

原花青素 B2 对 H₂O₂ 诱导的星形胶质细胞氧化损伤和凋亡的保护作用及机制研究

苑舒文¹, 董艺薇¹, 刘健¹, 梁亚杰¹, 黄建军², 肖保国³, 王青^{1*}, 马存根^{1*} (1.山西中医药大学国家中医药管理局多发性硬化益气活血重点研究室, 神经生物学研究中心, 山西 晋中 030619; 2.山西省卫健委神经疾病防治研究重点实验室/国药同煤总医院神经外科, 山西 大同 037003; 3.复旦大学附属华山医院神经内科, 医学神经生物学国家重点实验室, 上海 200025)

摘要: **目的** 探讨原花青素 B2(proanthocyanidin B2, PC-B2) 对过氧化氢 (H₂O₂) 诱导的小鼠星形胶质细胞 (astrocytes, AS) 氧化损伤和凋亡的保护作用及其机制。**方法** 利用 C57BL/6 新生小鼠 (1~3 d) 分离、培养 AS, 通过筛选的 H₂O₂ 和 PC-B2 最佳作用浓度分为正常组、正常+PC-B2 组 (100 μg·mL⁻¹ PC-B2 处理 24 h)、H₂O₂ 模型组 (200 μmol·L⁻¹ H₂O₂ 处理 24 h)、PC-B2 组 (200 μmol·L⁻¹ H₂O₂ 与 100 μg·mL⁻¹ PC-B2 共同处理 24 h); CCK-8 法检测各组细胞存活率, LDH 法进行细胞毒性检测; ABTS 和 DPPH 法检测 PC-B2 的抗氧化能力; ELISA 试剂盒检测各组细胞中 MDA 含量以及 SOD、CAT 和 GSH-Px 活力; TUNEL 染色法检测各组细胞凋亡情况; RT-PCR 和 Western blotting 分别检测 AS 中 Bax、Bcl-2、Caspase-3、Akt/Stat3、p-Akt、p-Stat3、Nrf2/HO-1 的 mRNA 和蛋白表达水平。**结果** PC-B2 能够明显增强细胞活力, 抑制 AS 凋亡。并且与 H₂O₂ 模型组相比, PC-B2 干预能够显著降低 AS 中 LDH、MDA 含量, 提高 SOD、CAT 和 GSH-Px 活力, 抑制 Bax、Caspase-3 的 mRNA 和蛋白表达, 上调 Akt/Stat3、Bcl-2、Nrf2/HO-1 的 mRNA 和蛋白表达。**结论** PC-B2 能够通过 Akt/Stat3 和 Nrf2/HO-1 途径增强 AS 抗氧化能力, 减轻 H₂O₂ 诱导的 AS 氧化损伤和凋亡。

关键词: 原花青素 B2; 星形胶质细胞; H₂O₂; 氧化损伤; 细胞凋亡; Akt/Stat3; Nrf2/HO-1

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2024)06-0727-09

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20230642

引用本文: 苑舒文, 董艺薇, 刘健, 等. 原花青素 B2 对 H₂O₂ 诱导的星形胶质细胞氧化损伤和凋亡的保护作用及机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2024, 41(6): 727-735.

Protective Effect and Mechanism of Proanthocyanidin B2 Against H₂O₂-induced Oxidative Damage and Apoptosis of Astrocytes

YUAN Shuwen¹, DONG Yiwei¹, LIU Jian¹, LIANG Yajie¹, HUANG Jianjun², XIAO Baoguo³, WANG Qing^{1*}, MA Cungen^{1*} (1.The Key Research Laboratory of Benefiting Qi for Acting Blood Circulation Method to Treat Multiple Sclerosis of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Research Center of Neurobiology, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China; 2.The Key Laboratory of Prevention and Treatment of Neurological Disease of Shanxi Provincial Health Commission/Department of Neurosurgery, Sinopharm Tongmei General Hospital, Datong 037003, China; 3.State Key Laboratory of Neurobiology, Department of Neurology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200025, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the protective effect proanthocyanidin B2(PC-B2) on oxidative damage and apoptosis of mouse astrocytes(AS) induced by hydrogen peroxide(H₂O₂) and its mechanism. **METHODS** AS were isolated and cultured from neonatal C57BL/6 mice(1~3 d). The optimal concentration of H₂O₂ and PC-B2 was divided into four groups: normal group, normal+PC-B2 group(100 μg·mL⁻¹ PC-B2 treated for 24 h), H₂O₂ model group(200 μmol·L⁻¹ H₂O₂ treated for 24 h), PC-B2 group(200 μmol·L⁻¹ H₂O₂ and 100 μg·mL⁻¹ PC-B2 treated for 24 h). The cell viability of each group was detected by CCK-8 method. Cytotoxicity was detected by LDH method. The antioxidant capacity was detected by ABTS and DPPH. The content of MDA and the activity of SOD, CAT and GSH-Px were detected by ELISA kit. Detection of apoptosis in each group was done by TUNEL staining. The mRNA and protein expression levels of Bax, Bcl-2, Caspase-3, Akt/Stat3, p-Akt, p-Stat3 and Nrf2/HO-1 in

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (81903596); 山西省归国留学人员科研项目 (2022-165); 山西中医药大学科技创新团队 (2022TD2006); 山西中医药大学研究生创新创业项目 (2021CX009, 2022CX018)

作者简介: 苑舒文, 男, 硕士生 E-mail: 973460042@qq.com *通信作者: 王青, 女, 博士, 副教授, 硕士 E-mail: 4024771456@163.com 马存根, 男, 博士, 二级教授, 博导 E-mail: macungen@sxtcm.edu.cn

AS were detected by RT-PCR and Western blotting, respectively. **RESULTS** PC-B2 could significantly enhance cell viability and inhibit AS apoptosis. Compared with the H_2O_2 model group, PC-B2 intervention could significantly reduce the content of LDH and MDA in AS, and increase the activity of SOD, CAT and GSH-Px. PC-B2 intervention could inhibit the mRNA and protein expression of Bax and Caspase-3, and up-regulate the mRNA and protein expression of Akt/Stat3, Bcl-2, Nrf2/HO-1. **CONCLUSION** PC-B2 can enhance the antioxidant capacity of AS through Akt/Stat3 and Nrf2/HO-1 pathways, therefore reduce H_2O_2 -induced AS oxidative damage and apoptosis.

KEYWORDS: proanthocyanidin B2; astrocytes; H_2O_2 ; oxidative damage; cell apoptosis; Akt/Stat3; Nrf2/HO-1

中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 在人体保持高水平的新陈代谢, 导致大量自由基的产生, 如活性氧 (reactive oxygen species, ROS)。当自由基的产生超过 CNS 的抗氧化能力时, 就会发生氧化应激^[1]。氧化应激被认为是各种 CNS 退行性疾病的重要调节因素, 包括阿尔茨海默病、帕金森病和亨廷顿病等^[2]。相关研究发现, 氧化应激诱导的 ROS 增加与神经元斑块、 α -突触核蛋白和突变亨廷顿蛋白的形成密切相关。其中在阿尔茨海默病中, 错误折叠的 Tau 蛋白和 β -淀粉样蛋白的积累能够介导 ROS 的产生, 诱导脂质过氧化, 从而导致膜通透性受损, 显著改变神经传递和认知功能^[3]。

星形胶质细胞 (astrocytes, AS) 是 CNS 中的关键稳态细胞, 在维持 CNS 正常生理功能方面起着至关重要的作用, 例如为神经元提供营养以及突触传递、离子稳态和自由基清除等方面^[4]。在大脑中, 一方面, 氧化应激会诱导“反应性星形胶质细胞病”, 导致 AS 异常活化和增殖, 释放多种有害细胞因子, 加重 CNS 退行性疾病的进程; 另一方面, AS 中的抗氧化体系能够促进 CNS 中自由基的清除, 保护 CNS 免受氧化应激损伤^[5]。因此, 如何保护 AS 免受氧化应激的损害, 正成为治疗 CNS 退行性疾病的重要靶点。

原花青素 B2(proanthocyanidin B2, PC-B2) 是类黄酮家族的一员, 广泛存在于植物和食品中, PC-B2 已经被证实具有抗氧化和抗凋亡等多种生物活性, 并且它还在肿瘤和神经退行性疾病中显示出治疗功效^[6]。在先前的研究中, Zhou 等^[7]发现 PC-B2 能够通过调控 Akt/Nrf2/HO-1 信号传导途径来改善神经元受到的氧化损伤。但是目前还没有调查研究表明 PC-B2 是否对原代 AS 受到的氧化损伤具有保护作用。因此, 本研究通过 H_2O_2 诱导 AS 氧化损伤作为体外模型, 旨在探究 PC-B2 对氧化应激导致的 AS 损伤的保护作用及其可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物与试剂 SPF 级新生 1~3 d C57BL/6 小鼠, 购买于山西医科大学迎泽校区实验动物中心, 动物生产许可证号: SCXK(晋)2019-004。所有操作均符合医学伦理学要求和原则。

PC-B2(成都瑞芬斯生物科技有限公司, 货号: RFS-Y07902105024; HPLC $\geq$ 98%); 高糖 DMEM 培养基 (货号: 11995040)、青链霉素双抗 (货号: 15070063) 均购自 Gibco; CCK-8(货号: C0037)、TUNEL 试剂盒 (货号: C1086) 均购自上海碧云天公司; 乳酸脱氢酶试剂盒 (lactate dehydrogenase, LDH, Solarbio, 货号: BC0685); H_2O_2 (南京化学试剂, 货号: C0404510123); 丙二醛 (malondialdehyde, MDA, 货号: A007-1-1) 试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px, 货号: A005-1-2) 试剂盒、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD, 货号: A003-4-1) 试剂盒、过氧化氢酶 (catalase, CAT, 货号: A001-3-2) 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所; B 淋巴细胞瘤-2 基因 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2, 货号: 50599)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax, 货号: 68103) 均购自武汉三鹰生物技术有限公司; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cysteiny aspartate specific proteinase-3, Caspase-3)、蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)、p-Akt 抗体均购自英国 Abcam 公司, 货号分别为 ab184787, ab8805, ab38449; 核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid2-related factor 2, Nrf2)、血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)、信号转导和转录激活因子 3(signal transducer and activator of transcription 3, Stat3)、p-Stat3 抗体、胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 均购自 Cell Signaling Technology 公司, 货号分别为 12721, 26416, 9139, 9145, 56522。

1.1.2 仪器 DM4000B 荧光显微镜 (德国 Leica); Forma Series 2 Water Jacket CO₂ 细胞培养箱、Varioskan LUX 酶标仪、Megafuge 8R 4 °C 离心机 (美国 Thermo Fisher Scientific, 离心半径 10 cm); JB-13 加热磁力搅拌器 (上海仪电科学仪器股份有限公司); Mini-Protean Tetra Cell 蛋白电泳仪、Power Pac Universal 电转仪、CFX96 Optics Module 荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad); Azure c300 增强型化学发光 (ECL) 系统 (美国 Azure biosystems)。

1.2 方法

1.2.1 原代 AS 的提取及传代培养 将 C57BL/6 新生鼠 (1~3 d) 放入 75% 的乙醇溶液中麻醉消毒 3~5 min, 移入超净工作台, 用眼科剪于“人”字缝处剪开后分离脑组织并置于预冷的高糖 DMEM 中, 用眼科剪将组织剪成 1 mm³ 左右的碎块, 再加入 0.25% 胰蛋白酶于 37 °C CO₂ 恒温培养箱中消化 15 min, 加入完全培养基 (含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基) 终止消化并充分混匀, 以 1 500 r·min⁻¹ 离心 5 min 弃去上清, 加入完全培养基重悬细胞后用 40 μm 细胞筛过滤分离为单细胞悬液, 以 2×10⁵·mL⁻¹ 接种于提前被 L-多聚赖氨酸包被的 T175 培养瓶中, 将培养瓶放置于 37 °C CO₂ 恒温培养箱, 每 3 d 更换 1 次培养液。7~8 d 细胞长满后进行传代, 将培养瓶上清弃掉并加入 0.25% 胰蛋白酶消化 3~5 min, 加入完全培养基终止消化, 以 1 000 r·min⁻¹ 离心 5~10 min, 弃去上清并加入完全培养基充分混匀重悬细胞, 以 2×10⁵·mL⁻¹ 接种于提前被 L-多聚赖氨酸包被的 T 75 培养瓶中, 置于 37 °C CO₂ 恒温培养箱稳定贴壁 1 d, 放于摇床以 200 r·min⁻¹ 摇晃 3~4 h 后弃掉上清液 (去除小胶质细胞和少突胶质细胞) 重新加入完全培养液, 继续放置于 37 °C CO₂ 恒温培养箱中培养, 用于后续相关实验。

1.2.2 LDH、CCK-8 和氧自由基清除实验筛选 H₂O₂ 和 PC-B2 最佳作用浓度 取对数生长期的 AS 接种于多个 96 孔板中, 进行以下实验: ①分别使用 0, 12.5, 25, 50, 100, 200, 300, 400 μmol·L⁻¹ 的 H₂O₂ 培养孵育 24 h。将 96 孔板以 900 r·min⁻¹ 离心 5 min, 收集细胞上清, 采用 LDH 法进行细胞毒性检测; 选取同批 96 孔板, 每孔加入 10 μL CCK-8 溶液继续培养孵育 1~4 h, 酶标仪中设置 450 nm 测定值, 计算细胞存活率。根

据 LDH 和 CCK-8 实验结果筛选 H₂O₂ 最佳作用浓度。②分别使用 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150, 200 μg·mL⁻¹ 的 PC-B2 培养孵育 24 h。LDH 法和 CCK-8 法同上, 根据实验结果筛选 PC-B2 作用于 AS 的无毒剂量。③分别使用含 5, 10, 20, 50, 100 μg·mL⁻¹ 的 PC-B2 联合 200 μmol·L⁻¹ 的 H₂O₂ 共同处理 AS 24 h, LDH 检测细胞毒性, CCK-8 法检测细胞存活率, DPPH 和 ABTS 检测 PC-B2 的抗氧化能力, 确定 PC-B2 保护 H₂O₂ 诱导的 AS 损伤的最佳作用浓度。

1.2.3 细胞造模及分组 根据筛选的 H₂O₂ 和 PC-B2 最佳作用浓度处理 AS, 采用随机数字表法将 AS 分为 4 组: 正常组、正常+PC-B2 组 (100 μg·mL⁻¹ PC-B2 处理)、H₂O₂ 模型组 (200 μmol·L⁻¹ H₂O₂ 处理)、PC-B2 组 (200 μmol·L⁻¹ H₂O₂ 与 100 μg·mL⁻¹ PC-B2 共同处理), 在 37 °C CO₂ 恒温培养箱中培养 24 h 后, 收集上清和 AS 进行后续相关实验。

1.2.4 TUNEL 染色检测细胞凋亡率 将 AS 悬液接种于 24 孔板 (爬片提前放入) 中放入 37 °C CO₂ 恒温培养箱中培养, 待细胞贴壁后按筛选剂量分组加药并继续培养 24 h, 取出细胞爬片于室温晾干固定 15 min; PBS 冲洗 3 次; 在每个样本中加入 50~100 μL 的 TUNEL 工作溶液, 置于 37 °C 恒温孵箱中孵育 60 min, PBS 冲洗 3 次, 每个样本中加入 100 μL 的 DAPI 对细胞核染色 5~10 min, PBS 冲洗 3 次。滤纸吸干爬片周围 PBS 后用抗荧光淬灭封片液封片, 置于荧光显微镜下观察。

1.2.5 ELISA 检测 MDA 含量和 SOD、CAT、GSH-Px 活力 各组 AS 加药培养 24 h 后, 弃去上清, PBS 冲洗 3 次, 加入适量 0.25% 胰蛋白酶消化吹打收集各组细胞, 于 1 200 r·min⁻¹ 离心 5 min 后弃去上清液, 向细胞沉淀中加入 RIPA 裂解液和蛋白酶抑制剂于冰上裂解 15 min, 超声 10~15 s, 之后于 12 000 r·min⁻¹ 低温离心 10 min 后取上清, 按照 ELISA 试剂盒说明书测定 MDA 含量和 SOD、CAT、GSH-Px 活力。

1.2.6 RT-PCR 检测细胞相应 mRNA 的表达水平 将各组 AS 细胞加药培养 24 h 后, 提取细胞总 RNA, 紫外分光光度计检测 RNA 浓度。根据 TaKaRa 逆转录试剂盒说明书, 将提取后的总 RNA 统一浓度后逆转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板, 选用 β-actin 作为内参, 按照 2×M5 HiPer

SYBR Premix EsTaq 试剂盒说明进行 RT-PCR 扩增反应, 通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因相对表达量。引物序列由上海擎科生物科技有限公司合成, RT-PCR 引物设计序列参见表 1。

表 1 引物序列
Tab. 1 Primers for RT-PCR

基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
Bax	CCCAGAGGTCTTTTCC GAG	CCAGCCCATGATGGTTCT GAT
Bcl-2	GGTGGGGTCATGTGTGTG G	CGGTCAGGTACTCAGTC ATCC
Caspase-3	CATGGAAGCGAATCAAT GGACT	CTGTACCAGACCGAGAT GTCA
Nrf2	TCAGCGACGGAAAGAGT ATGA	CCACTGGTTTCTGACTGG ATGT
HO-1	AAGACTGCGTTCCTGCTC AAC	AAAGCCCTACAGCAACT GTCG
Akt	CTTCTATGGTGCGGAGAT TGT	CAGCCCGAAGTCCGTTAT C
Stat3	GAGAGCAGAAGGGAGCA A	CTCACAGAGTGGGGCAA A
β -actin	GACTCCTATGTGGGTGAC GA	CCAGTTGGTAACAATGCC AT

1.2.7 Western blotting 检测细胞中氧化应激及凋亡相关蛋白表达水平 各组 AS 加药培养 24 h 后, 弃掉完全培养基, 加入 RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂 Cocktail、PMSF 和磷酸化蛋白酶抑制剂, 于冰上超声 10~15 s 破碎细胞, 将细胞置于冰上裂解 20 min(每 5 min 涡旋振荡 1 次), 于 $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 低温离心 15 min 提取上清, 采用 BCA 法测定提取的蛋白样品浓度并定量 $40\text{ }\mu\text{g}$ 样品用于上样, 将蛋白样品加入 Loading Buffer 煮沸 10 min 变性后备用。根据蛋白分子量制胶上样后, 通过 SDS-PAGE 凝胶电泳将蛋白湿转到活化的 PVDF 膜上, 使用 5% BSA 封闭液于室温封闭 2 h。TBST 漂洗后加入按照相应稀释比例稀释的一抗 [β -actin(1 : 5 000)、Bax(1 : 2 000)、Bcl-2(1 : 5 000)、Caspase-3(1 : 2 000)、Akt(1 : 500)、p-Akt(1 : 1 000)、Stat3(1 : 1 000)、p-Stat3(1 : 2 000)、Nrf2(1 : 1 000)、HO-1(1 : 1 000)], 放入 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育 12~18 h 或过夜。次日, TBST 冲洗 3 次洗去多余的一抗, 根据一抗种属的不同加入相应的二抗, 室温摇床缓慢孵育 2 h, TBST 冲洗 3 次。加入 ECL 发光液于凝胶成像系统对条带进行成像, 使用 Image J 软件分析各个条带图像的灰度值。检测各组细胞中 Bax、Bcl-2、Caspase-3、p-Akt、p-Stat3、Nrf2 及 HO-1 蛋白的表达水平。

1.3 统计学分析

实验数据通过 GraphPad Prism 8.0 统计软件进行分析, 各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间样本比较采用单因素方差分析, 不同组间两两比较选用多重 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AS 纯度鉴定

为保证 AS 的纯度, 通过免疫荧光检测了原代 AS 特异性标志物 GFAP 表达情况^[8]。结果显示, AS 占有细胞总数 $>95\%$, 因此, 可开展后续相关实验。见图 1。

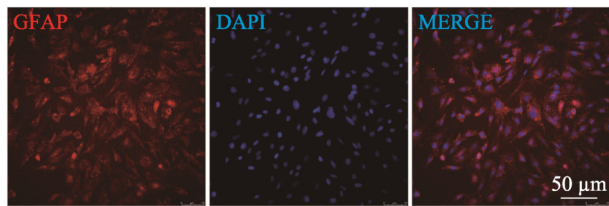


图 1 原代培养星形胶质细胞 GFAP 免疫荧光染色 (200×)
Fig. 1 GFAP immunofluorescence staining of primary cultured AS(200×)

2.2 筛选 H_2O_2 和 PC-B2 的最佳作用浓度

2.2.1 筛选 H_2O_2 最佳诱导浓度 采用不同浓度 H_2O_2 干预 AS 24 h 后, LDH 结果显示, 细胞毒性随 H_2O_2 作用浓度升高而逐渐增加, 其中 50, 100, 200, 300, $400\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 对 AS 有明显的细胞毒性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$), 见图 2A; CCK-8 结果显示, 细胞存活率随 H_2O_2 作用浓度升高而逐渐降低, 其中 $200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 作用 AS 24 h 后, 细胞存活率接近 50% ($P < 0.001$), 见图 2B; 综合 LDH 和 CCK-8 结果故采用 $200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 作用于 AS 构建细胞氧化损伤模型。

2.2.2 筛选 PC-B2 最佳作用浓度 采用不同浓度的 PC-B2 干预 AS 24 h 后, LDH 结果显示, 细胞毒性随 PC-B2 作用浓度升高而逐渐增加, 其中 $150\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 H_2O_2 对 AS 有明显的细胞毒性 ($P < 0.001$), 见图 3A; CCK-8 结果显示, 细胞存活率随 PC-B2 作用浓度升高而逐渐降低, 其中 5, 10, 20, 50, $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 PC-B2 作用于 AS 24 h 后, 细胞存活率无明显影响, 差异无统计学意义, 见图 3B。因此, 需要进一步筛选无毒剂量中的最佳药物作用浓度。

2.2.3 筛选 PC-B2 抑制 H_2O_2 诱导 AS 损伤的最佳作用浓度 为了进一步确定 PC-B2 作用于 AS 的

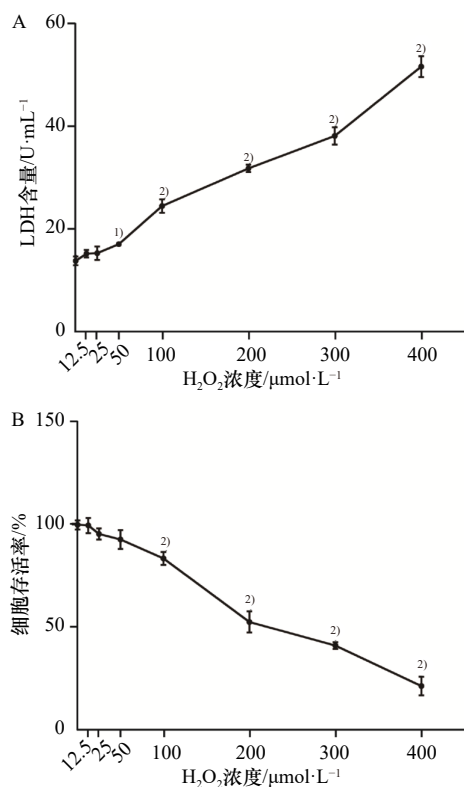


图2 LDH法(A)和CCK-8法(B)检测不同浓度H₂O₂对AS的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)与正常组(0 μmol·L⁻¹ H₂O₂)比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.001$ 。

Fig. 2 LDH(A) and CCK-8(B) method for detecting the effect of different concentrations of H₂O₂ on AS($\bar{x} \pm s$, $n=3$) Compared with the normal group(0 μmol·L⁻¹ H₂O₂), ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.001$.

最佳浓度并观察其对H₂O₂诱导的AS氧化损伤和凋亡的保护作用,通过上述实验结果分别选用5, 10, 20, 50, 100 μg·mL⁻¹的PC-B2联合200 μmol·L⁻¹的H₂O₂共同处理AS 24 h,收集各组上清检测其LDH,结果显示与H₂O₂模型组比较,50 μg·mL⁻¹和100 μg·mL⁻¹的PC-B2干预组细胞毒性明显降低,增殖能力升高($P<0.01$ 或 $P<0.001$),而100 μg·mL⁻¹的PC-B2干预后细胞存活率显著提升接近正常组水平($P<0.001$),效果最为明显,见图4A~B。同时,体外氧自由基清除试验显示,PC-B2在浓度为100 μg·mL⁻¹时对DPPH和ABTS自由基具有强大的清除作用,显示出最优抗氧化能力和最佳作用浓度,见图4C~D。因此,后续采用100 μg·mL⁻¹的PC-B2干预AS进行研究。

2.3 PC-B2对H₂O₂诱导的AS氧化应激水平的影响

由于氧化应激会介导细胞损伤和凋亡,因此,通过ELISA试剂盒检测了各组AS氧化应激水平的变化。结果显示,与正常组相比较,

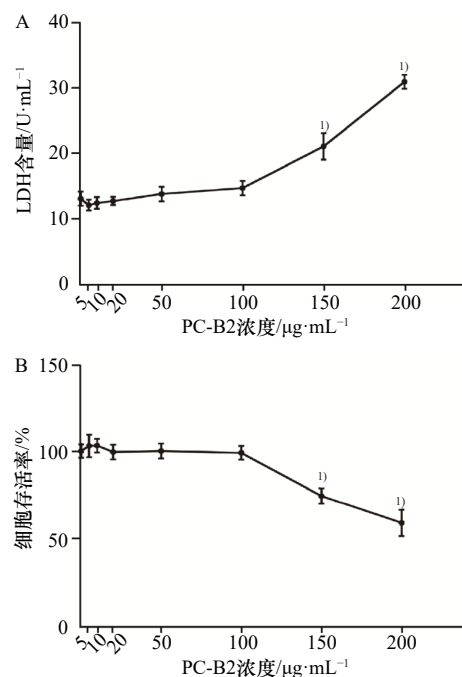


图3 LDH法(A)和CCK-8法(B)检测不同浓度PC-B2对AS的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)与正常组(0 μg·mL⁻¹ PC-B2)比较, ¹⁾ $P<0.001$ 。

Fig. 3 LDH(A) and CCK-8(B) method for detecting the effect of different concentrations of PC-B2 on AS($\bar{x} \pm s$, $n=3$) Compared with the normal group(0 μg·mL⁻¹ PC-B2), ¹⁾ $P<0.001$.

H₂O₂模型组AS中MDA含量显著升高,SOD、CAT和GSH-Px活力显著降低($P<0.001$);经PC-B2干预后,与H₂O₂模型组相比较,AS中MDA含量显著降低,SOD、CAT和GSH-Px活力显著升高($P<0.001$),能够明显缓解细胞所受氧化损伤,提升抗氧化能力,见表2。结果显示,PC-B2能够通过减少MDA含量的同时提高SOD、CAT和GSH-Px活力,从而降低H₂O₂诱导的AS氧化应激水平,改善细胞所受的氧化损伤和凋亡。

2.4 PC-B2对H₂O₂诱导的AS凋亡的影响

为了观察各组AS增殖和凋亡的情况,通过

表2 PC-B2对H₂O₂诱导的星形胶质细胞氧化应激水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 2 Effect of PC-B2 on oxidative stress levels of AS induced by H₂O₂($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

分组	MDA/ μmol·mgprot ⁻¹	SOD/ U·mgprot ⁻¹	CAT/ U·mgprot ⁻¹	GSH-Px/ U·mgprot ⁻¹
正常组	5.198±0.198 9	39.76±1.181	24.580±1.120	265.0±15.33
正常+PC-B2组	6.961±0.322 0	38.35±1.825	22.320±1.995	221.5±11.16
H ₂ O ₂ 模型组	16.320±1.296 ¹⁾	19.62±1.347 ¹⁾	7.724±1.551 ¹⁾	175.2±7.840 ¹⁾
PC-B2组	7.959±0.779 1 ²⁾	40.12±1.224 ²⁾	22.870±0.896 ²⁾	235.5±13.18 ²⁾

注:与正常组比较, ¹⁾ $P<0.001$;与H₂O₂模型组比较, ²⁾ $P<0.001$ 。

Note: Compared with the normal group, ¹⁾ $P<0.001$; compared with the H₂O₂ model group, ²⁾ $P<0.001$.

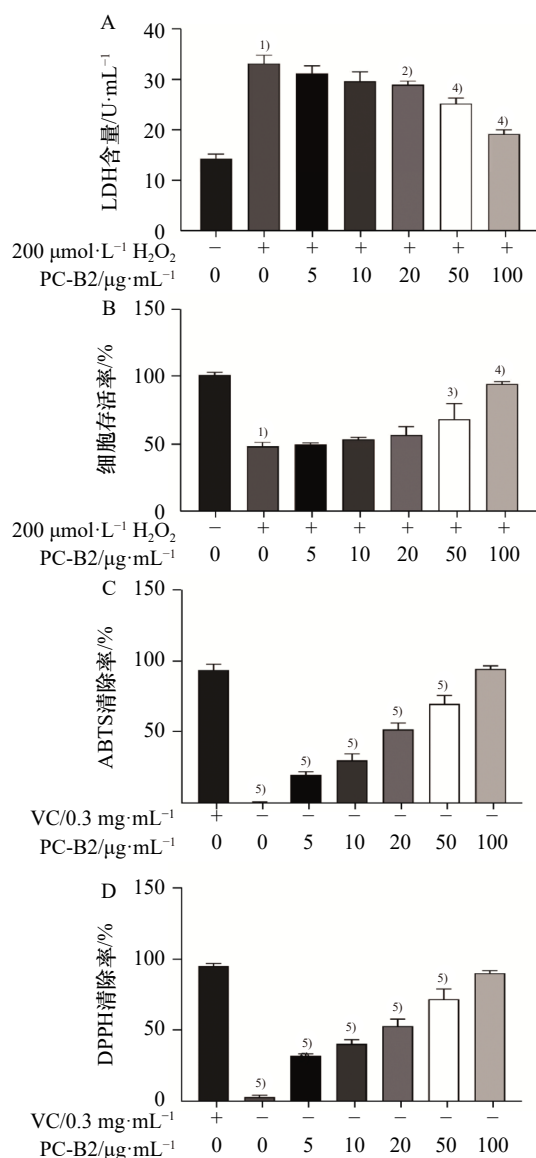


图4 PC-B2的最佳作用浓度筛选和抗氧化能力检测 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

A-LDH法; B-CCK-8法; C-ABTS法; D-DPPH法。与正常组($0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$)比较, ¹⁾ $P<0.001$; 与 H_2O_2 模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$, ⁴⁾ $P<0.001$; 与VC组比较, ⁵⁾ $P<0.001$ 。

Fig. 4 Screening of the optimal concentration of PC-B2 and detection of its antioxidant capacity($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

A-LDH method; B-CCK-8 method; C-ABTS method; D-DPPH method. Compared with the normal group($0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$), ¹⁾ $P<0.001$; compared with the H_2O_2 model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$, ⁴⁾ $P<0.001$; compared with the VC group, ⁵⁾ $P<0.001$ 。

TUNEL 荧光染色法进行了检测。结果显示, 与正常组相比较, H_2O_2 模型组细胞凋亡率显著升高 ($P<0.001$); 经 PC-B2 干预后, 与 H_2O_2 模型组相比较, 细胞凋亡率显著降低 ($P<0.001$), 见图 5。同时, 抗凋亡蛋白 Bcl-2、促凋亡蛋白 Bax 以及细胞凋亡关键酶 Caspase-3 在细胞凋亡过程中扮演重要角色, 因此, 通过 RT-PCR 和 Western blotting 检

测了对应指标 mRNA 和蛋白表达水平的变化。结果显示, 与正常组相比较, H_2O_2 模型组 Bax、Caspase-3 的 mRNA 和蛋白表达水平显著升高 ($P<0.001$), Bcl-2 的 mRNA 和蛋白表达水平显著降低 ($P<0.001$ 或 $P<0.01$); 经 PC-B2 干预后, 与 H_2O_2 模型组相比较, Bax、Caspase-3 的 mRNA 和蛋白表达水平显著降低 ($P<0.001$), Bcl-2 的 mRNA 和蛋白表达水平显著升高 ($P<0.001$), 见图 6。因此, PC-B2 可以通过上调 Bcl-2 的表达, 抑制 Bax 和 Caspase-3 的表达, 改善细胞凋亡。

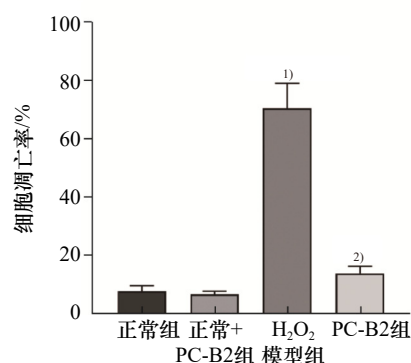
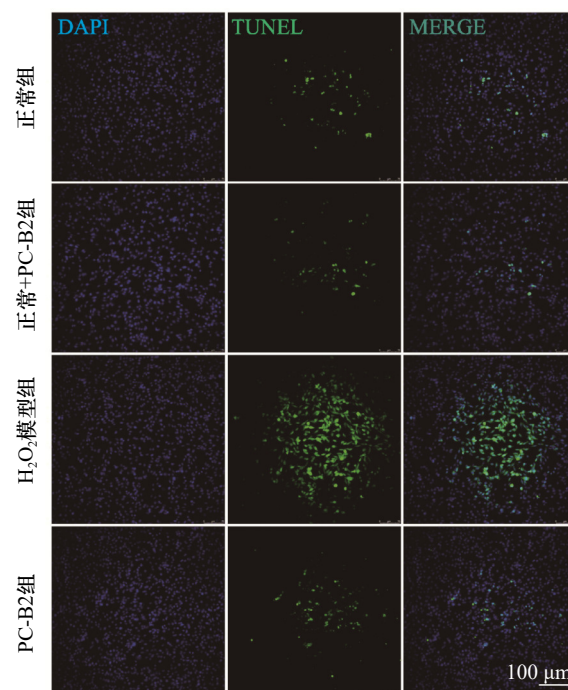


图5 TUNEL 染色检测各组 AS 凋亡情况 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$) 与正常组比较, ¹⁾ $P<0.001$; 与 H_2O_2 模型组比较, ²⁾ $P<0.001$ 。

Fig. 5 Apoptosis of AS in each group detected by TUNEL ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Compared with the normal group, ¹⁾ $P<0.001$; compared with the H_2O_2 model group, ²⁾ $P<0.001$ 。

2.5 PC-B2 对 H_2O_2 诱导的 AS 中 Akt/Stat3 和 Nrf2/HO-1 信号通路活化的影响

研究表明, Akt/Stat3 信号通路介导细胞增殖

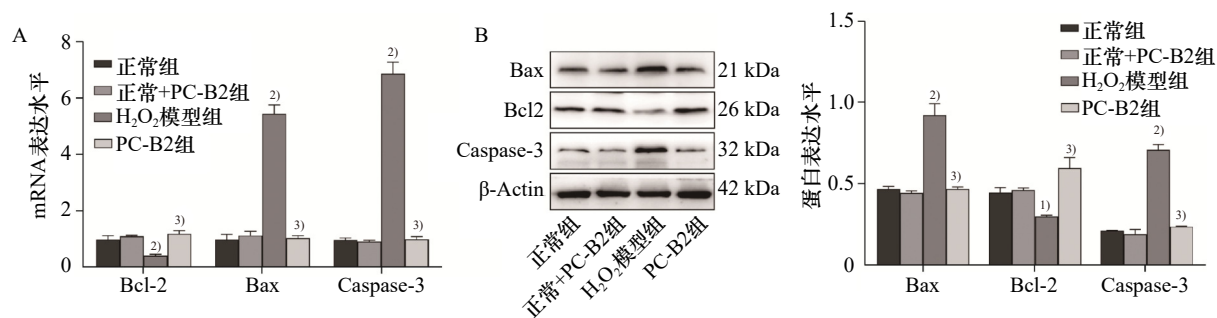


图6 PC-B2对H₂O₂诱导的AS中Bax、Bcl-2、Caspase-3的mRNA(A)和蛋白(B)表达水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
与正常组比较, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.001$; 与H₂O₂模型组比较, ³⁾ $P<0.001$ 。

Fig. 6 Effect of PC-B2 on the mRNA(A) and protein(B) expression of Bax, Bcl-2 and Caspase-3 in AS induced by H₂O₂ ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Compared with the normal group, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.001$; compared with the H₂O₂ model group, ³⁾ $P<0.001$.

和凋亡, 并且 Nrf2/HO-1 信号传导途径在细胞抗氧化系统中发挥着重要作用^[9]。为了进一步探究 PC-B2 是否通过调节 Akt/Stat3 和 Nrf2/HO-1 信号传导途径改善 H₂O₂ 诱导的 AS 氧化损伤和凋亡, 本研究采用 RT-PCR 和 Western blotting 检测 Akt/Stat3 和 Nrf2/HO-1 的 mRNA 和蛋白表达水平的变化。结果显示, 与正常组比较, H₂O₂ 模型组 Akt、Stat3、Nrf2、HO-1 的 mRNA 表达显著降低 ($P<0.001$), p-Akt、p-Stat3、Nrf2、HO-1 的蛋白表达水平显著降低 ($P<0.001$ 或 $P<0.01$); 经 PC-B2 干预后, 与 H₂O₂ 模型组相比较, Akt、Stat3、Nrf2、HO-1 的 mRNA 表达显著升高 ($P<0.001$), p-Akt、p-Stat3、Nrf2、HO-1 的蛋白表达水平显著升高 ($P<0.001$), 见图 7。这些结果表明, PC-B2 发挥改善 H₂O₂ 诱导的 AS 氧化损伤和凋亡的保护作用与 Akt/Stat3 和 Nrf2/HO-1 信号通路的活化有关。

3 讨论

大量研究表明, 氧化应激是大脑老化和 CNS 退行性疾病的主要致病因素, 能够通过不同的分子途径加剧 CNS 退行性疾病中的神经损伤, 在此过程中产生的 ROS 可导致细胞主要成分如脂质、蛋白质和 DNA 的损伤, 从而引发细胞坏死和凋亡^[2]。AS 作为 CNS 中最丰富的细胞类型, 在许多 CNS 退行性疾病中起重要作用, 靶向 AS 保护其形态和功能的完整性, 是治疗神经退行性病变并维持 CNS 稳态的重要靶点^[10]。然而, 现有的药物治疗不能从根本上改善 CNS 退行性疾病的发展进程, 只有很少的有效疗法可以用于缓解疾病, 但也往往伴随着许多不良反应^[11]。基于这些研究基础, 研究者对于天然药物来源抗氧化剂的研究

兴趣日益增加。其中 PC-B2 作为公认的天然强效抗氧化剂, 显示出多种药理活性和有益作用, 并且在各领域研究中日益广泛, 有研究表明, PC-B2 能够通过清除多余的 ROS 来保护神经元免受氧化损伤^[12], Tian 等^[13]还发现 PC-B2 能够通过激活 Nrf2 信号途径调节氧化应激导致的行为损伤, 维持髓鞘的完整性。这些结果表明 PC-B2 在治疗 CNS 退行性疾病中显示出巨大潜力, 同时也为 PC-B2 对 AS 在受到氧化应激影响时的潜在保护作用提供了理论依据。

正常生理状态下, 细胞内氧化还原稳态依靠氧化剂和抗氧化剂的相对平衡来维持, 一旦细胞内产生的氧代谢物超过了细胞抗氧化机制的能力, 这种平衡就会被打破, 导致细胞毒性水平的上升, 引发细胞凋亡^[14]。H₂O₂ 作为主要的氧代谢物之一, 是氧化应激中的主要氧化还原信号分子, 已被广泛用于诱导不同细胞系的氧化损伤, 来模拟氧化疾病机制进行药物筛选构建体外细胞模型^[15]。MDA 是脂质过氧化的标志物, 由多不饱和脂肪酸催化分解产生, 对细胞具有明显的毒性作用, 能够诱导细胞凋亡; 而 CAT、SOD、GSH-Px 等抗氧化酶构成了针对过度氧代谢物的酶促抗氧化系统的核心, 其中 SOD 是机体内清除氧自由基的酶, 可将 MDA 转化成 H₂O₂ 对抗超氧化物毒性; CAT 是一种末端氧化酶, 能够迅速将 H₂O₂ 分解为无毒的水和氧气; GSH-Px 作为重要的细胞抗氧化酶, 也可通过分解 H₂O₂ 清除机体内的自由基, 从而维持机体内氧化应激水平^[16-17]。相关研究表明, 降低 MDA 含量, 提高 CAT、SOD、GSH-Px 的活性, 能够保护软骨细胞免受氧化损伤和凋亡^[18]。在本研究中, H₂O₂ 作用于 AS 后, 细胞内

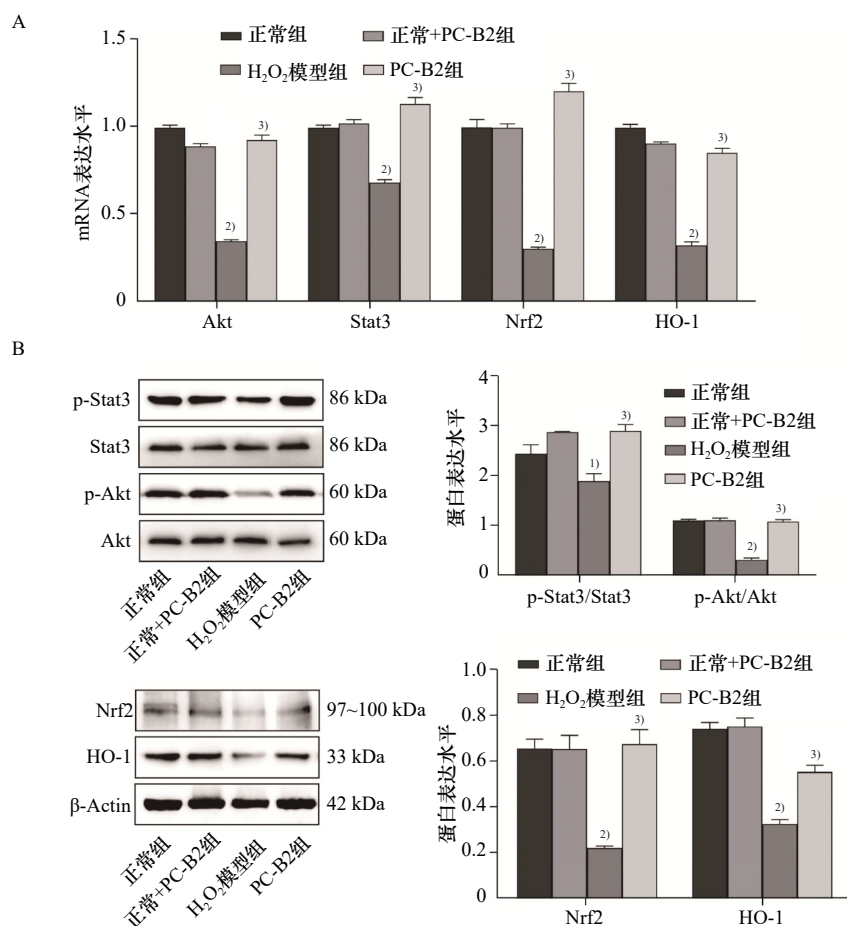


图7 PC-B2对H₂O₂诱导的AS中Akt/Stat3和Nrf2/HO-1通路的mRNA(A)和蛋白(B)表达水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)与正常组比较, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.001$; 与H₂O₂模型组比较, ³⁾ $P<0.001$ 。

Fig. 7 Effect of PC-B2 on the mRNA(A) and protein(B) expression of Akt/Stat3 and Nrf2/HO-1 pathway in AS induced by H₂O₂ ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Compared with the normal group, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.001$; compared with the H₂O₂ model group, ³⁾ $P<0.001$.

MDA含量显著升高, SOD、CAT和GSH-Px活力显著降低; 经PC-B2干预后, 细胞内MDA含量显著降低, SOD、CAT和GSH-Px活力显著升高, 说明PC-B2能够通过降低H₂O₂引起的氧化应激水平, 改善AS受到的氧化损伤。

过度的氧化应激致使细胞氧化损伤, 最终导致细胞凋亡。在细胞凋亡途径中, Bcl-2/Bax/Caspase-3信号通路发挥着重要作用。Bcl-2作为线粒体外壁中的抗凋亡蛋白, 抑制促凋亡因子细胞色素c(cytochrome c, Cyt-c)的释放。相比之下, Bax是一种促凋亡蛋白, 会从细胞质转移到线粒体表面, 导致膜电位降低, 膜通透性增加, 从而促进线粒体释放Cyt-c, 此时, 细胞凋亡“执行阶段”的关键调节因子Caspase-3被激活, 从而引发半胱天冬酶级联反应, 最终导致DNA损伤和细胞凋亡^[19]。先前的研究发现, PC-B2能够通过增加Bcl-2的表达、降低Bax和Caspase-3的表达来抑

制人脐静脉内皮细胞的凋亡^[7]。本研究结果显示, H₂O₂诱导的氧化损伤能够下调Bcl-2的表达、上调Bax和Caspase-3的表达; 经PC-B2干预后, 细胞内Bcl-2的表达显著增加, Bax和Caspase-3的表达显著降低。同时, 结合TUNEL染色结果也证实PC-B2干预后AS凋亡数目显著减少, 表明PC-B2能够通过抑制细胞凋亡发挥对AS的保护作用。

氧化应激介导的细胞损伤和凋亡, 可能涉及多层次、多环节以及多条信号通路的调节。其中Akt是一种能够介导细胞增殖、存活、蛋白质合成的丝氨酸苏氨酸激酶, 活化的Akt转运到细胞内的不同位置, 磷酸化多种参与细胞生存和细胞生长的蛋白质底物^[20]。Stat3作为Akt的下游分子, 直接通过与细胞周期蛋白D1的启动子结合诱导其转录来调控细胞的增殖分化和凋亡过程。Wu等^[9]的研究发现四氯二苯-p-二恶英能够通过激活

Akt/Stat3/Cyclin D1 途径促进 AS 的增殖。在本实验中, H₂O₂ 模型组中的 p-Akt 和 p-Stat3 的表达被显著抑制, PC-B2 干预能够激活 Akt/Stat3 信号通路抑制 AS 的凋亡。同时, Nrf2 作为一种对氧化还原非常敏感的转录因子, 受抗氧化反应元件的调控能够优先在 AS 中被激活, 已经证实了 Nrf2 是 AS 中解毒和抗氧化防御的细胞保护途径。HO-1 是一种微粒体酶, Nrf2 的激活促进其高表达, 催化血红基团的降解, 抵消氧化损伤并提供细胞保护^[21-22]。本研究结果显示, H₂O₂ 模型组中的 Nrf2 和 HO-1 的表达显著降低, PC-B2 干预能够激活 AS 中 Nrf2/HO-1 信号传导途径, 增强细胞抗氧化能力抑制细胞凋亡, 发挥细胞保护作用。

综上所述, 本研究结果表明, 对于 H₂O₂ 诱导的 AS 氧化损伤和凋亡, PC-B2 能够有效地发挥保护作用, 其作用机制可能与调控 Akt/Stat3 和 Nrf2/HO-1 信号传导途径有关, 本实验为 PC-B2 治疗神经退行性病变提供了强有力的证据。然而, 上述研究还需要体内实验进一步论证完善, 以证实本研究结果, 为后续的研究奠定基础。

REFERENCES

- [1] CHEN Y X, QIN C, HUANG J H, et al. The role of astrocytes in oxidative stress of central nervous system: A mixed blessing[J]. *Cell Prolif*, 2020, 53(3): e12781.
- [2] SINGH A, KUKRETI R, SASO L, et al. Oxidative stress: A key modulator in neurodegenerative diseases[J]. *Molecules*, 2019, 24(8): 1583.
- [3] BARKER S, PAUL B D, PIEPER A A. Increased risk of aging-related neurodegenerative disease after traumatic brain injury[J]. *Biomedicines*, 2023, 11(4): 1154.
- [4] WANG Q, YANG Z C, DONG Y W, et al. Mechanism of grape seed proanthocyanidins oligomer inhibiting polarization of type A1 astrocytes[J]. *Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报)*, 2023, 39(1): 77-83.
- [5] ALI A M, KUNUGI H. Bee honey protects astrocytes against oxidative stress: A preliminary *in vitro* investigation[J]. *Neuropsychopharmacol Rep*, 2019, 39(4): 312-314.
- [6] FENG J, WU L W, JI J, et al. PKM2 is the target of proanthocyanidin B2 during the inhibition of hepatocellular carcinoma[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 204.
- [7] ZHOU L H, CHANG J R, GAO Y L, et al. Procyanidin B2 protects neurons from cypermethrin-induced oxidative stress through the P13K/Akt/Nrf2 signaling pathway[J]. *J South Med Univ(南方医科大学学报)*, 2021, 41(8): 1158-1164.
- [8] ZHANG M, MA Y, CHAI L, et al. Storax protected oxygen-glucose deprivation/reoxygenation induced primary astrocyte injury by inhibiting NF- κ B activation *in vitro*[J]. *Front Pharmacol*, 2018(9): 1527.
- [9] WU C Y, YIN K Z, ZHANG Y, et al. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin promotes proliferation of astrocyte cells via the Akt/STAT3/cyclin D1 pathway[J]. *Biomed Environ Sci*, 2019, 32(4): 281-290.
- [10] LINNENBAUER M, ROTHHAMMER V. Protective functions of reactive astrocytes following central nervous system insult[J]. *Front Immunol*, 2020(11): 573256.
- [11] CORONA J C. Natural compounds for the management of Parkinson's disease and attention-deficit/hyperactivity disorder [J]. *Biomed Res Int*, 2018(2018): 4067597.
- [12] SUTCLIFFE T C, WINTER A N, PUNESSEN N C, et al. Procyanidin B2 protects neurons from oxidative, nitrosative, and excitotoxic stress[J]. *Antioxidants*, 2017, 6(4): 77.
- [13] TIAN H, SUN W C, ZHANG Q Y, et al. Procyanidin B2 mitigates behavioral impairment and protects myelin integrity in cuprizone-induced schizophrenia in mice[J]. *RSC Adv*, 2018, 8(42): 23835-23846.
- [14] XIE Y X, DENG Q Y, GUO M L, et al. Proanthocyanidins: A novel approach to Henoch-Schönlein purpura through balancing immunity and arresting oxidative stress via TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway (Review)[J]. *Exp Ther Med*, 2023, 25(6): 300.
- [15] HUANG B, LIANG J J, ZHUANG X, et al. Intravitreal injection of hydrogen peroxide induces acute retinal degeneration, apoptosis, and oxidative stress in mice[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018(2018): 5489476.
- [16] GALASSO M, GAMBINO S, ROMANELLI M G, et al. Browsing the oldest antioxidant enzyme: Catalase and its multiple regulation in cancer[J]. *Free Radic Biol Med*, 2021(172): 264-272.
- [17] DODSON M, CASTRO-PORTUGUEZ R, ZHANG D D. NRF2 plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis[J]. *Redox Biol*, 2019(23): 101107.
- [18] MENG R D, HU Z J, MAO Q. Protective effect of icariin on H₂O₂-induced chondrocyte oxidative damage and its mechanism[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2021, 38(24): 3115-3121.
- [19] CHEN C, CHEN Y H, LIU T T, et al. Dexmedetomidine can enhance PINK1/parkin-mediated mitophagy in MPTP-induced PD mice model by activating AMPK[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022(2022): 7511393.
- [20] SHARIATI M, MERIC-BERNSTAM F. Targeting AKT for cancer therapy[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2019, 28(11): 977-988.
- [21] AL-MUBARAK B R, BELL K F S, CHOWDHURY S, et al. Non-canonical Keap1-independent activation of Nrf2 in astrocytes by mild oxidative stress[J]. *Redox Biol*, 2021(47): 102158.
- [22] LIN Q, LI Z R, GUO J L, et al. Study on the effect of standardized myrtle on Nrf2/HO-1 pathway in chronic obstructive pulmonary disease rats[J]. *Chin J New Drugs(中国新药杂志)*, 2021, 30(22): 2105-2110.

收稿日期: 2023-03-13

(本文责编: 沈倩)