

人参皂苷 Rb1 对 4-羟基壬烯醛诱导的人视网膜色素上皮细胞氧化损伤的影响

于越瀛 田莲姬 赵田田 金玫宏 崔仁哲 崔俊 (延边大学附属医院眼科,吉林 延吉 133000)

〔摘要〕 **目的** 研究人参皂苷 Rb1 对 4-羟基壬烯醛(4-HNE)诱导的人视网膜色素上皮细胞(ARPE-19)氧化损伤的保护作用及其机制。**方法** 采用 CCK-8 法检测人参皂苷 Rb1、4-HNE 处理浓度。将 ARPE-19 细胞随机分为对照组、Rb1 处理组、4-HNE 组和 4-HNE+Rb1 处理组。采用光学显微镜观察各组细胞形态结构,同时采用荧光显微镜检测细胞内的活性氧自由基(ROS)含量。采用 Western 印迹检测细胞凋亡相关因子 B 细胞淋巴瘤(Bcl)-2、Bax 蛋白表达水平。**结果** CCK-8 检测的结果显示人参皂苷 Rb1 浓度为 100 μmol/L 时 ARPE-19 细胞的增殖率最高,具有较好的保护作用,因此选择 100 μmol/L 人参皂苷 Rb1 进行后续实验。与 4-HNE 组比较,50.0 μmol/L 和 100.0 μmol/L 人参皂苷 Rb1 组细胞活力明显升高($P<0.05$)。与对照组比较,4-HNE 组细胞内 ROS 含量明显增加($P<0.05$),Bax 蛋白表达量升高,Bcl-2 蛋白表达量降低。与 4-HNE 组比较,4-HNE+Rb1 处理组细胞内 ROS 含量显著减少($P<0.05$),Bax 蛋白表达量降低,Bcl-2 蛋白表达量升高。**结论** 人参皂苷 Rb1 能改善 4-HNE 诱导的视网膜色素上皮细胞氧化损伤,其机制可能与人参皂苷 Rb1 减轻细胞凋亡有关。

〔关键词〕 人参皂苷 Rb1;4-羟基壬烯醛;氧化损伤;人视网膜色素上皮细胞
〔中图分类号〕 R774.1 **〔文献标识码〕** A **〔文章编号〕** 1005-9202(2022)13-3274-04;doi:10.3969/j.issn.1005-9202.2022.13.046

年龄相关性黄斑变性(AMD)是一种老年退行性眼科疾病^[1]。其发病机制尚不明确,但氧化应激反应作用于视网膜色素上皮(RPE),促使线粒体发生损害,产生的活性氧(ROS)减少^[2,3]。随着年龄的逐渐增长,人体内过氧化物酶的活性下降,视网膜 RPE 发生氧化损伤,导致 AMD,可严重造成视力减退,影响生活质量^[4]。因此,发挥抗氧化作用保护 RPE 细胞是防止 AMD 的有效途径。4-羟基壬烯醛(4-HNE)是一种醛类化合物,存在于细胞线粒体中,是导致线粒体功能障碍的重要物质^[5]。氧化应激反应可引起 4-HNE 的积累,破坏信号通路,诱导炎症反应及产生细胞凋亡信号,也参与各种细胞的毒性反应,引起氧化应激相关疾病的发生发展^[6,7]。人参皂苷 Rb1(Rb1)不仅对心血管系统、中枢神经系统、免疫系统等多个系统有保护作用^[8],而且具有促进骨骼形成、增强免疫力、抗皮肤衰老、消除氧自由基等多种作用^[9]。目前人参皂苷 Rb1 是否对 RPE 细胞氧化损伤具有保护作用及相关的机制尚不清楚。本研究采用 4-HNE 损伤 RPE 细胞建立体外氧化损伤模型,分析人参皂苷 Rb1 对 RPE

细胞氧化损伤的保护作用及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料 人视网膜色素上皮细胞 ARPE-19(美国 ATCC 公司);人参皂苷 Rb1(成都普瑞法公司);4-HNE、二氯二氢荧光素(DCFH-DA,美国 Sigma 公司);胎牛血清(美国 Gibco 公司);DMEM/F12 培养基、胎牛血清(美国 HyClone 公司);CCK-8 细胞活性检测试剂盒(日本 Dojindo 公司);B 细胞淋巴瘤(Bcl)-2、Bax、β-actin 抗体(美国 CST 公司);CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司);荧光倒置显微镜(日本 Olympus 公司);酶标仪(美国 BIOTEK 公司)。

1.2 细胞培养 将人 ARPE-19 细胞培养于含有 10% 胎牛血清、1% 100 mg/L 的青霉素和 100 mg/L 链霉素的 DMEM/F12 培养基中,在 5% CO₂ 培养箱中培养,温度为 37℃。当细胞生长融合至 80%,定期更换培养基并将细胞进行传代繁殖,选取对数生长期细胞进行后续实验。

1.3 CCK-8 法检测细胞活力 采用传代繁殖后 ARPE-19 细胞以每孔中含有 5×10³ 个细胞为标准接种于 96 孔细胞培养板中,且每孔中分别为 200 μl 细胞悬液,接种于加有培养液的细胞培养皿中,且培养皿 1 w 更换 2 次。细胞贴壁传代繁殖后更换为无血清培养液,将不同浓度人参皂苷 Rb1 溶液加入培养皿中培养 24 h,其中人参皂苷 Rb1 浓度分别 0.0、12.5、25.0、50.0、100.0 μmol/L,24 h 后分别在每孔中加入 10 μl CCK-8 溶液,将培养板放置培养箱中

基金项目:吉林省科技厅自然科学基金项目(No. 20200201553JC)
通信作者:崔俊(1985-),男,博士,主治医师,主要从事视网膜疾病研究。
崔仁哲(1976-),男,博士,主任医师,硕士生导师,主要从事眼底病研究。
第一作者:于越瀛(1995-),女,在读硕士,住院医师,主要从事眼底病研究。

继续培养 3 h,显微镜下观察并收集细胞。实验重复 3 次,采用 CCK-8 试剂盒检测 ARPE-19 细胞的存活率,选择 450 nm 波长,采用酶标仪测定各孔吸光度(OD)值,计算细胞增殖率。

1.4 细胞分组及给药处理 选择 10 μmol/L 的 4-HNE 作为给药适宜浓度^[10],再根据 CCK-8 法筛选药物最佳浓度,选择浓度为 100 μmol/L 的人参皂苷 Rb1 作为最适宜浓度,接着将 ARPE-19 细胞分为对照组、Rb1 处理组、4-HNE 组和 4-HNE+Rb1 处理组。对照组:进行常规培养;Rb1 处理组:加入 100 μmol/L Rb1 作用 24 h;4-HNE 组:加入 10 μmol/L 4-HNE 细胞作用 12 h;4-HNE+Rb1 处理组:100 μmol/L Rb1 作用 24 h,随后再加入 10 μmol/L 4-HNE 作用 12 h。在光学显微镜下观察各组 ARPE-19 细胞排列、大小、形态等变化。

1.5 荧光显微镜测定细胞内 ROS 含量 将分组处理后的细胞接种于直径为 14 mm 的 24 孔荧光酶标板中进行爬片,细胞进行良好的黏附后放置于培养箱中培养 24 h,促进细胞贴壁生长,用磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗 1 min,进行 3 次。采用无血清培养液稀释荧光染料 DCFH-DA,稀释浓度为 10 μmol/L。放置于温度为 4℃ 的细胞培养箱中进行避光孵育 10 min,孵育完成后用 PBS 再次洗涤 3 次,在荧光显微镜下采用荧光标记法检测细胞内 ROS 含量。

1.6 Western 印迹检测蛋白表达水平 收集各组细胞,加入 50 μl 蛋白裂解液(含 PMSF),冰上裂解 30 min,在 4℃ 离心机离心 15 min,提取细胞总蛋白,采用二喹啉甲酸(BCA)法蛋白定量,取 50 μg 蛋白样品在 10%~15% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)胶上电泳,蛋白转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后,分别加入 Bax、Bcl-2、β-actin 抗体 4℃ 孵育过夜。次日, TBST 洗 3 次,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的山

羊抗兔 IgG,室温孵育 1 h,TBST 冲洗 3 次后,加入 ECL 化学发光显影剂,用 Image J 凝胶图像分析系统计算 Bax 和 Bcl-2 的相对蛋白表达。

1.7 统计学分析 采用 SPSS21.0 软件进行单因素方差分析、LSD-*t* 检验。

2 结 果

2.1 人参皂苷 Rb1 对 ARPE-19 细胞活力的影响 0.0、12.5、25.0、50.0、100.0 μmol/L Rb1 作用于 ARPE-19 细胞 24 h 细胞增殖率分别为(100.00±0.37)%、(101.30±0.64)%、(101.36±0.28)%、(102.59±0.85)%、(103.21±0.57)%,各组细胞活力差异有统计学意义(*P*<0.01)。50.0、100.0 μmol/L 人参皂苷 Rb1 处理后 ARPE-19 细胞活性显著提高(*P*<0.05)。

2.2 人参皂苷 Rb1 对 4-HNE 诱导的 ARPE-19 细胞活力的影响 对照组、4-HNE 组、4-HNE+50 μmol/L Rb1 处理组、4-HNE+100 μmol/L Rb1 处理组细胞活性分别为(100.00±0.72)%、(66.39±1.14)%、(84.02±0.96)%、(89.41±1.11)%,4 组间细胞活性差异有统计学意义(*P*<0.001)。组间两两比较,4-HNE 组明显低于对照组(*P*<0.05);50、100 μmol/L Rb1 处理组明显高于 4-HNE 组(*P*<0.05),且 100 μmol/L Rb1 处理组变化更明显(*P*<0.05)。本研究选择后续实验中人参皂苷 Rb1 的作用浓度为 100 μmol/L。

2.3 人参皂苷 Rb1 对 4-HNE 诱导的 ARPE-19 细胞形态学影响 对照组细胞呈梭形、常规贴壁生长;4-HNE 组细胞皱缩、数量较少、形态欠佳且细胞排列异常,部分细胞不能贴壁生长;4-HNE+Rb1 处理组细胞逐渐得到缓解,形态得到改善。Rb1 处理组与对照组细胞类似,无明显差异,见图 1。

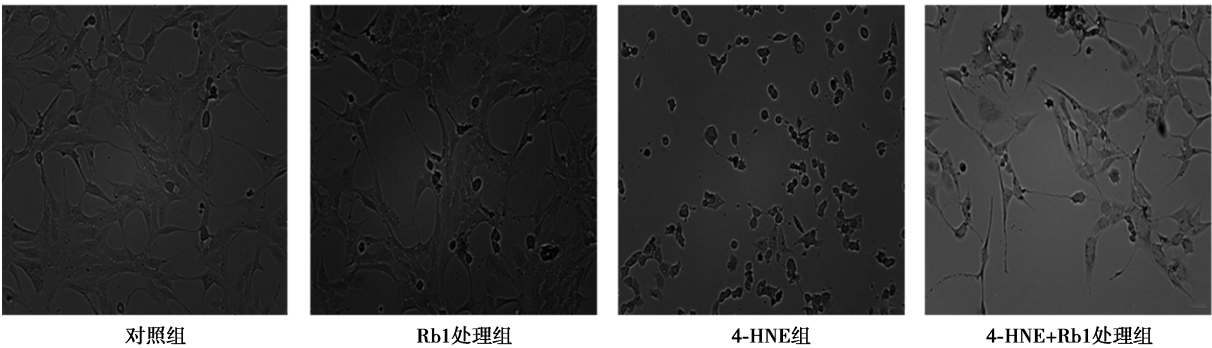


图 1 人参皂苷 Rb1 对 4-HNE 诱导的 ARPE-19 细胞形态学的影响(×40)

2.4 荧光显微镜下观察 Rb1 对各组细胞 ROS 生成的影响 对照组和 Rb1 处理组几乎没有呈现绿色高荧光,而 4-HNE 组相较于对照组呈现绿色高荧光

信号增强;4-HNE+Rb1 处理组相比较于 4-HNE 组呈现出绿色高荧光信号减弱,见图 2。

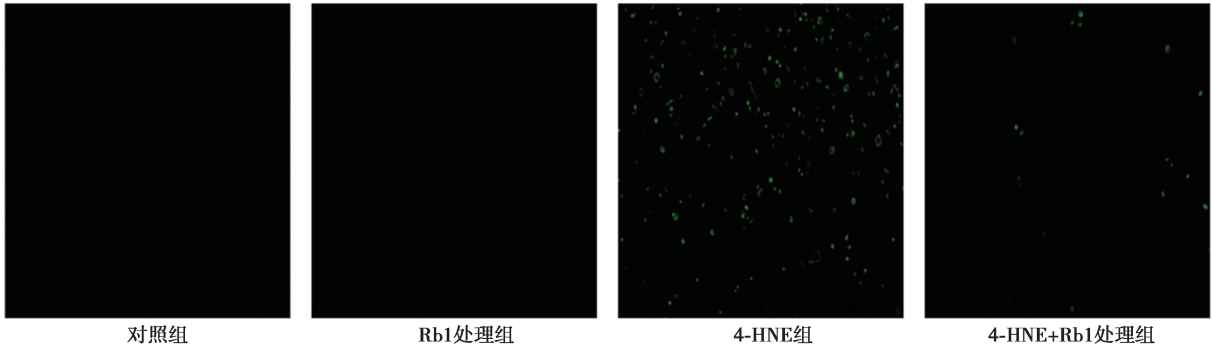


图2 人参皂苷 Rb1 对 4HNE 诱导的 ARPE-19 细胞内 ROS 生成的影响(×40)

2.5 人参皂苷 Rb1 对 4-HNE 诱导的 ARPE-19 细胞 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响 对照组、4-HNE 组、4-HNE + Rb1 处理组 Bcl-2/Bax 表达 (1.85 ± 0.16 、 0.36 ± 0.05 、 1.03 ± 0.06) 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。与对照组相比,4-HNE 组 Bcl-2/Bax 表达明显下调 ($P < 0.05$);与 4-HNE 组相比较,4-HNE+Rb1 处理组明显上调 ($P < 0.05$),见图 3。

为治疗 AMD 研究探讨的热点。

Rb1 作为人参皂苷中含量最多的一种有效成分^[16],能改善衰老小鼠体内氧化应激水平^[17]。人参皂苷 Rb1 也可抑制视神经 RGC-5 细胞氧化应激^[18]。氧化应激可诱导 RPE 细胞中的 ROS 增多,造成视网膜功能损害^[19]。本研究证明 4-HNE 可诱导 ARPE-19 细胞氧化损伤;人参皂苷 Rb1 可以清除 4-HNE 诱导生成的 ROS,促进 RPE 细胞抗氧化损伤,提示人参皂苷 Rb1 对视网膜氧化损伤具有一定的保护作用。

研究显示 RPE 细胞功能受损可引起细胞凋亡,而人参皂苷 Rb1 具有显著的抗凋亡活性^[20,21]。本研究结果提示人参皂苷 Rb1 能够抑制 4-HNE 诱导的细胞氧化损伤,进一步提示人参皂苷 Rb1 能对 RPE 细胞功能受损引起的细胞凋亡具有抑制作用。

综上,人参皂苷 Rb1 对 4-HNE 诱导的 ARPE-19 细胞氧化损伤具有保护作用,其机制可能与抑制氧化应激反应有关,为临床治疗 AMD 等视网膜疾病的防治提供了新的诊疗策略。

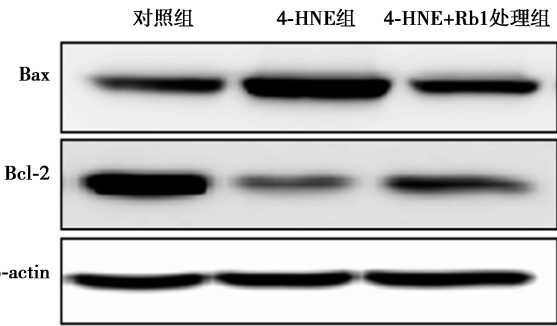


图3 人参皂苷 Rb1 对 4-HNE 诱导的 ARPE-19 细胞凋亡蛋白表达的影响

3 讨论

随着日常人口老龄化速度的加快及人均寿命的逐渐延长,AMD 成为老年人视力下降的原因之一,目前临床上对于 AMD 大多采用抗血管内皮生长因子(VEGF)治疗^[11]。有研究表明,氧化应激是 AMD 发病原因之一^[12],且随着人类的年龄逐渐增长,体内氧化应激反应越来越多,造成各器官逐渐衰老,进而加重损伤视网膜^[13],使视网膜光感受器受损,RPE 层细胞氧化应激反应作为 AMD 的致病因素已得到证实^[14]。临床上使用抗氧化剂对 AMD 患者的视力有改善作用^[15]。抗氧化剂越来越受到重视,成

4 参考文献

- 1 刘俊杰,伍大洋,徐军,等. 叶酸、维生素 B6 对年龄相关性黄斑变性患者血清同型半胱氨酸水平及氧化应激状态的影响[J]. 中国老年学杂志,2021;41(4):723-6.
- 2 陈海霞,张璐. 年龄相关性黄斑变性与氧化应激相关性研究进展[J]. 国际眼科杂志,2017;17(4):652-4.
- 3 俞永珍,邹秀兰,邹玉平. 氧化应激及抗氧化物在年龄相关性黄斑变性中的作用[J]. 眼科新进展,2015;35(5):489-92.
- 4 Chiras D,Kitsos G,Petersen MB,et al. Oxidative stress in dry age-related macular degeneration and exfoliation syndrome[J]. Crit Rev Clin Lab Sci,2015;52(1):12-27.
- 5 Santin Y,Fazal L,Sainte-Marie Y,et al. Mitochondrial 4-HNE derived

from MAO-A promotes mitoCa2+ overload in chronic postischemic cardiac remodeling[J]. Cell Death Differ,2020;27(6):1907-23.

6 Wang FX, Li HY, Li YQ, *et al.* Can medicinal plants and bioactive compounds combat lipid peroxidation product 4-hne-induced deleterious effects[J]? Biomolecules,2020;10(1):146.

7 Breitzig M, Bhimineni C, Lockey R, *et al.* 4-Hydroxy-2-nonenal: a critical target in oxidative stress[J]. Am J Physiol Cell Physiol,2016;311(4):C537-43.

8 杨秋娅, 李晓宇, 刘皋林. 人参皂苷 Rb1 的药理作用研究进展[J]. 中国药学杂志,2013;48(15):1233-7.

9 李琴, 李红月, 孙志伟. 人参皂苷 Rb1 的药理作用研究进展[J]. 信息化建设,2016;(10):218-9.

10 Cui R, Tian L, Lu D, *et al.* Exendin-4 protects human retinal pigment epithelial cells from H₂O₂-induced oxidative damage via activation of NRF2 signaling[J]. Ophthalmic Res,2020;63(4):404-12.

11 欧阳灵艺, 邢怡桥. 抗 VEGF 药物在湿性年龄相关性黄斑变性中的应用进展[J]. 国际眼科杂志,2020;20(1):74-8.

12 梁厚成, 陈凌, 冯海晓, 等. 视网膜色素上皮细胞氧化应激相关 microRNA 的鉴定[J]. 国际眼科杂志,2015;(9):1521-4.

13 孙子雯, 汤垚, 陈晨, 等. 年龄相关性黄斑变性的发病机制与抗氧化治疗[J]. 国际眼科杂志,2020;20(3):468-71.

14 姜双, 徐海月. 碘酸钠对小鼠视网膜形态和功能变化的影响[J]. 国际眼科杂志,2016;16(6):1036-8.

15 张英俊, 白鸽, 何向东, 等. 秦皮乙素对氧化损伤 ARPE-19 细胞的保护作用及其机制[J]. 中华实验眼科杂志,2020;38(12):1025-31.

16 Qiao L, Zhang X, Liu M, *et al.* Ginsenoside Rb1 enhances atherosclerotic plaque stability by improving autophagy and lipid metabolism in macrophage foam cells[J]. Front Pharmacol,2017;8:727.

17 宋志明, 余舒杰, 巩贵宏, 等. 人参皂苷 Rb1 通过抑制炎症反应及氧化应激改善老年小鼠内皮功能[J]. 中国实验诊断学,2018;22(6):136-40.

18 Liu Z, Chen J, Huang W, *et al.* Ginsenoside Rb1 protects rat retinal ganglion cells against hypoxia and oxidative stress [J]. Mol Med Rep,2013;8(5):1397-403.

19 Kozłowski MR. The ARPE-19 cell line: mortality status and utility in macular degeneration research [J]. Curr Eye Res, 2015;40(5):501-9.

20 杨翠, 任建勋, 吴红金, 等. 人参皂苷 Rb1 经 ERK1/2 对 H2O2 诱导的乳鼠心肌细胞损伤的保护作用[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2014;12(2):207-9.

21 Li J, Shao ZH, Xie JT, *et al.* The effects of ginsenoside Rb1 on JNK in oxidative injury in cardiomyocytes[J]. Arch Pharm Res,2012;35(7):1259-67.

[2021-11-15 修回]

(编辑 滕欣航)

柴胡皂苷 D 对人三阴乳腺癌细胞 MDA-MB-231 增殖的影响

杨楠¹ 冯苗苗² 邕铭伟² 严晓丽² 王明娟² 薛晶²
(承德医学院 1 护理系, 河北 承德 067000; 2 基础医学院)

〔摘要〕目的 探讨柴胡皂苷(SS)D 对人三阴乳腺癌(TNBC)细胞 MDA-MB-231 增殖的影响及机制。方法 MDA-MB-231 细胞株培养, 采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)比色法测定不同浓度 SSD 的生长抑制作用并选择 SSD 的处理浓度, 再用 Western 印迹检测对照组(不加 SSD)、实验组(加入 20 μmol/L SSD)的细胞周期相关因子人缺氧诱导因子(HIF)-1、胰岛素样生长因子结合蛋白(IGFBP)-6、血管内皮生长因子(VEGF)蛋白的表达。结果 20 μmol/L 以上浓度的 SSD 对 TNBC 细胞的增殖起抑制作用($P<0.01$)。与对照组比较, 实验组细胞 HIF-1、VEGF 蛋白相对表达量显著降低($P<0.05$, $P<0.01$), IGFBP-6 蛋白相对表达量均显著升高($P<0.05$)。结论 SSD 可抑制人 TNBC MDA-MB-231 细胞的增殖, 其抑制机制与 HIF-1、VEGF 蛋白的表达降低和 IGFBP-6 蛋白的表达升高相关。

〔关键词〕三阴乳腺癌; 柴胡皂苷 D; 细胞增殖

〔中图分类号〕R73 〔文献标识码〕A 〔文章编号〕1005-9202(2022)13-3277-03; doi:10.3969/j.issn.1005-9202.2022.13.047

我国女性恶性肿瘤发病率排第 1 位的是乳腺癌, 其病死率排第 5 位, 是临床常见恶性肿瘤之一。近 1/4 乳腺癌患者为三阴乳腺癌(TNBC), TNBC 有高侵袭、恶性程度高、易转移和预后差等特点^[1,2]。

基金项目: 2019 年河北省教育厅青年科学基金项目(QN2019131); 2019 年承德医学院校级大学生创新创业训练计划项目(2019040)

通信作者: 薛晶(1986-), 女, 硕士, 讲师, 主要从事肿瘤机制研究。

第一作者: 杨楠(1998-), 女, 主要从事护理学研究。

柴胡根茎中分离出的三萜皂苷柴胡皂苷(SSs)具有多重药理作用。其中, 柴胡皂苷(SS)D 的中药理活性最强, 能逆转肿瘤细胞的耐药性, 通过抑制肿瘤细胞增殖分裂和阻断细胞周期, 从而促进细胞凋亡^[3]。据报道, SSD 抑制细胞生长或诱导细胞凋亡的作用在肾癌、胶质瘤、甲状腺癌、肝癌等恶性肿瘤中都有体现^[4~7]。但 SSD 对人 TNBC 细胞 MDA-MB-231 增殖的影响和作用机制尚未报道, 本实验拟研究其对 TNBC 细胞 MDA-MB-231 增殖的影响及