DOI:10.19789/j.1004-9398.2016.06.010

5 种甘肃道地中药对 D-半乳糖致衰海马神经元影响的比较研究*

王 昱

(陇南师范高等专科学校生化系,甘肃 成县 742500)

摘 要

目的:研究 5 种甘肃道地中药对 D-半乳糖致衰海马神经元影响的差异. 方法:将用 D-半乳糖致衰原代培养的大鼠海马神经元分别用 5 种中药处理. 实验分为正常组、模型组、纹党组、红芪组、当归组、大黄组和半夏组,MTT 法检测海马神经元的增殖能力,以超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)为指标观察细胞的抗氧化能力,ELISA 法检测海马神经元源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、神经生长因子(nerve growth factor, NGF)含量的变化,Western blot 法检测海马神经元 BDNF 和 NGF 的表达水平. 结果:与正常组相比,模型组海马神经元增殖能力及 SOD、GSH-Px、BDNF 和 NGF 的水平显著降低,MDA 含量显著增加. 与模型组比较,各中药组海马神经元增殖能力及 SOD、GSH-Px、BDNF 和 NGF 的水平呈增加趋势,MDA 含量呈降低趋势,纹党组和红芪组上述指标改变更为明显. 结论:纹党、红芪、当归、大黄和半夏的水提液可通过提高海马神经元增殖能力、提高衰老细胞的抗氧化能力、增加 BDNF 和 NGF 的水平而发挥抗衰老作用,纹党和红芪对海马神经元的调节作用优于当归、大黄和半夏.

关键词:道地中药,海马神经元,细胞增殖,抗氧化,神经营养因子.
中图分类号:R285

衰老是机体在生命活动过程中的一种渐进性、累积性的不可逆转的组织、器官的退行性改变,成为心血管疾病、癌症等许多疾病的危险因素,严重危害健康,影响生活质量,但其发生机制目前还不十分清楚[1]. 中医理论以整体观念和辨证论治为主要特点,修补和激发自身的防御系统和自愈系统,达到阴阳平衡的目的. 现代药理学研究表明,中医中药毒副作用小,在治疗常见病、多发病及疑难病症有其独特的优势,在延缓衰老、抗氧化、调节体液免疫、促进淋巴细胞增殖、影响免疫器官等功能方面显示出巨大的潜力[2-3]. 中医对药材质量非常重视,不管是中医处方,或中成药的制作,都要选购道地药材. 甘肃省陇南地区的土壤、水质、气候、雨量等自然条件很适合中药材的生长,是中国主要中药材产地之一,如文县的纹党、武都的红芪、宕昌的当归、礼县的大黄和西和的半夏等道地中药材品种优良、疗效突出. 已有文献报道,纹党、红芪、当归、大黄和半夏有延缓衰老、抗氧化、抗病毒、提高机体免疫力等功能[4-8]. 因此,陇南民间已经将纹党、红芪、当归、大黄和半夏作为抗衰老、美容的药物广泛使用. 但纹党、红芪、当归、大黄和半夏的主要活性成分各异,生物学效应也不尽相同,是否都有抗衰老作用? 还需进一步研究. D-半乳糖致大鼠衰老模型,表现为退行性病变,是一种简便优良的衰老模型. 本实验选用 D-半乳糖制备衰老大鼠模型,之后用纹党、红芪、当归、大黄和半夏进行干预,通过 MTT 法检测海马神经元的增殖能力,以超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶和丙二醛为指标观察细胞的抗氧化能力,以 ELISA 法和 Western blot 法检测海马神经元源性神经营养因子、神经生长因子水平的变化,初步分析比较纹党、红芪、当归、大黄和半夏在抗衰老方面的差异,为道地中药的应用提供实验依据.

1 材料与方法

1.1 材 料

甘肃武都产红芪、宕昌产当归、文县产纹党、

收稿日期:2016-01-19
* 甘肃省自然科学基金项目(1107RJZK243);甘肃省高等学校科研资助项目(2015B-148).

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

礼县产大黄、西和产半夏(由甘肃农业大学李唯教授鉴定);D-半乳糖(北京优尼康生物科技);胰蛋白酶、多聚赖氨酸、阿糖胞苷、胎牛血清、刀豆蛋白 A(ConA)和四甲基偶氮唑盐(MTT)(美国 Sigma 公司);DMSO(上海碧云天生物技术公司);超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)、BDNF 和 NGF 试剂盒(南京建成生物工程研究所);细胞培养基 DMEM/F12 和无血清培养添加剂 B27、bFGF(Peprotech 公司);兔抗 BDNF 和 NGF 抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司);β-actin 抗体、HRP 标记的羊抗兔 IgG(上海碧云天生物技术研究所);0.45 μm 硝酸纤维膜(Solarbio 公司);二氧化碳培养箱(日本 Sanyo 公司);SpectraMax M5 型酶标仪(Molecular Devices,美国);酶联免疫检测仪(ELx800,美国 BioTek 公司);高速台式冷冻离心机(TGL-16M,Beckman 美国)等;出生 4 d 的 SD 大鼠(清洁级,兰州大学实验动物中心,生产许可证编号:SCXK(甘)2005-0007).

1.2　方　法

1.2.1　中药水煎剂溶液的制备

称取纹党、红芪、当归、大黄和半夏各 50 g 置砂锅中,加 10 倍量水浸泡过夜,加热至沸,改用文火煎 30 min,趁热滤过,滤渣另加 8 倍量水,同法煎煮 30 min、滤过,合并 2 次滤液于烧杯中[9],水浴浓缩后放凉至室温,100 mL 容量瓶定容,倒入输液瓶中,盖薄膜,压胶塞和铝盖,高压灭菌(表压 0.7 kg/cm^2、115 ℃、30 min),取出放凉得到五种中药的水煎溶液,并稀释为 1 g/kg 溶液备用.

1.2.2　海马神经元的原代培养

参照文献[10],选用出生后第 4 天的 SD 大鼠,冷冻麻醉,于 4 ℃的解剖液中,在实体显微镜下分离海马,用眼科剪剪碎再用弯头吸管反复吹打,0.125% 胰蛋白酶 37 ℃水浴消化 20 ~ 25 min. 终止消化后弃去消化液,加入含 DMEM/F12 培养液,反复吹打离散,200 目细胞筛过滤. 细胞计数、调整细胞密度为 400 个细胞/mm^2,接种于预先涂有 0.1% 多聚赖氨酸的塑料培养皿中,30 min 后加入含 2% B27、104 μg/L bFGF 培养液,置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中孵育,第 2 天换液时用无血清培养液,第 3 天在培养液中加入 0.005 g/ml 阿糖胞苷以抑制非神经元细胞的过度增殖. 第 4 天更换为无血清培养液,培养 8 天开始实验.

1.2.3　分组与模型

将原代或传代细胞培养至 7 ~ 8 d 后随即分为正常组,模型组(D-半乳糖 40 g/L),及浓度为 6 mg/mL 的红芪、当归、纹党、大黄、半夏和浓度为 40 g/L 的 D-半乳糖构成的红芪组、当归组、纹党组、大黄组和半夏组,各组细胞种植在 96 孔板中,DMEM/F12 培养液,置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱内分别培养 48 h.

1.2.4　细胞增殖能力检测

将细胞悬液加入 96 孔培养板,每孔 100 μL,每个样本设 8 个复孔,其中 4 孔每孔加 100 μL ConA(终浓度为 5 mg/L),另外 4 孔作为对照,于 37 ℃ 5% CO_2 饱和湿度条件下培养 68 h,每孔加 20 μL MTT(浓度为 5 g/L),在振荡器上振荡混匀,继续培养 4 h. 细胞培养终止后,弃上清,每孔加入 150 μL DMSO,振荡混匀,静置数分钟,用酶标仪在 490 nm 处测定每孔的 OD 值,并计算各组的细胞相对存活率(细胞相对存活率 = 实验组 OD 值/空白对照 OD 值).

1.2.5　细胞抗氧化能力测定

取每孔细胞上清液 50 μL,按照检测试剂盒说明书操作,结果分别用 kU/g 和 μmol/g 表示.

1.2.6　BDNF 和 NGF 含量的测定

取适量每组细胞上清液,按照检测试剂盒说明书操作,结果用 μg/L 表示.

1.2.7　Western blot 各组蛋白质表达

按照常规方法提取细胞总蛋白,BCA 法测定总蛋白浓度. 定量后稀释好的样品经过 SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜、封闭(5% 脱脂奶粉,用 TBST 稀释). 将膜取出,加一抗 BDNF 和 NGF(浓度均为 1∶1 000),4 ℃冰箱过夜,充分洗涤,加偶联辣根过氧化物酶(HRP)的二抗(浓度为 1∶5 000),室温下作用 1 h,洗膜后加 ECL 发光液,以 β-actin 作为内参照,运用 Image Lab 软件进行曝光成像,采用 Quantity one 软件分析条带灰度值,实验重复三次.

1.2.8　数据处理

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 13.0 软件进行单因素方差分析,LSD 法进行组间两两比较,以 $p < 0.05$ 表示差异有统计学意义.

2　结　果

2.1　细胞增殖能力的比较

与正常组相比,模型组海马神经元增殖能力

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

显著降低,细胞存活率降为 36.5%($p<0.01$).纹党组、红芪组和当归组海马神经元增殖能力显著高于模型组,细胞存活率分别升高了 39.1%、23.4%和 17.3%,差异具有显著性($p<0.05$,$p<0.01$),纹党组海马神经元增殖能力及存活率与红芪组和当归组差异显著($p<0.05$),红芪组海马神经元增殖能力及存活率与当归组间无显著差异($p>0.05$),大黄组和半夏组海马神经元增殖能力及存活率与模型组相比,无显著差异($p>0.05$,图 1).

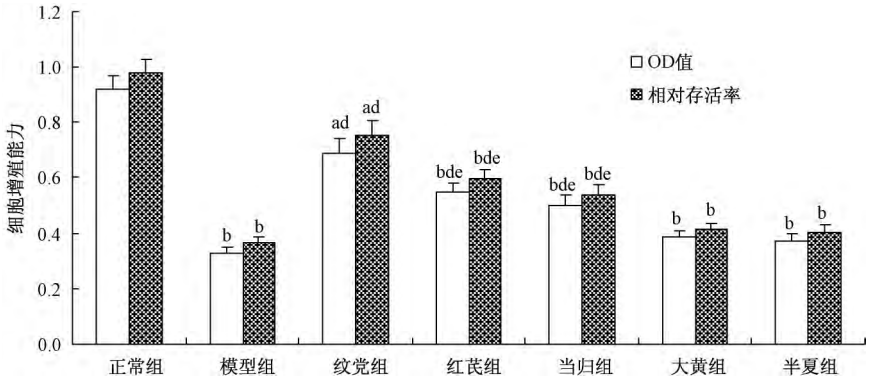


图 1 五种中药对细胞增殖能力的影响

注:与正常组比较,$^{a}p<0.05$,$^{b}p<0.01$;与模型组比较,$^{c}p<0.05$,$^{d}p<0.01$;与纹党组比较,$^{e}p<0.05$(图 2~4 同).

2.2 细胞抗氧化能力的比较

与正常组相比,模型组海马神经元 SOD、GSH-Px 活性显著降低,MDA 含量显著增加($p<0.01$).与模型组相比,各给药组海马神经元 SOD、GSH-Px 活性均有升高趋势,MDA 均有降低趋势,其中纹党组、红芪组和当归组海马神经元 SOD、GSH-Px、MDA 与模型组差异极显著($p<0.01$),纹党组、红芪组和当归组间均无差异($p>0.05$);大黄组和半夏组海马神经元 SOD、GSH-Px、MDA 与模型组差异显著($p<0.05$),大黄组和半夏组间无显著性差异($p>0.05$,图 2).

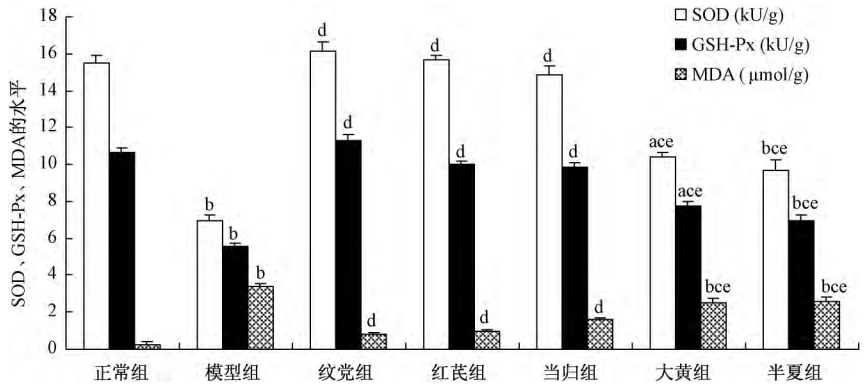


图 2 五种中药对细胞 SOD、GSH-Px、MDA 含量的影响

2.3 细胞 BDNF 和 NGF 含量的比较

与正常组相比,模型组海马神经元 BDNF 和 NGF 含量显著降低($p<0.01$).与模型组相比,各给药组海马神经元 BDNF 和 NGF 含量均呈升高趋势,但纹党组和红芪组海马神经元 BDNF 和 NGF 含量显著高于模型组($p<0.05$,$p<0.01$),纹党组海马神经元 BDNF 含量高于红芪组($p<0.05$),纹党组海马神经元 NGF 含量与红芪组相比无显著性差异($p>0.05$),其余各给药组海马神经元 BDNF 和 NGF 含量与模型组相比,无显著差异($p>0.05$,图 3).

2.4 Western blot 蛋白质表达的比较

与正常组比较,模型组细胞 BDNF 和 NGF 表达明显降低,差异极显著($p<0.01$).各给药组与模型组比较,纹党组和红芪组细胞 BDNF 和 NGF 表达增加明显($p<0.05$,$p<0.01$),纹党组细胞 BDNF 表达高于红芪组($p<0.05$),但 NGF 表达与红芪组无显著差异($p>0.05$).其余各组细胞

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

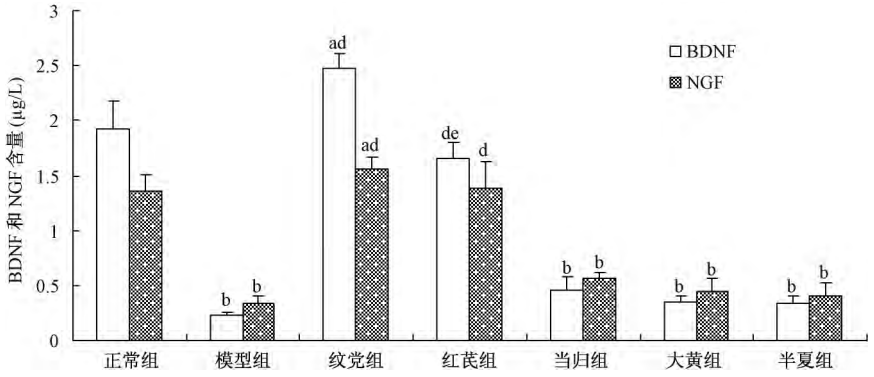


图 3　五种中药对细胞 BDNF 和 NGF 含量的影响

BDNF 和 NGF 表达与模型组比较均无明显差异 ($p > 0.05$,图 4). BDNF 和 NGF 积分吸光度值与 β-actin 积分吸光度值的比值见图 5.

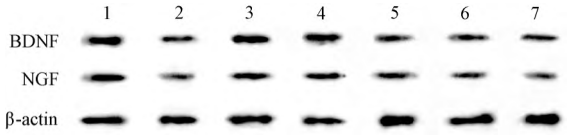


图 4　海马神经元 BDNF 和 NGF 蛋白质印迹分析

注: 1. 正常组; 2. 模型组; 3. 纹党组; 4. 红芪组; 5. 当归组; 6. 大黄组; 7. 半夏组.

3　讨论和结论

衰老是机体的生理功能逐渐下降,组织器官逐步发生退行性改变,并最终走向死亡的过程. 现代医学研究发现纹党[4]、红芪[5]、当归[6]、大黄[7]、半夏[8]及其有效提取物对中枢神经系统、消化系统、免疫系统、内分泌系统等有广泛的作用,可通过调节机体体液免疫、细胞免疫、抗氧化等,来达到增强机体对有害刺激的非特异性抵抗力. 已有文献报道,黄芪、红芪水煎液可穿过血脑屏障减轻受损的神经元[11-12]. 本实验结果显示,与正常组比较,模型组海马神经元增殖能力和细胞存活率显著降低; 与模型组比较,纹党组、红芪组和当归组海马神经元增殖能力和细胞存活率显著升高,而大黄组和半夏组海马神经元增殖能力及存活率与模型组相比差异不显著,表明纹党、红芪和当归通过提高细胞的增殖能力对致衰细胞具有较好的保护作用,与大黄、半夏相比,体现了纹党、红芪和当归抗衰老作用的优越性.

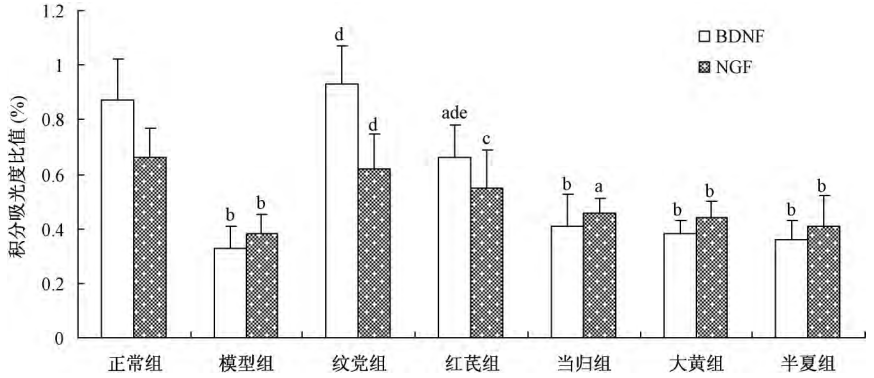


图 5　五种中药对海马神经元 BDNF 和 NGF 表达的影响

自由基学说认为机体代谢过程产生的自由基与体内蛋白质、脂肪等物质发生反应,对细胞产生严重损伤,从而引起衰老[13]. SOD 和 GSH-Px 是动物机体内重要的抗氧化剂,可清除多种自由基. MDA 是自由基和脂质过氧化的代谢终产物,可引起多种毒性反应,形成老年斑、脂褐素等异常代谢产物,造成机体衰老和多种疾病[14]. 本实验发现,模型组海马神经元 SOD、GSH-Px 的活性均显著低于正常组,MDA 含量的显著增加,经纹党、红芪、当归、大黄和半夏处理后海马神经元 SOD、GSH-Px 的活性均显著升高,MDA 含量的显著降低,与模型组比较均有统计学意义,其中纹党组、红芪组和当归组海马神经元 SOD、GSH-Px、MDA 与模型组间差异极显著,表明这 5 种道地中药在抗脂质过氧化和清除氧自由基的作

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

用方面具有相似的功能,而纹党、红芪、当归在提高机体抗氧化能力方面高于大黄和半夏.

BDNF 和 NGF 是神经系统最主要的生物活性分子,也是神经营养因子家族中的重要成员,对神经细胞的生长发育、分化、再生等发挥重要作用[15,16]. 本研究结果表明,模型组与正常组相比,海马神经元 BDNF 和 NGF 的表达水平显著降低. 经纹党、红芪、当归等中药处理后,海马神经元 BDNF 和 NGF 的表达水平均呈升高趋势,其中纹党和红芪效果更为明显,表明纹党和红芪在提高 D-半乳糖致衰海马神经元营养活性方面高于其他几种中药,这也可能是中药发挥神经保护作用的机制之一.

综上所述,本实验从促进细胞增殖力、抗氧化及神经营养因子水平等相关指标着手,比较了纹党、红芪、当归、大黄和半夏水提物对衰老海马神经元的影响,结果表明,纹党和红芪对衰老神经元的调节作用优于当归、大黄和半夏. 据此,在治疗临床衰老相关疾病、延缓机体的衰老进程时可以优选纹党和红芪,也为道地中药复方的开发提供了实验依据.

参 考 文 献

[1] 雷超,张力华,苏婷. 加味四君子汤对衰老大鼠的脾脏及细胞因子的影响[J]. 中华中医药杂志,2014,29(9):2941-2944.

[2] Zhang W, Li R, Wang S, et al. Effect of Chinese traditional herb Epimedium grandiflorum C. Morren and its extract Icariin on osteoarthritis via suppressing NF-kappaB pathway[J]. Indian J Exp Biol, 2013, 51(4):313-321.

[3] Xie S, Ling X L. Regulation effects of Auricular Acupuncture, Moxibustion and Chinese herbs on immunologic function in the D-galactose-induced aging mouse[J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2008, 28(2): 129-133.

[4] 何敏,伍春,明海霞,等. 甘肃党参水煎剂对 D-半乳糖诱导衰老小鼠免疫功能的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2013,29(8): 794-797.

[5] 蔺兴遥,张毅,李娟,等. 黄芪黄酮与红芪黄酮对肺间质纤维化模型大鼠肺功能影响的对比研究[J]. 中成药,2013,35(8): 1770-1773.

[6] 张梦思,邹婷,叶渊文,等. 当归多糖对衰老模型大鼠脾脏结构与功能的影响[J]. 解剖学报,2015,22(2): 310-311.

[7] Lin C C, Lee M H, Lin J H, et al. Crude extract of *Rheum palmatum* L. Induces cell cycle arrest S phase and apoptosis through mitochondrial-dependent pathways in U-2 OS human osteosarcoma cells[J]. Environmental Toxicology, 2015, 30(2): 1-13.

[8] Xu T, Wang B, Wang L, et al. Pinellia ternata agglutinin produced in Bombyx mori cells exhibits bioactivity[J]. Acta Biochim Pol, 2012, 59(2):231-236.

[9] 王璟. 如何煎制中药汤剂[J]. 首都医药,2000,7(2): 55.

[10] 张亚丽,常丽荣,宋一志,等. 淀粉样蛋白对培养海马神经元 NMDA 受体亚单位磷酸化及其细胞定位的影响[J]. 神经解剖学杂志,2013,29(5): 479-483.

[11] 孙念霞. 黄芪提取物对脑缺血再灌注大鼠线粒体功能的影响[D]. 承德:承德医学院,2014.

[12] 刘永琦,王志旺,魏舒畅,等. 超滤与醇沉对黄芪、红芪抗大鼠脑缺血的影响[J]. 中国应用生理学杂志,2015,31(2): 132-135

[13] Afanas'ev I. Signaling and damaging functions of free radicals in aging-free radical theory, hormesis, and TOR[J]. Aging Dis, 2010, 1(2): 75-88.

[14] Palmer D M, Kitchin J S. Oxidative damage, skin aging, antioxidants and a novel antioxidant rating system[J]. Journal of Drugs in Dermatology, 2010, 9(1): 11-15.

[15] Zhao J, Xu H, Tian Y, et al. Effect of electroacupuncture on brain-derived neurotrophic factor mRNA expression in mouse hippocampus following cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. J Tradit Chin Med, 2013, 33(2):253-257.

[16] Cui Q, Zhang J, Zhang L, et al. Angelica injection improves functional recovery and motoneuron maintenance with increased expression of brain derived neurotrophic factor and nerve growth factor[J]. Curr Neurovasc Res, 2009, 6(2): 117-123.

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Comparative Study of Five Kinds of Gansu Authentic Chinese Herbal Medicine on the Aging Hippocampal Neurons Induced by D-galactose

Wang Yu

(Department of Biology and Chemistry, Longnan Teachers College, Chengxian Gansu 742500)

Abstract

Objective: Study on the differences among five kinds of Gansu authentic Chinese herbal medicine by influence on aging hippocampal neurons induced by D-galactose. Methods: The five kinds of Chinese herbal medicine were applied to treat aging cultured hippocampal neurons induced by D-galactose, respectively. Samples were randomly divided into normal control group, model group, *Codonopsis pilosula* group, *Astragali radix* group, *Angelica sinensis* group, *Rheum palmatum* L group and *Pinellia ternate* group. MTT test was used to determine the ability of cell proliferation. Then superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and malondialdehyde (MDA) were taken as indices of antioxidant function. The contents of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) were evaluated by ELISA method. Western blot was used to analyze expressions of BDNF and NGF in hippocampal neurons. Results: Compared with normal control group, the ability of cell proliferation and levels of SOD, GSH-Px, BDNF, NGF were markedly reduced, while MDA content was significantly increased in aging model group. Compared with model group, the ability of cell proliferation and levels of SOD, GSH-Px, BDNF, NGF showed increasing trend, MDA content tended to decrease in herb groups. These indexes became more significant in the *Codonopsis pilosula* group and *Astragali radix* group. Conclusion: The aqueous extracts of *Codonopsis pilosula*, *Astragali radix*, *Angelica sinensis*, *Rheum palmatum* L and *Pinellia ternata* could exert anti-aging effected by enhancing the ability of cell proliferation, improving antioxidant capacity and increasing expressions of BDNF and NGF in aging hippocampal neurons. Moreover, *Codonopsis pilosula* and *Astragali radix* have better regulation effects on hippocampal neurons than those of *Angelica sinensis*, *Rheum palmatum* L and *Pinellia ternata*.

Key words: authentic Chinese herbs, hippocampal neuron, cell proliferation, antioxidation, neurotrophin.

作者简介　王昱(1973 -),男,甘肃省天水市人,硕士研究生,教授. 研究方向: 细胞与发育生物学. E-mail: gswangyu@126.com

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net