

# 人参皂苷Re对人神经母细胞瘤SH-SY5Y细胞缺氧复氧损伤的保护作用

庞亚南<sup>1</sup> 李敏<sup>2</sup> 周小娟<sup>1△</sup>

(1 浙江省立同德医院药学部, 杭州 310012; 2 浙江大学药物信息学研究所, 杭州 310058)

**摘要 目的:**探讨人参皂苷Re对人神经母细胞瘤SH-SY5Y细胞缺氧复氧损伤的保护作用。**方法:**采用缺氧复氧法制备SH-SY5Y细胞损伤模型, 分为对照组、模型组、Re 6.25 μg/mL组和Re 12.50 μg/mL组。采用MTT法测定细胞存活率, 四甲基罗丹明甲酯(TMRM)染色评估细胞线粒体膜电位变化, DAPI染色观察细胞凋亡率, 并进一步采用免疫印迹检测各组细胞核因子NF-E2相关因子2(Nrf-2)、Bax和p53的蛋白表达。**结果:**人参皂苷Re对SH-SY5Y细胞活力无显著影响; 缺氧复氧条件下, 细胞存活率显著降低, 而人参皂苷Re在6.25、12.50 μg/mL浓度下预保护可显著提高细胞存活率。缺氧复氧损伤后, 人参皂苷Re 6.25、12.50 μg/mL能显著提高SH-SY5Y细胞的线粒体膜电位水平和抑制SH-SY5Y细胞的凋亡率。人参皂苷Re能够提高Nrf-2的蛋白表达, 抑制Bax和p53蛋白的表达。**结论:**人参皂苷Re可以抑制缺氧复氧损伤细胞的凋亡和氧化损伤, 对缺氧复氧诱导的神经细胞具有显著的保护作用。

**关键词** 人参皂苷Re; SH-SY5Y细胞; 缺氧复氧; 线粒体膜电位; 凋亡

## Protective effect of ginsenoside Re on human neuroblastoma SH-SY5Y cells injured by hypoxia reoxygenation

Pang Yanan<sup>1</sup>, Li Min<sup>2</sup>, Zhou Xiaojuan<sup>1△</sup>

(1. Department of Pharmacy, Tongde Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 310012;

2. Institute of Pharmaceutical Informatics, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

**Abstract Objective:** To observe the protective effect of ginsenoside Re on human neuroblastoma SH-SY5Y cells injured by hypoxia reoxygenation. **Methods:** SH-SY5Y cells were divided into control group, hypoxia reoxygenation group, Re 6.25 μg/mL group, and Re 12.50 μg/mL group. MTT assay was used to determine the cell survival rate. Mitochondrial membrane potential was assessed using TMRM staining. DAPI staining was used to observe cell apoptosis. And immunoblotting was used to detect the protein expression of nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf-2), Bax and p53. **Results:** Ginsenoside Re alone had no significant effect on the viability of SH-SY5Y cells. The viability of SH-SY5Y cells was significantly decreased in the model group. While ginsenoside Re at 6.25 μg/mL and 12.50 μg/mL could significantly improve the survival rate of SH-SY5Y cells. Ginsenoside Re 6.25 μg/mL and 12.50 μg/mL could significantly increase mitochondrial membrane potential and inhibit the apoptosis rate. Ginsenoside Re could increase the protein expression of Nrf-2 and inhibit the expression of Bax and p53. **Conclusion:** Ginsenoside Re can inhibit cell apoptosis and oxidative damage and has significant protective effect on neurons induced by hypoxia reoxygenation.

**Key words** ginsenoside Re; SH-SY5Y cells; hypoxia reoxygenation; mitochondrial membrane potential; apoptosis

近年来, 中医药在防治脑缺血损伤方面取得了巨大进展<sup>[1]</sup>。人参皂苷是人参发挥药理作用的主要成分, Re是人参皂苷的重要组成<sup>[2]</sup>。现代药理学研究表明, 人参皂苷Re在心血管系统<sup>[3]</sup>、中枢神经系统<sup>[4]</sup>、抗休克<sup>[5]</sup>和抗血小板聚集<sup>[6]</sup>等多方面具有

显著的保护作用。李政泽等<sup>[7]</sup>报道人参皂苷Re能抑制谷氨酸损伤的神经细胞凋亡, 提高细胞存活率。但人参皂苷Re对缺氧复氧损伤的人神经母细胞瘤SH-SY5Y细胞的保护作用及机制尚无报道, 因此, 本研究通过建立体外SH-SY5Y细胞缺氧复氧损伤模型, 研究人参皂苷Re对神经细胞的保护作用, 并初步探讨其作用机制, 为进一步开发利用人参皂苷提供理论依据。

第1作者 E-mail: tdpangyn@163.com

△通信作者, E-mail: xiaojuanzhou1987@126.com

收稿日期: 2021-10-04; 修回日期: 2022-03-20

## 1 材料和方法

### 1.1 材料及分组

人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞购自中国科学院细胞库；人参皂苷 Re（产品批号：1901062）购自上海源叶生物科技有限公司；胎牛血清、胰蛋白酶、青霉素链霉素溶液购自美国 Gibco 公司；DMEM 高糖培养基购自美国 Corning 公司；二甲基亚砜购自国药集团化学试剂有限公司；噻唑蓝（MTT）粉末购自美国 Sigma 公司；四甲基罗丹明甲基（TMRM）染料购自 Invitrogen 公司；DAPI 染色液、 $\beta$ -actin 抗体和辣根过氧化酶二抗购自碧云天生物技术有限公司；核因子 NF-E2 相关因子 2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf-2)、p53 抗体购自 Proteintech 公司；Hoechst 染料、Bax 抗体购自 CST 公司。

采用缺氧复氧法制备 SH-SY5Y 细胞损伤模型，分为对照组、模型组（缺氧 4 h/复氧 2 h）、Re 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组、Re 12.50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组（人参皂苷 Re 缺氧复氧前预孵育细胞 12 h）。

### 1.2 MTT 法检测人参皂苷 Re 对常氧 SH-SY5Y 细胞存活率的影响

取对数期生长的 SH-SY5Y 神经细胞消化计数，以  $5 \times 10^3$  个/孔的密度接种于 96 孔板，37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中贴壁生长 24 h。更换含不同浓度人参皂苷 Re (6.25、12.50、25.00、50.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的药液孵育 24 h，吸去培养液，避光加入 MTT 溶液（每孔 100  $\mu\text{L}$ ），继续于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱孵育 4 h，吸弃上清液，每孔加入 100  $\mu\text{L}$  DMSO，37 °C 振摇 10 min，使用 Infinite M1000 Pro 多功能酶标仪测定 580 nm 波长处各孔吸光度值。

### 1.3 MTT 法检测人参皂苷 Re 对缺氧复氧 SH-SY5Y 细胞存活率的影响

取对数期生长的 SH-SY5Y 神经细胞消化计数，以  $5 \times 10^3$  个/孔的密度接种于 96 孔板，37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中贴壁生长 24 h。以完全培养基(含 10% FBS 的高糖 DMEM)配制不同浓度的人参皂苷 Re (6.25、12.50、25.00、50.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 加药预保护 12 h，吸去培养液，更换无糖无血清 DMEM 培养基，于 37 °C 缺氧小室中缺氧处理 4 h。然后更换为完全培养基，并转移至 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中复氧 2 h。正常对照组细胞不进行缺氧复氧处理。复氧 2 h 后，按照上述 MTT 法测定 580 nm 波长处各孔吸光度，计算各组细胞存活率。

### 1.4 TMRM 染色评估人参皂苷 Re 对 SH-SY5Y 细胞

### 线粒体膜电位的影响

细胞培养及缺氧复氧处理同上述操作。复氧 2 h 后，吸去上清液，PBS 清洗细胞，然后用 Hoechst 染色液 37 °C 避光孵育 10 min，PBS 清洗细胞，TMRM 染色液 100  $\mu\text{L}$  避光孵育染色 30 min，随后于荧光显微镜下拍照，统计分析细胞线粒体膜电位变化情况。

### 1.5 DAPI 染色观察人参皂苷 Re 对 SH-SY5Y 细胞凋亡的作用

细胞培养及缺氧复氧处理同上述操作。复氧 2 h 后，吸去上清液，预冷 PBS 清洗细胞，然后用多聚甲醛固定液 100  $\mu\text{L}$  室温固定 30 min，PBS 洗去固定液，每孔加入 50  $\mu\text{L}$  DAPI 染色液，室温避光孵育 5 min，PBS 洗涤，随后于荧光显微镜下观察拍照。

### 1.6 免疫印迹检测 SH-SY5Y 细胞蛋白表达

取对数期生长的 SH-SY5Y 神经细胞消化计数，以  $3 \times 10^5$ /孔的密度接种于 6 孔板，37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中贴壁生长 24 h。以完全培养基（含 10% FBS 的高糖 DMEM）配制不同浓度的人参皂苷 Re (6.25、12.50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 加药预孵育 12 h 后按照上述操作进行缺氧复氧处理。复氧 2 h 后，吸去上清液，预冷 PBS 清洗细胞，然后用 4× 上样缓冲液 80  $\mu\text{L}$  进行细胞裂解，金属浴煮沸 10 min。取 10  $\mu\text{L}$  上样，进行 SDS-PAGE 电泳，转膜后用 5% 牛奶室温封闭 1 h，然后 4 °C 孵育 Nrf-2 (1 : 1 000)、p53 (1 : 1 000)、Bax (1 : 1 000) 和  $\beta$ -actin (1 : 1 000) 一抗过夜，TBS-T 洗 3 次，室温孵育二抗 (1 : 5 000) 1 h，TBS-T 洗 3 次后进行 ECL 显影曝光。采用凝胶图像软件分析系统扫描，以目的条带与内参条带的灰度值比作为蛋白相对表达量。

### 1.7 统计学处理

采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析。所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示，组间比较采用 *t* 检验，*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 人参皂苷 Re 对常氧 SH-SY5Y 细胞存活率的影响

MTT 检测细胞存活率结果显示（图 1），人参皂苷 Re 在 6.25~50.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度范围内与 SH-SY5Y 神经细胞共孵育 24 h 对细胞活力没有明显影响，可以采用该浓度进行后续实验研究。

### 2.2 人参皂苷 Re 对缺氧复氧 SH-SY5Y 细胞存活率的影响

MTT 结果显示（图 2），缺氧 4 h 复氧 2 h 能够

显著降低模型组细胞的存活率；与模型组比较，人参皂苷 Re 在  $6.25 \mu\text{g}/\text{mL}$  和  $12.50 \mu\text{g}/\text{mL}$  浓度下预保护 12 h 能够显著提高 SH-SY5Y 细胞的存活率 ( $P<0.05$ )，对缺氧复氧损伤的细胞具有明显的保护作用。

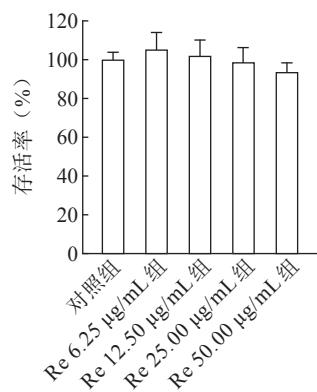


图 1 人参皂苷 Re 对常氧 SH-SY5Y 细胞存活率的影响

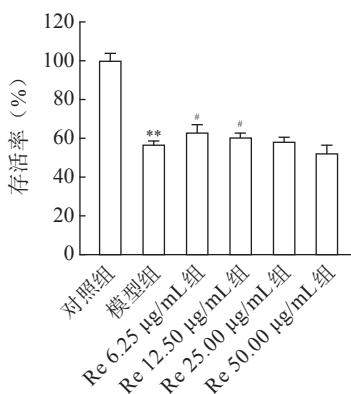


图 2 人参皂苷 Re 对缺氧复氧损伤 SH-SY5Y 细胞存活率的影响  
\*\* $P<0.01$  vs 对照组；# $P<0.05$  vs 模型组

### 2.3 人参皂苷 Re 对 SH-SY5Y 细胞线粒体膜电位的影响

TMRM 染色结果显示（图 3），与对照组相比，模型组 SH-SY5Y 细胞线粒体 TMRM 荧光强度显著降低；而人参皂苷 Re  $6.25 \mu\text{g}/\text{mL}$  和  $12.50 \mu\text{g}/\text{mL}$  预孵育能够增加线粒体膜电位水平，人参皂苷 Re  $6.25 \mu\text{g}/\text{mL}$  处理组与模型组比较差异有统计学意义 ( $P<0.01$ )。

### 2.4 人参皂苷 Re 对 SH-SY5Y 细胞凋亡的抑制作用

DAPI 染色结果显示（图 4），与对照组相比，模型组 SH-SY5Y 细胞发生明显凋亡，细胞核固缩，呈致密浓染；而人参皂苷 Re 在  $6.25 \mu\text{g}/\text{mL}$  和  $12.50 \mu\text{g}/\text{mL}$  浓度下预孵育能够减少浓染的细胞核比例，抑制细胞凋亡，与模型组比较差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。

### 2.5 人参皂苷 Re 对 SH-SY5Y 细胞蛋白表达的影响

免疫印迹结果显示（图 5），模型组细胞促凋亡蛋白 Bax 和 p53 表达明显增加。而人参皂苷 Re  $6.25 \mu\text{g}/\text{mL}$  和  $12.50 \mu\text{g}/\text{mL}$  处理组 Bax 和 p53 的表达水平显著降低。同时人参皂苷 Re 处理组抗氧化蛋白 Nrf-2 的表达明显提高，与模型组比较差异有统计学意义 ( $P<0.01$ )。

## 3 讨论

缺血性脑卒中是世界上最常见的脑血管病，并且近年来在年轻人群中的发病率也显著增加<sup>[8-9]</sup>。早期的血运重建仍然是最有效的治疗手段，但是血流恢复会对缺血脑组织产生新的再灌注损伤。发现和探索具有保护缺血再灌注损伤的药物对缺血性脑卒中的预后具有重要意义。SH-SY5Y 细胞缺氧复氧模型是经典的模拟脑缺血再灌注损伤的体外细胞模型<sup>[10]</sup>，本实验通过糖氧剥夺建立缺氧复氧损伤的 SH-SY5Y 细胞模型，探讨人参皂苷 Re 的神经保护作用。研究结果显示，缺氧复氧后，SH-SY5Y 细胞存活率明显降低，细胞线粒体膜电位显著降低，细胞凋亡增加。人参皂苷 Re  $6.25 \mu\text{g}/\text{mL}$  和  $12.50 \mu\text{g}/\text{mL}$  能够提高 SH-SY5Y 细胞存活率，抑制细胞线粒体膜电位降低，提高细胞抗氧化能力，从而抑制细胞凋亡，对 SH-SY5Y 细胞缺氧复氧损伤具有明显的保护作用。

线粒体在维持细胞正常功能中起重要作用，正常的线粒体膜电位是维持线粒体进行氧化磷酸化、产生三磷酸腺苷的重要前提，线粒体膜电位的稳定有利于维持细胞的正常生理功能。氧化应激条件下，细胞产生大量氧自由基，进而刺激细胞线粒体，导致线粒体膜电位降低，线粒体功能障碍<sup>[11-12]</sup>。本研究结果显示缺氧复氧条件下，SH-SY5Y 细胞线粒体膜电位水平较正常对照组显著下降，细胞线粒体功能明显受损。而人参皂苷 Re 预孵育能够增加线粒体膜电位，说明人参皂苷 Re 能够保护缺氧复氧损伤 SH-SY5Y 细胞的线粒体，对维持细胞正常功能具有促进作用。

氧化应激损伤在缺血性脑病的发生发展过程中起着至关重要的作用，研究表明，通过提高机体内源性的抗氧化能力将是保护缺血性脑血管疾病的重要途径<sup>[13]</sup>。Nrf-2 是一种重要的核转录因子，具有改善机体氧化应激状态，维持氧化还原稳态的作用<sup>[14-15]</sup>。血红素氧化酶 1 (heme oxygenase-1, HO-1) 是一种重要的抗氧化酶，研究表明，机体在氧化应激条件下，Nrf-2 可以激活下游的 HO-1，从

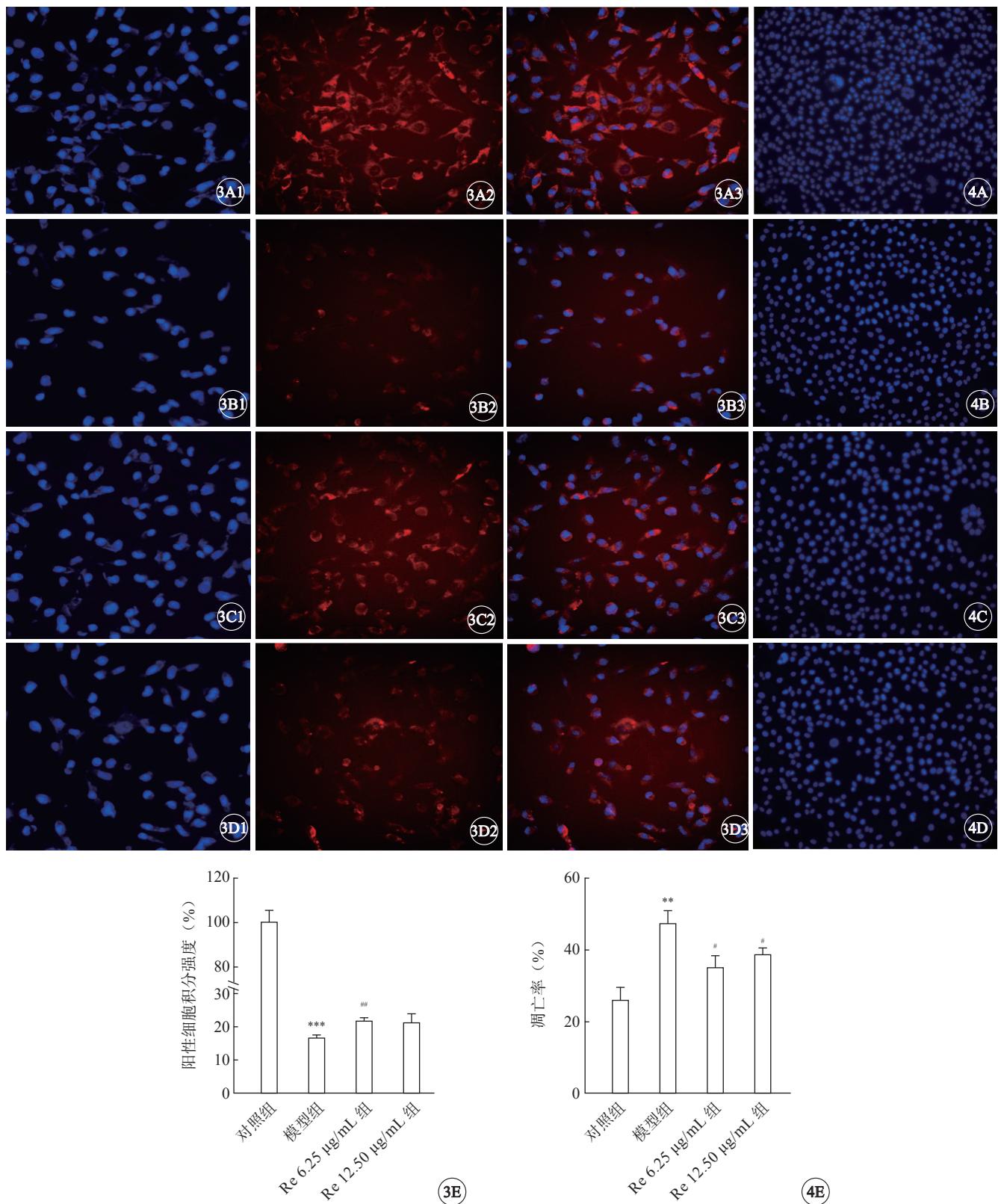


图3 人参皂苷Re对缺氧复氧损伤SH-SY5Y细胞线粒体膜电位的影响， $\times 200$ 。A1~D1：Hoechst染色；A2~D2：TMRM染色；A3~D3：Merge。A：对照组；B：模型组；C：Re 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组；D：Re 12.50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组；E：各组阳性染色细胞积分强度水平。 $^{***}P<0.001$  vs 对照组； $^{**}P<0.01$  vs 模型组。

图4 人参皂苷Re对缺氧复氧损伤SH-SY5Y细胞凋亡的影响， $\times 200$ 。A：对照组；B：模型组；C：Re 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组；D：Re 12.50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组；E：各组SH-SY5Y细胞凋亡率。 $^{**}P<0.01$  vs 对照组； $^{\#}P<0.05$  vs 模型组。

而发挥抗氧化和抑制细胞凋亡的作用<sup>[16-17]</sup>。本研究结果显示，缺氧复氧损伤后，人参皂苷Re 6.25、12.50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 能够增加SH-SY5Y细胞抗氧化蛋白

Nrf-2的表达，说明人参皂苷Re能够通过增强细胞对抗氧化应激的能力，保护细胞免受损伤。

药理学研究表明，细胞凋亡在脑缺血缺氧诱导

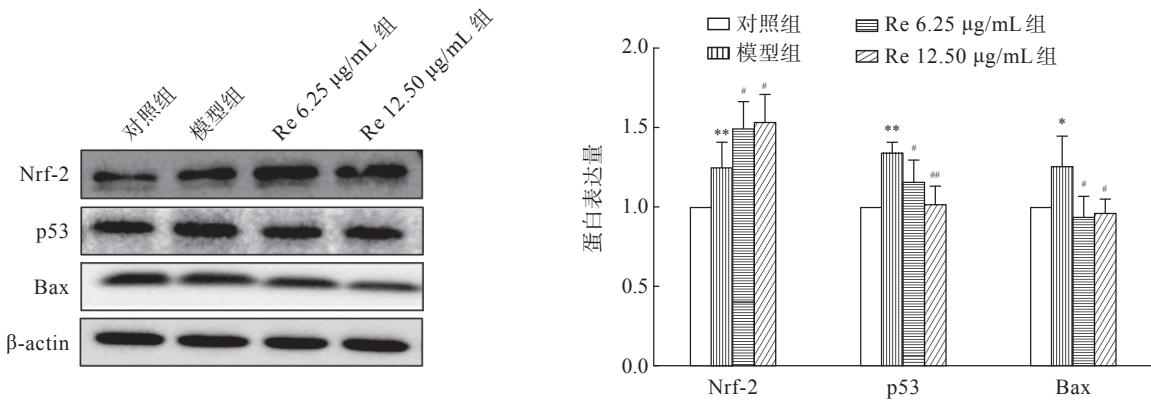


图5 人参皂苷Re对SH-SY5Y细胞Nrf-2、p53和Bax蛋白表达的影响

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs对照组 ; # $P<0.05$ , ## $P<0.01$  vs模型组

神经细胞死亡过程中具有重要的意义，而Bcl-2家族对细胞凋亡起到重要的调节作用，其中抑凋亡蛋白Bcl-2和促凋亡蛋白Bax的相互拮抗决定细胞是否进入凋亡状态<sup>[18-19]</sup>。p53是一个重要的抗癌基因，p53可以上调Bax的表达水平，以及下调Bcl-2的表达共同完成促进细胞凋亡作用<sup>[20]</sup>。本研究结果显示，SH-SY5Y细胞缺氧复氧后，p53和Bax蛋白表达与正常对照组相比显著增加，而人参皂苷Re能够显著抑制细胞的凋亡，抑制p53和Bax蛋白表达水平。

综上所述，人参皂苷Re对缺氧复氧损伤SH-SY5Y细胞具有明显的保护作用，其机制可能是通过抑制细胞线粒体损伤，提高细胞抗氧化应激水平，从而减少细胞凋亡而实现，具体作用机制仍需进一步深入研究。

#### 参考文献

- [1] 李岩, 王凯华. 脑缺血再灌注损伤过氧化相关机制及中医药治疗[J]. 解放军医药杂志, 2019, 31 (5) : 113-116.
- [2] 曹瑀莹, 杜丙秀, 李劭恒, 等. 人参皂苷Re对异丙肾上腺素诱导离体灌流大鼠心脏心律失常的调节作用[J]. 中草药, 2021, 52 (20) : 6234-6244.
- [3] Yu Y, Sun J, Liu J, et al. Ginsenoside Re preserves cardiac function and ameliorates left ventricular remodeling in a rat model of myocardial infarction[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2020, 75(1): 91-97.
- [4] Madhi I, Kim J H, Shin J E, et al. Ginsenoside Re exhibits neuroprotective effects by inhibiting neuroinflammation via CAMK/MAPK/NF-κB signaling in microglia[J]. Mol Med Rep, 2021, 24 (4) : 698.
- [5] 吕爽. 人参皂苷Re的抗体作用[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [6] 刘晓春, 张瑞英. 人参皂苷Re抗血小板聚集及作用机制研究[J]. 山西医药杂志, 2015, 44 (14) : 1610-1612.
- [7] 李政泽, 肖深根, 刘仲华, 等. 人参皂苷Re对谷氨酸致SH-SY5Y细胞损伤的保护作用[J]. 北京农业, 2013, (7) : 1-2.
- [8] 秦伟, 胡红梅, 李瀛婷, 等. 青年缺血性脑卒中患者脑小血管病发
- 生情况及危险因素分析[J]. 山东医药, 2021, 61 (17) : 20-24.
- [9] Zhang Z, Cao X, Bao X, et al. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript protects synaptic structures in neurons after ischemic cerebral injury[J]. Neuropeptides, 2020, 81 : 102023.
- [10] 刘麟文, 周雅春, 姚俊岩. DADLE对SH-SY5Y细胞缺氧复氧损伤的保护作用[J]. 解剖学杂志, 2020, 43 (1) : 31-36.
- [11] 尤旭, 朱小芳, 胡运鹏, 等. 黄芪总皂苷对心衰大鼠心肌细胞凋亡和线粒体膜电位的影响[J]. 基础医学与临床, 2020, 40 (9) : 1218-1223.
- [12] 吴倩, 汪宁, 刘娇, 等. 薰本内酯对缺糖缺氧/复氧所致PC12细胞线粒体分裂的影响[J]. 中国中药杂志, 2020, 45 (16) : 3931-3937.
- [13] Su X T, Wang L, Ma S M, et al. Mechanisms of acupuncture in the regulation of oxidative stress in treating ischemic stroke[J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 24 : 7875396.
- [14] Ma Q. Role of Nrf-2 in oxidative stress and toxicity[J]. Ann Rev Pharmacol Toxicol, 2013, 53 (1) : 401- 426.
- [15] Peng S, Hou Y, Yao J, et al. Activation of Nrf2 by costunolide provides neuroprotective effect in PC12 cells[J]. Food Funct, 2019, 10 (7) : 4143-4152.
- [16] 郭伟伟, 张晓鹏, 李霞, 等. 三七皂苷R1调控AMPK/Nrf-2/HO-1信号通路缓解冠心病大鼠心肌损伤的研究[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38 (1) : 36-41.
- [17] Surh Y J, Kundu J K, Li M H, et al. Role of Nrf2-mediated heme oxygenase-1 upregulation in adaptive survival response to nitrosative stress[J]. Arch Pharmacal Res, 2009, 32 (8) : 1163-1176.
- [18] 崔阳. 高压氧治疗对癫痫大鼠血清白细胞介素1β, 白细胞介素2, 白细胞介素8, 肿瘤坏死因子α水平及海马神经元Bax及Bcl-2表达的影响[J]. 解剖学杂志, 2021, 44 (3) : 204-208.
- [19] 陈秉朴, 黄瑞雅, 李培春, 等. 参麦注射液对缺氧复氧致鼠大脑皮层神经细胞Bcl-2/Bax蛋白表达的影响[J]. 中华现代中西医杂志, 2005, 3 (19) : 1732-1734.
- [20] Yan H, Huang W, Rao J, et al. miR-21 regulates ischemic neuronal injury via the p53/Bcl-2/Bax signaling pathway[J]. Aging (Albany NY), 2021, 13 (18) : 22242-22255.