

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.16.004

宁夏无果枸杞芽水提物对老年小鼠心肌细胞抗氧化及凋亡蛋白表达的影响*

马新伟¹, 刘郎^{2#}, 曹羿堃³, 严青¹, 秦毅¹, 贾桦¹, 张莲香^{1,4△}

(1. 宁夏医科大学基础医学院人体解剖与组织胚胎学系, 银川 750004; 2. 宁夏医科大学总医院, 银川 750004; 3. 宁夏回族自治区石嘴山市第一人民医院 753600; 4. 宁夏颅脑疾病重点实验室, 银川 750004)

[摘要] 目的 观察宁夏无果枸杞芽水提物对老年小鼠心肌细胞抗氧化能力及凋亡相关蛋白表达的影响。方法 将 13 个月龄自然衰老的 C57BL/6J 小鼠分为老年对照组和 AEFLS 低剂量组(AEFLS1 组)、AEFLS 中剂量组(AEFLS2 组)、AEFLS 高剂量组(AEFLS3 组)。AEFLS1 组、AEFLS2 组、AEFLS3 组分别给予 5、10、20 mg/kg 的 AEFLS 灌胃, 老年对照组灌胃生理盐水, 连续 8 周。分别用黄嘌呤氧化酶法和硫代巴比妥酸法测定心脏组织 SOD 和 MDA 的水平; Western-blot 技术和免疫组织化学方法检测小鼠心肌组织 Bcl-2、Bax 和 Capase-3 的表达。结果 与老年对照组比较, AEFLS2 和 AEFLS3 组 MDA 水平降低, SOD 活性升高, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。Western-blot 结果: 与老年对照组比较, AEFLS2 和 AEFLS3 组的 Bcl-2 蛋白光密度值升高, Bax 和 Capase-3 蛋白光密度值降低($P < 0.01$); 免疫组化结果: 与老年对照组比较, AEFLS2 和 AEFLS3 组 Bcl-2 蛋白免疫阳性表达均升高, Bax 和 Capase-3 蛋白免疫阳性表达降低($P < 0.01$)。结论 中、高剂量的 AEFLS 能提高衰老小鼠的心肌组织抗氧化能力, 上调 Bcl-2 的表达, 下调 Capase-3 和 Bax 的表达, 发挥抗心肌细胞凋亡的作用。

[关键词] 衰老; 无果枸杞芽; 心脏; 抗氧化; 凋亡

[中图分类号] R285

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)16-2170-04

Effect of Ningxia fruitless lycium sprout extracts on cardiomyocyte antioxidation and apoptotic protein expression in aging mice*

Ma Xinwei¹, Liu Lang^{2#}, Cao Yikun³, Yan Qin¹, Qin Yi¹, Jia Hua¹, Zhang Lianxiang^{1,4△}

(1. Faculty of Human Anatomy, Histology and Embryology, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China;

2. General Hospital, Affiliated Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China;

3. Shizuishang Municipal First People's Hospital, Shizuishang, Ningxia 753000, China;

4. Ningxia Key Laboratory of Cerebrocranial Diseases, Yinchuan, Ningxia 750004, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effect of Ningxia aqueous extracts of fruitless lycium sprout (AEFLS) on cardiomyocyte antioxidation and apoptosis-related protein expression in aging mice. **Methods** The natural aging C57BL/6J mice with 13 months old were randomly divided into aged control group, AEFLS low dose group (AEFLS1), AEFLS middle dose group (AEFLS2) and AEFLS high dose group (AEFLS3). The AEFLS1, AEFLS2 and AEFLS3 groups were respectively given with 5, 10, 20 mg/kg AEFLS gavage, while the aged control group was given with the normal saline gavage, for continuous 8 weeks. The xanthine oxidase assay and thiobarbituric acid method were used for the determination of SOD and MDA in heart tissues. Western-blot and immunohistochemical method were used to detect the expressions of Bcl-2, Bax and Capase-3 in heart tissue. **Results** Compared with the aged control group, the MDA level in the AEFLS2 and AEFLS3 groups was decreased, while the SOD activity was increased, the difference was statistically significant ($P < 0.01$). The Western-blot result showed that compared with the aged control group, the optical density value of Bcl-2 in the AEFLS2 and AEFLS3 groups was increased, but the optical density values of Bax and Capase-3 were decreased ($P < 0.01$); the immunohistochemical results showed that compared with the aged control group, the immunopositive(IP) expressions of Bcl-2 protein in heart tissues in the AEFLS2 and AEFLS3 groups were increased ($P < 0.01$), while the IP expressions of Bax and Capase-3 were decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** Middle and high doses of AEFLS can increase the antioxidative ability of myocardial tissue, up-regulates the Bcl-2 expression, down-regulates the Bax and Capase-3 expressions and plays anti-cardiomyocyte apoptotic role.

[Key words] aging; aqueous extract of fruitless lycium sprout; heart; antioxidant; apoptosis

研究表明,随着年龄的增加心脏功能逐渐减退,其主要原因一方面老年心肌细胞不能再生,另一方面随着年龄的增长心肌细胞的丢失增多,而这种心肌细胞的丢失以细胞凋亡为主^[1-2]。故通过药物干预延缓或减少心肌细胞凋亡,进而延缓增龄造成的心功能的减退是研究的重点。枸杞为传统的抗衰老中药,无果枸杞芽为无果枸杞树上采摘的嫩芽,作者研究发现无果枸杞芽提取物可提高衰老小鼠脑组织抗氧化能力^[3-4],

发挥抗衰老作用,但关于对心肌细胞衰老的影响少见报道。本研究拟观察无果枸杞芽水提物(AEFLS)对老年小鼠心肌组织丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)水平及凋亡蛋白表达的影响,为探讨其抗心肌细胞衰老机制的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 酶标仪(上海),RE501 旋转蒸发器(上海),冰冻切片机(德国,Leica 公司),电泳仪、转移槽、凝胶成像仪

* 基金项目:教育部春晖计划项目(11045);宁夏医科大学面上项目(NY2014053)。作者简介:马新伟(1980-),实验师,本科,主要从事衰老和地方中草药抗衰老研究。#:共同第一作者,刘郎(1983-),在读研究生,主管技师,主要从事心血管疾病的相关研究。△ 通信作者, E-mail:zhlianxiang@163.com。

(Bio-Rad 公司)。蛋白测定试剂盒、SOD、MDA 检测试剂盒(南京建成生物研究所),蛋白提取试剂盒、兔抗人 Bcl-2、Bax 和 Capase-3 多克隆抗体、SP 试剂盒(Santa Cruz 公司)。

1.2 实验动物及分组 取健康 SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠 13 月龄 60 只,老年小鼠月龄的确定参考方喜业主编的《医学实验动物学》^[5],小鼠由宁夏医科大学实验动物中心提供,动物合格证号 SCXK(宁)(2005-0001),随机分为 AEFLS 低剂量组(AEFLS1)、AEFLS 中剂量组(AEFLS2)、AEFLS 高剂量组(AEFLS3)和老年对照组,每组 15 只。

1.3 方法

1.3.1 无果枸杞芽水提物的制备及给药方法 取无果枸杞芽干品(宁夏杞芽食品科技有限公司提供,批号 0955A0111)1 kg 浸泡 12 h,煎煮 5 h,过滤取出药液,药渣加冷水再煎,反复 3 次,合并药液,静置沉淀,用 4 层纱布过滤 3 次,煎出的药液放到小火上煎煮蒸发浓缩,使它逐渐形成稠膏状。制备的无果枸杞芽水提物每克膏相当于 3.17 g 生药。根据《中国药典》成人(体质量 60 kg 为参考)中草药的剂量与小鼠(体质量 20 g 为参考)用药剂量进行换算,将水提物分为 3 个剂量 5、10、20 mg/kg,按 0.2 mL/10 g 溶解在蒸馏水中,以灌胃的方式给予,1 次/天,持续 8 周,对照组灌胃等量生理盐水。

1.3.2 取材 将各组小鼠取 5 只,用 10% 水合氯醛 350 mg/kg 麻醉后,4% 多聚甲醛灌注固定,取材做石蜡包埋备用。

1.3.3 小鼠心脏组织 SOD 和 MDA 含量的测定 各组小鼠取 5 只断头处死,取左心室称重,按 1:15 的比例加入蛋白裂解液匀浆,4℃ 4 500 r/min 离心 15 min,取上清液,进行蛋白定量,用黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活性,硫代巴比妥酸法测定 MDA 含量,其余蛋白-80℃ 保存。

1.3.4 Western-blot 技术检测 Bcl-2、Bax 和 Capase-3 蛋白的表达 取已提取的蛋白按照 Western-blot 操作步骤检测 Bcl-2、Bax 和 Capase-3 蛋白的表达,用 Bio-Rad 分析系统得到相对光密度比值。

1.3.5 免疫组化 SP 法检测 Bcl-2、Bax 和 Capase-3 蛋白的表达 制备 5 μm 石蜡切片进行免疫组织化学染色,具体步骤按照免疫组化 SP 法操作说明书进行,光学显微镜下观察。Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白免疫反应阳性表现为棕色或棕黄色颗粒,阳性颗粒定位于细胞胞浆中。每张切片于阳性表达区域选

择 5 个无重复视野,用图像分析系统分析其光密度值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

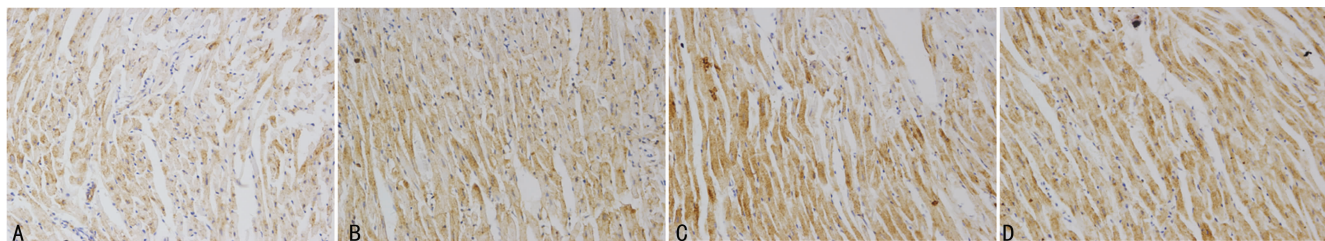
2.1 各组 SOD 和 MDA 水平 与老年对照组比较,AEFLS2 和 AEFLS3 组心肌组织 SOD 活性明显增加,AEFLS3 组 MDA 水平明显下降($P < 0.01$);AEFLS1 组 SOD 活性及 AEFLS1、AEFLS2 组 MDA 水平无明显变化($P > 0.05$)。与 AEFLS1 组比较,AEFLS2 和 AEFLS3 组心肌组织 SOD 活性明显增加($P < 0.01$);AEFLS3 组 MDA 水平明显下降($P < 0.01$)。见表 1。

2.2 SP 法检测小鼠 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 的表达 各组小鼠心肌细胞均可见 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 蛋白免疫阳性细胞,阳性细胞为棕黄色,免疫阳性颗粒主要表达在胞浆。各组分别选取 5 个高倍视野,统计免疫阳性细胞的光密度值,结果见图 1、2、3。Bcl-2 免疫阳性细胞:与老年对照组比较,AEFLS1 组阳性细胞光密度值差异无统计学意义($P > 0.05$);AEFLS2 组和 AEFLS3 组免疫反应阳性细胞光密度值明显增加($P < 0.01$)。与 AEFLS1 组比较,AEFLS2 组和 AEFLS3 组免疫阳性细胞的光密度值增加($P < 0.01$)。Bax 及 Caspase-3 免疫阳性细胞光密度值:老年对照组及 AEFLS1 组 Bax 及 Caspase-3 免疫阳性细胞光密度值较高,两组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);AEFLS2 组和 AEFLS3 组明显降低,与老年对照组及 AEFLS1 组比较,AEFLS2 组和 AEFLS3 组蛋白光密度值减小($P < 0.01$);AEFLS2 组和 AEFLS3 组光密度值比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 各组小鼠心肌组织 SOD 和 MDA 水平比较($\bar{x} \pm s, n=5$)

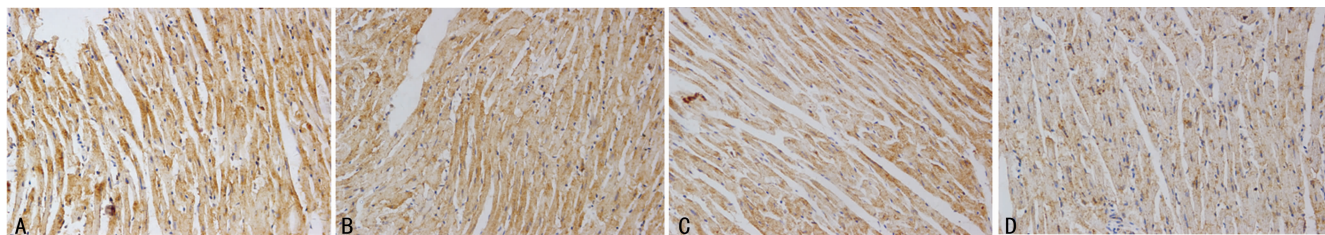
组别	SOD(U/mL)	MDA(nmol/mL)
老年对照组	140.2±15.4	8.5±0.8
AEFLS1 组	136.3±9.7	7.4±1.69
AEFLS2 组	175.1±12.8*#	6.5±2.2
AEFLS3 组	177.2±17.5*#	5.1±2.1*#

*: $P < 0.01$,与老年对照组比较;#: $P < 0.01$,与 AEFLS1 组比较。



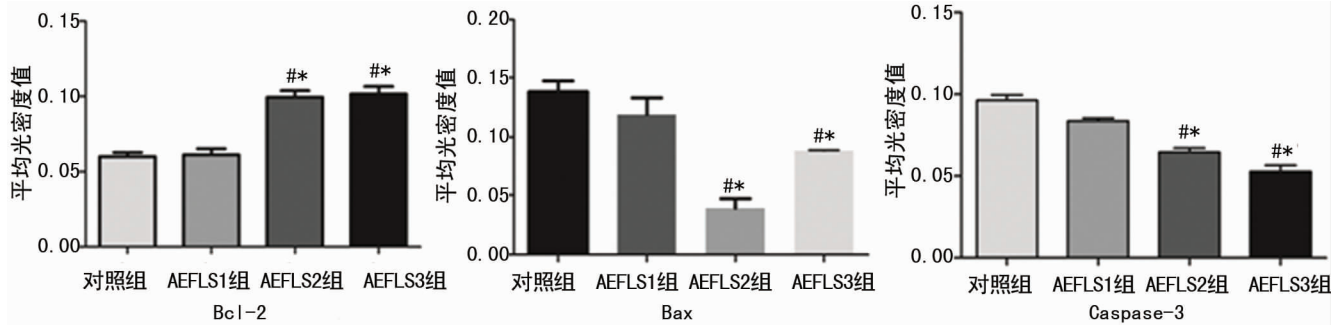
A: 对照组; B: AEFLS1 组; C: AEFLS2 组; D: AEFLS3 组。

图 1 各组 Bcl-2 蛋白的表达(Bar:50 μm)



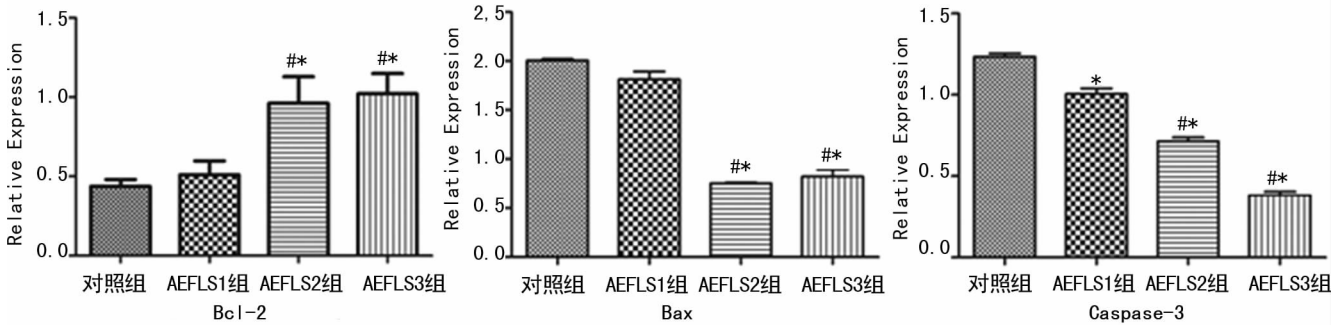
A: 对照组; B: AEFLS1 组; C: AEFLS2 组; D: AEFLS3 组。

图 2 各组 Caspase-3 蛋白的表达(Bar:50 μm)



*: $P < 0.01$, 与对照组比较; #: $P < 0.01$, AEFLS1 组比较。

图3 各组 Bcl-2、Capase-2 蛋白免疫阳性细胞的平均光密度值



*: $P < 0.01$, 与对照组比较; #: $P < 0.01$, AEFLS1 组比较。

图4 各组 Western-blot 检测结果

2.3 Western Blot 技术 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 的相对光密度比值 与老年对照组比较, AEFLS1 组 Bcl-2 蛋白相对光密度比值差异无统计学意义 ($P > 0.05$); AEFLS2 和 AEFLS3 组 Bcl-2 蛋白的光密度比值明显增高 ($P < 0.01$)。与 AEFLS1 组比较, AEFLS2 和 AEFLS3 组 Bcl-2 蛋白光密度比值亦明显增高 ($P < 0.01$); AEFLS2 组与 AEFLS3 组比较, Bcl-2 蛋白光密度比值差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。Bax 和 Caspase-3 蛋白相对光密度比值: 与老年对照组比较, AEFLS1 组两种蛋白的光密度比值差异无统计学意义 ($P > 0.05$); AEFLS2 组和 AEFLS3 组 Bax 和 Caspase-3 蛋白光密度比值降低 ($P < 0.01$)。与 AEFLS1 组比较, AEFLS2 和 AEFLS3 组 Bax 和 Caspase-3 蛋白光密度比值降低 ($P < 0.01$); AEFLS2 与 AEFLS3 组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 4、5。

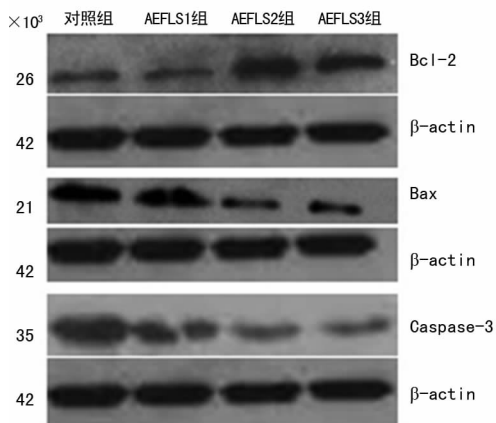


图5 各组 Western-blot 检测结果

3 讨论

既往研究认为心肌细胞死亡之后很难再生。Anversa 等^[6]研究发现心肌细胞在不断发生凋亡、坏死中再生, 心肌细胞的增殖和丢失是维持正常心脏组织自稳态的一部分。成年

后, 随着年龄的增加心肌细胞逐渐出现老化, 其典型表现是心肌细胞丢失增多和增殖减少, 增龄造成的心肌细胞丢失由细胞坏死、自噬和凋亡共同作用的结果。生理状态下, 以细胞凋亡为主。随着年龄增加, 心脏自身生理功能与应激能力下降^[7], 人体内自由基清除系统呈退化趋势, 造成脂质过氧化和自由基大量积聚, 引起心肌细胞凋亡增加, 进而导致心肌收缩和舒张功能降低^[8-11]。凋亡是由基因控制的程序性细胞死亡方式, 提示可通过抑制或减少细胞凋亡来降低心肌细胞丢失率进而延缓心功能的下降。如何最大限度地减少心肌细胞的死亡, 在防治老年心脏退行性疾病中具有重要意义, 中药的抗衰老作用效果显著。

枸杞的抗衰老作用, 历代医书都有记载, 其根、茎、芽、果均可入药。早在唐代甄权的《药性本草》中已有关于枸杞叶药用价值的记载。《食疗本草》: “坚筋耐老, 除风, 补益筋骨, 能益人, 去虚劳”。有较多文献^[12-13]报道枸杞芽具有增强免疫、抗疲劳、耐缺氧等功效。本文应用的宁夏无果枸杞芽经甘肃农业大学重点实验室检测, 多种成分远高于枸杞果和普通枸杞芽, 其中多酚类物质含量是绿茶的 3 倍, 每百克中含儿茶素 14.9 g, 硒 27 μg 、黄酮 520 mg、铁 3.71 mg、镁 1 060 mg、钾 669 mg、磷 1 570 mg、钙 12.2 mg、锌 30 μg 、生物素 16 μg 。文献^[14]报道黄酮类、多酚类、儿茶素类物质具有清除自由基、抗氧化、延缓衰老等功效。文献^[15-16]报道微量元素如锌、硒、铜、铁、磷、钙等在抗衰老机制中发挥重要的作用。李宝玉等^[17]研究发现补锌可缓解由缺锌诱导的心肌纤维化对心肌细胞和心肌纤维起到保护作用。因无果枸杞芽中多种微量元素和生物活性物质含量较高, 推测其可清除心肌中的自由基、发挥抗氧化、抗心肌细胞凋亡的作用。

因此, 本研究观察了无果枸杞芽水提取物对衰老心脏的抗氧化作用和对凋亡蛋白表达的影响。结果显示: 给予衰老小鼠灌胃无果枸杞芽水提取物 8 周, 无果枸杞芽水提取物低剂量组小鼠心脏组织 SOD 及 MDA 水平无明显变化, 中、高剂量的无果枸杞

芽水提物可使小鼠心脏组织 SOD 活性明显提高,高剂量的无果枸杞芽水提物可明显降低小鼠心脏组织 MDA 水平,提示低剂量的无果枸杞芽水提物其抗氧化能力相对较弱,不能完全清除自由基抵损伤的作用;中、高剂量的无果枸杞芽水提物其抗氧化成分含量较高,可显著提高衰老小鼠 SOD 活性,发挥其抗氧化能力,SOD 不断清除心肌组织中的自由基,减少脂质过氧化,降低氧自由基对心肌组织造成的损害,保证心肌组织代谢平衡,维持其功能正常,发挥抗氧化、抗衰老作用。

本研究应用不同剂量的无果枸杞芽水提物干预后,通过免疫组织化学方法和 Western-blot 技术观察到衰老心肌细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 的表达变化,结果表明中、高剂量的无果枸杞芽水提物可增加衰老心肌细胞 Bcl-2 蛋白的表达,降低 Bax 和 Caspase-3 蛋白的表达。而且免疫组化和 Western-blot 检测结果一致,实验结果亦表明中、高剂量的无果枸杞芽水提物使 Bcl-2/Bax 比值增加,提示无果枸杞芽水提物可改变 Bcl-2 蛋白家族 Bcl-2 家族成员的表达,减少心肌细胞的凋亡。

因此,无果枸杞芽水提物抗心肌细胞凋亡机制可能与提高衰老小鼠心脏组织 SOD 活性,降低 MDA 水平,提高机体抗氧化能力,减少了氧自由基在体内的堆积对心肌组织造成的损害,同时无果枸杞芽水提物上调抗凋亡蛋白 Bcl-2,下调促凋亡蛋白 Bax、Caspase-3 蛋白的表达,提高 Bcl-2/Bax 比值有关,发挥抗心肌细胞凋亡的作用。有关无果枸杞芽水提物中的哪种或哪些成分发挥了作用需要进一步深入研究。

参考文献

- [1] Mallat Z, Fornes P, Costagliola R, et al. Age and gender effects on cardiomyocyte apoptosis in the normal human heart[J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2001, 56(11): 719-723.
- [2] Lakatta EG. Cardiovascular regulatory mechanisms in advanced age[J]. *Physiol Rev*, 1993, 73(2): 413-467.
- [3] 陈海军,王慧茹,张莲香,等.宁夏无果枸杞芽水提物对慢性温和不可预见性应激小鼠学习记忆的影响[J]. *神经解剖学杂志*, 2014, 30(2): 211-216.
- [4] 张莲香,陈海军,胡嘉航,等.宁夏无果枸杞芽提取物对自然衰老小鼠 SOD、MDA 及 NCAM 的影响[J]. *宁夏医科大学学报*, 2012, 34(12): 1265-1268.

- [5] 中华医学会.法定计量单位在医学上的应用[M].3版.北京:人民军医出版社,2001.
- [6] Anversa P, Nadal-Ginard B. Myocyte renewal and ventricular remodelling[J]. *Nature*, 2002, 415(6868): 240-243.
- [7] Warner HR, Hodes RJ, Pocinski K. What does cell death have to do with aging? [J]. *J Am Geriatr Soc*, 1997, 45(9): 1140-1146.
- [8] Dorn GW. Mechanisms of non-apoptotic programmed cell death in diabetes and heart failure[J]. *Cell Cycle*, 2010, 9(17): 3442-3448.
- [9] Boengler K, Schulz R, Heusch G. Loss of cardioprotection with ageing[J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 83(2): 247-261.
- [10] Nitahara JA, Cheng W, Liu Y, et al. Intracellular Calcium, DNase activity and myocyte apoptosis in aging Fischer 344 rats[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1998, 30(3): 519-535.
- [11] 王瑾,王晓樑,白克华,等.心肌细胞凋亡对老年大鼠心脏功能的影响[J]. *山西医科大学学报*, 2013, 44(10): 758-762.
- [12] 王莉,魏智清.宁夏枸杞芽水提物增强小鼠抗疲劳抗缺氧能力研究[J]. *时珍国医国药*, 2012, 23(3): 583-584.
- [13] Shi XY. The antioxidation and mechanism of tea polyphenols[J]. *Foreign Med Sci; SecPharm*, 1998, 25(4): 196-198.
- [14] Chen X, Lu Y, Li QS, et al. The protective effect of EGCG on Hydrogen peroxide induced SH-SY5Y cell injury[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2011, 27(3): 320-324.
- [15] 龚太平,纪晓萍.传统中医抗衰老中药的微量元素分析[J]. *微量元素与健康研究*, 2002, 19(3): 32-33.
- [16] Ostrakhovitch LA, Lordnejad MR, Schliess F, et al. Copper ions strongly activate the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway independent strongly of the generation of reactive oxygen species[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2002, 397(2): 232-239.
- [17] 李保玉,金毅,王景华,等.ET-NO 系统与心肌胶原代谢的关系[J]. *临床与实验病理学杂志*, 1999, 15(1): 57-59.

(收稿日期:2017-01-20 修回日期:2017-03-24)

(上接第 2169 页)

- [4] Tanahashi K, Natsume A, Ohka F, et al. Assessment of tumor cells in a mouse model of diffuse infiltrative glioma by Raman spectroscopy[J]. *Biomed Res Int*, 2014(2): 860241.
- [5] Philips P, Li Y, Martin RC. Low-energy DC current ablation in a mouse tumor model[J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1121(1121): 257-265.
- [6] Lepage C, Capocaccia R, Hackl M, et al. Survival in patients with primary liver cancer, gallbladder and extrahepatic biliary tract cancer and pancreatic cancer in Europe 1999-2007; results of EURO-CARE-5[J]. *Eur J Cancer*, 2015, 51(51): 2169-2178.
- [7] 卢旷逸,范昕,马小艳,等. TLR9 激动剂在胰腺星状细胞介导的胰腺癌耐药中的作用[J]. *江苏大学学报(医学版)*, 2012, 22(3): 223-226.

- [8] 孙运良,徐灿,苏长青,等.靶向重组腺病毒介导 Hsp70 基因表达对大鼠胰腺癌移植瘤的抑制作用[J]. *世界华人消化杂志*, 2012, 20(1): 15-21.
- [9] Wu HQ, Wang B, Zhu SK, et al. Effects of CPG ODN on biological behavior of PANC-1 and expression of TLR9 in pancreatic cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(8): 996-1003.
- [10] Zambirinis CP, Levie E, Nguy S, et al. TLR9 ligation in pancreatic stellate cells promotes tumorigenesis[J]. *J Exp Med*, 2015, 212(12): 2077-2094.
- [11] Bruckner H. Phase I and II studies of intravenous Regin-G as monotherapy for stage IV b gemcitabine-resistant pancreatic cancer[J]. *Br J Surg*, 2014, 63(2): 162-165.

(收稿日期:2017-01-14 修回日期:2017-03-18)