

基础医学研究

多穗石柯叶水提物及其主要成分对 PC12 细胞增殖的影响

吕 纯¹ 高健美² 邓 艳² 龚其海¹

(1. 遵义医科大学 基础药理教育部重点实验室暨特色民族药教育部国际合作联合实验室, 贵州 遵义 563099; 2. 遵义医科大学 药学院, 贵州 遵义 563099)

[摘 要] 目的 考察多穗石柯叶水提物及其主要成分对 PC12 细胞的增殖影响。方法 将对数生长期的 PC12 细胞接种于 96 孔板, 多穗石柯叶水提物(0.25、50、75、100、200 $\mu\text{g/L}$)、根皮苷(0.25、50、75、100、200 μM)、三叶苷(0.25、50、75、100、200 μM)及茶多酚(0.25、50、75、100、200 μM)分别作用 PC12 细胞 72 h 后采用 BrdU ELISA 试剂盒检测 PC12 细胞的 BrdU 相对含量以反映其促增殖的作用。结果 75 ~ 200 $\mu\text{g/L}$ 的多穗石柯叶水提物和 75 ~ 200 μM 的三叶苷可显著增加 PC12 细胞的 BrdU 相对含量, 而不同浓度的根皮苷及茶多酚对 PC12 细胞的增殖无影响。同时经 75 ~ 200 $\mu\text{g/L}$ 的多穗石柯叶水提物作用的 PC12 细胞 BrdU 相对含量相比于经 75 ~ 200 μM 的三叶苷作用的 PC12 细胞 BrdU 相对含量高。结论 多穗石柯叶水提物和三叶苷均可显著促进 PC12 细胞增殖, 而根皮苷及茶多酚则无促增殖作用。说明多穗石柯叶水提物的促增殖作用可能与三叶苷有关, 但其作用机制有待于进一步研究。

[关键词] 多穗石柯叶水提物; 根皮苷; 三叶苷; 茶多酚; PC12 细胞; 增殖

[中图分类号] R965.1 [文献标志码] A [文章编号] 1000-2715(2019)03-0272-04

DOI:10.14169/j.cnki.zunyixuebao.2019.0056

Effects of the water extract of sweet tea and its main components on proliferation of PC12 cells

Lyu Chun¹, Gao Jianmei², Deng Yan², Gong Qihai¹

(1. Key Laboratory of Basic Pharmacology of Ministry of Education and Joint International Research Laboratory of Ethnomedicine of Ministry of Education, Zunyi Medical University, Zunyi Guizhou 563099, China; 2. School of Pharmacy, Zunyi Medical University, Zunyi Guizhou 563099, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of the water extract of sweet tea and its main components on proliferation of PC12 Cells. **Methods** PC12 cells in logarithmic growth phase were cultured into 96 - well plates. The water extract of sweet tea (0.25, 50, 75, 100, 200 $\mu\text{g/L}$), phlorizin (0.25, 50, 75, 100, 200 μM), trilobatin (0.25, 50, 75, 100, 200 μM) and tea polyphenols (0.25, 50, 75, 100, 200 μM) were cultured with PC12 cells for 72 h, respectively. The BrdU ELISA kit was used to detect the relative content of BrdU in PC12 cells, which can reflect the proliferative effect. **Results** The results showed that the water extract of sweet tea (75 ~ 200 $\mu\text{g/L}$) and trilobatin (75 ~ 200 μM) significantly increased the relative content of BrdU in PC12 cells, while different concentrations of phlorizin and tea polyphenols did not exert the proliferative effect on PC12 cells. Meanwhile, the relative content of BrdU in PC12 cells treated with the water extract of sweet tea (75 ~ 200 $\mu\text{g/L}$) was higher than that of PC12 cells treated with trilobatin (75 ~ 200 μM). **Conclusion** Both the water extract of sweet tea and trilobatin significantly promote the proliferation of PC12 cells, while phlorizin and tea polyphenols have no proliferative effects. It is indicated that the proliferative effect of the water extract of sweet tea is likely to be related to trilobatin, but its mechanism needs further study.

[Key words] the water extract of sweet tea; phloridzin; trilobatin; tea polyphenols; PC12 cells; proliferation

[基金项目] 教育部创新团队资助项目(NO: IRT_17R113)。

[通信作者] 龚其海, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 神经药理学, E-mail: gqh@zmu.edu.cn。

• 272 •

神经退行性疾病是一类严重影响患者身体健康及生活质量,并给其家庭及社会带来严重负担的疾病,其主要病理特征为大脑神经元及其髓鞘的退化与缺失^[1]。临床实践证明,现有的药物如阿尔兹海默症治疗药多奈哌齐、美金刚、帕金森病治疗药左旋多巴、司来吉兰等均只能部分地控制症状或延缓病程^[2-3],而且由于其毒性反应较大、价格较昂贵等缺点限制了其在临床的应用。有研究报道,神经干细胞移植可有效治疗神经组织损伤^[4-5],但是由于神经干细胞获取的伦理、宗教问题^[6]、体内致瘤性^[7]、长期存活率及表型稳定性不理想、纯化困难等原因使其在临床中的应用受到限制。因此,探索神经退行性疾病的新疗法和替代疗法有着重要的社会意义及广阔的临床应用前景。

我国中药资源丰富,中医理法方药理论齐备,近年多项研究证明中药复方、提取物或单体具有良好的保护中枢神经系统的作用。多穗石柯 [*Lithocarpus polystachys* (Wall.) Rehd] 又名甜茶或多穗柯,为贵州省民族药,系壳斗科石柯属常绿乔木,具有“养阴补肾、护肝解毒、清热利湿”等功效^[8]。现代研究表明,多穗石柯的主要化学成分包括黄酮类、三萜类等,同时还包含多酚类、氨基酸、微量元素等^[9],可降血糖降血脂^[10]、抗氧化^[11]、抗炎^[12]、改善记忆力^[13]等。本课题组前期研究表明,多穗石柯叶水提取物的主要成分为根皮苷(0.64%)、三叶苷(18.54%)及茶多酚(27.65%)^[14],但是否具有促进神经细胞增殖的作用尚未见报道。基于以上背景,本研究旨在探索多穗石柯水提取物及其主要成分对 PC12 细胞的增殖作用,并为探索神经退行性疾病的治疗提供新策略。

1 材料与方法

1.1 实验材料、试剂及仪器 多穗石柯叶采自贵州省凤冈县,由遵义医科大学大学生药学教研室杨建文教授鉴定确属壳斗科石柯属植物多穗石柯的干燥叶;根皮苷标准品及三叶苷标准品购自成都普思生物科技股份有限公司;茶多酚标准品购自上海源叶生物科技有限公司。高分化大鼠嗜铬细胞瘤 PC12 细胞购自美国 ATCC 细胞库;DMEM(高糖)培养基、磷酸盐缓冲液、青链霉素混合液及胰蛋白酶血清购自 HyClone 公司;澳洲胎牛血清购自 Gibco 公司;BrdU ELISA 试剂盒购自上海江莱实业股份有限公司。Midi40 二氧化碳培养箱及全波长酶标仪(Thermo Fisher Scientific 公司);超净工作台(SW

-CJ-IFD,泰斯特仪器有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 多穗石柯叶水提取物的制备 取 30.0 g 多穗石柯干燥叶于圆底烧瓶中,按 1:20 的料液比加入纯净水,加热回流 30 min 后滤过,滤渣重复提取 2 次后合并滤液。将提取液减压浓缩为浸膏,放入真空冷冻干燥机干燥^[14]。

1.2.2 PC12 细胞的培养 按常规方法,以含 10% 胎牛血清、1% 青链霉素混合液的 DMEM(高糖)培养基为完全培养基,在 5% CO₂、37℃ 的环境中培养 PC12 细胞^[15]。待细胞密度达到 75% ~ 90% 时用磷酸盐缓冲液洗去培养基后用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。

1.2.3 PC12 细胞增殖能力检测 当 PC12 细胞进入对数生长期后,将细胞按 1×10^4 、100 μ L 的浓度接种于 96 孔板中,培养 24 h 后弃培养基,根据预实验结果,分别加入不同浓度的多穗石柯水提取物(0.25、50、75、100、200 μ g/L)、根皮苷试剂(0.25、50、75、100、200 μ M)、三叶苷试剂(0.25、50、75、100、200 μ M)及茶多酚试剂(0.25、50、75、100、200 μ M)。各浓度设 6 个复孔,置于 5% CO₂、37℃ 培养 72 h 后,按 BrdU ELISA 试剂盒说明书所述方法操作。

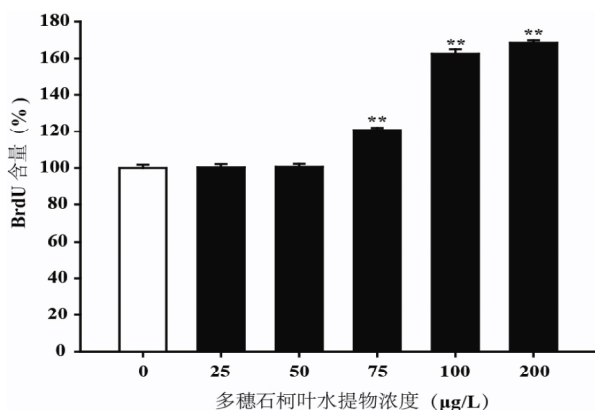
1.3 统计学处理 本实验所有数据均采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。One - Way ANOVA 分析各组间变化的统计学意义,组间比较时方差齐用 LSD 检验,方差不齐采用 Dunnett's T3 检验,当 $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 时认为差异的统计学意义非常显著。

2 结果

2.1 多穗石柯叶水提取物对 PC12 细胞增殖的作用

实验结果表明,25 μ g/L 和 50 μ g/L 的多穗石柯水提取物作用时间为 72 h 后,PC12 细胞的 BrdU 相对含量(100.43 $\pm$ 1.69%, 100.66 $\pm$ 1.60%)与对照组(100.00 $\pm$ 1.79%)比较无统计学意义($P > 0.05$)。而 75 μ g/L、100 μ g/L 和 200 μ g/L 多穗石柯叶水提取物较对照组明显增加 PC12 细胞 BrdU 相对含量(120.82 $\pm$ 1.19%, 162.54 $\pm$ 2.51%, 168.54 $\pm$ 1.33%) [$F(5, 30) = 199.618, P < 0.001$] ($P < 0.05$) (见图 1)。

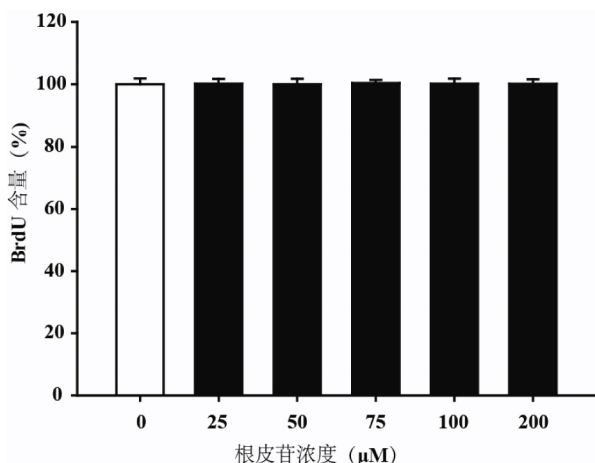
2.2 根皮苷对 PC12 细胞增殖的作用 根皮苷(0.25、50、75、100、200 μ M)作用于 PC12 细胞 72 h



** : 与对照组比较 $P < 0.01$ 。

图1 多穗石柯叶水提取物对 PC12 细胞增殖的作用

后, BrdU 的相对含量为 $100.00 \pm 1.79\%$ 、 $100.13 \pm 1.48\%$ 、 $100.01 \pm 1.67\%$ 、 $100.31 \pm 1.00\%$ 、 $100.16 \pm 1.58\%$ 、 $100.10 \pm 1.38\%$, 与对照组比较均无统计学意义 ($P > 0.05$, 见图 2)。

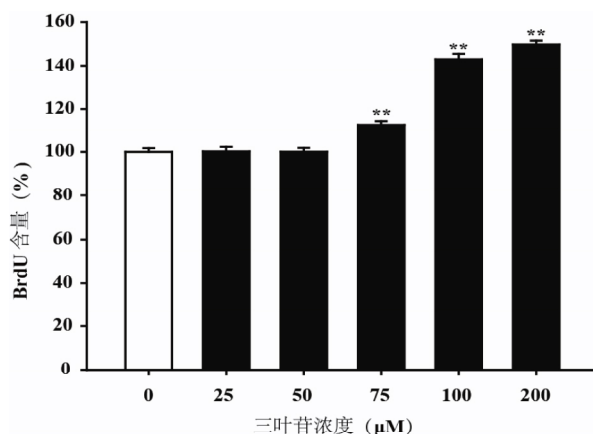


** : 与对照组比较 $P < 0.01$ 。

图2 根皮苷对 PC12 细胞增殖的作用

2.3 三叶苷对 PC12 细胞增殖的作用 实验结果显示 25、50 µM 三叶苷作用 72 h 后, PC12 细胞的 BrdU 相对含量 ($100.25 \pm 2.09\%$, $100.11 \pm 1.80\%$) 与对照组 ($100.00 \pm 1.79\%$) 相比无统计学意义 ($P > 0.05$)。而 75、100、200 µM 的三叶苷作用 72 h 后, BrdU 的相对含量分别为 $112.66 \pm 1.75\%$ 、 $143.04 \pm 2.45\%$ 及 $149.83 \pm 1.72\%$, 与对照组相比具有统计学意义 [$F(5, 30) = 93.996$, $P < 0.001$] ($P < 0.05$, 见图 3)。

2.4 茶多酚对 PC12 细胞增殖的作用 不同浓度的茶多酚 (25、50、75、100、200 µM) 作用 72 h 后, PC12 细胞 BrdU 的相对含量 ($100.34 \pm 1.71\%$ 、 $99.99 \pm 1.50\%$ 、 $100.07 \pm 1.73\%$ 、 $100.77 \pm 1.24\%$ 、 $100.00 \pm 1.79\%$) 与对照组比较无统计学意义 ($P > 0.05$, 见图 4)。



** : 与对照组比较 $P < 0.01$ 。

图3 三叶苷对 PC12 细胞增殖的作用

1.79%、 $100.35 \pm 1.78\%$) 与对照组 ($100.00 \pm 1.79\%$) 比较无统计学意义 ($P > 0.05$, 见图 4)。

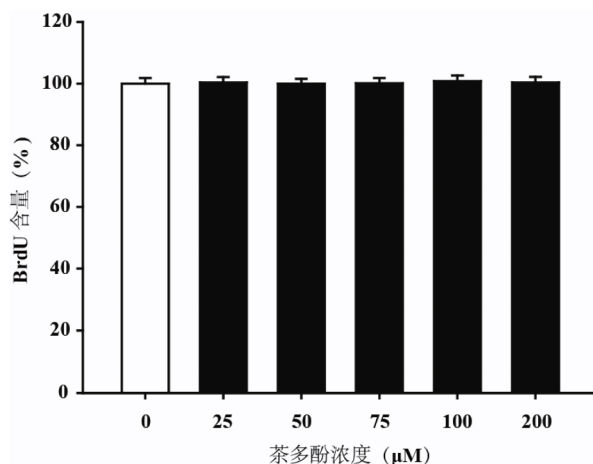


图4 茶多酚对 PC12 细胞增殖的作用

3 讨论

随着我国人口老龄化日益严重, 神经退行性疾病的发病率呈逐年上升趋势, 寻找有益于神经系统功能维持的化合物意义重大。多穗石柯叶是一种我国使用悠久、药食同源的植物, 常以“甜茶”、“甘茶”等形式出现在老百姓的生活中, 因此本实验采用多穗石柯叶水提取物为研究对象。高分化大鼠嗜铬细胞瘤 PC12 细胞, 来源于大鼠肾上腺髓质肿瘤克隆细胞系, 因其具有交感神经元特性, 现已广泛用于神经系统的体外研究^[10-11, 15-19]。BrdU 是一种人工合成的胸腺嘧啶类似物, 可在合成期渗入 DNA 分子中, 在细胞培养时加入 BrdU, 再与 BrdU 单克隆抗体相结合, 可反映细胞的增殖情况。因此, 本研究采用 BrdU ELISA 法观察多穗石柯叶水提取物及其主要成分对 PC12 细胞增殖的影响。本

研究结果表明,多穗石柯叶水提物可以明显促进 PC12 细胞的增殖,其主要成分三叶苷同样有显著的促 PC12 细胞增殖作用,而根皮苷和茶多酚对 PC12 细胞增殖作用无影响。提示多穗石柯水提物中的三叶苷可能是其促增殖作用的主要成分,这与本课题组的前期研究结论一致^[18]。值得注意的是,三叶苷作用的 PC12 细胞的 BrdU 相对含量低于多穗石柯水提物作用的 PC12 细胞的 BrdU 相对含量,表明三叶苷的促增殖作用低于多穗石柯叶水提物。推测其原因可能于多穗石柯中含有多种化学成分,还有其他成分发挥促增殖的作用,或者由于各成分间的相互作用使其促增殖作用明显增加有关,但是具体原因及其可能的作用机制尚需进一步研究探索。

综上所述,在本实验条件下,多穗石柯叶水提物的促增殖作用可能与其主要成分三叶苷有关。但本研究初步探索了多穗石柯水提物、根皮苷、三叶苷和茶多酚对 PC12 细胞增殖的影响,并未对其作用机制进行分析。因此,在未来的研究中将进一步采用多种实验法,例如 EDU 荧光染色、流式细胞术、Western blot 法等进一步验证多穗石柯水提物及其主要活性成分对 PC12 细胞的影响及其作用机制。本研究可为多穗石柯防治神经退行性疾病以及脑损伤的研究提供基础药理学依据。

[参考文献]

- [1] Hoch N C, Hanzlikova H, Rulten S L, et al. XRCC1 mutation is associated with PARP1 hyperactivation and cerebellar ataxia [J]. *Nature* 2017, 541(7635): 87–91.
- [2] 金凤, 吴芹, 陆远富, 等. 白藜芦醇对帕金森病大鼠的保护作用及机制研究 [J]. *遵义医学院学报*, 2009, 32(3): 222–224.
- [3] 程鹏, 李泰明. 乙酰胆碱酯酶抑制剂在阿尔兹海默症治疗中的研究进展 [J]. *科学技术创新* 2018(9): 50–51.
- [4] Pineda J R, Rubio N, Akerud P, et al. Neuroprotection by GDNF-secreting stem cells in a Huntington's disease model: optical neuroimage tracking of brain-grafted cells [J]. *Gene Ther* 2007, 14(2): 118–128.
- [5] 程青格, 徐平, 龚其海. 阿尔茨海默病的发病机制及治疗研究进展 [J]. *遵义医学院学报* 2013, 36(6): 586–589.
- [6] Monni E, Cusulin C, Cavallaro M, et al. Human fetal striatum-derived neural stem (NS) cells differentiate to mature neurons in vitro and in vivo [J]. *Curr Stem Cell Res Ther* 2014, 9(4): 338–346.
- [7] Lee H J, Kim K S, Kim E J, et al. Brain transplantation of immortalized human neural stem cells promotes functional recovery in mouse intracerebral hemorrhage stroke model [J]. *Stem Cells* 2007, 25(5): 1204–1212.
- [8] 蒋桂雄, 朱积余. 广西珍贵树种高效栽培技术(连载) [J]. *广西林业* 2015(8): 45–46.
- [9] 雷鸣, 徐应淑, 徐凡, 等. 多穗石柯化学成分及药理作用研究进展 [J]. *中药药理与临床* 2017, 33(6): 176–180.
- [10] Zhou C J, Huang S, Liu J Q, et al. Sweet tea leaves extract improves leptin resistance in diet-induced obese rats [J]. *J Ethnopharmacol* 2013, 145(1): 386–392.
- [11] 高健美, 雷鸣, 刘双, 等. 根皮苷对过氧化氢诱导损伤 PC12 细胞的保护作用 [J]. *中国新药与临床杂志*, 2016, 35(12): 886–889.
- [12] 文祎, 蔡淑娴, 黄建安. 茶叶活性成分的抗炎作用及其机制研究进展 [J]. *食品安全质量检测学报* 2017, 8(10): 3925–3930.
- [13] Noguchi Shinohara M, Yuki S, Dohmoto C, et al. Consumption of green tea, but not black tea or coffee, is associated with reduced risk of cognitive decline [J]. *Plos One* 2014, 9(5): e96013.
- [14] 雷鸣. 多穗石柯水提物对人正常肝细胞 L-02 增殖作用的研究 [D]. 遵义: 遵义医学院 2018.
- [15] 刘双. ICS1 通过激活 BDNF/TrkB 信号通路抗 β 淀粉样蛋白 25–35 片段诱导的 PC12 细胞凋亡 [D]. 遵义: 遵义医学院 2018.
- [16] Gao J, Xu Y, Lei M, et al. Icariside II, a PDE5 inhibitor from *Epimedium brevicornum*, promotes neuron-like pheochromocytoma PC12 cell proliferation via activating NO/cGMP/PKG pathway [J]. *Neurochem Int* 2018, 112: 18–26.
- [17] Liu S, Li X, Gao J, et al. Icariside II, a phosphodiesterase-5 inhibitor, attenuates beta-amyloid-induced cognitive deficits via BDNF/TrkB/CREB signaling [J]. *Cell Physiol Biochem* 2018, 49(3): 985.
- [18] Gao J M, Liu S, Xu F, et al. Trilobatin protects against oxidative injury in neuronal PC12 Cells through regulating mitochondrial ROS homeostasis mediated by AMPK/Nrf2/Sirt3 signaling pathway [J]. *Frontiers In Molecular Neuroscience* 2018, 11(11): 267–283.
- [19] 张玮, 胡娟, 吴芹, 等. 金钗石斛生物总碱对 β 淀粉样蛋白 25–35 片段所致 PC12 细胞损伤的保护作用 [J]. *遵义医学院学报* 2015, 38(4): 346–349.

[收稿 2019-02-18; 修回 2019-04-17]

(编辑: 谭秀荣)