

## 染料木素抗 PC12 神经细胞炎症作用实验研究

周迎, 熊婷, 陈莹, 李海刚

长沙医学院药学院 湖南长沙

**【摘要】目的** 探讨染料木素对双氧水诱导的 PC12 细胞炎症模型的影响及其抗炎作用机制。**方法** 1、筛选适合造模的双氧水浓度构建 PC12 细胞炎症模型。2、测定不同浓度染料木素对细胞存活率的影响。3、MTT 法观测染料木素对 PC12 细胞双氧水炎症模型的预保护作用。4、实时 PCR 检测各组 PC12 细胞中 NgR mRNA 的表达。**结果** 1、染料木素浓度 100  $\mu\text{M}$  以下基本不具细胞毒性, 染料木素预处理具有保护作用, 与模型组相比显著提高 PC12 炎症模型细胞存活率。2、染料木素显著下调  $\text{H}_2\text{O}_2$  损伤引起 NgR 基因的表达。**结论** 染料木素可通过 Nogo/NgR 信号通路, 下调 NgR 水平发挥抗 PC12 神经细胞炎症的作用。

**【关键词】** 染料木素; 神经炎症; 抗炎; NgR

**【基金项目】** 湖南省教育厅科学研究重点项目 (湘教通[2019]90 号 NO18A497); 湖南省中医药科研计划课题青年项目 (湘中医药[2020]1 号 NO202098); 湖南省教育厅科学研究重点项目 (湘教通[2019]90 号 NO18C1150); 湖南省教育厅科学研究重点项目 (湘教通[2019]353 号 NO19C0194)。

**【收稿日期】** 2022 年 11 月 3 日 **【出刊日期】** 2022 年 12 月 13 日 **【DOI】** 10.12208/j.ircm.20220080

### Experimental Study on the Anti-inflammatory Effect of Genistein on PC12 Nerve Cells

Ying Zhou, Ting Xiong, Ying Chen, Haigang Li

Changsha Medical College school of pharmacy Changsha Hunan

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of genistein on PC12 cell inflammatory model induced by hydrogen peroxide and its anti-inflammatory mechanism. **Methods** 1. Select the suitable concentration of hydrogen peroxide for modeling to construct PC12 cell inflammation model. 2. The effects of different concentrations of genistein on cell survival were determined. 3. MTT assay was used to observe the protective effect of genistein on PC12 cells with  $\text{H}_2\text{O}_2$  induced inflammation. 4. The expression of NgR mRNA in PC12 cells of each group was detected by real-time PCR. **Result** 1. Genistein concentration 100  $\mu\text{M}$  There is basically no cytotoxicity below M, and genistein pretreatment has a protective effect. Compared with the model group, it significantly improves the cell survival rate of PC12 inflammatory model. 2. Genistein significantly decreased the expression of NgR gene induced by  $\text{H}_2\text{O}_2$  damage. **Conclusion** Genistein can inhibit the inflammation of PC12 neurons by down regulating the level of NgR through Nogo/NgR signaling pathway.

**【Keywords】** genistein; Neuroinflammation; Anti inflammation; NgR

人口老龄化现象日趋加剧, 老年性疾病发病率越来越高, 阿尔茨海默 (Alzheimer's disease, AD) 等慢性神经退行性疾病尤为突出<sup>[1]</sup>。AD 的发病机制存在多方面的假说: 胆碱能假说、 $\beta$  淀粉样蛋白假说、炎症假说等, 具体发病分子机制尚不清楚, 目前临床缺乏有效治疗方法<sup>[2]</sup>。2009 年 AD 患者 530 万, 2018 年 AD 患者约 5 千万, 预计 2050 年患病人数将高达一亿<sup>[3]</sup>。研究表明阿尔兹海默等神经退

行性疾病与神经炎症有关, 神经细胞的炎症反应诱发、加速了 AD 等神经退行性疾病的发生发展<sup>[4]</sup>。

Nogo-66 受体 NgR 在神经炎症发生发展过程中起着重要的调控作用<sup>[5]</sup>, Nogo-66 是 Nogo-A 中的一个抑制神经突生长的结构域, 它可以与 Nogo-66 受体 (NgR) 结合, 起到抑制神经突生长的作用<sup>[6]</sup>。小胶质细胞中表达的 NgR 能诱导细胞活化并释放多种炎症因子, 调节细胞粘附和迁移行为, NgR 在神经

细胞损伤模型中表达可特异性增高<sup>[7]</sup>。

染料木素又称金雀异黄酮、染料木黄酮, 是豆科植物千斤拔的主要异黄酮类成分, 其结构类似内源性雌激素具有抗肿瘤、抗炎、保护心脏等作用<sup>[8]</sup>。千斤拔中异黄酮提取物可显著减少 N2a 细胞内  $A\beta$  的累积而发挥抗炎作用, 有研究表明染料木素能显著提高红细胞的抗氧化酶活性、抑制肾脏炎症、抑制炎症细胞因子释放等作用<sup>[9]</sup>。

永久神经元细胞是体外研究神经细胞炎症最常使用的细胞模型, 其中 PC12 细胞是一种很好的药物筛选模型<sup>[10]</sup>,  $H_2O_2$  细胞炎症造模是较经典的炎症造模方法<sup>[11]</sup>。本研究拟采用  $H_2O_2$  诱导 PC12 神经细胞产生炎症, 探索染料木素抑制双氧水诱导的炎症作用及其可能存在的机制。

## 1 实验部分

### 1.1 溶液制备

精密称取染料木素(购自 Sigma 公司) 0.0041g 溶于 0.5mL DMSO 中, 完全溶解后, 再加入无血清的 DMEM 培养基配制成 10mmol/mL 的母液, 避光存放于 4°C 的冰箱备用。

### 1.2 炎症损伤模型建立

PC12 细胞以  $6.5 \times 10^4$  个/mL 密度种于 96 孔板, 种板 24 h 后加入含不同浓度的双氧水完全培养基(10%胎牛血清, 购自 gibco 公司), 继续培养 24、48 h 后移除细胞上清液每孔加入 100  $\mu$ L 的 5% MTT (购自上海天云生物), 培养箱孵育 3-4 h 移除上清液并加入 150  $\mu$ L 的二甲基亚砷(购自国药集团化学试剂公司)。酶标仪 570 nm 处测定吸光度, 并计算细胞存活率。药物处理后细胞存活率(%) = (模型组吸光度数值-溶剂吸光度数值) / (对照组吸光度数值-溶剂吸光度数值)  $\times$  100%。

### 1.3 染料木素对细胞增殖的影响

不同浓度的染料木素用全培养基等比稀释其母液配制而成, 过 0.22  $\mu$ m 的微孔滤膜, 避光 4°C 冰箱保存备用。以  $7 \times 10^4$  个/mL 的密度每孔 100  $\mu$ L 种于 96 孔板, 培养 24、48 h 后 MTT 法测定细胞存活率。

### 1.4 染料木素抗 PC12 细胞炎症实验

PC12 细胞以  $6.5 \times 10^4$  个/mL 的密度每孔 100  $\mu$ L 种于 96 孔板。24h 后实验组加入不同浓度的染料木素预保护作用 24h。次日实验组和模型组都加入适当浓度  $H_2O_2$  造模, 对照组加入等量的生理盐水。24h 后移除细胞上清液每孔加入 100  $\mu$ L 的 MTT 培养箱

孵育 3~4h, 再次移除细胞上清液后加入 150  $\mu$ L 的 DMSO 溶解, 酶标仪检测。比较药物组与模型组、空白对照组的存活率。

### 1.5 实时荧光定量 PCR 检测 NgR mRNA 表达

取代数生长期状态良好的细胞消化后以  $8 \times 10^4$  个/mL 的密度种于 6 孔板, 种板 24 h 后加入染料木素进行预保护, 染料木素加入 24 h 后加入适当浓度的  $H_2O_2$ 。24h 后 trizol (购自 Ambion 公司) 提取总 RNA 置 -80 °C 冰箱冷藏备用。按照 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (购自 thermal fisher 公司) 试剂盒说明书进行逆转录。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同浓度的双氧水及染料木素对细胞活力的影响

700  $\mu$ M 的  $H_2O_2$  作用 24 h 后细胞抑制率为 69.56% 为较理想造模剂量和造模时间。染料木素浓度在 30  $\mu$ M 以下, 对 PC12 细胞无明显细胞毒性; 100  $\mu$ M 浓度以下的染料木素对 PC12 细胞活力基本无影响。染料木素对 PC12 神经细胞炎症模型的预保护作用。与空白对照组相比,  $H_2O_2$  模型对照组细胞存活率为 36.45%, 造模成功。与模型对照组相比, 一定浓度的染料木素可提高 PC12 细胞的存活率。低剂量 5、10  $\mu$ M 的染料木素作用效果最好, 存活率达到了 68% 以上 ( $P < 0.01$ )。与模型组相比, 染料木素预处理显著提高了 PC12 神经细胞的存活率。与文献<sup>[12]</sup>的实验结论相一致, 染料木素起到了良好的抗炎作用。

### 2.2 染料木素对炎症模型 NgR mRNA 表达的影响

如表 2 所示, 与空白对照组相比,  $H_2O_2$  上调了模型对照组 NgR mRNA 的表达。染料木素明显下调了 NgR mRNA 的表达水平, 且染料木素预处理细胞减少了细胞 NgR mRNA 的表达, 说明染料木素可发挥预保护作用。使用公式  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算 NgR mRNA 的相对表达量。

神经炎症是 AD 等神经退行性疾病发病的关键, 其临床治疗药物品种少、疗效有限, 常用多奈哌齐等药物抗炎而发挥作用。天然药物中提取的有效成分具有多靶点、多途径、副作用小等优点, 当归、五味子等提取物能抑制神经元细胞分泌  $A\beta$ , 当归根提取物甚至能够逆转记忆和行为障碍, 千斤拔等植物中提取的染料木素同样显示出良好的抗氧化和抗炎活性。衰

老可显著提高 NgR 水平从而降低机体 A $\beta$  的清除能力, 提示 NgR 受体有可能成为治疗 AD 的潜在靶点<sup>[15]</sup>。Nogo 与小胶质细胞上的 NgR 受体结合后通过阻断 Nogo/NgR 信号通路改善神经炎症, 可减轻 A $\beta$  形成的斑块, 在 AD 发病过程中发挥重要作用。研究表明 NgR siRNA 沉默基因转染后, NgR 蛋白表达下调, 可减少促炎介质的释放。本实验结果表明 NgR mRNA 在单独 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用下的表达水平高于对照组, 显著抑制了 PC12 细胞的生长。染料木素预保护 PC12 细胞时, 与模型组相比 NgR mRNA 的表达量有所降低, 染料木素可能通过 Nogo/NgR 信号通路减轻 PC12 神经细胞的炎症反应, 发挥抗炎作用。

### 3 结论

综上所述, 双氧水建立 PC12 细胞神经细胞炎症模型造模成功, PC12 炎症细胞模型 NgR mRNA 的表达水平显著上调。预先给予染料木素进行干预可以有效逆转双氧水对 PC12 细胞损伤引起的 NgR mRNA 表达上调而发挥对神经细胞炎症的保护作用。本实验结果为千斤拔的抗神经细胞炎症治疗提供了一定的实验依据。

### 参考文献

- [1] 王雪,代朝,方坚松.刺五加防治神经退行性疾病的药理研究进展[J].中国中药杂志,2022,10(05),1-9.
- [2] 肖飞. Nogo-66 受体作为阿尔茨海默病药物治疗新靶标的研究[D].广州:暨南大学,2010.
- [3] 孔繁格.连翘酯苷 B 对阿尔兹海默症的保护作用及其相关机制研究[D].长春:吉林大学,2020.
- [4] ZHOU R, JI B,KONG Y, et al. PET imaging of neuroinflammation in Alzheimer's Disease[J]. Front Immunol, 2021;12:739130.
- [5] ALREHAILI AA, LEE JY, BAKHURAYSAH MM, et al. Nogo receptor expression in microglia/macrophages during experimental autoimmune encephalomyelitis progression[J]. Neural Regen Res, 2018,13(5): 896-907.
- [6] 刘百峰,王晓芳,徐行,等.NgR 特异性 siRNA 筛选及其慢病毒表达载体构建[J].中国伤残医学, 2013,21(07):99-101.
- [7] 崔佳莹,许峰巍,彭莹莹,等.染料木黄酮抗肿瘤作用研究进展[J].药物评价研究,2018,41(12): 2369-2375.
- [8] 黄河,管家宁,冯爱露,等.染料木素对阿霉素诱导心脏毒性保护作用的初步研究[J].徐州医科大学学报,2021,41(12):859-864.
- [9] 朱卫丰,李佳莉,孟晓伟,等.葛属植物的化学成分及药理活性研究进展[J].中国中药杂志,2021, 46(06):1311-1331.
- [10] 徐梦蕾.大豆异黄酮对甲萘威诱导损伤的 PC12 细胞的保护作用[D].长春:吉林大学,2016.
- [11] HONG H, LIU GQ. Protection against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in PC12 cells by scutellarin[J]. Life Sci, 2004,74(24):2959-2973.

**版权声明:** ©2022 作者与开放获取期刊研究中心(OAJRC)所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。  
<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



**OPEN ACCESS**