

## ·基础研究·

本文引用:刘晓丹,成绍武,范婧莹,宋祯彦,李平,邓常清.人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HT22 细胞凋亡及胞内 Ca<sup>2+</sup>变化的影响[J].湖南中医药大学学报,2017,37(3):236-239.

## 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HT22 细胞凋亡及胞内 Ca<sup>2+</sup>变化的影响

刘晓丹<sup>1</sup>,成绍武<sup>1</sup>,范婧莹<sup>2</sup>,宋祯彦<sup>1</sup>,李平<sup>1</sup>,邓常清<sup>3\*</sup>

(1.湖南中医药大学 中西医结合心脑血管疾病防治湖南省重点实验室;2.湖南中医药大学 中西医结合学院,  
3.湖南中医药大学 医学院,湖南 长沙 410218)

**[摘要]** 目的 研究人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HT22 细胞凋亡及胞内 Ca<sup>2+</sup>浓度变化的影响。方法 以 0、6.25、12.5、25、50、100 μg/L 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 预处理细胞 24 h, 采用 Ca<sup>2+</sup>荧光染料探针 Fluo-3/AM 负载细胞 1 h 后, 50 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激细胞, 多功能酶标仪测定荧光强度, 激光共聚焦显微镜实时监测 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 变化, Hoechst 33258 染色检测细胞凋亡。结果 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可诱导细胞内 Ca<sup>2+</sup>浓度增加 (P<0.01), 并增加细胞凋亡率 (P<0.01)。不同浓度人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 可呈剂量依赖性的抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HT22 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 增加 (P<0.01), 抑制细胞凋亡 (P<0.01), 以 50 μg/L 的作用为最强 (P<0.01)。结论 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 可通过降低 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HT22 细胞内 Ca<sup>2+</sup>水平的升高, 抑制氧化应激引起的细胞凋亡。

**[关键词]** 人参皂苷 Rg<sub>1</sub>; HT22 细胞; 细胞凋亡; Ca<sup>2+</sup>浓度

**[中图分类号]** R285.5

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.03.002

### Effect of Ginsenoside Rg<sub>1</sub> on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Induced Apoptosis and Intracellular Ca<sup>2+</sup> Concentration in HT22 Cells

LIU Xiaodan<sup>1</sup>, CHENG Shaowu<sup>1</sup>, FAN Jingying<sup>2</sup>, SONG Zhenyan<sup>1</sup>, LI Ping<sup>1</sup>, DENG Changqing<sup>3\*</sup>

(1. Key Laboratory of Hunan Province of Rebrovascular Disease Prevention and Treatment of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. College of Integrated of Traditional Chinese and Western Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China;  
3. Medical School, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of ginsenoside Rg<sub>1</sub> on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced apoptosis and intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in HT22 cells. **Methods** Ginsenoside Rg<sub>1</sub> with 0, 6.25, 12.5, 25, 50 and 100 μg/L were used to pre-processing HT22 cells for 24 h, separately. Ca<sup>2+</sup> fluorescent probe Fluo-3/AM was used to load cells for 1h. Then using 50 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulate cells. The fluorescence intensity was measured for microplate reader, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> changes were monitored by scanning confocal microscopy. Apoptosis were tested by Hoechst 33258 staining. **Results** The Ca<sup>2+</sup> concentration (P<0.01) and apoptosis (P<0.01) induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> increased significantly. Different concentrations of ginsenoside Rg<sub>1</sub> showed dose dependent inhibition in increasing the HT22 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (P<0.01) and apoptosis (P<0.01) induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and the concentration of 50 μg / L shows strongest effect (P<0.01). **Conclusion** The ginsenoside Rg<sub>1</sub> could inhibit apoptosis of oxidative apoptosis by reducing the cellular Ca<sup>2+</sup> level induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**[Keywords]** ginsenoside Rg<sub>1</sub>; HT22 cell; apoptosis; Ca<sup>2+</sup> concentration

**[收稿日期]** 2016-08-30

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目 (81473581), 湖南省教育厅项目 (14C0859), 中西医结合防治心脑血管疾病的相关基础研究湖南省高校科技创新团队项目 (2015CXTD), 中西医结合基础湖南省重点学科开放基金项目。

**[作者简介]** 刘晓丹, 女, 硕士, 实验师, 研究方向: 心脑血管疾病中西医结合防治研究。

**[通讯作者]** \* 邓常清, 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, E-mail: dchangq@sohu.com。

脑缺血发病率高、死亡率高、致残率高,严重威胁人类健康,且病理生理机制复杂,目前仍未完全清楚。近年来的脑缺血损伤的病理生理机制研究表明,神经细胞的胞外 Ca<sup>2+</sup>内流增加可引发细胞变性,最后导致死亡;兴奋性氨基酸及多种神经毒素引起神经细胞变性死亡,总是伴随胞浆 Ca<sup>2+</sup>超负荷现象,故认为细胞 Ca<sup>2+</sup>信号转导异常是神经元变性的“最后共同通道”<sup>[1]</sup>。

人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 是人参、三七的主要有效成分,对心血管、中枢神经系统均有较强的保护作用,有研究发现<sup>[2-6]</sup>,人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 能够减轻脑缺血再灌注损伤,其机制可能与抑制神经细胞凋亡、抗氧化损伤等有关。本研究通过采取 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HT22 细胞损伤模型,观察人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 预处理对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HT22 细胞凋亡的影响,并通过分析细胞内[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 的变化,探索人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 抗 HT22 细胞凋亡的作用及与[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 的关系,为人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 在脑缺血的治疗应用上提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 药物与试剂 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> (批号: MUST-16022407), 购自成都曼思特生物科技有限公司, 纯度 ≥98%; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (美国 sigma 公司), Fluo-3/AM ((美国 sigma 公司), α-MEM 培养基、胎牛血清、青链霉素溶液、PBS 缓冲液、改良台式液均购自 GIBCO 公司。

1.1.2 细胞 HT22 细胞, 小鼠海马神经元细胞系, 低分化, 购自中南大学湘雅医学院。

1.1.3 主要仪器 激光共聚焦显微镜 (日本尼康, 型号: A1+), 多功能酶标仪 (德国 BIOTEC, 型号: CYTATION3), 超净工作台 (苏州, 型号: 8WJ-2F0), 倒置显微镜 (重庆, 型号: XDS-1B), 二氧化碳培养箱 (德国贺利氏, 型号: Heracell)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 HT22 细胞培养 采用含 10% 胎牛血清, 1% 青链霉素溶液的 α-MEM 培养基, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 浓度及饱和湿度下的培养箱中培养, 每天换液, 待单层细胞生长至 80%~90% 融合后传代培养, 所有实验采用对数生长期细胞。

1.2.2 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 最适浓度摸索 细胞共分为 7 组, 正常组 (α-MEM 无血清培养基常规培养)、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组 (加入 50 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激细胞)、不同浓度人参皂苷 Rg<sub>1</sub> (6.25、12.5、25、50、100 μg/L) 组。细胞加入不同浓度人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 处理 24 h 后, 弃去培养基, 用台式液洗涤 2 次, 加入 Fluo-3/AM 工作液 (荧光探针 Fluo-3/AM 在负载细胞时用台式液配制成终浓度为 5 μmol/L 的工作液), 37 °C 避光培养 1 h, 弃去荧光探针, 用台式液洗涤 2 次, 加入含终浓度为 50 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的台式液继续孵育 1 h。在多功能酶标仪下, 选择激发波长 488 nm 进行扫描, 读取荧光强度值。

1.2.3 激光共聚焦显微镜检测细胞内钙离子浓度 细胞分为 3 组, 正常组 (α-MEM 无血清培养基常规培养)、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组及人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 组 (加入上述实验摸索的人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 最适浓度) 培养 24 h。Fluo-3/AM 负载 1 h 后, 弃去荧光探针, 用台式液洗涤 2 次, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组和人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 组加入含终浓度为 50 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的台式液, 在激光共聚焦显微镜下观察选择贴壁良好、形态伸展、荧光强度较亮的细胞, 设置扫描条件为 488 nm 波长激发、20% 激光强度, 同时采集 DIC 图像, 每 3 分钟采集 1 张, 连续扫描 1 h, 动态观察荧光强度变化情况。选取第 1 张图片, 15、30 min 和 1 h 4 张图片利用 Image J 统计软件进行平均荧光强度分析。

1.2.4 Hoechst 33258 染色检测细胞凋亡 细胞分组及处理同上, 处理完成后, 用 PBS 漂洗细胞 2 次, 加入新鲜配置的 4% 多聚甲醛, 4 °C 固定 15 min; PBS 洗 2 次后, 加入终浓度为 5 mg/L 的 Hoechst 33258 室温下作用 5 min。在倒置荧光显微镜下观察, 随机选取 5 个 200× 镜下视野, 计算凋亡细胞百分率。

### 1.3 统计学方法

所有数据均采用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示, 采用 SPSS 17.0 统计软件进行正态性分析和方差齐性检验, 多组间均数比较用单因素方差分析, 组间两两比较方差齐者用 LSD 检验, 方差不齐者用 Dunnett's T3 法检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义,  $P < 0.01$  为差异有显著统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同浓度人参皂苷 R<sub>g1</sub> 对细胞内 Ca<sup>2+</sup>浓度的影响

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激后, 荧光强度显著增高( $P<0.01$ ), 提示细胞内 Ca<sup>2+</sup>浓度水平显著增加。人参皂苷 R<sub>g1</sub> 不同浓度组均能够显著抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤后细胞荧光强度的增高( $P<0.05$ – $P<0.01$ ), 其中以 50 μg/L 浓度最为明显(见表 1)。故在下面的实验中选择 50 μg/L 浓度的人参皂苷 R<sub>g1</sub> 进行实验。

表 1 不同浓度人参皂苷 R<sub>g1</sub> 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HT22 细胞内 Ca<sup>2+</sup> 的荧光强度值影响 ( $n=5, \bar{x} \pm s$ )

组别	荧光强度值
正常组	7 814.6±430.62
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 损伤组	45 496±156 5.1**
6.25 μg/L 浓度组	37 584±154 5.7 <sup>△</sup>
12.5 μg/L 浓度组	29 211±281 3.6 <sup>△</sup>
25 μg/L 浓度组	26 341±457.17 <sup>△△</sup>
50 μg/L 浓度组	16 015±108 8.3 <sup>△△</sup>
100 μg/L 浓度组	17 318±351.45 <sup>△△</sup>
<i>F</i>	23.268
<i>P</i>	0.019

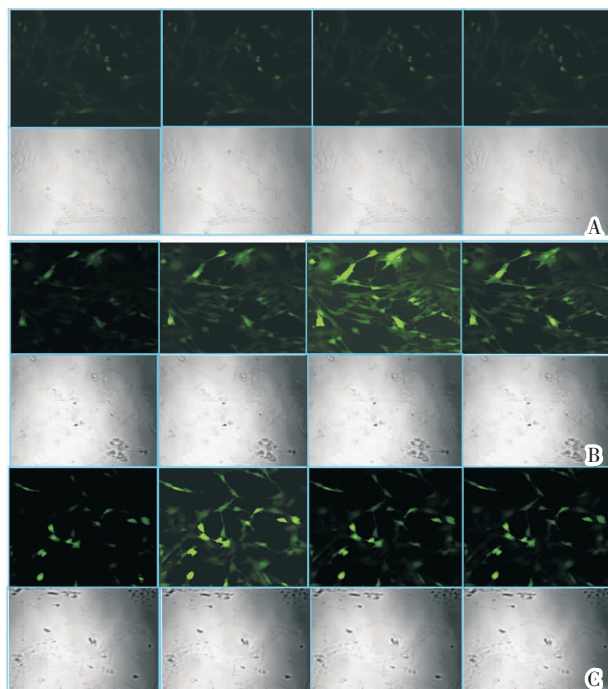
注: 与正常组比较 \*\* $P<0.05$ , 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组比较  $\Delta P<0.05$ ,  $\Delta\Delta P<0.01$ 。

### 2.2 激光共聚焦显微镜实时监测人参皂苷 R<sub>g1</sub> 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HT22 细胞内钙离子荧光强度动态变化

正常细胞胞浆内钙离子浓度较低, 在 488 nm 激发光激发下发出较弱的绿色荧光, 且随着时间的延长, 荧光强度无变化(0、15、30 min 和 1 h)4 个时间点荧光强度分别为 70.61、71.12、71.13、71.21); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激后, 细胞胞浆内钙离子浓度迅速增高, 荧光强度显著增高, 在 30 min 达到峰值(0、15、30 min 和 1 h 4 个时间点荧光强度分别为 90.12、126.45、150.22、136.8)( $P<0.05$ – $P<0.01$ ), 50 μg/L 浓度的人参皂苷 R<sub>g1</sub> 能够有效抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤后细胞荧光强度的增高(0、15、30 min 和 1 h 4 个时间点荧光强度分别为 94、125.6、102、98.3)( $P<0.05$ ), 见图 1。

### 2.3 人参皂苷 R<sub>g1</sub> 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HT22 细胞凋亡的影响

Hoechst 33258 染色结果显示, 正常组细胞呈现弥漫均匀的低荧光强度, 未见凋亡细胞。经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激后, 细胞呈现明显的凋亡特征, 表现为细胞核浓缩、破裂, 与正常组比较, 细胞凋亡率显著升高, 达



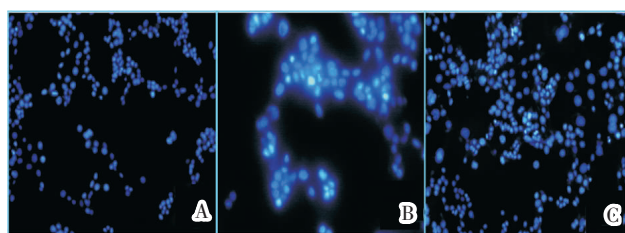
A. 正常组; B. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组; C. 人参皂苷 R<sub>g1</sub> 组

从左至右分别为 0、15、30 min 和 1 h

(上为 488 nm 波长激光下的荧光图片, 下为 DIC 视野图片)

图 1 激光共聚焦显微镜实时监测不同时间点人参皂苷 R<sub>g1</sub> 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HT22 细胞 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 变化的影响 (×200)

(50.12±1.4)% ( $P<0.01$ ), 人参皂苷 R<sub>g1</sub> 能够有效地抑制细胞凋亡, 使凋亡细胞显著减少, 细胞凋亡率为 (22.04±2.8)% ( $P<0.01$ ), 见图 2。



A. 正常组; B. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组; C. 人参皂苷 R<sub>g1</sub> 组

图 2 Hoechst 33258 染色检测人参皂苷 R<sub>g1</sub> 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HT22 细胞凋亡(倒置荧光显微镜×200)

## 3 讨论

脑缺血损伤机制复杂未明, 脑缺血时神经元损伤因素包括兴奋性氨基酸释放过多、自由基产生增加以及能量代谢障碍等, 大多都伴有胞浆内 Ca<sup>2+</sup>浓度升高。现代研究发现<sup>[7]</sup>, Ca<sup>2+</sup>超载可触发一系列下游反应, 包括胱天蛋白酶的激活、ATP 合成障碍、钙依赖性蛋白酶和核酸内切酶的激活等, 而这些事件最终导致神经元的损伤和死亡, 细胞内 Ca<sup>2+</sup>超载是缺血性神经元损伤的共同通路。本研究发现,

HT22 细胞损伤后,细胞内 Ca<sup>2+</sup>浓度明显增高,且随着钙离子浓度的增高,细胞凋亡率越高,表明钙超载可能是引起神经元死亡和损伤的重要途径。这与以往的研究相符<sup>[8-9]</sup>。

人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 是存在于人参、三七的主要活性成分,现代药理研究发现,人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 具有较强的抗疲劳、抗衰老、抗肿瘤、提高免疫力等药理作用。近年来,人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 对心血管和中枢神经系统的保护作用,越来越受到国内外学者的关注。大量动物实验和体外细胞实验表明<sup>[10-13]</sup>,人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 能通过抑制神经元凋亡,减少谷氨酸释放,抗炎反应、清除自由基、促进神经元修复和再生等机制改善脑缺血再灌注损伤。本研究通过 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 建立 HT22 细胞氧化损伤模型,研究人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 能否抑制钙超载,抑制氧化应激引起的神经细胞凋亡,从而减轻脑缺血损伤。研究表明,人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 可成剂量依赖性的减轻氧化应激引起的神经细胞凋亡,其机制与抑制钙超载有关。

Fluo3-AM 为一种脂溶性染料,自身不与 Ca<sup>2+</sup>结合,在细胞内经脂解脱去脂基后生成游离 Fluo3,后者是一敏感性钙指示剂,与游离的 Ca<sup>2+</sup>特异性结合,并在一定波长激发后产生荧光,其荧光强度与 Ca<sup>2+</sup>浓度成正比,因而荧光值可反应 Ca<sup>2+</sup>浓度的变化情况。

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 是一类 ROS,它不仅能直接氧化细胞膜上的脂质及蛋白,而且能自由穿过细胞膜和细胞内铁离子反应生成·OH 等活性更强的自由基,导致系列反应。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 具有获得容易、性质稳定和操作简单等特点,因此目前 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 是各类细胞氧化损伤模型中应用最为广泛的应激源之一<sup>[14]</sup>,因此本项目用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤细胞来建立 HT22 细胞氧化损伤模型是可行的。

#### 参考文献:

[1] Matsude T, Arakawa N, Takuma K, et al. SEA0400, a novel

and selective inhibitor of the Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger attenuates reperfusion injury in the vitro and in vivo cerebral ischemic models [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 298(1): 249-256.

- [2] 吴露,黄小平,邓常清,等.人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 对小鼠脑缺血再灌注后脑组织损伤及 Nrf2/HO-1 途径的影响[J].*中国病理生理杂志*,2013,29(11):2066-2071.
- [3] 刘晓丹,邓常青.黄芪甲苷和三七总皂苷中有效成分抗 PC12 细胞氧化损伤的配伍研究[J].*湖南中医药大学学报*,2012,32(1):8-12.
- [4] 于利,刘霞,包翠芬,等.人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 对脑缺血再灌注大鼠大脑细胞死亡方式的影响[J].*中国临床解剖学杂志*,2013,31(5):555-559.
- [5] 陈彦,吴鸿浩,何斌,等.人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 对大鼠海马神经元缺糖氧/复糖氧后钙内流的影响[J].*中国急救医学*,2012,32(11):1001-1004.
- [6] 屈惠莹,袁静,包翠芬,等.人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 对脑缺血再灌注大鼠 nNOS、iNOS 表达的影响[J].*天津医药*,2014,12(9):889-892,893.
- [7] Szydłowska K, Fymianski M. Calcimn, ischemia and excitotoxicity[J]. *Cell*, 2010, 47(2): 122-129.
- [8] 李燕华,李瑶宣.脑缺血大鼠水通道蛋白-9 mRNA 表达与钙离子浓度的改变及其关系[J].*《临床神经病学杂志》*,2008,21(2):129-132.
- [9] 石咏梅.脑缺血/再灌注神经钙离子通道的研究进展[J].*医学综述*,2014,20(14):2507-2509.
- [10] 于利,刘霞,包翠芬,等.人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 对脑缺血再灌注大鼠大脑细胞死亡方式的影响[J].*中国临床解剖学杂志*,2013,31(5):555-559.
- [11] Xie CL, Li JH, Wang WW, et al. Neuroprotective effect of ginsenoside -Rg1 on cerebral ischemia/reperfusion injury in rats by downregulating protease-activated receptor-1 expression[J]. *Life Sci*. 2014, 121(2015):145-151.
- [12] 邹晓莉,杜继卫.人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 对局灶性脑缺血大鼠 iNOS 和 eNOS 表达的影响[J].*山东医药*,2012,52(13):44-45.
- [13] 黄小平,卢金冬,丁焯,等.黄芪和三七的主要有效成分配伍对脑缺血/再灌注小鼠 NF-κB 信号通路及炎症因子表达的影响[J].*中国药理学通报*,2015(1):141-146.
- [14] 张斌,夏作理,赵晓民,等.氧化应激模型的建立及其评价[J].*中国临床康复*,2006,10(44):112-114.

(本文编辑 杨 瑛)