

大蒜多糖抗氧化活性及其对 PC12 细胞增殖的影响

郑颖^{1,3}, 王辉¹, 郭国庆¹, 黄雪松², 沈伟哉¹

(暨南大学 1. 医学院解剖学教研室; 2. 食品科学与工程系, 广东广州 510632; 3. 白城师范学院, 吉林白城 137000)

[摘要] 目的: 检测大蒜多糖对大鼠嗜铬瘤细胞株(pheochromocytoma cells, PC12)增殖的影响和对经过过氧化氢(H₂O₂)诱导损伤的 PC12 细胞的保护作用。方法: 应用四氮唑蓝(MTT)比色法检测大蒜多糖对细胞增殖的影响; 建立 H₂O₂ 致 PC12 细胞损伤模型, 于倒置相差显微镜下观察细胞形态的变化; 化学比色法测定乳酸脱氢酶(LDH)释放量及细胞内和细胞培养上清液中丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)的活性。结果: 大蒜多糖各剂量组均能显著提高正常 PC12 细胞的存活数, 大蒜多糖各剂量组均能有效对抗由 25 μmol/L H₂O₂ 引起的细胞存活率下降和细胞凋亡, 可明显改善细胞形态的衰变, 显著降低 LDH 释放量和细胞培养液及细胞内的 MDA 含量, 提高 SOD 活性。结论: 大蒜多糖促进正常 PC12 细胞增殖; 且对 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞损伤具有保护作用, 其作用机制可能与提高 PC12 细胞的抗氧化能力有关。

[关键词] 大蒜多糖; PC12 细胞; 细胞增殖; 过氧化氢; 抗氧化

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2008)02-0110-05

Effect of garlic polysaccharide on cell proliferation and antioxidant activities in PC12 cells

ZHENG Ying^{1,3}, WANG Hui¹, GUO Guo-qing¹, HUANG Xue-song², SHEN Wei-zai¹

(1. Department of Anatomy, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2. Department of Food Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

3. Baicheng Normal College, Baicheng 137000, China)

[Abstract] **Aim:** To study the effect of garlic polysaccharide on cell proliferation and its protective effect on pheochromocytoma cells injury induced by hydrogen peroxide. **Methods:** MTT assay for cell proliferation, the model that H₂O₂ induced injury in PC12 cells was generated. Morphological changes of PC12 cells were observed under reversal phase microscope. Lactate dehydrogenase (LDH), malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) in the culture medium and MDA, SOD in cells were measured by spectroscopy respectively. **Results:** Garlic polysaccharide with different concentrations could promote the cell proliferation of PC12. It could resist the decrease in the cell viability and increase in the apoptotic rate induced by 25 μmol/L H₂O₂. After exposed to 25 μmol/L H₂O₂ for 4 h, typical morphological characteristics of cells injury were observed. Both LDH and MDA levels increased significantly, while SOD level decreased significantly in H₂O₂ induced group compared with those in the sham group. Garlic polysaccharide could decrease LDH and MDA content and increase SOD level significantly. **Conclusion:** Garlic polysaccharide stimulates the proliferation of PC12; and it has protective effect on PC12

[收稿日期] 2007-12-19

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30471216); 广东省自然科学基金研究团队资助项目(039213)

[作者简介] 郑颖(1979-), 女, 硕士研究生。研究方向: 天然产物对神经损伤的修复。通讯作者: 沈伟哉, 电话: 020-85223503; E-mail:

tshenwz@jnu.edu.cn

cells injury induced by hydrogen peroxide in culture, which may be related to enhancing the antioxidant abilities of PC12.

[Key words] garlic polysaccharide; PC12 cell; cell proliferation; hydrogen peroxide; antioxidant

大蒜(*Allium sativum* L)为百合科葱属植物的鳞茎,营养丰富,是生活中的常用香辛蔬菜和调味品,具有很强的防病、治病和保健功能^[1]。中医认为,大蒜有开胃健脾、祛寒除湿和消肿散毒等功能^[2]。现代医学、营养学、预防医学的研究证明:大蒜有降血脂、预防动脉硬化、防治冠心病、脑血栓、消炎杀菌、抗肿瘤、提高机体免疫力、保护肝脏、降血压和延缓衰老等作用^[3],大蒜的药用保健效果与其所含的有机锗和硒、超氧化物歧化酶(SOD)等酶类、蒜氨酸及其分解产物大蒜素、大蒜多糖等成分有直接或间接的关系^[4]。大蒜多糖(garlic polysaccharide, GP)是大蒜的主要成分之一,目前的研究表明,大蒜多糖具有抗菌、消炎、抗凝血、降血脂和预防动脉粥样硬化等多方面的生理功能^[5]。为了探讨大蒜多糖对神经细胞的营养和保护作用,本研究以大鼠嗜铬瘤细胞株(pheochromocytoma cells, PC12)为对象,用25 μmol/L H₂O₂造成细胞氧化损伤模型,观察不同浓度的大蒜多糖对PC12细胞的增殖影响和抗氧化效果。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

PC12细胞由中山大学实验动物中心提供,在DMEM培养基(Gibco,美国)中培养。大蒜多糖由暨南大学食品科学与工程系分离纯化及鉴定。胰蛋白酶购自美国Gibco公司,胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司,乳酸脱氢酶(LDH)测定试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)活性测定试剂盒及丙二醛(MDA)测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.2 方法

(1)PC12细胞的体外培养 PC12细胞接种在含有体积分数10%胎牛血清、100 IU/mL青霉素和100 IU/mL链霉素的DMEM培养基中,于37℃、95%湿度及体积分数5%CO₂条件下培养、传代。

(2)大蒜多糖对PC12细胞增殖的影响 采用MTT法测定细胞存活数和细胞存活率^[6]:将对数生长期细胞按 1×10^5 /mL接种于96孔培养板(Cor-

ning,美国)中,每孔200 μL,CO₂培养箱中培养过夜。大蒜多糖溶于DMEM并稀释成浓度为4 000、2 000和1 000 μg/mL的高、中、低剂量组,分别加到不同孔中,每组6个平行孔,于上述条件下培养,每24 h换液1次。对照组用DMEM做相同的处理。培养48、72及96 h后,每孔加入MTT溶液(10 mol/L)20 μL,37℃孵育4 h后,小心吸弃培养板中的液体,每孔加入150 μL DMSO,振荡10 min,使结晶物充分溶解后在酶联免疫检测仪(BIO-RAD,美国)上以570 nm波长测定吸收值(A)。细胞存活率按公式:存活率=实验组/对照组×100%计算,重复6次。

(3)抗氧化损伤的实验分组 96孔板中同一代PC12细胞长成单层后,随机分为5组:正常组、H₂O₂致损伤组、大蒜多糖高浓度组、大蒜多糖中浓度组及大蒜多糖低浓度组。高、中、低浓度大蒜多糖作用20 h后,相应组加入H₂O₂溶液(终浓度为25 μmol/L),继续培养4 h后测定相应指标。

(4)形态学观察 在倒置相差显微镜下观察各组PC12细胞的形态变化并照相。

(5)PC12细胞培养液中LDH、SOD和MDA含量测定 分别取经1.2(3)处理的各组细胞上清液,按LDH、SOD和MDA测定试剂盒说明书操作,比色法测定细胞培养液中LDH、SOD及MDA的A值并计算其活性。

(6)PC12细胞内SOD和MDA的含量测定 收集经1.2(3)处理后的细胞并悬浮于0℃生理盐水,冰浴中用超声细胞破碎仪完全破碎细胞(20 kHz, 2 min),显微镜下观察无细胞后分别取100 μL悬液,按SOD及MDA测定试剂盒说明书测定其A值并计算活性。

1.3 统计学处理

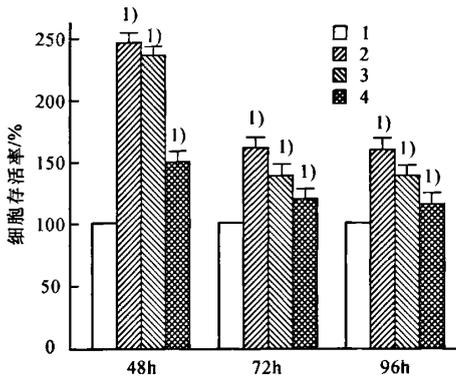
采用SPSS软件进行统计学处理,各组数据用($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 大蒜多糖对正常PC12细胞增殖影响

处理24 h后各组细胞在光镜下无明显差异。

随着培养时间延长,差异逐渐明显,大蒜多糖高、中、低剂量组细胞比对照组生长旺盛、数密度明显增高。MTT 检测结果显示,与对照组比较,处理 48、72 和 96 h 后大蒜多糖高、中、低剂量组细胞的存活率均明显高于对照组($P < 0.01$,图 1、表 1),表明大蒜多糖可以促进正常 PC12 细胞增殖。



1. 对照组,2. 大蒜多糖高浓度组,3. 大蒜多糖中浓度组,4. 大蒜多糖低浓度组,1)与对照组比较, $P < 0.01$

图 1 MTT 计数的正常神经细胞存活率

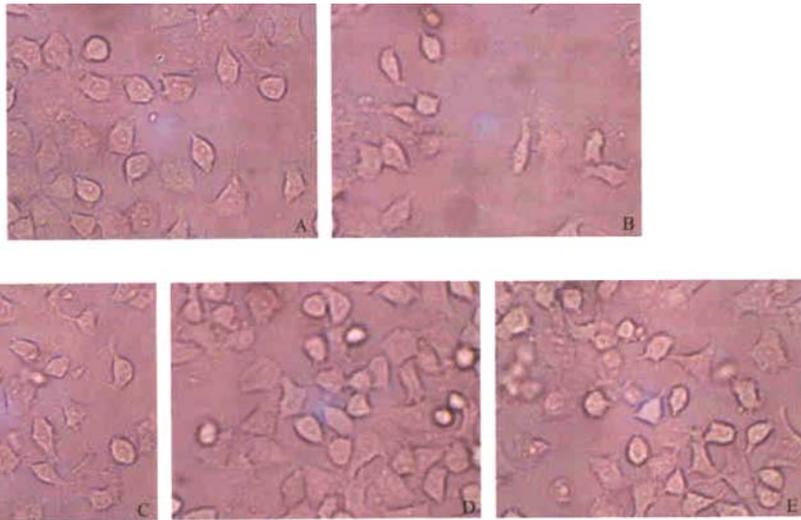
表 1 大蒜多糖作用不同时间对正常 PC12 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞组数	A 值		
		48 h	72 h	96 h
对照组	6	0.218 ± 0.015	0.316 ± 0.013	0.405 ± 0.012
大蒜多糖低剂量组	6	0.231 ± 0.012 ¹⁾	0.355 ± 0.018 ¹⁾	0.456 ± 0.024 ¹⁾
大蒜多糖中剂量组	6	0.515 ± 0.036 ¹⁾	0.422 ± 0.022 ¹⁾	0.532 ± 0.033 ¹⁾
大蒜多糖高剂量组	6	0.537 ± 0.039 ¹⁾	0.482 ± 0.031 ¹⁾	0.596 ± 0.016 ¹⁾

1)与对照组比较, $P < 0.01$

2.2 大蒜多糖对 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞形态损伤修复的作用

与对照组相比(图 2 A),H₂O₂ 致损伤组 PC12 细胞体积缩小,突起多消失,表面变光滑,细胞间隙显著增大,表现出明显的细胞损伤形态(图 2 B)。与 H₂O₂ 致损伤组相比,大蒜多糖各浓度组受损伤细胞减少,细胞形态基本恢复正常(图 2 C、D、E),细胞密度明显增大。因此,不同浓度的大蒜多糖均能明显降低由 25 μmol/L H₂O₂ 所致的 PC12 细胞形态损伤的程度。



A. 正常组; B. H₂O₂ 致损伤组; C. 4 000 μg/mL 大蒜多糖 + H₂O₂ 组; D. 2 000 μg/mL 大蒜多糖 + H₂O₂ 组; E. 1 000 μg/mL 大蒜多糖 + H₂O₂ 组

图 2 倒置相差显微镜下 PC12 细胞形态学观察 (×200)

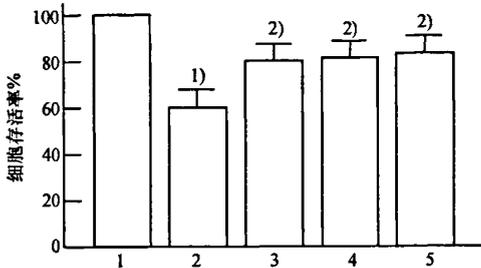
2.3 大蒜多糖对 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞损伤的细胞存活率测定

按照 1.2(3) 处理,MTT 检测结果显示,25 μmol/L H₂O₂ 可导致细胞存活率明显下降,下降比

率达 40%(图 2.2)($P < 0.01$)。大蒜多糖高、中、低剂量组均能显著抑制氧化损伤导致的细胞存活率下降,可大幅度提高细胞存活率(大于 20%)($P < 0.01$) 见图 3(3.4.5)。

2.4 PC12 细胞培养液中 LDH 含量、SOD 活性及 MDA 含量的变化

由表 2 可见, H_2O_2 致损伤组细胞培养液中 LDH 含量较对照组增加了 4.4 倍, SOD 活性明显降低, MDA 水平则增大 3.3 倍, 与对照组相比均表现出显著变化 ($P < 0.01$)。与 H_2O_2 致损伤组相比, 大蒜多糖高、中、低浓度组可降低由 H_2O_2 所导致的 PC12 细胞 LDH 释放的增高 ($P < 0.05$); 大蒜多糖高浓度组和中浓度组可显著提高 PC12 细胞培养液中 SOD 活性(两组 $P < 0.01$), 但低浓度组 PC12 细胞培养液中 SOD 活性提高无统计学意义; 同时, 各浓度组均可降低由 H_2O_2 所导致的 PC12 细胞培养液中 MDA 增高的水平, ($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.05$)。



1. 对照组; 2. H_2O_2 致损伤组; 3. 大蒜多糖低浓度组; 4. 大蒜多糖中浓度组; 5. 大蒜多糖高浓度组。1) 与对照组比较, $P < 0.01$; 2) 与 H_2O_2 致损伤组比较, $P < 0.01$

图 3 MTT 计数法测得的损伤后细胞存活率

表 2 大蒜多糖对 H_2O_2 诱导 PC12 细胞培养液中酶类含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	LDH/(U·L ⁻¹)	SOD/(U·mL ⁻¹)	MDA/(nmol·mL ⁻¹)
对照组	240.570 ± 95.872	14.390 ± 0.232	0.190 ± 0.021
H_2O_2 致损伤组	1057.310 ± 211.261 ²⁾	13.080 ± 0.125 ²⁾	0.621 ± 0.048 ³⁾
大蒜多糖高浓度组	771.110 ± 88.368 ¹⁾	14.270 ± 0.140 ²⁾	0.357 ± 0.038 ²⁾
大蒜多糖中浓度组	752.650 ± 127.771 ¹⁾	13.720 ± 0.261 ²⁾	0.392 ± 0.057 ²⁾
大蒜多糖低浓度组	962.400 ± 224.081 ¹⁾	13.300 ± 0.187	0.523 ± 0.045 ¹⁾

1) 与 H_2O_2 损伤组比较, $P < 0.05$; 2) 与 H_2O_2 损伤组比较, $P < 0.01$; 3) 与对照组比较, $P < 0.01$

2.5 PC12 细胞内 SOD 和 MDA 含量的影响

由表 3 可见, 与对照组相比, H_2O_2 致损伤组的 PC12 细胞内 SOD 的活性明显降低 ($P < 0.01$), MDA 水平明显增加 ($P < 0.01$)。与 H_2O_2 致损伤组相比, 不同浓度大蒜多糖处理后再由 H_2O_2 诱导 PC12 细胞内的 SOD 活性明显升高, 而 MDA 水平显著降低, 最终均趋向于正常。

表 3 大蒜多糖对 H_2O_2 诱导 PC12 细胞内酶类含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	SOD/(U·mg ⁻¹)	MDA/(nmol·mg ⁻¹)
对照组	196.400 ± 11.830	21.740 ± 6.602
H_2O_2 致损伤组	87.890 ± 14.200 ²⁾	143.400 ± 14.780 ²⁾
大蒜多糖高浓度组	134.300 ± 7.585 ¹⁾	70.050 ± 12.310 ¹⁾
大蒜多糖中浓度组	159.100 ± 6.481 ¹⁾	83.550 ± 8.706 ¹⁾
大蒜多糖低浓度组	159.700 ± 10.190 ¹⁾	93.850 ± 18.730 ¹⁾

1) 与 H_2O_2 损伤组比较, $P < 0.01$; 2) 与对照组比较, $P < 0.01$

3 讨论

GP 是大蒜的主要成分之一, 为果聚糖(含少量的葡萄糖)^[7], 目前的研究表明, 大蒜多糖具有抗菌、消炎、抗凝血、降血脂和预防动脉粥样硬化等多方面的生理功能^[8]。但是关于大蒜多糖的抗氧化活性, 尤其是作用于神经系统的抗氧化活性方面的研究不多。而中枢神经系统的氧化退变又是目前常见的中枢疾病, 其病理机制多是与神经细胞的氧化损伤和凋亡有关, 因此保护神经细胞免受损伤是治疗中枢神经系统氧化退变的一个重要手段。

PC12 细胞是从大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤中分离出的一个瘤细胞系, 虽然不是真正的神经元, 但在体外培养中表现出的聚集成团和有纤维状突起等生长特征类似神经元, 而且能分泌儿茶酚胺、多巴胺和去甲肾上腺素等神经递质^[9]。由于分化的 PC12 细胞在形态和功能上具有典型的神经元特征, 因此被广泛地作为细胞模型用于神经细胞凋亡及神经细胞分化等方面的研究^[10]。 H_2O_2 是一种重要的活性氧, 外源性 H_2O_2 极易通过细胞膜进入细胞, 在细胞内过渡金属存在时通过 Fenton 反应, 形成高活性的自由基, 如单态氧、羟自由基等, 进一步造成细胞损伤^[11]。因其操作简单, 容易控制, 常用于体外模拟细胞的过氧化损伤实验。

本实验观察了大蒜多糖对 PC12 细胞生长增殖的影响, 结果表明高、中、低剂量均有促进细胞增殖作用, 同时存在相应的剂量依赖效应关系, 且优于它的时间依赖效应关系。为了进一步探讨其作用机制, 利用 PC12 细胞模拟神经元的反应, 建立低浓度 H_2O_2 诱导 PC12 细胞损伤的体外培养模型, 观察大蒜多糖对神经元的可能保护作用。形态学观察表明, H_2O_2 致损伤组 PC12 细胞体积明显缩小, 突起消失, 表面变光滑, 细胞间隙增大, 细胞出现损伤

形态。大蒜多糖可明显保护 H_2O_2 所致 PC12 细胞形态损伤。LDH 水平的升高是细胞受损的一个敏感指标,细胞释放 LDH 增加,通常反映细胞损伤、细胞膜通透性增加^[12]。本研究结果表明, H_2O_2 (25 $\mu\text{mol/L}$) 诱导 4 h, PC12 细胞培养液中 LDH 含量较正常组明显升高,而大蒜多糖高、中、低浓度组均可降低 H_2O_2 所致 PC12 细胞这种 LDH 的释放,提示大蒜多糖对 H_2O_2 致 PC12 细胞损伤具有一定的保护作用。

MDA 和 SOD 是反映自由基损伤的指标。自由基对神经细胞的损害作用是引起生物膜上 PUFA 发生脂质过氧化反应,生成大量的髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO), MPO 的代谢产物 MDA 可使磷脂、蛋白质发生交链、变性,同时其含量的变化间接反映了组织中氧自由基含量的变化。由于 MDA 是 MPO 的稳定代谢产物,常用来反映组织脂质过氧化损伤的程度^[13]。SOD 是存在于细胞质和线粒体中的一种金属蛋白酶,可催化歧化反应,清除引发自由基连锁反应的起始基-超氧阴离子,通过一系列化学反应缓冲及清除自由基而具有抗自由基损伤的作用,是机体内抗氧化系统的重要组成部分,其活性高低可间接反映组织自由基的含量和脂质过氧化程度^[14]。因此,测定 MDA、SOD 活性不仅可反映神经细胞损伤的原因,还可以判断细胞损伤的程度。

本研究结果显示, H_2O_2 诱导 PC12 细胞 4 h, 与正常组相比, H_2O_2 致损伤组 PC12 细胞内及培养液中 MDA 活性明显升高,而 SOD 活性显著降低,提示 H_2O_2 所致 PC12 细胞损伤与脂质过氧化损伤有关。大蒜多糖可提高 PC12 细胞内及培养液中 SOD 活性,并显著降低培养液和细胞内 MDA 水平,提示大蒜多糖可能是通过抗过氧化作用保护 H_2O_2 诱导的 PC12 细胞损伤。

[参考文献]

[1] 王文玲, 黄雪松, 曾莉莎. 大蒜多糖的研究综述[J].

广州食品工业科技, 2004, 20(4): 144-146.

- [2] 臧至清, 周瑞美. 大蒜药用和保健价值的综合开发[J]. 食品研究与开发, 1999, 20(2): 25-28.
- [3] 陈能煜, 伍睿. 大蒜研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2000, 18(2): 67-74.
- [4] 辛小林, 刘长海. 中药多糖抗氧化作用研究进展[J]. 北京中医药大学学报, 2000, 23(5): 54-56.
- [5] 严常开, 曾繁典. 大蒜的主要化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中国新药杂志, 2004, 13(8): 8-10.
- [6] 郑永唐, 贲昆龙. 测定细胞存活和增殖的 MTT 方法的建立[J]. 免疫学杂志, 1992, 8(3): 266-269.
- [7] BAUMGARTNER S, THOMAS G, DAX W, et al. Characterisation of the high-molecular weight fructan isolated from garlic (*Allium sativum* L.) [J]. Carbohydrate Res, 2000, (328): 177-183.
- [8] 吴基良, 余薇, 汪晖, 等. 大蒜多糖对中毒性心肌炎心肌细胞凋亡的影响[J]. 中国生物工程杂志, 2005, 8(3): 27-29.
- [9] RIVLIN R S. Historical perspective on the use of garlic [J]. The Journal of Nutrition, 2001, 131(Supplement3): 951-954.
- [10] TANG X Q, FENG J Q, CHEN J, et al. Protection of oxidative preconditioning against apoptosis induced by H_2O_2 in PC12 cells: Mechanism via MMP, ROS, and Bcl-2 [J]. Brain Res, 2005, 1057(2): 57-64.
- [11] 蒋秋燕, 乔旭光, 张振华. 影响大蒜多糖提取的因素及其条件优化(1) [J]. 中国食品学报, 2005, 5(4): 101-105.
- [12] 余薇, 吴基良, 汪晖. 大蒜多糖对阿霉素所致小鼠心脏毒性的拮抗作用[J]. 中国药理学通报, 2005, 6(1): 52-54.
- [13] 余薇, 吴基良, 汪晖, 等. 大蒜多糖对阿霉素所致心肌细胞损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2005, 21(1): 96-99.
- [14] 刘向前. 大蒜的化学成分及药理研究[J]. 中国药师, 2006, 99(6): 36-38.

[责任编辑:李弘,朱颖嫻]