

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2018.03.036

蝉花提取物通过促进 HeLa 细胞氧化胁迫 应答抑制 H₂O₂ 诱导的细胞衰老

王为岩¹, 高雪洁¹, 刘冰花^{1,2}, 杨力¹, 闫孟力¹, 刘科¹

(1. 四川大学生命科学学院生物资源与生物环境重点实验室, 成都 610065;

2. 成都大学医学院生物化学与分子生物学教研室, 成都 610106)

摘要: 本实验探究蝉花提取物(CCE)通过促进 HeLa 细胞的氧化胁迫应答抑制 H₂O₂ 诱导的细胞衰老. 在实验中,使用不同浓度的 CCE 处理 HeLa 细胞 48h 或 72h,检测细胞的存活率. 然后使用 H₂O₂ 在 HeLa 细胞中诱导氧化胁迫,检测 CCE 处理组和对照组细胞的 β -半乳糖苷酶活性和 ROS 水平的变化. HeLa 细胞经 CCE 处理 72h 之后,提取 RNA,通过实时荧光定量实验检测 CAT、SOD1、SOD2、GPX1 等抗氧化基因的表达量. 结果表明:CCE 抑制 HeLa 细胞的增殖,且呈剂量依赖效应,较低浓度的 CCE(≤ 0.100 mg/mL)对细胞生长无明显抑制作用. 0.100mg/mL 的 CCE 处理 HeLa 细胞 72h 后能够显著地促进 CAT 和 SOD1 等基因的转录,从而降低 H₂O₂ 产生的过量 ROS,抑制细胞衰老.

关键词: 蝉花; 活性氧; 抗氧化; 抗衰老

中图分类号: Q591

文献标识码: A

文章编号: 0490-6756(2018)03-0632-05

Cordyceps cicadae extracts has a protect effect against H₂O₂-induced cellular senescence by promoting oxidative stress response in HeLa cells

WANG Wei-Yan¹, GAO Xue-Jie¹, LIU Bing-Hua^{1,2}, YANG Li¹, YAN Meng-Li¹, LIU Ke¹

(1. Key Laboratory of Bio-Resources and Eco-Environment of Ministry of Education, College of Life Sciences,

Sichuan University, Chengdu 610065, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology,

Medical College, Chengdu University, Chengdu 610106, China)

Abstract: This study aims to investigate the protective role of Cordyceps cicadae extracts(CCE)against H₂O₂-induced oxidative stress in HeLa cells. HeLa cells were treated with CCE for 48h and 72 h to check cell viability. The SA- β -Gal activity and intracellular ROS was detected under the microscope after H₂O₂ treatment. The mRNA levels of CAT, SOD1, SOD2 and GPX1 were measured by real time PCR in HeLa cells after CCE treatment. Results show that CCE inhibited the growth of HeLa cells in a dose-dependent manner. Pre-treated HeLa cells with CCE (0.100mg/mL) showed decrease cellular senescence and level of ROS against H₂O₂-induced oxidative stress. CCE can increase CAT and SOD1. Our results indicate that the CCE has protective effect against H₂O₂-induced cellular senescence in HeLa cells.

Keywords: Cordyceps cicadae; ROS; Anti-oxidant; Anti-aging

收稿日期: 2017-04-04

基金项目: 成都市科技人才发展工程项目(2015-RC02-00040-HZ)

作者简介: 王为岩(1990-), 男, 山西晋中市, 硕士, 主要从事生物化学与分子生物学研究. E-mail: 672575199@qq.com

通讯作者: 刘科. E-mail: Kliu@scu.edu.cn

1 引言

活性氧(ROS)是人体正常代谢的产物,低浓度的活性氧是重要的信号分子,具有保护细胞的作用^[1],但是阿尔兹海默病等疾病会导致机体产生大量 ROS,导致氧化胁迫的发生,进而对细胞内的 DNA,蛋白质,线粒体等造成损伤^[6].清除氧化胁迫产生的活性氧是延缓细胞衰老的一种有效手段,天然抗氧化剂具有清除 ROS 功能,对肿瘤、阿尔兹海默病、帕金森症、心脑血管等疾病有明显的防治作用^[2-4].

该文选取我国传统中草药蝉花,从抗氧化的角度出发,研究蝉花提取物(CCE)在促进氧化胁迫应答抑制 H₂O₂ 诱导的 HeLa 细胞衰老中的效果^[5],研究发现 CCE 能够通过诱导抗氧化防御基因 CAT 和 SOD1 的转录,增强哺乳动物细胞的氧胁迫抵抗能力,降低胞内活性氧的水平,从而抑制细胞衰老的发生.该研究对以蝉花为代表的我国传统中药的研究开发应用有参考意义.

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 试剂 HeLa 细胞(本实验室提供),蝉花干粉(浙江泛亚生物医药股份有限公司),DMEM 高糖培养基、胰蛋白酶(Hyclone 公司),CCK-8 试剂盒(北京庄盟生物公司),胎牛血清、二甲基亚砜(DMSO)(Giobco 公司),细胞衰老特异性 β -半乳糖苷酶原位染色试剂盒(上海杰美基因医药科技有限公司),DCFH-DA(Sigma 公司),RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、实时荧光定量试剂盒(Takara, 公司).

2.1.2 主要仪器和设备 生物安全柜(中国苏州安泰有限责任公司),CO₂ 恒温培养箱(美国 Thermo 公司),iMark(美国 Bio-rad 公司),倒置荧光显微镜(Nikon eclipse Ti-U),倒置显微镜(中国北京瑞邦科技有限公司),培养皿(美国 Corning 公司),超纯水处理系统(美国 Millipore 公司),-80℃ 低温冰箱(美国 Thermo 公司).

2.2 实验方法

2.2.1 蝉花提取物的制备 将 2g 蝉花干粉和 20mL 95%乙醇放入带磨口塞的 50mL 锥形瓶中(盖上塞子),混匀,30℃ 200r/min 振摇 48h.过滤,收集滤液.40℃ 旋转蒸发滤液,得到淡黄色粉末状的 CCE.将 CCE 溶于无水乙醇,配成 100 mg/mL CCE 醇溶液备用.

2.2.2 HeLa 细胞的培养 将 HeLa 细胞传代入 DMEM 高糖培养基(含 10%胎牛血清、1%双抗),37℃、5% CO₂ 培养.

2.2.3 CCE 对 HeLa 细胞增殖影响的检测 将对数期的 HeLa 细胞以 1×10^4 个/孔的密度接种到 96 孔板中,37℃、5% CO₂ 培养 24h.然后分别加入浓度为 0、0.050、0.100、0.250、0.500 和 1.000 mg/mL 的 CCE,每个浓度平行 5 个孔,培养 48、72 h.弃去培养基,PBS 缓冲液清洗 2 遍后向每个孔中加入 100 μ L 培养基以及 10 μ L CCK-8 试剂,37℃ 培养箱中孵育 2h.用酶标仪检测波长 450 nm 处的吸光度(参考波长为 630 nm).细胞存活率计算公式:细胞存活率=(A_{treatment}/A_{control}) \times 100%.做三组独立重复实验.

2.2.4 细胞衰老的检测 将对数期的 HeLa 细胞以 1.0×10^5 个/孔的密度接种于 24 孔板中,37℃、5% CO₂ 培养.24h 后向 CCE 处理组细胞中加入 0.100 mg/mL 的 CCE,继续 37℃、5% CO₂ 培养 72h.然后将 24 孔板中旧的培养基弃去,PBS 缓冲液清洗两遍,衰老组细胞中加入 400 μ M H₂O₂ 后放回培养箱继续培养 4h.然后弃去培养基,用 PBS 缓冲液洗涤 2 遍,加入新鲜的完全培养基,继续培养 48h,以确保细胞稳定衰老^[6].用细胞衰老染色试剂盒对细胞进行染色,衰老细胞染色后呈蓝色,在显微镜下统计衰老细胞的百分比.做三组独立重复实验.

2.2.5 细胞内 ROS 水平的测定 将对数期的 HeLa 细胞以 5×10^5 个/孔的密度分别接种到 6 孔板的 4 个孔中,37℃、5% CO₂ 培养 24h.向 CCE 处理组加入 0.100mg/mL 的 CCE,放回培养箱继续培养 72h.然后将 6 孔板中旧的培养基弃去,PBS 缓冲液清洗两遍,每孔加入含有 10 μ M DCFH-DA 探针的 PBS 缓冲液 1mL,37℃ 避光孵育.30min 后弃去探针孵育液,PBS 缓冲液洗涤两遍.然后向 H₂O₂ 处理组细胞中加入 400 μ M H₂O₂,其余细胞加入等体积的 PBS 缓冲液作为对照,孵育 30min.然后在荧光显微镜下观察 ROS 的变化(激发波长为 488nm,发射波长为 525nm).做三组独立重复实验.

2.2.6 实时荧光定量 PCR 检测 CAT、SOD1、SOD2、GPH-Px 基因表达 按照 2.3.5 的方法将 HeLa 细胞接种到 6 孔板的 6 个孔中,37℃、5% CO₂ 培养 24h.向其中的三个孔中分别加入 0.100mg/mL 的 CCE(另外的三个孔作为对照),放

回培养箱继续培养. 72h 后用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 然后用逆转录试剂盒将 mRNA 逆转录为 cDNA, 再用实时荧光定量试剂盒分别检测基因 SOD1、SOD2、CAT、GPH-Px 的表达量. 其中, β -actin 基因的上游引物为 5'-TCACCCACACTGT-GCCCATCTACGA-3', 下游引物为 5'-CAGCG-GAACCGCTCATTGCCAA TGG-3'; SOD1 基因的上游引物为 5'-TTGGGCAATGTGACTGCT-GACAAA-3', 下游引物为 5'-GGGCGATC-CCAATTACACCACA A-3'; SOD2 基因的上游引物为 5'-CTGATTTGGACAAGCAGCAA-3', 下游引物为 5'-CTGGACAAACCTCAGCCCTA-3'; GPH-Px 基因的上游引物为 5'-AATGTGGCGTC-CCTC TGAGGCA-3', 下游引物为 5'-GCTCGT-TCATCTGGGTGTAGTCCCG-3'; CAT 基因的上游引物为 5'-CCTATCCTGACACTCACCGCCATCG-3', 下游引物为 5'-GGATGCTGTGCTCCAGGGCA-GA-3'^[7]. 采用 25 μ L 反应体系, 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 30s; 95 $^{\circ}$ C 5s, 75 $^{\circ}$ C 30s, 40 个循环. 以 β -actin 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算基因表达的相对变化. 做三组独立重复实验.

3 实验结果

3.1 CCE 对 HeLa 细胞增殖的影响

以 CCE 的浓度为横坐标, 以细胞存活率为纵坐标作图, 如图 1 所示. 结果显示高浓度的 CCE 对细胞的增殖有抑制作用, 抑制作用随着 CCE 浓度的增加而增强, 且呈剂量依赖性关系; 低浓度 (≤ 0.100 mg/mL) 的 CCE 对细胞的生长无明显抑制作用. 后续实验 CCE 的浓度均为 0.100 mg/mL.

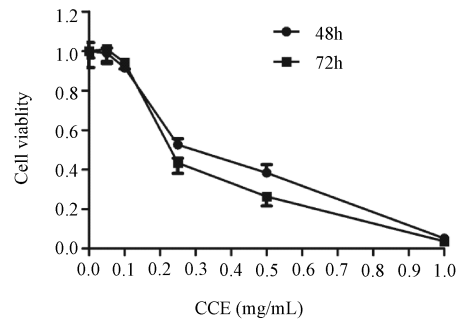


图 1 CCE 对 HeLa 细胞增殖的影响
Fig. 1 The effect of CCE on the proLiferation of HeLa cells

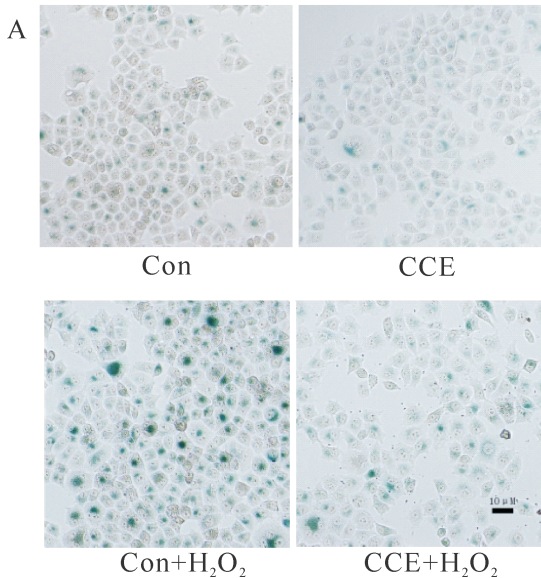


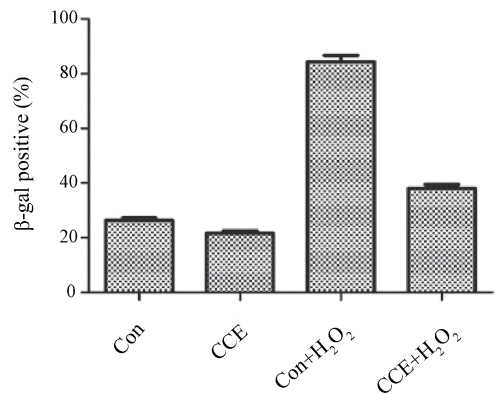
图 2 CCE 抑制 H₂O₂ 诱导的细胞衰老

A. HeLa 细胞衰老染色; B. 对衰老的细胞进行定量

Fig. 2 HeLa cells pre-treated with CCE were resistant to H₂O₂-induced cellular senescence

A. representative fields; B. quantification of SA- β gal-positive cells

B



3.2 CCE 抑制 H₂O₂ 诱导的细胞衰老

细胞衰老实验表明, 如图 2 所示, Con 组和 CCE 组细胞的衰老程度无明显区别, Con+H₂O₂ 组细胞的衰老程度明显高于 Con 组细胞的衰老程度, 而 CCE+H₂O₂ 组细胞的衰老程度略高于 CCE

组细胞但远远低于 Con+H₂O₂ 组细胞的衰老程度. 证明 CCE 可以抑制 H₂O₂ 诱导的细胞衰老.

3.3 CCE 抑制 H₂O₂ 诱导的 ROS 产生

使用 DCFH-DA 荧光探针检测细胞内的 ROS, DCFH-DA 进入细胞后经过酶切反应生成

DCFH, 与 ROS 反应生成发绿色荧光的 DCF, 荧光强度与 ROS 的含量成正比. 实验结果表明, CCE 组细胞的 ROS 含量与 Con 组细胞无明显差别, Con+H₂O₂ 组细胞 ROS 含量比 Con 组细胞高得

多; 虽然 CCE+H₂O₂ 组细胞的 ROS 含量也比 CCE 组细胞高, 但却远远低于 Con+H₂O₂ 组细胞的 ROS 含量, 如图 3 所示. 证明 CCE 可明显抑制 H₂O₂ 诱导的 ROS 产生.

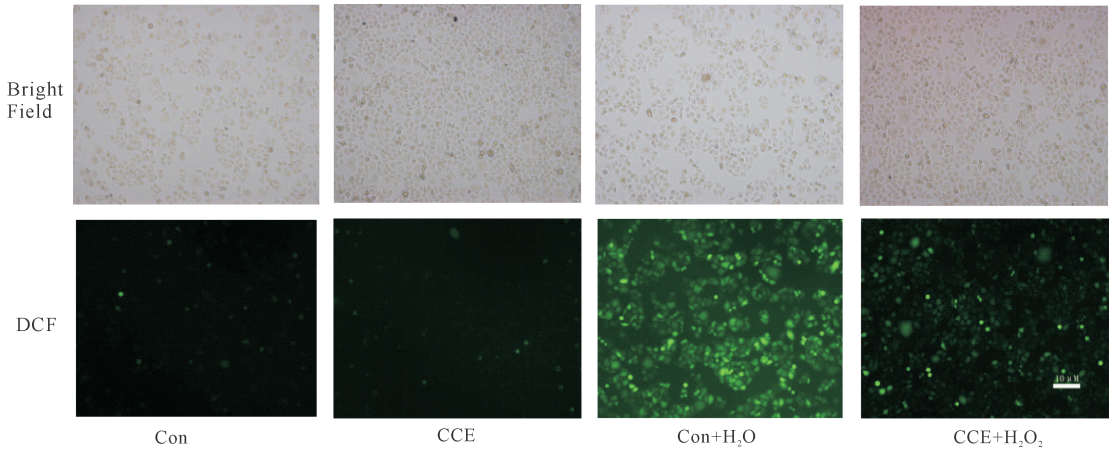


图 3 CCE 抑制 H₂O₂ 诱导的 ROS 产生

HeLa 细胞经 0.100mg/mL 的 CCE 处理 72h, 之后孵育 DCFH-DA 探针 30min, PBS 洗涤两遍之后, 加入 400 μ M H₂O₂ 处理 30min, 在荧光显微镜下观察 ROS 水平

Fig. 3 CCE decrease H₂O₂-induced ROS increase. HeLa cells were pre-treated with CCE (0.100mg/mL) for 72h and then were stained using DCFH-DA for 30min, then PBS wash twice. HeLa cells were treated with 400 μ M H₂O₂ for 30min, the ROS lever was detected under fluorescence microscope

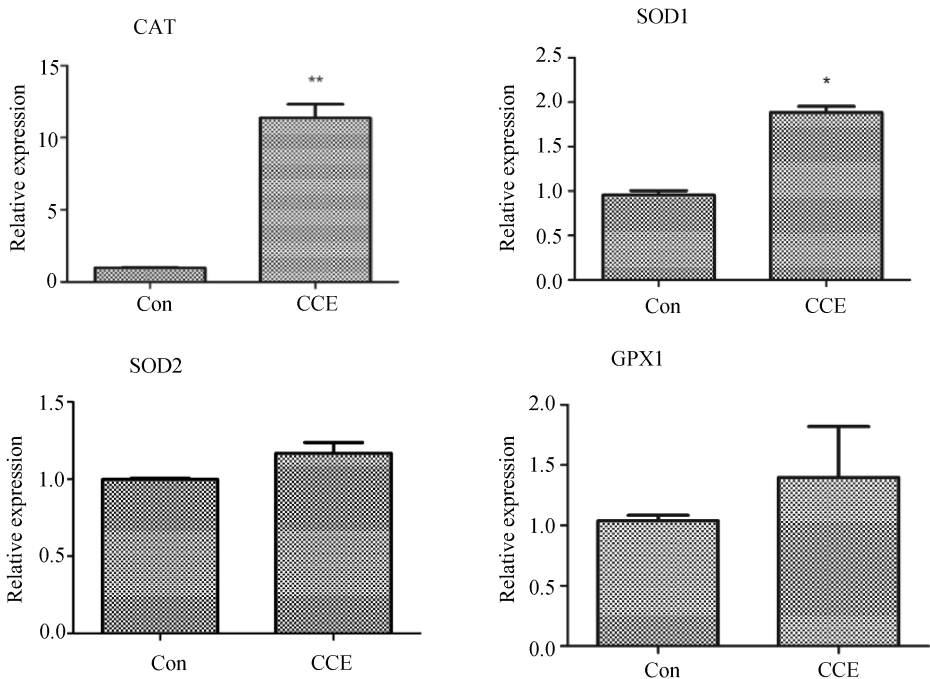


图 4 CCE 提高 CAT、SOD1 的 mRNA 水平表达量, * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$.

Fig. 4 CCE upregulate the mRNA level of CAT、SOD1 in HeLa cells, * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$.

3.4 CCE 对 CAT、SOD1、SOD2 和 GPX1 基因表达的影响

CAT、SOD1、SOD2 和 GPX1 基因的相对表达量如图 4 所示, CAT mRNA 水平上调了 14 倍左

右, SOD1 mRNA 水平上调了 1 倍左右, 可知 CCE 可以明显提高 HeLa 细胞 CAT 和 SOD1 mRNA 的表达水平; 而 CCE 对 SOD2 和 GPX1 mRNA 水平没有明显影响, 证明 CCE 的抗氧化活性主要是

通过上调 CAT 和 SOD1 的表达所致。

4 讨 论

氧化胁迫理论(the oxidative stress theory, OST)是最为流行的衰老生物学理论之一,其在分子水平上阐述了衰老是源自于氧化损伤导致的机体在氧化防御、DNA 修复、端粒结构、免疫功能、代谢调控等方面产生的障碍^[8,9,10]。活性氧在衰老调控途径中起着非常重要的作用,如热量限制在延缓衰老延长寿命的同时能够增强抗氧化因子的表达^[11]。而 Sirtuins,特别是 Sirt3 可以通过调控 SOD 活性及线粒体活性氧水平来调控衰老^[12]等。

本实验从抗氧化的角度出发,以 HeLa 细胞作为体外模型,检测 CCE 对 HeLa 细胞氧化胁迫应答的影响。结果显示,高浓度 CCE 可以显著抑制 HeLa 细胞的生长,且呈剂量依赖效应;低浓度($\leq 0.100\text{mg/mL}$)的 CCE 对 HeLa 细胞的生长没有明显的抑制作用。选择 0.100mg/mL CCE 进一步研究发现,CCE 处理组细胞对氧化胁迫的抵抗能力增强,能够有效的降低 H_2O_2 导致的细胞衰老和 ROS 的上升;通过对细胞内具有抗氧化能力的一些基因 CAT、SOD1、SOD2、GPX1 的表达进行检测发现,CCE 能够显著地促进 CAT 和 SOD1 等基因的转录。最后我们得出结论:蝉花提取物能够通过诱导抗氧化防御基因 CAT 和 SOD1 的表达,增强哺乳动物细胞的氧胁迫抵抗能力,降低胞内活性氧的水平,从而抑制细胞衰老的发生。

参考文献:

[1] Liu Y, Long J, Liu J. Mitochondrial free radical theory of aging: who moved my premise[J]. *Geriatr Gerontol Int*, 2014, 14: 740.

- [2] 赵保路. 自由基和天然抗氧化剂[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [3] 赵保路. 氧自由基和天然抗氧化剂和健康[M]. 北京: 中国科学文化出版社, 2007.
- [4] 赵保路. 一氧化氮自由基[M]. 北京: 科学出版社, 2008.
- [5] Frippiat C, Chen Q M, RemacLe J, *et al.* Cell cycle regulation in H_2O_2 -induced premature senescence of human diploid fibroblasts and regulatory control exerted by the papilloma virus E6 and E7 proteins[J]. *Exp Gerontol*, 2000, 35: 733.
- [6] Guo G E, Ma L W, Jiang B, *et al.* Hydrogen Peroxide Induces p16INK4a Through an AuF1-Dependent Manner[J]. *J Cell Biochem*, 2010, 109: 1000.
- [7] Pawlowska-Góral K, Kimsa-Dudek M, Synowiec-Wojtarowicz A, *et al.* Effect of static magnetic fields and phloretin on antioxidant defense system of human fibroblasts[J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2016, 23: 14989.
- [8] Chandrasekaran A, Idelchik M D, Melendez J A. Redox control of senescence and age-related disease[J]. *Redox Biol*, 2017, 11: 91.
- [9] 郟蓓蓓, 闫磊, 吕舟, 等. Sch9 通过 Cdc34 调控酵母细胞的寿命和胁迫应答[J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2015, 52: 1145.
- [10] 吕舟, 郟蓓蓓, 闫磊, 等. 酿酒酵母蛋白激酶 Sch9 的 PDK1 位点调控 C 末端磷酸化状态[J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2016, 53: 639.
- [11] Walsh M E, Shi Y, Van Remmen H. The effects of dietary restriction on oxidative stress in rodents[J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 66: 88.
- [12] Bause A S, Haigis M C. SIRT3 regulation of mitochondrial oxidative stress[J]. *Exp Gerontol*, 2013, 48: 643.