

赤藓糖醇对 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞氧化损伤的保护作用

韩春妮, 何芳雁, 代蓉, 范源
(云南中医学院, 云南昆明 650500)

[摘要] 目的 研究赤藓糖醇对 PC12 细胞氧化损伤的保护作用. 方法 用 H₂O₂ 造成 PC12 细胞氧化损伤模型, 通过观察细胞形态, 测定细胞存活率(MTT法)、LDH 泄漏量和 GSH 含量, 探讨赤藓糖醇对 PC12 细胞氧化损伤的保护作用. 结果 赤藓糖醇可减轻 H₂O₂ 对 PC12 细胞的氧化损伤程度, 明显提高细胞存活率 ($P < 0.05$), 减少细胞 LDH 泄漏 ($P < 0.01$), 提高细胞内 GSH 含量 ($P < 0.01$). 结论 赤藓糖醇在体外具有抗氧化损伤的作用.

[关键词] 赤藓糖醇; H₂O₂; 氧化损伤; PC12 细胞

[中图分类号] R965 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2014) 08-0009-04

The Protective Effects of Erythritol against Oxidative Damage Induced by H₂O₂ in PC12 Cells

HAN Chun-ni, HE Fang-yan, DAI Rong, FAN Yuan

(Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming Yunnan 650500, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the protective effect of Erythritol against the oxidative damage of PC12 cells. **Methods** We established the oxidative damage cellular model in PC12 cells through H₂O₂ treatment. The protective effect of Erythritol was evaluated by morphological identification, colorimetric MTT assay, leakage of LDH, and the content of GSH in cells. **Results** Compared with the model group, Erythritol could reduce the PC12 cells damage induced by H₂O₂, increased the survival rate ($P < 0.05$), decreased the release of LDH ($P < 0.01$) and increased the intracellular GSH content ($P < 0.01$). **Conclusion** Erythritol has obvious antioxidant effect in vitro.

[Key words] Erythritol; H₂O₂; Oxidative damage; PC12 cells

糖尿病是当今社会的常见病和多发病, 目前我国 2 型糖尿病的患病率持续上升, 严重危害人类的健康. 2 型糖尿病是一种复杂的代谢紊乱疾病, 胰岛 β 细胞凋亡是其主要的病理基础之一^[1,2]. 高血糖状态即葡萄糖毒性作用促使 β 细胞群数量逐渐减少, 胰岛 β 细胞凋亡可导致血糖进一步增高, 导致大量的氧自由基形成, 并降低抗氧化防御系统, 从而引起各种并发症的发生^[3-6]. 因此, 临床上常采用低能量的甜味剂来代替蔗糖以降低糖尿病人的血糖浓度, 并适量的补充抗氧化剂来防止氧化应激损伤. 赤藓糖醇 (Erythritol) 是一种采用生物技术生产的新型发酵低热量甜味剂, 在食品工业中广泛应用. 有研究发现, 赤藓糖醇是

一种低糖的抗氧化剂^[3], 而且大量消耗后对血液中的胰岛素或葡萄糖水平没有影响, 这使得它可以作为一种有效和安全的食品成分而应用于糖尿病患者. 然而, 它的抗氧化作用迄今没有得到深入的研究. 本研究采用 H₂O₂ 造成 PC12 细胞氧化损伤模型评价赤藓糖醇的体外抗氧化作用, 并对其作用机制进行初步的探讨.

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

PC12 细胞株, 由昆明医科大学云南省天然药物药理重点实验室提供. 赤藓糖醇, 购自 Sangon

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81360652)

[作者简介] 韩春妮 (1989~), 女, 云南弥勒县人, 在读硕士研究生, 主要从事中药药理研究与应用工作.

[通讯作者] 范源. E-mail:1647909799@qq.com

公司；依达拉奉、过氧化氢均购于 Adamas 公司；改良型 RPMI-1640 培养基、胎牛血清均购于 HyClone 公司；二甲基亚砜 (DMSO)、噻唑蓝 (MTT) 均购自 Sigma 公司；微量还原型谷胱甘肽 (GSH) 试剂盒 (批号：20130930)、乳酸脱氢酶 (LDH) 试剂盒 (批号：20131202) 均购自南京建成生物工程研究所。

1.2 主要仪器

Ti-S 型倒置相差显微镜 (Nikon)；3111 型二氧化碳细胞培养箱 (Thermo)；BSC-1300 II A2 型生物安全柜 (苏净安泰)；Infinite M200 PRO 型酶标仪 (Tecan)；AB204-S 型电子分析天平 (METTLER TOLEDO)。

1.3 实验方法和步骤

1.3.1 细胞培养和处理 PC12 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基，置 CO₂ 培养箱 (37℃、5%CO₂) 中培养，2~3 d 传代 1 次，取对数生长期细胞进行实验。

1.3.2 实验分组及药物处理 取对数生长期细胞，按 3×10^4 接种于 96 孔培养板。培养 24 h 后分组给药，分别设定：正常组、模型组、阳性对照组、给药组。阳性对照组为 160 mg/L 依达拉奉溶液；给药组分别为 50 mg/L、100 mg/L 赤藓糖醇溶液；正常组和模型组给予等量 RPMI-1640 无血清培养基。继续培养 24 h 后，除正常组外，其余各组吸弃原培养液，加入含 H₂O₂ (终浓度为 50 μmol/L)

的无血清培养基损伤细胞 2 h，弃原培养液，加 180 μL 培养液继续培养 42 h 后，倒置显微镜下观察各组细胞形态变化。

1.3.3 细胞存活率的测定 采用 MTT 比色法^[7,8]，造模损伤恢复培养 42 h 后，加 5 g/L 的 MTT 液 20 μL，孵育 4 h，吸弃上清液，加 150 μL 100 % DMSO，摇床上振荡 10 min，使结晶物充分溶解，570 nm 波长下定各孔吸光度 (A)。

1.3.4 细胞培养上清液中 LDH 活性的测定 细胞造模处理后，收集细胞培养上清液，参照南京建成生物工程研究所 LDH 试剂盒说明书测定培养液中 LDH 活性。

1.3.5 细胞内的 GSH 含量测定 细胞造模处理后，收集细胞，参照南京建成生物工程研究所 GSH 试剂盒说明书方法测定细胞内 GSH 的含量。

2 结果

2.1 形态学观察

与正常组比较，模型组细胞数量明显减少，多数细胞突起收回，胞体变圆，部分变圆细胞成团存在，胞体边缘模糊，折光性减弱，贴壁能力降低，培养板底部可见细胞碎片；与模型组比较，依达拉奉 160 mg/L 和赤藓糖醇 50、100 mg/L 浓度下的细胞整体数量和梭形细胞数量增加，成团细胞数减少，细胞折光性和贴壁能力恢复良好，见图 1。

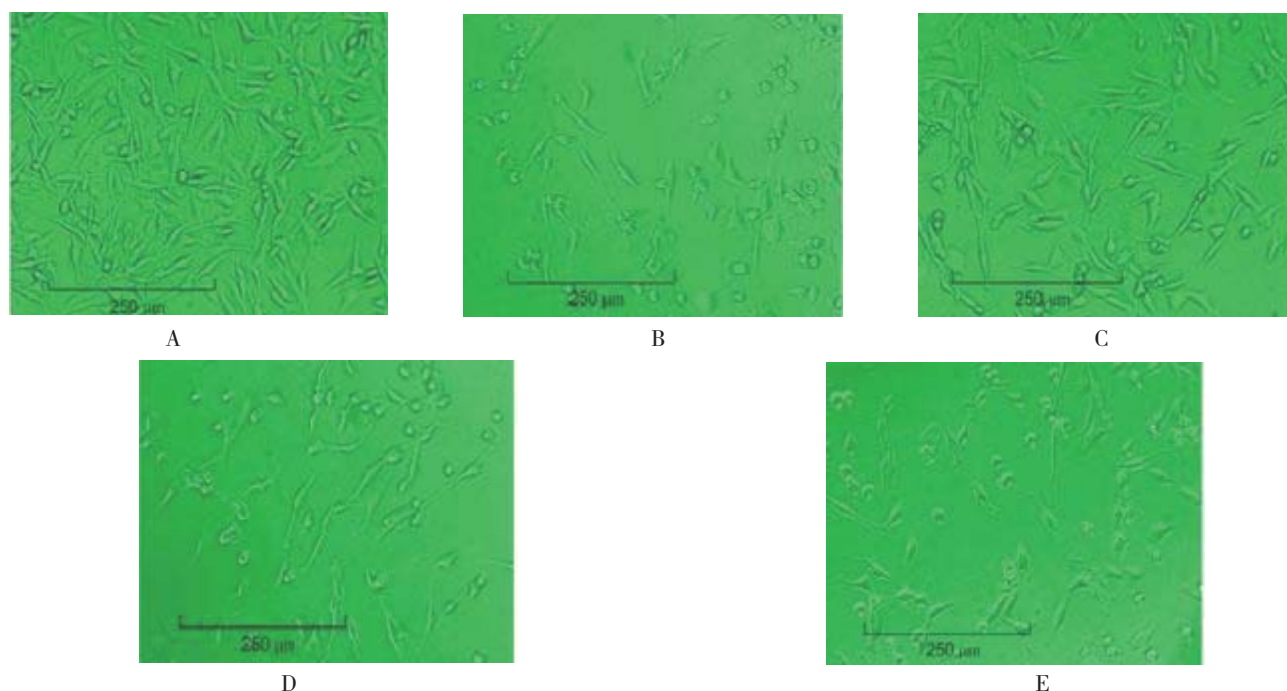


图 1 赤藓糖醇对 H₂O₂ 损伤 PC12 细胞后的形态学观察 (×200)

Fig. 1 The effect of Erythritol on the morphology of PC12 cells after oxidative damage caused by H₂O₂ (×200)

A: 正常对照组; B: 模型组; C: 依达拉奉 -160 mg/L 组; D: 赤藓糖醇 -50 mg/L 组; E: 赤藓糖醇 -100 mg/L 组。

2.2 赤藓糖醇对 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞氧化损伤后细胞存活率的影响

与正常组比较, 模型组细胞存活率明显降低 ($P < 0.01$), 细胞存活率为 48.6%; 与模型组比较, 依达拉奉 160 mg/L 组提高细胞存活率 12% ($P < 0.05$), 赤藓糖醇各给药组均具有提高细胞存活率的趋势, 以 50 mg/L 具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1.

2.3 赤藓糖醇对 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞氧化损伤后细胞内 GSH 含量及 LDH 的影响

与正常组比较, 模型组细胞内 GSH 含量明显减少 ($P < 0.01$); 细胞 LDH 泄漏量明显增加 ($P < 0.01$). 与模型组比较, 依达拉奉和赤藓糖醇各给药组均能提高细胞内 GSH 含量 ($P < 0.01$); 并降低细胞 LDH 泄漏量 ($P < 0.01$), 见表 2.

表 1 赤藓糖醇对 H₂O₂ 致 PC12 细胞氧化损伤后细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The effect of Erythritol on the survival of PC12 cells after oxidative damage caused by H₂O₂ ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mg/L)	n	存活率 (%)
正常组	-	6	100.0 ± 3.2
模型组	-	6	48.6 ± 2.4**
依达拉奉	160	6	60.6 ± 2.3 [△]
赤藓糖醇	50	6	56.4 ± 3.7 [△]
	100	6	57.8 ± 4.4

与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, [△] $P < 0.05$.

表 2 赤藓糖醇对 H₂O₂ 致 PC12 细胞氧化损伤后 GSH 含量及 LDH 的影响

Tab. 2 The effect of Erythritol on GSH and LDH content in PC12 cells after oxidative damage caused by H₂O₂

组别	剂量 (mg/L)	n	GSH (μmol/L)	LDH (U/L)
正常组	-	6	26.1 ± 1.7	28 ± 3
模型组	-	6	15.6 ± 1.4**	180 ± 11**
依达拉奉	160	6	23.2 ± 2.3 [△]	130 ± 6 [△]
赤藓糖醇	50	6	20.9 ± 1.1 [△]	138 ± 9 [△]
	100	6	22.7 ± 2.1 [△]	108 ± 7 [△]

与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, [△] $P < 0.05$.

3 讨论

氧化应激是导致糖尿病和其并发症发生的重要原因^[9]. 研究显示, 当机体处于高血糖状态时, 会导致过量的 ROS 生成, 引起氧化应激反应. 胰岛

素是机体内调节糖代谢必不可少的蛋白激酶, 而胰岛素抵抗与氧化应激水平存在明显相关性^[10], ROS 和氧化应激能激活一系列应激激酶通路, 导致胰岛 β 细胞受损和胰岛素抵抗的发生^[11], 最终导致一系列并发症的发生. 因此, 增强机体抗氧化能力, 是预防和治疗糖尿病的重要策略.

赤藓糖醇是一种低热量的甜味剂. 近年研究发现, 赤藓糖醇能够与·OH- 反应, 是一个很好的自由基清除剂^[9]; 另外, 赤藓糖醇能够保护高糖状态下内皮细胞功能, 可能预防糖尿病并发症发生^[12]. H₂O₂ 是 ROS 中一种较强的氧化剂, 极易穿透细胞膜, 通过 Haber-Weiss 或 Fenton 反应, 形成高活性的自由基^[13], 常用来建立体外对靶细胞的氧化应激损伤模型, 观察药物对自由基的抑制作用或者对细胞的保护作用. 因此, 本实验采用 H₂O₂ 致 PC12 细胞氧化损伤模型, 进一步验证赤藓糖醇的抗氧化活性.

本文研究表明, 赤藓糖醇能明显改善氧化损伤后的 PC12 细胞形态, 提高细胞存活率, 同时保护细胞膜以降低 LDH 泄露, 提高细胞内 GSH 含量, 提示赤藓糖醇对 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞损伤具有显著保护作用, 其机制可能与抗氧化作用有关.

[参考文献]

- [1] KRISHNAN S, FIELDS D A, COPELAND K C, et al. Sex differences in cardiovascular disease risk in adolescents with type 1 diabetes [J]. Gender Medicine, 2012, 9 (4): 251.
- [2] YU F J, HUANG M C, CHANG W T, et al. Increased ferritin concentrations correlate with insulin resistance in female type 2 diabetic patients [J]. Annals of Nutrition and Metabolism, 2012, 61(1): 32 - 40.
- [3] GERTJAN J M, DEN HARTOG, AGNES W, et al. Erythritol is a sweet antioxidant [J]. Nutrition, 2010, 26 (4): 449 - 458.
- [4] 宿世震, 邢冬杰. 氧化应激与糖尿病肾病[J]. 中国实用医药, 2008, 3(3): 138.
- [5] 孙毓蔓. 超氧化物歧化酶和氧磷脂酶-1 在 2 型糖尿病肾病患者血清中的表达及临床意义[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2010, 26(11): 1 120 - 1 121.
- [6] 陈洋, 付婷, 姜爱花. 氧化应激与糖尿病肾病的关系[J]. 西南军医, 2012, 14(2): 278 - 280.
- [7] R.I. 弗雷谢尼. 动物细胞培养—基本技术指南 [M]. 北京: 科学出版社, 2008: 490.
- [8] 夏星, 钟振国, 冯丹霞. 三七总皂苷保护 PC12 细胞对抗

(下转第 19 页)

在神经病理性疼痛大鼠脊髓小胶质细胞中表达明显升高, P₂X₄ 受体参与了大鼠的神经病理性疼痛的发生发展, 这为神经病理性疼痛的发生机制提示了一个新的可能机制, 为其治疗提供了新的靶点^[10,11].

神经病理性疼痛大鼠脊髓小胶质细胞 P₂X₄ 受体的表达明显增加, P₂X₄ 受体参与了神经病理性疼痛的发生发展.

[参考文献]

- [1] TSUDA M, INOVEK, SALTE M W. Neuropathic pain and spinal microglia a big problem from molecules in "small" glia[J]. Trends Neurosci, 2005, 28(2):107.
- [2] ZHANG Z, ZHANG Z Y, FAUSERU, et al. Mechanical allodynia and pinal up regulation of P2X4 receptor in experimental auto immune neuritis rats[J]. Neuroscience, 2008, 152(2):495 - 501.
- [3] TSUDA M, INJOUE K. Neuropathic pain and ATP receptors in spinal microglia [J]. Brain Nerve, 2007, 59(9): 953 - 959.
- [4] KIM S H, CHURG M. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat[J]. Pain, 1992, 50: 355 - 363.
- [5] CHAPLAN S R, BACH F W, POGREL J W, et al. Quantitive assessment of tactile allodynia in the rat paw [J]. J Neurosci Methods, 1994, 53(1):55 - 63.
- [6] 彭伟, 张咸伟, 田学慷, 等. 永生小鼠小胶质细胞 P2X4 siRNA 靶点的筛选[J]. 华中科技大学学报:医学版, 2008, 37(5):657 - 660.
- [7] SWEITZE S M, SCHUBERT P, DELEO J A. Propentofylline, a glial modulating agent, exhibits antiallodynic properties in rat model of neuropathic pain [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2009, 297(3):1 210 - 1 217.
- [8] INOUE K, TSUDA M, KOIZUMI S. ATP- and adenosine-mediated-signaling in the central nervous system: chronic pain and microglia: involvement of the ATP receptor P2X4 [J]. J Pharmacol Sci, 2004, 94:112 - 114
- [9] MULLER C E. Emerging structures and ligands for P2X3 and P2X4 receptors—towards novel treatments of neuropathic pain [J]. Purinergic Signal, 2010, 6(2):259 - 269.
- [10] 陈灏, 杜小波. 双嘧达莫对多发性硬化症的治疗作用及机制的研究 [J]. 海南医学院学报, 2014, 20(4): 453 - 457.
- [11] 于熙, 田国刚, 田毅. 乌司他丁的脑保护作用研究进展 [J]. 海南医学院学报, 2010, 16(7):948 - 950. (2014 - 06 - 14 收稿)
- [1] 过氧化氢损伤的作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(2):216.
- [9] 王颖, 张桂芳, 赵亮, 等. 葡萄籽提取物原花青素对糖尿病小鼠的抗氧化作用[J]. 中国老年学杂志, 2014, 1(34):433 - 435.
- [10] GOODARZI M T, NAVIDI A A, REZAEI M, et al. Oxidative damage to DNA and lipids: correlation with protein glycation in patients with type 1 diabetes [J]. J Clin Lab Anal, 2010, 24(2):72 - 76.
- [11] 李爱琴, 陆环, 徐文静, 等. 氧化应激与2型糖尿病的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(12):2 371 - 2 378.
- [12] DANIELLE M P H J, BOESTEN, ALVIN BERGER, et al. Multi-Targeted Mechanisms Underlying the Endothelial Protective Effects of the Diabetic-Safe Sweetener Erythritol [J]. POLS ONE, 2013, 8(6):1 - 12.
- [13] INAN OLMEZ, HUSEYIN OZYURT. Reactive oxygen species and ischemic cerebrovascular disease [J]. Neurochemistry International, 2012, 60(2):208 - 212. (2014 - 05 - 11 收稿)

(上接第 11 页)