 SH-SY5Y 细胞的氧化损伤模型。

MTT 比色法系利用一定细胞数范围内, MTT 与

活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶反应形成蓝紫色结晶甲瓩 Formazan, 且结晶形成的量与细胞数成正相关的关系进行存活率的测定^[19]。但是随着 MTT 加入时间的延长, MTT 还原为水不溶性的蓝紫色结晶甲瓩 Formazan 的生成量也会增加, 从而增加了实验误差。SRB 是一种蛋白质结合染料, 可与生物大分子中的碱性氨基酸结合, 其在 565 nm 处产生最大吸收峰, 其吸光值与细胞量呈线性正关系, 即比色法可定量测定细胞内总蛋白质的含量; 且磺酰罗丹明 B 与蛋白质结合后, 吸光值不受时间影响, 比 MTT 法更稳定^[20]。

本课题前期研究已采用 MTT 法考察了 RVF 对细胞存活率的影响^[3], 考虑到 SRB 法比 MTT 法有着更好的稳定性, 拟进一步采用 SRB 法验证 RVF 对细胞存活率的影响, 并与 MTT 法的检测结果同时进行分析, 结果如图 11~12 所示。

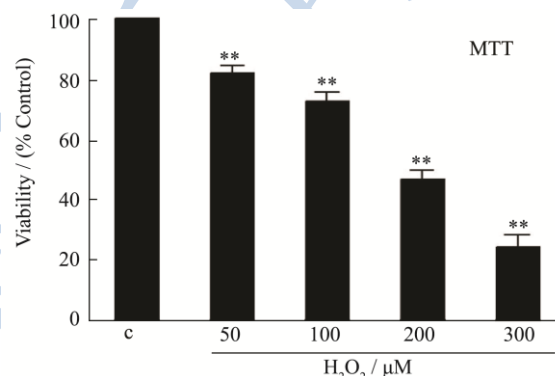


图 11 H₂O₂ 浓度对 SH-SY5Y 细胞存活率的影响 (MTT)

Fig.11 Effects of H₂O₂ on SH-SY5Y cell viability (MTT assay)

注: **: p<0.01 与对照组相比具有极显著差异。

从图 11 可知, 随着 H₂O₂ 浓度的增大, 采用 MTT 法检测的细胞存活率也越来越低。在 H₂O₂ 浓度达到 200 μmol/L 时, SH-SY5Y 细胞的存活率为 46.90±2.00% (P<0.01), 接近 50.00%。

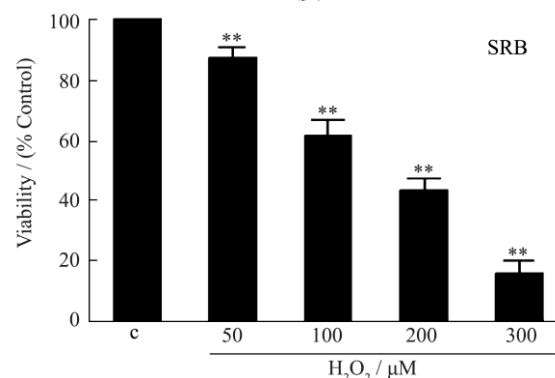


图 12 H₂O₂ 浓度对 SH-SY5Y 细胞存活率的影响 (SRB)

Fig.12 Effects of H₂O₂ on SH-SY5Y cell viability (SRB)

注: **: p<0.01 与对照组相比具有极显著差异。

从图 12 可知, SRB 法也得到了相似的结果。在 H₂O₂ 浓度达到 200 μmol/L 时, SH-SY5Y 细胞的存活

率为 43.50±1.10% ($P<0.01$)。虽然从检测原理来看, MTT 法反映的是活细胞线粒体中琥珀酸脱氢酶活力, 而 SRB 法则是通过 SRB 与碱性氨基酸的结合来反映细胞内总蛋白质的含量, 但两者的检测结果相似。因 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用 SH-SY5Y 细胞 12 h 后, 细胞成活率接近 50.00%, 所以将此条件作为建立 SH-SY5Y 细胞氧化损伤模型的条件。

2.2.2 RVF 预孵育浓度对 SH-SY5Y 细胞存活率的影响

本研究考察了不同浓度 RVF 对 H_2O_2 诱导的 SH-SY5Y 细胞存活率的影响, 以确定最佳的 RVF 作用浓度, 结果如图 13、14 所示。

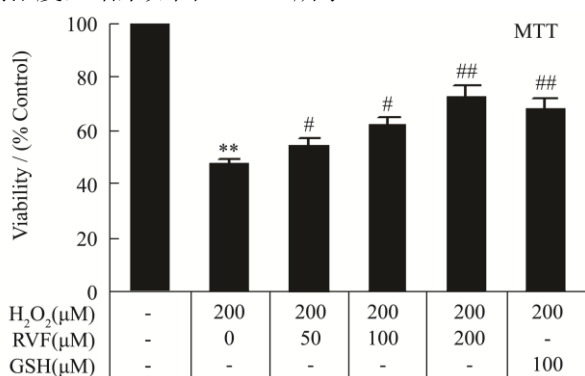


图 13 RVF 预孵育对 H_2O_2 诱导 SH-SY5Y 细胞氧化损伤的保护作用 (MTT)

Fig.13 Protective effects of RVF pre-incubation on H_2O_2 -induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells (MTT)

注: **: $p<0.01$ 与对照组相比具极显著差异; #: $p<0.05$; ##: $p<0.01$ 与 H_2O_2 组相比具显著差异。

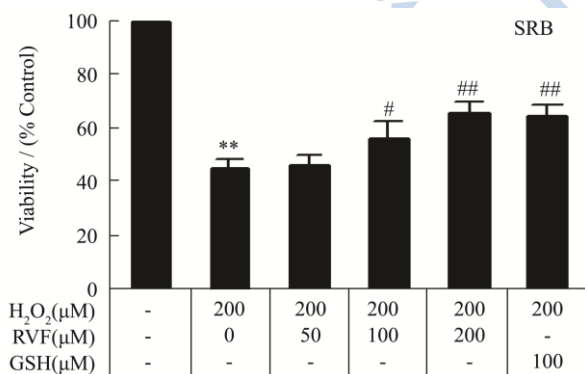


图 14 RVF 预孵育对 H_2O_2 诱导 SH-SY5Y 细胞氧化损伤的保护作用 (SRB)

Fig.14 Effects of RVF pre-incubation on H_2O_2 -induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells (SRB assay)

注: **: $p<0.01$ 与对照组相比具极显著差异; #: $p<0.05$; ##: $p<0.01$ 与 H_2O_2 组相比具显著差异。

从图 13 可知, MTT 法检测结果为 50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 的 RVF 干预组可将细胞存活率由 H_2O_2 作用组的 47.85%±1.80% ($p<0.01$) 分别提高至 54.80%±2.60%

($p<0.05$)、62.70%±2.30% ($p<0.05$) 和 72.90%±3.90% ($p<0.01$), 即可分别将细胞存活率提升 6.95% ($p<0.05$)、14.85% ($p<0.05$)、25.05% ($p<0.01$), 结果表明 RVF 预孵育浓度越高, 对 SH-SY5Y 细胞的保护效果也越好。

从图 14 可知, SRB 法也得到了相似结果, 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 损伤组的细胞存活率显著下降至 44.20%±3.10% ($p<0.01$), 而 50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 的 RVF 干预组的存活率可分别提高到 46.20%±2.20%、57.50%±3.30% ($p<0.05$) 和 66.10%±1.80% ($p<0.01$), 即可分别将细胞存活率提升 2.00%、13.30% ($p<0.05$)、21.90% ($p<0.01$), 并呈现了一定的剂量依赖性。

从 MTT 法与 SRB 法的检测结果可知, 50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ RVF 干预组均能显著性地提升 H_2O_2 损伤的细胞存活率, 考虑到 200 $\mu\text{mol/L}$ RVF 将细胞存活率提升最高, 本研究后续实验选择 RVF 预孵育浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.2.3 RVF 预孵育时间对 SH-SY5Y 细胞存活率的影响

在确定了 RVF 最佳预孵育浓度后, 进一步考察 RVF 预孵育时间对 H_2O_2 诱导的 SH-SY5Y 细胞存活率的影响, 以确定最佳的 RVF 预孵育时间, 结果如图 15 所示。

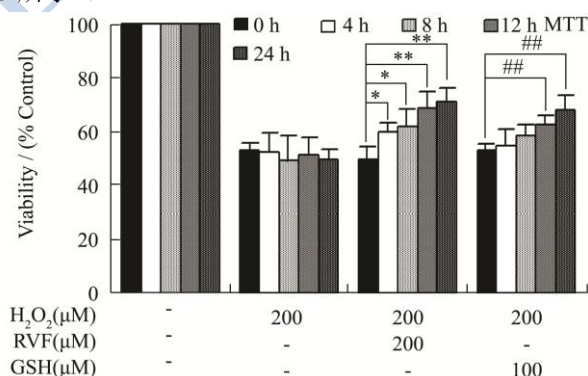


图 15 RVF 预孵育时间对细胞存活率的影响 (MTT)

Fig.15 Time-dependent effects of RVF pre-incubation on H_2O_2 -induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells (MTT assay)

注: *: $p<0.05$; **: $p<0.01$ RVF 与 H_2O_2 组相比具有极显著差异; ##: $p<0.01$ GSH 与 H_2O_2 组相比具有显著差异。

由图 15 可知, 200 $\mu\text{mol/L}$ RVF 分别预孵育 4 h、8 h、12 h 和 24 h 后, 细胞存活率逐渐升高。当预孵育时间延长至 12 h 时, RVF 极显著地提高了细胞存活率 ($p<0.01$); 虽然与对照组相比预孵育 24 h 细胞存活率也有极显著差异 ($p<0.01$), 但是与预孵育 12 h 相比并没有显著性差异, 兼顾实验时间缩短的优势, 本研究后续实验选择 RVF 预孵育时间为 12 h。

Zhang^[21]和 Kwon^[22]等通过 MTT 实验分别发现红

景天苷和马钱子苷可缓解 H_2O_2 诱导的 SH-SY5Y 细胞存活率的下降,表明红景天苷和马钱子苷可抑制 H_2O_2 导致的 SH-SY5Y 细胞的氧化损伤; Pasquali^[23]等通过 MTT 和 SRB 实验发现过量的维生素 A 可以提升人肺癌细胞的存活率,而加入维生素 E 后又可抑制细胞存活率的提高表明过量服用维生素 A 可能提高了细胞氧化应激水平和肺癌发病率,但是联合服用维生素 E 后,细胞氧化应激现象得到抑制。

2.2.4 RVF 对 SH-SY5Y 细胞形态的影响

正常 SH-SY5Y 细胞呈梭形或多角形状,在 H_2O_2 刺激下,细胞会变圆或细长,且贴壁性下降;细胞凋亡时,则会有明显的皱缩,且部分漂浮在培养基中,可通过细胞形态变化来了解细胞的应激状况^[24,25]。

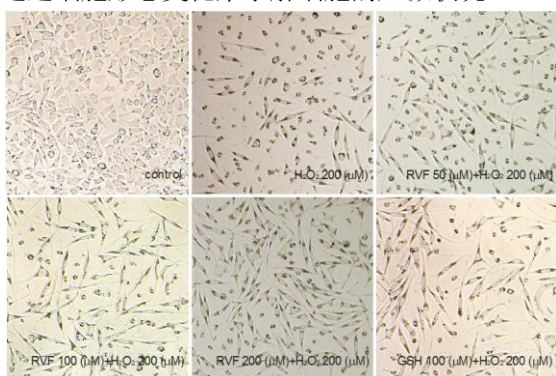


图 16 麦胚抗氧化肽 RVF 对 H_2O_2 诱导 SH-SY5Y 细胞的形态变化的影响

Fig.16 Effects of RVF on H_2O_2 -induced morphological alterations in SH-SY5Y cells

RVF 干预 H_2O_2 诱导的 SH-SY5Y 细胞的形态变化如图 16 所示。从图 16 可知, H_2O_2 作用组的细胞不仅明显皱缩,且变得细长;而 50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ RVF 干预后,细胞形态逐渐恢复,梭形或多角形细胞数目逐渐增多,说明 RVF 对 H_2O_2 导致的 SH-SY5Y 细胞氧化应激具有抑制作用。Zhang^[21]、Kwon^[22]等关于红景天苷和马钱子苷对 SH-SY5Y 细胞凋亡时细胞形态变化的研究也得到了相似的结果。

3 结论

3.1 在无血清条件下, RVF 分别作用 12 h、24 h、48 h、72 h 后,只有 200 μM RVF 作用 12 h 的组别可将细胞存活率由 $68.30 \pm 2.60\%$ ($p < 0.01$) 提升至 $81.30 \pm 2.50\%$ ($p < 0.05$),表明在无血清饥饿模型中, RVF 并没有明显的营养功能;细胞形态学分析结果也表明 RVF 并没能有效缓解细胞因饥饿导致的数目和形态的变化。

3.2 在 1% 的血清条件下,除 500 $\mu\text{mol/L}$ RVF 作用 24 h 可将细胞存活率由 $66.10 \pm 2.60\%$ ($p < 0.01$) 提高至

$78.20 \pm 2.40\%$ ($p < 0.05$) 外,其他组别没有显著性差异,表明在 1% 的血清饥饿模型中, RVF 没有明显的营养功能;在 3% 的血清条件下,100-500 $\mu\text{mol/L}$ RVF 作用 72 h 对细胞也没有明显的保护作用;结果表明在 40 个不同浓度与作用时间的 RVF 组别中对 SH-SY5Y 细胞具有显著营养功能的只有 2 个组别,与细胞模型中无血清没有必然关系,且不具有剂量与时间依赖性。

3.3 通过 MTT 和 SRB 实验可知,200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用 SH-SY5Y 细胞 12 h 后,SH-SY5Y 细胞存活率接近 50.00%,所以选择 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用 SH-SY5Y 细胞 12 h 作为后续实验的模型条件。

3.4 与 H_2O_2 作用组相比,50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 的 RVF 将细胞存活率分别提高了 6.95%、15.95%、25.05% (MTT 法) 和 2.00%、13.30%、21.90% (SRB 法);并且经 RVF 分别预孵育 4 h、8 h、12 h 和 24 h 后,细胞存活率逐渐升高;当预孵育时间延长至 12 h 时, RVF 极显著地提高了细胞存活率,因而选择预孵育 12 h 作为保护模型时间;细胞形态检测结果表明 RVF 干预后,SH-SY5Y 细胞逐渐由皱缩、细长恢复到梭形或多角形,且细胞数目也逐渐增多、粘附性增强,说明 RVF 对 H_2O_2 导致的 SH-SY5Y 细胞氧化应激具有抑制作用。

3.5 综上所述, RVF 在 H_2O_2 诱导的细胞氧化损伤模型中的保护作用更加突出,因此本研究将继续在 H_2O_2 诱导的细胞氧化损伤模型中考察 RVF 的保护机制。

参考文献

- [1] Jaruga M. Free radical-induced damage to dna:mechanisms and measurement [J]. Free radical Biology & Medicine, 2002, 32(11): 1102-1115
- [2] 张丽霞,顾振新,周剑忠,等.双酶水解麦胚制备抗氧化肽的工艺优化[J].江苏农业学报,2010,26(3):601-606
ZHANG Li-xia, GU Zhen-xin, ZHOU Jian-zhong, et al. Optimization of preparation of wheat germ antioxidant peptides with two enzymes [J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2010, 26(3): 601-606
- [3] Cheng Yun-hui, Zhang Li, Sun Wei, et al. Protective effects of a wheat germ peptide (RVF) against H_2O_2 -induced oxidative stress in human neuroblastoma cells [J]. Biotechnology Letters, 2014, 36(8): 1615-1622
- [4] Hardi DG AMP-activated protein kinase-an energy sensor that regulates all aspects of cell function [J]. Genes Development, 2011, 25(18): 1895-1908
- [5] Hardie DG, Carling D, Gamblin S J. AMP-activated protein kinase:also regulated by ADP [J]. Trends in Biochemical

- Sciences, 2011, 36(9): 470-477
- [6] Ching JK, Rajguru P, Marupudi N, et al. A role for AMPK in increased insulin action after serum starvation [J]. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2010, 299(5): C1171-C1179
- [7] Pandey S, Lopez C, Jammuan A. Oxidative stress and activation of proteasome protease during serum deprivation-induced apoptosis in rat hepatoma cells; inhibition of cell death by melatonin [J]. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2003, 8(5): 497-508
- [8] 马志仁,冯玉萍,李倬,等.动物血清在细胞培养中的重要性及其质量控制标准[J].西北民族大学学报, 2003, 50(24): 56-58
- MA Zhong-ren, FENG Yu-ping, LI Zhuo, et al. The importance of animal serum in cell culture and its quality control standard [J]. Journal of northwest university for nationalities, 2003, 50(24): 56-58
- [9] 董关木.细胞培养用牛血清现状与进展[J].中国生物制品学杂志,2007,20(9):697-700
- [10] 董萍,杨永鹏,丁克祥,等.不同血清浓度及体外培养时间对小鼠成纤维细胞L929细胞系生长曲线和细胞形态学的影响[J].中国老年学杂志,2011,31(11):2020-2024
- DONG Ping, YANG Yong-peng, DING Ke-xiang, et al. The influence of different blood serum concentration and growth time upon the growth curve and the morphological character of in vitro cultured L929 cell line of mouse fibroblasts [J]. Chinese Journal of Gerontology, 2011, 31(11): 2020-2024
- [11] Crispo J A, Piche M, Ansell D R, et al. Protective effects of methyl gallate on H₂O₂-induced apoptosis in PC12 cells [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010, 393(4): 773-778
- [12] Joshi G, Perluigi M, Sultana R, et al. *In vivo* protection of synaptosomes by ferulic acid ethyl ester (FAEE) from oxidative stress mediated by 2,2-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH) or Fe²⁺/H₂O₂:insight into mechanisms of neuroprotection and relevance to oxidative stress-related neurodegenerative disorders [J]. Neurochemistry International, 2006, 48(4): 318-327
- [13] Tang Li-Li, Wang Rui, Tang Xi-Can. Huperzine A protects SHSY5Y neuroblastoma cells against oxidative stress damage via nerve growth factor production [J]. European Journal of Pharmacology, 2005, 519(1-2): 9-15
- [14] Manabe S, Gu Z, Lipton S A. Activation of matrix metalloproteinase-9 via neuronal nitric oxidasesynthase contributes to NMDA-induced retinal ganglion cell death [J]. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2005, 46(12): 4747-4753
- [15] Danielson SR, Andersen JK. Oxidative and nitrative protein modifications in Parkinson's disease [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2008, 44(10): 1787-1794
- [16] Radak Z, Kumagai S, Nakamoto H, et al. 8-Oxoguanosine and uracil repair of nuclear and mitochondrial DNA in red and white skeletal muscle of exercise-trained old rats [J]. Journal of Applied Physiology, 2007, 102(4): 1696-1701
- [17] Manzanero S, Santro T, Arumugam TV. Neuronal oxidative stress in acute ischemic stroke: Sources and contribution to cell injury [J]. Neurochemistry International, 2013, 62(5): 712-718
- [18] Bogdanov MB, Ramos LE, Xu Zuo-shang, et al. Elevated "hydroxyl radical" generation in vivo in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis [J]. Journal of Neurochemistry, 1998, 71(3): 1321-1324
- [19] Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, et al. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing [J]. Cancer Research, 1987, 47(4): 936-942
- [20] Skehan P, Storeng R, Scudiero D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening [J]. Journal of the National Cancer Institute, 1990, 82(13): 1107-1112
- [21] Zhang Li, Yu Hui-Xin, Yang Sun, et al. Protective effects of salidroside on hydrogen peroxide-induced apoptosis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells [J]. European Journal of Pharmacology, 2007, 564(1-3): 18-25
- [22] Kwona SH, Kim JA, Hong SI, et al. Loganiin protects against hydrogen peroxide-induced apoptosis by inhibiting phosphorylation of JNK, p38, and ERK 1/2 MAPKs in SH-SY5Y cells [J]. Neurochemistry International, 2011, 58(4): 533-541
- [23] Pasquali MA, Gelain DP, Fares ZC, et al. Vitamin A (retinol) downregulates the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) by oxidant-dependent activation of p38 MAPK and NF- κ B in human lung cancer A549 cells [J]. Cellular Signalling, 2013, 25(4): 939-954
- [24] Zhang Li, Yu Hui-Xin. Neuroprotective effects of salidroside against beta-amyloid-induced oxidative stress in SH-SY5Y human neuroblastoma cells [J]. Neurochemistry International. 2010, 57(5): 547-555
- [25] Nakagawa T, Zhu Hong. Caspase-12 mediates endoplasmic reticulum specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- β [J]. Letters to Nature, 2000, 403(6): 98-103