

五没食子酰基葡萄糖对 H_2O_2 诱导的肾小球系膜细胞氧化损伤及凋亡的影响

林爱琴¹, 卜文婕¹, 窦德宇², 宫磊¹

(1. 皖南医学院医学生物学教研室, 安徽 芜湖 241002;
2. 活性生物大分子研究安徽省重点实验室, 安徽 芜湖 241002)

摘要:目的 研究五没食子酰基葡萄糖(PGG)对过氧化氢(H_2O_2)诱导的大鼠肾小球系膜细胞(GMCs)活性氧(ROS)水平、细胞凋亡和氧化相关因子的影响。**方法** 通过CCK8试剂盒筛选出对GMCs细胞无毒性的PGG浓度和能够引起GMCs细胞产生凋亡的 H_2O_2 浓度。实验设置6组,分别为正常组、阳性组、10 μ M PGG组、5 μ M PGG组、1 μ M PGG组、0.1 μ M PGG组,正常组为不做处理的GMCs细胞,阳性组细胞给予600 μ M的 H_2O_2 刺激,PGG组细胞给予600 μ M的 H_2O_2 和不同浓度PGG刺激,18 h后通过流式细胞仪检测活性氧(ROS)和细胞凋亡水平;试剂盒检测各组超氧化物歧化酶(SOD)和总谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性。**结果** PGG能够降低GMCs细胞ROS水平,减少细胞凋亡;提高抗氧化酶SOD和GSH-Px活性,从而减少 H_2O_2 诱导的系膜细胞氧化损伤程度,其中10 μ M PGG组抗氧化程度最明显。**结论** PGG对于 H_2O_2 诱导GMCs细胞的凋亡有一定抑制作用,能够抑制GMCs细胞产生ROS,减少氧化应激的水平,从而起到对细胞的保护作用。

关键词:五没食子酰基葡萄糖;氧化应激;凋亡;活性氧

中图分类号:R285.5 文献标识码:A 文章编号:1001-5817(2019)06-0601-05
doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2019.06.001

Effects of Penta-O-galloyl-D-glucose on H_2O_2 -induced oxidative damage and apoptosis in glomerular mesangial cells

Lin Aiqin¹, Bu Wenjie¹, Dou Deyu², Gong Lei¹

(1. Department of Medical Biology, Wannan Medical College, Wuhu 241002, Anhui, China;
2. Anhui Provincial Key Laboratory of Biological Macro-molecules Research, Wuhu 241002, Anhui, China)

Abstract: **Objective** To study the effects of Penta-O-galloyl-D-glucose (PGG) on reactive oxygen species (ROS) levels, apoptosis and oxidation-related factors in H_2O_2 -induced glomerular mesangial cells (GMCs) of rats. **Methods** The concentration of PGG that is not toxic to GMCs and the concentration of H_2O_2 that can cause apoptosis in GMCs were screened by CCK8 kit. Six groups were set up for experiment: normal group, positive group, 10 μ M PGG group, 5 μ M PGG group, 1 μ M PGG group, 0.1 μ M PGG group. The normal group consisted of untreated GMCs, the positive group cells were stimulated with 600 μ M H_2O_2 , and the PGG group cells were stimulated with 600 μ M H_2O_2 and different concentrations of PGG. The level of ROS and cell apoptosis level were measured by flow cytometry after 18 h. The activities of superoxide dismutase (SOD) and total glutathione peroxidase (GSH-Px) in each group were detected by kit. **Results** PGG could

基金项目:皖南医学院校中青年基金项目(WK201615,WK201904)

第一作者简介:林爱琴(1982-),女,硕士,实验师,研究方向:细胞生物学与分子生物学,E-mail:linaiqin945@163.com

通讯作者简介:卜文婕(1989-),女,硕士,实验师,研究方向:细胞生物学,E-mail:Buwj611@163.com

reduce the ROS level of GMCs, reduce cell apoptosis, increase the activity of antioxidant enzymes SOD and GSH-Px, and thus reduce the degree of oxidative damage induced by H_2O_2 in mesangial cells. The anti-oxidation degree of 10 μM PGG group was the most obvious. **Conclusion** PGG has a certain inhibitory effect on H_2O_2 -induced apoptosis of GMCs, and it can inhibit the production of ROS by GMCs, reduce the level of oxidative stress and thus play a protective role on cells.

Key words: Penta-O-galloyl-D-glucose; oxidative stress; apoptosis; reactive oxidative species

五没食子酰基葡萄糖(英文全称 Penta-O-galloyl-D-glucose,简称 PGG)广泛存在于自然界的植物中,其中五倍子中的含量最高,其次为牡丹皮、白芍、赤芍、黄芩等^[1]。由于 PGG 分子中含有多个酚羟基^[2],从而它具有了独特的理化性质和生理活性,表明 PGG 将可能成为一种天然抗氧化剂而具有潜在的广泛应用前景。正常情况下,机体不断产生活性氧(ROS)、超氧阴离子等,同时机体中的超氧化物歧化酶(SOD)、维生素 E、谷胱甘肽还原酶等进行抗氧化清除,而剩余的 ROS 参与维持血管紧张和一系列信号传导过程,当机体在外部刺激下,ROS 增多,氧化程度超过了抗氧化清除能力,机体出现了氧化应激(OS)^[3]。本研究通过一定浓度的过氧化氢(H_2O_2)刺激大鼠肾小球系膜细胞(GMCs)产生氧化应激,了解不同浓度的 PGG 对 GMCs 细胞抗氧化能力的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株 GMCs 细胞株来源于皖南医学院弋矶山医院中心实验室。

1.1.2 实验试剂 PGG,上海源叶生物科技有限公司;30% H_2O_2 ,国药集团化学试剂有限公司;低糖 DMEM 培养基,美国 Hyclone 公司;胎牛血清,澳洲 CLARK Bioscience 公司;CCK8 试剂盒,碧云天生物技术有限公司;活性氧检测试剂盒,碧云天生物技术有限公司;细胞凋亡试剂盒,碧云天生物技术有限公司;总 SOD 活性检测试剂盒,碧云天生物技术有限公司;总谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒,碧云天生物技术有限公司。

1.1.3 主要的实验仪器设备 多功能微孔检测仪(瑞士 TECAN, M200 PRO),流式细胞仪(BD 公司, FACSVerseTM),超净工作台(苏州苏净, SW-CJ-2FD),高速离心机(美国 Eppendorf)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 将细胞株从液氮罐中取出迅速在 37℃ 水浴锅中水浴,复苏后接种于完全培养基(含有 10% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养基)中。在 5% CO_2 、37℃ 的细胞培养箱中培养,待细胞生长至 80% 时进行消化传代,本实验选取 5~7 代对数生长期细胞进行研究。

1.2.2 H_2O_2 和 PGG 最佳浓度的筛选 用完全培养基将 GMCs 细胞稀释成单个细胞悬液并接种于 96 孔板中,24 h 细胞贴壁后,换用无血清的低糖 DMEM 培养基饥饿 12 h,用无血清低糖 DMEM 培养基配制不同浓度 H_2O_2 (100 μM 、200 μM 、300 μM 、400 μM 、500 μM 、600 μM),PGG 用 DMSO 溶解后用无血清低糖 DMEM 培养基稀释成不同浓度(0.1 μM 、1 μM 、5 μM 、10 μM 、20 μM),CCK8 试剂盒检测分别筛选出最佳浓度的 H_2O_2 (对细胞产生一定损伤的浓度)和 PGG (对细胞不产生毒性的浓度)。

1.2.3 流式细胞术检测各组 ROS 和细胞凋亡水平 取对数生长期细胞均匀接种于 6 孔板上,分为 6 组:正常组、阳性组、10 μM PGG 组、5 μM PGG 组、1 μM PGG 组、0.1 μM PGG 组,每组 3 个复孔,待贴壁后换无血清培养基饥饿 3 h 各组进行加药处理,正常组为不做处理的 GMCs 细胞,阳性组细胞给予 600 μM 的 H_2O_2 刺激,PGG 各组细胞给予 600 μM 的 H_2O_2 和不同浓度 PGG 刺激,各组在处理 18 h 后,通过流式细胞仪上机检测,采用 Flowjo 7.6 软件对结果进行分析,计算 ROS 和凋亡水平。

1.2.4 试剂盒检测各组 SOD 和 GSH-Px 水平 各组细胞按上述方法在 6 孔板中处理后,分别加入裂解液,蛋白裂解后制成样品,用试剂盒检测每个样品中 SOD 和 GSH-Px 含量,再检测样品的蛋白含量,最终结果以单位总蛋白中的目的蛋白的含量为准。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,数据用($\bar{x} \pm s$)表示,两组间的比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。作图工具为 Graphpad 5.0 软件。

2 结果

2.1 H_2O_2 和 PGG 最佳浓度的筛选 当 H_2O_2 浓度达到 500 μM 时,OD 值与正常组开始产生显著差异($P < 0.05$),在 600 μM 浓度下,与正常组间差异更明显($P < 0.01$),因此,600 μM 的 H_2O_2 可作为较合适的浓度,刺激细胞产生氧化作用。见表 1。PGG 浓度在达到 20 μM 时,其 OD 值明显低于正常组($P < 0.01$),说明此浓度对 GMCs 细胞产生了一定毒性,细胞发生凋亡,所以本实验选择 PGG 的最高浓度为 10 μM 。见表 2。

表1 不同浓度 H₂O₂ 对 GMCs 细胞产生的影响 (n=5, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量	OD
正常对照组	—	1.654 ± 0.096
H ₂ O ₂	100 μM	1.538 ± 0.041
H ₂ O ₂	200 μM	1.689 ± 0.151
H ₂ O ₂	300 μM	1.578 ± 0.190
H ₂ O ₂	400 μM	1.529 ± 0.096
H ₂ O ₂	500 μM	1.443 ± 0.115 ^a
H ₂ O ₂	600 μM	1.317 ± 0.125 ^b

注:与正常对照组比较, a: P < 0.05, b: P < 0.01

表2 不同浓度 PGG 对 GMCs 细胞产生的毒性影响 (n=5, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量	OD
正常对照组	—	1.378 ± 0.088
PGG	0.1 μM	1.267 ± 0.164
PGG	1 μM	1.360 ± 0.130
PGG	5 μM	1.511 ± 0.240
PGG	10 μM	1.353 ± 0.080
PGG	20 μM	1.076 ± 0.178 ^a

注:与正常对照组比较, a: P < 0.01

2.2 不同浓度 PGG 对 H₂O₂ 诱导 GMCs 细胞中 ROS 含量的影响 流式细胞仪检测结果(见图1)显示,随着 PGG 浓度的升高,GMCs 细胞产生的 ROS 逐渐减少,0.1 μM PGG 组虽然减少但与阳性对照组比较差异无统计学意义(P > 0.05)。从 1 μM PGG 浓度开始,PGG 各组与阳性对照组的 ROS 含量有明显差异(P < 0.05),其中 10 μM PGG 组与正常组间已无差异,表明在一定浓度范围内 PGG 的抗氧化作用随着浓度的升高而增强。

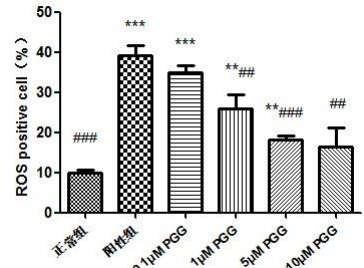
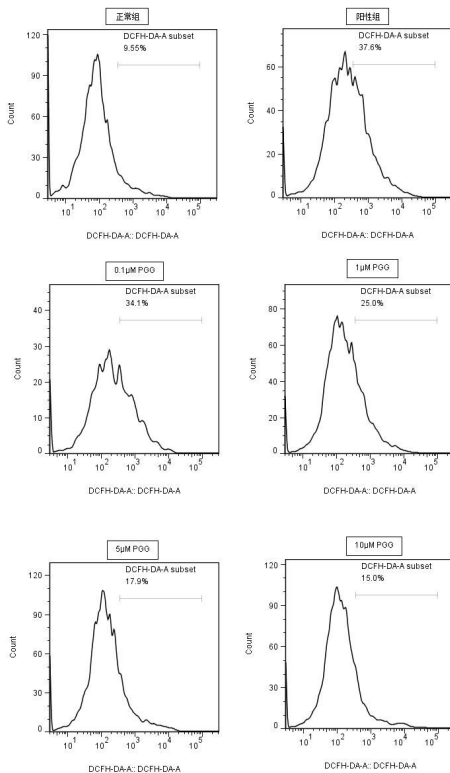


图1 不同浓度 PGG 对 H₂O₂ 诱导的 GMCs 细胞产生 ROS 的影响

注:与正常组比较, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001;与阳性组比较, # P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.001

2.3 不同浓度 PGG 对 H₂O₂ 诱导 GMCs 细胞凋亡的影响 氧化应激可引起 GMCs 细胞产生细胞凋亡,本实验结果显示(见图2),在 600 μM H₂O₂ 的浓度下,细胞凋亡最多,达到 38.76%,当加入 PGG 保护时,随着 PGG 浓度升高,细胞凋亡率逐渐减少,但仍存在一定凋亡,与阳性组相比,有显著降低(P < 0.05)。

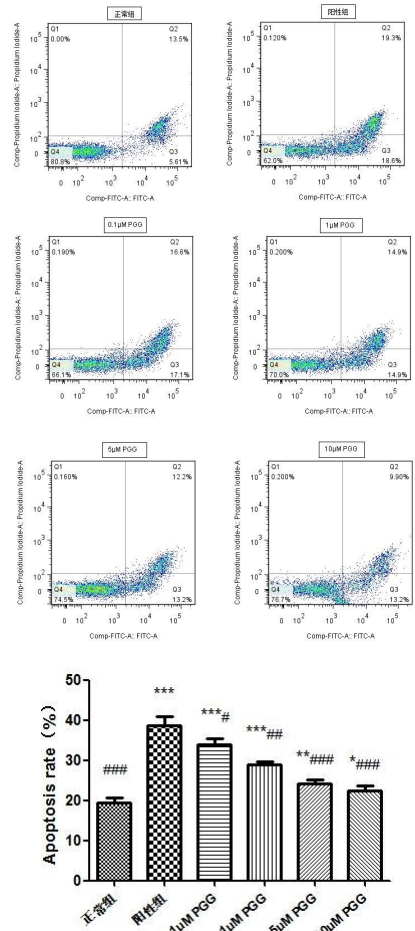


图2 不同浓度 PGG 对 H₂O₂ 诱导的 GMCs 细胞凋亡的影响

注:与正常组比较, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001;与阳性组比较, # P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.001

2.4 不同浓度 PGG 对 H_2O_2 诱导的 GMCs 细胞 SOD、GSH-Px 活力的影响 10 μM 、5 μM 和 1 μM PGG 组的 SOD 水平均明显高于阳性组,10 μM PGG 组的 SOD 活性较其他加药组最高,与正常组间差异无统计学意义($P > 0.05$),0.1 μM PGG 组则与阳性组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。PGG 组细胞的 GSH-Px 水平均明显高于阳性组,但低于正常组,差异有统计学意义($P < 0.05$),随着 PGG 浓度的升高,GSH-Px 活力水平也相应增加。见表 3。

表 3 不同浓度 PGG 对 H_2O_2 诱导的 GMCs 细胞产生氧化应激的相关因子活性 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	SOD(U/mg)	GSH-Px(mU/ml)
正常组	20.77 \pm 1.11 ^c	41.97 \pm 2.90 ^f
阳性组	12.81 \pm 2.19 ^b	9.78 \pm 1.74 ^c
PGG(10 μM)	19.19 \pm 0.42 ^e	33.42 \pm 3.31 ^{af}
PGG(5 μM)	17.61 \pm 0.50 ^{ad}	26.00 \pm 1.61 ^{bf}
PGG(1 μM)	16.59 \pm 0.17 ^{bd}	23.54 \pm 2.58 ^{cf}
PGG(0.1 μM)	15.44 \pm 0.62 ^b	21.17 \pm 3.52 ^{cf}

注:与正常组比较,a: $P < 0.05$,b: $P < 0.01$,c: $P < 0.001$;与阳性组比较,d: $P < 0.05$,e: $P < 0.01$,f: $P < 0.001$

3 讨论

糖尿病肾病作为糖尿病主要慢性并发症之一,近年来临床及实验研究表明其发病机制与很多因素有关,主要包括氧化应激、蛋白激酶 C、蛋白非酶糖基、多元醇通路 4 种学说,其中氧化应激在其发展中起到关键作用^[4-5]。氧化应激指的是机体遭受到各种刺激后,体内的 ROS 产生过多,引起氧化系统和抗氧化系统的失衡,细胞产生脂质过氧化,导致溶酶体和线粒体损伤,进而导致组织损伤的一系列过程^[6]。ROS 作为机体代谢过程中氧化还原反应产物,参与调节杀菌、解毒等多种代谢途径^[7],也是细胞凋亡的前期产物。而过量的 ROS 是引起糖尿病肾损伤多条通路激活的共同途径^[8]。过氧化氢(H_2O_2)是一种强氧化剂,能够诱导机体产生大量的 ROS,导致机体产生氧化应激反应,从而引起氧化损伤。目前由于 H_2O_2 比较容易获得并且其性质相对稳定,易透过细胞膜,从而生成活性氧自由基,因而很多研究都是通过 H_2O_2 作为诱导细胞产生氧化应激模型^[9-10]。

当细胞内 ROS 产生和清除的动态平衡被打破时,就会启动有效地抗 ROS 防御体系,如 SOD、GSH-Px 等因子^[11]。SOD 和 GSH-Px 是细胞内重要的抗氧化酶,具有降解细胞内 ROS 的作用^[12]。SOD 能够催化 ROS 生成 H_2O_2 和 O_2 ,其活性在一定程度上体现了机体对活性氧自由基的清除能力^[13],通过特异地与超氧化物阴离子($O_2^{\cdot-}$)发生歧化反应,清除 $O_2^{\cdot-}$,保护机

体免受自由基的损害。GSH-Px 进一步代谢 H_2O_2 ,加速 H_2O_2 的分解形成分子 O_2 和 H_2O ^[14],阻断氧化反应发挥拮抗脂质过氧化作用,避免 H_2O_2 对细胞的影响。

PGG 具有多种生物及药理活性,如抗炎、抗氧化、抗肿瘤、抗血管再生以及延长寿命等,近年来有研究发现 PGG 在治疗糖尿病方面具有较高的价值^[15]。本实验通过 600 μM H_2O_2 刺激 GMCs 细胞并同时加入不同浓度 PGG,检测 ROS 水平及细胞凋亡程度,并检测细胞中抗氧化相关因子 SOD 和 GSH-Px 水平,从而研究不同浓度 PGG 是否对氧化应激损伤下的 GMCs 细胞产生一定的抗氧化作用。最终结果表明,随着 PGG 浓度的升高,GMCs 细胞中 ROS 水平逐渐降低,细胞凋亡程度减轻,当 PGG 浓度达到 10 μM 时,与正常组间无显著差异,说明此浓度下的 PGG 能有效减少 H_2O_2 诱导细胞产生的 ROS,从而减少细胞凋亡程度;PGG 各组的 SOD 和 GSH-Px 活性均显著高于阳性组,其中 10 μM PGG 组表达量最高,说明氧化应激水平明显降低,所以,PGG 可能通过影响细胞内 SOD 和 GSH-Px 的水平,减少 H_2O_2 对 GMCs 细胞产生的氧化应激,减少 ROS 产生,进一步减少细胞凋亡,从而对细胞起到一定的保护作用。

综上所述,PGG 对于 H_2O_2 引起的 GMCs 细胞产生的氧化应激有一定抗氧化作用,提示 PGG 可能作为一种抗氧化途径解决糖尿病肾病损伤,为后续 PGG 在糖尿病肾病方面的研究提供了一定的理论依据和实验基础。

参考文献:

- [1] 王维聪,王潮,宋学英,等. 44 种中药中 1,2,3,4,6-五-O-倍酰-D-葡萄糖含量的测定[J]. 中国中药杂志,2008,33(6):656-659.
- [2] 欧阳瑞. PGG 及其肠道菌群降解产物的生物活性分析[D]. 广州:华南农业大学,2016.
- [3] Miranda-Vizuet A, Veal EA. Caenorhabditis elegans as a model for understanding ROS function in physiology and disease[J]. Redox Biology,2017,11:708-714.
- [4] 林子桐,张超,沈雪梅. 糖尿病肾病发病机制研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2014,28(5):765-773.
- [5] 郭晓玲,康丽霞,任美芳,等. 黄芪多糖对糖尿病肾病肾小管上皮细胞凋亡、转分化及 ROS 含量的影响研究[J]. 中国免疫学杂志,2018,34(3):388-392.
- [6] 黄丽娟,黄彦峰,王映,等. 茴香提取液对糖尿病大鼠血清 NO、MDA 和 SOD 的影响[J]. 右江民族医学院学报,2016,38(1):14-16.

(下转第 609 页)

海:上海科学技术出版社,2011:60.

- [4] 王磊,夏帅,宫玉霜,等. 氯丙咪嗪对家兔离体小肠平滑肌自发收缩活动的影响[J]. 滨州医学院学报,2018,41(5):321-325,342.
- [5] 李志东,王慧,张海娟,等. 老龙七水提液对兔离体肠平滑肌收缩的影响[J]. 中国药房,2015,26(4):463-466.
- [6] 黄永毅,王彩冰,黄彦峰,等. 核桃叶提取液对离体小肠收缩功能的实验研究[J]. 右江民族医学院学报,2015,37(6):789-790,795.
- [7] 张昌壮,金银花,佟亚楠,等. 木蝴蝶化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发,2013,25(5):628-630.
- [8] 李书灵,陆珏秀,余艾虹,等. 儿茶素对家兔离体小肠平滑肌收缩功能和机制的实验研究[J]. 世界最新医学信息文摘,2018,18(28):162-163.
- [9] 杨敏,卢静,牟金金,等. 冬凌草甲素对家兔肠平滑肌活动的影响[J]. 中国药业,2012,21(14):26-28.

- [10] 翟玉荣,刘波,莫镇涛,等. 茉莉花叶水提物对小肠平滑肌的影响[J]. 中国老年学杂志,2015,35(11):2964-2965.
- [11] 王慧,张海娟,李志东. 忍冬藤提取物对兔离体肠平滑肌的舒张作用及其机制[J]. 中国农业科学,2017,50(2):372-379.
- [12] 陈钟权,符春茹,符凤亲,等. 胡椒碱对槟榔碱促进家兔离体小肠平滑肌运动的影响[J]. 世界华人消化杂志,2019,27(1):20-28.
- [13] 向德标,阳漾,刘小娟,等. 地锦草醇提物对兔离体小肠平滑肌作用及机制研究[J]. 中国医院药学杂志,2015,35(15):1371-1375.
- [14] 吴悦,钟雯雅,倪陆桥,等. 桃仁提取液对家兔小肠收缩运动影响的研究[J]. 浙江中医杂志,2018,53(3):178-180.

收稿日期:2019-08-12;修回日期:2019-08-29

(上接第 604 页)

- [7] Steinbrenner H, Sies H. Protection against reactive oxygen species by selenoproteins [J]. *Biochem Biophys Acta*, 2009,1790(11):1478-1485.
- [8] Coughlan MT, Sharma K. Challenging the dogma of mitochondrial reactive oxygen species overproduction in diabetic kidney disease[J]. *Kidney Int*, 2016,90(2):272-279.
- [9] Huang WY, Wu H, Li DJ, et al. Protective Effects of Blueberry Anthocyanins against H₂O₂-Induced Oxidative Injuries in Human Retinal Pigment Epithelial Cells[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2018,66(7):1638-1648.
- [10] 文丽梅,卢帅,吕国栋,等. 过氧化氢诱导人肝癌细胞 BEL7402 产生氧化应激细胞模型的建立[J]. 安徽医药, 2019,23(1):37-41.
- [11] 曾涵芳,张林,陈孟姣,等. 黄芪多糖对 H₂O₂ 诱导的奶牛乳腺上皮细胞氧化损伤及凋亡的影响[J]. 南京农业

大学学报,2019,42(5):903-910.

- [12] Yang BY, Han W, Han H, et al. Effects of lignans from schisandra chinensis rattan stems against A β 1-42-induced memory impairment in rats and neurotoxicity in primary neuronal cells [J]. *Molecules*, 2018, 23(4): E870.
- [13] Fattman CL, Schaefer LM, Oury TD. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine [J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2003,35(3): 236-256.
- [14] Yang LL, Huang MS, Huang CC, et al. The association between adult asthma and superoxide dismutase and catalase gene activity[J]. *International Archives of Allergy & Immunology*, 2011,156(4): 373-380.
- [15] 张建博,谢雨,杨浩然,等. 五没食子酰基葡萄糖治疗 2 型糖尿病及其并发症药效机制研究进展[J]. 中国免疫学杂志,2015,34(3):344-348,352.

收稿日期:2019-09-09;修回日期:2019-10-12