

六味地黄生物制剂对衰老模型小鼠脑海马区神经元 Bcl-2 和 Bax mRNA 表达的影响

丘婷,李天河,吴思,陈朋,赵越*
(广东药学院中药学院,广州 510006)

[摘要] 目的:观察六味地黄生物制剂(LW-PSB)对衰老模型小鼠脑海马区神经元 Bcl-2 和 Bax mRNA 表达的影响。方法:将昆明种小鼠随机分为模型组、阳性对照维生素 E(VE 0.27 g·kg⁻¹)组、LW-PSB 治疗组(0.50 g·kg⁻¹)和正常对照组,共 4 组,每组各 10 只。造模后第 15 天开始按 0.02 mL·g⁻¹体重灌胃给药,模型组、正常对照组灌胃等体积生理盐水,每日 1 次,连续灌胃 30 d。末次给药 30 min 后处死并分别取各组小鼠脑海马体,采用 RT-PCR 法检测各组小鼠脑海马区神经元 Bcl-2 和 Bax mRNA 的表达。结果:与模型组比较,LW-PSB 治疗组 Bcl-2 2^{- $\Delta\Delta\Delta\Delta$} 显著升高($P < 0.01$),阳性对照组和 LW-PSB 治疗组 Bax 2^{- $\Delta\Delta\Delta\Delta$} 显著降低($P < 0.01$),阳性对照组和 LW-PSB 治疗组 Bcl-2/Bax 比值显著升高($P < 0.01$);与阳性对照组比较,LW-PSB 治疗组 Bcl-2 2^{- $\Delta\Delta\Delta\Delta$} 升高($P < 0.05$),Bax 2^{- $\Delta\Delta\Delta\Delta$} 降低($P < 0.05$)和 Bcl-2/Bax 比值显著升高($P < 0.01$)。结论:六味地黄生物制剂通过促进脑海马区神经元 Bcl-2 mRNA 的表达和抑制 Bax mRNA 的表达起到抗衰老作用。

[关键词] 六味地黄生物制剂;衰老;Bcl-2;Bax;表达

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)21-0196-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120827.1045.008.html>

[网络出版时间] 2012-08-27 10:45

Effect of Liuwei Dihuang Decoction Metabolized by Photosynthetic Bacteria on the Expression of Bcl-2 and Bax mRNA in Hippocampus Neurons of Aging Model Mice

QIU Ting, LI Tian-he, WU Si, CHEN Peng, ZHAO Yue*

(College of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[收稿日期] 20120312(006)

[基金项目] 广东省自然科学基金重点项目(825022401000006)

[第一作者] 丘婷,硕士研究生,从事中药新剂型和新技术研究,Tel:15017559614,E-mail:tingtingshark@yahoo.com.cn

[通讯作者] *赵越,教授,Tel:020-39352173,E-mail:zybmbylk688@163.com

- [14] 姜国云,方玲,贾强华.原发性痛经的病因病机研究进展[J].长春中医药大学学报,2011,27(4):683.
- [15] 陈奇.中药药效研究思路与方法[M].北京:人民卫生出版社,2005:794.
- [16] 肖璐,闫宏宇.宁心缓痛汤对寒凝血瘀型原发性痛经大鼠子宫一氧化氮和钙离子的影响[J].新疆中医药,2011,29(1):10.
- [17] 嵇波,任晓暄,赵雅芳,等.原发性痛经发病机制与预防研究述评[J].中国现代医学杂志,2008,18(13):1856.
- [18] 裴培田,王昕,赵一梅,等.舒经玫瑰胶囊对小鼠原发性痛经 MAD、CA²⁺ 的影响[J].中国中医药信息杂志,2003,10(5):31.
- [19] 朱敏,段金殿,唐于平,等.四物汤及其组方药对与药物对小鼠原发性痛经模型的影响[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(18):109.
- [20] 杜静,王海东.香延止痛方治疗原发性痛经的研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(7):183.
- [21] 李亚洲,高冲,胡晓丞,等.赤芍果乙醇提取物对子宫内炎症继发性痛经作用研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(3):153.
- [22] 李亚洲,高冲,胡晓丞,等.赤芍果乙醇提取物对子宫内炎症继发性痛经作用机制研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(23):148.

[责任编辑 聂淑琴]

[Abstract] Objective: To investigate the effect of Liuwei Dihuang decoction metabolized by photosynthetic bacteria (LW-PSB) on the expression of Bcl-2 and Bax mRNA in hippocampus neurons of aging model mice. **Method:** Mice were randomly divided into 4 groups: model group, positive control group ($VE 0.27 g \cdot kg^{-1}$), LW-PSB-treated group ($0.50 g \cdot kg^{-1}$) and normal group. Each group was administrated continuously for 30 days. After 30 min of administration, the hippocampus of each group was separated and RT-PCR was adopted to detect the expression of Bcl-2 and Bax mRNA in hippocampus neurons. **Result:** Compared with the model group and positive control group, the Bcl-2 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ and Bcl-2/Bax were increased and Bax $2^{-\Delta\Delta Ct}$ was decreased in LW-PSB-treated group. **Conclusion:** LW-PSB might up-regulate expression of Bcl-2 mRNA and down-regulate expression of Bax mRNA to anti-aging.

[Key words] LW-PSB; aging; Bcl-2; Bax; expression

六味地黄生物制剂^[1](Liuwei Dihuang decoction metabolized by photosynthetic bacteria, LW-PSB)是将优选的光合细菌作为菌种,引入到中国传统名方六味地黄汤中进行代谢,通过光合细菌的生物转化功能和自身营养价值的利用,制备出新型高效的中药生物制剂。本课题组前期实验研究表明,LW-PSB具有显著的抗衰老作用^[2-4],优于传统的六味地黄汤。本实验采用 *sc D*-半乳糖的方法建立衰老模型小鼠,观察 LW-PSB 对衰老模型小鼠脑海马区神经元 Bcl-2 和 Bax mRNA 表达的影响,从分子水平探讨 LW-PSB 的抗衰老作用机制。

1 材料

1.1 试药 维生素 E(广州星群(药业)股份有限公司,批号 HE50010); *D*-半乳糖(阿拉丁,批号 40064); LW-PSB(广东药学院中药学院药剂实验室制备,批号 20100901);熟地黄、山茱萸、山药、泽泻、牡丹皮和茯苓 6 味中药以 8:4:4:3:3:3 的质量比例配药。加入 8 倍量水,文火煎煮 1.5 h,滤过。药渣再加 6 倍量水煎煮 1.5 h,滤过,合并两次滤液,浓缩至 $0.5 g \cdot mL^{-1}$ 备用。将上述六味地黄汤浓缩液经自然发酵后,按一定比例加入光合细菌菌液,于光照培养箱中培养一定时间既得。所制备的药液含生药材 $0.5 g \cdot mL^{-1}$,活菌数为 1×10^9 个/mL。

1.2 试剂和仪器 RNAiso Plus 试剂盒, SYBR® ExScript™ RT-PCR kit (Perfect Real Time) 试剂盒, SYBR® Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time) 试剂盒 [均为宝生物工程(大连)有限公司,批号 20111013]。2700 型 PCR System 扩增仪(Applied Biosystems 公司),UV-2550 型紫外分光光度计(日本岛津公司),iQ5 荧光定量 PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司)。

1.3 动物 SPF 级昆明种小鼠 40 只,质量 18 ~ 22 g,雄性,广州中医药大学实验动物中心,动物合

格证号 SCXK(粤)2008-0020。

2 方法

2.1 动物分组与造模 将 SPF 级昆明种小鼠适应性饲养 3 d 后,随机分为模型组、阳性对照组、LW-PSB 治疗组和正常对照组,共 4 组,每组各 10 只。取模型组、阳性对照组和 LW-PSB 治疗组小鼠,按 $0.01 mL \cdot g^{-1}$ 体重 *sc D*-半乳糖($100 mg \cdot kg^{-1}$)造衰老模型,每日 1 次,正常对照组 *sc* 等剂量的生理盐水,连续注射 45 d。造模后第 15 d 开始按 $0.02 mL \cdot g^{-1}$ 体重 *ig* 给药治疗观察,阳性对照组按 $0.27 g \cdot kg^{-1}$ *ig* 维生素 E, LW-PSB 治疗组按 $0.50 g \cdot kg^{-1}$ *ig* LW-PSB,其余各组 *ig* 等体积生理盐水,每日 1 次,连续 *ig* 30 d。末次给药 30 min 后处死并分别取各组小鼠脑海马体,置于 $-80^\circ C$ 的低温冰箱中保存备用。

2.2 衰老模型小鼠脑海马区神经元 Bcl-2 和 Bax mRNA 表达的检测

2.2.1 引物序列设计和合成 Bcl-2 和 Bax 的 cDNA 序列参照 NCBI GenBank 数据库设计,由宝生物工程(大连)有限公司合成。见表 1。

表 1 Bcl-2 和 Bax 的 cDNA 引物序列

引物名称	序列	片段长度 /bp
Bax	5'-GAGGATGCGTCCACCAAGAA-3'	869
	5'-CGTGTCCACGTCAGCAATCA-3'	
Bcl-2	5'-TGAAGCGGTCCGGTGGATA-3'	2 529
	5'-CAGCATTGCGAGAAGTCTCTGTA-3'	
β -actin	5'-TTCTACAATGAGCTCGGTGTGGC-3'	591
	5'-CTCTAGCTCTTCTCCAGGGAGGA-3'	

2.2.2 总 RNA 的提取与定量 按 RNAiso Plus 试剂盒说明书步骤提取各组小鼠脑海马区神经元总 RNA。取 $1 \mu L$ 总 RNA,稀释 100 倍后用紫外分光光

表 2 六味地黄生物制剂对脑海马区神经元 Bcl-2 mRNA 表达相对值的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Ct _{Bcl-2}	Ct _{β-actin}	ΔCt	ΔΔCt	2 ^{-ΔΔCt}
正常对照	-	27.21 ± 0.33	16.43 ± 0.29	10.78 ± 0.59	-	-
模型	-	27.72 ± 0.20	17.34 ± 0.28	10.38 ± 0.37	-0.40 ± 0.67	1.42 ± 0.60
维生素 E	0.27	26.46 ± 0.74	16.57 ± 0.06	9.89 ± 0.69	-0.84 ± 1.02	2.19 ± 1.60
LW-PSB 治疗	0.50	24.36 ± 0.26	15.99 ± 0.28	8.36 ± 0.52	-2.42 ± 0.78	5.87 ± 2.96 ^{2,3)}

注:与模型组比较¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01;与维生素 E 组比较³⁾P < 0.05, ⁴⁾P < 0.01(表 3~4 同)。

表 3 六味地黄生物制剂对脑海马区神经元 Bax mRNA 表达相对值的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Ct _{Bcl-2}	Ct _{β-actin}	ΔCt	ΔΔCt	2 ^{-ΔΔCt}
正常对照	-	24.20 ± 0.07	16.43 ± 0.29	7.77 ± 0.24	-	-
模型	-	22.05 ± 0.51	17.34 ± 0.28	4.71 ± 0.77	-3.06 ± 0.71	8.34 ± 1.76
维生素 E	0.27	24.67 ± 0.13	16.57 ± 0.06	8.10 ± 0.33	0.33 ± 0.09	1.26 ± 0.05 ²⁾
LW-PSB 治疗	0.50	25.19 ± 0.19	15.99 ± 0.28	9.20 ± 0.18	1.43 ± 0.29	0.57 ± 0.19 ^{2,3)}

度计测波长为 260 nm 和 280 nm 处的吸光度(A), 计算所提总 RNA 的量,并使 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值保持在 1.8~2.2。提取的各组总 RNA 于 -80 ℃ 的低温冰箱中保存待测。

2.2.3 逆转录反应 分别取上述各组总 RNA 2 μL,在 2700 型 PCR System 扩增仪上参照 SYBR® ExScript™ RT-PCR kit 试剂盒说明书,分别逆转录成 cDNA,反应参数为:反转录反应 37 ℃ 15 min;反转录酶失活反应 85 ℃ 5 s。反应产物于 -20 ℃ 冰箱中保存待测。

2.2.4 PCR 反应 反应体系总体积为 25 μL,按照 SYBR® Premix Ex Taq™ 试剂盒说明书,在 iQ5 荧光定量 PCR 仪上进行 PCR 反应。循环参数为:第 1 步预变性,95 ℃ 预变性 30 s,共 1 个循环;第 2 步 PCR 反应,95 ℃ 变性 5 s,60 ℃ 退火 30 s,共 40 个循环;72 ℃ 5 min 终末延伸。

2.3 统计学处理 实验数据采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。运用 One-way ANOVA 方法进行多组间差异显著性分析。结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。P < 0.05 有统计学意义。

3 结果

3.1 对脑海马区神经元 Bcl-2 mRNA 表达的影响 与模型组比较,LW-PSB 治疗组 Bcl-2 2^{-ΔΔCt} 显著升高(P < 0.01),表明 Bcl-2 mRNA 表达上调。与维生素 E 组比较,LW-PSB 治疗组 Bcl-2 2^{-ΔΔCt} 明显升高(P < 0.05),表明 LW-PSB 效应优于维生素 E。见表 2。

3.2 六味地黄生物制剂对脑海马区神经元 Bax mRNA 表达的影响 与模型组比较,维生素 E 组和

LW-PSB 治疗组 Bax 2^{-ΔΔCt} 显著降低(P < 0.01),表明 Bax mRNA 表达下调。与维生素 E 组比较,LW-PSB 治疗组 Bax 2^{-ΔΔCt} 降低(P < 0.05),表明 LW-PSB 效应优于维生素 E。见表 3。

3.3 六味地黄生物制剂对脑海马区神经元 Bcl-2/Bax 的影响 结果显示,与模型组比较,维生素 E 组和 LW-PSB 治疗组 Bcl-2/Bax 显著升高(P < 0.01)。与维生素 E 组比较,LW-PSB 治疗组 Bcl-2/Bax 显著升高(P < 0.01)。见表 4。

表 4 六味地黄生物制剂对各组脑海马区神经元 Bcl-2/Bax 比值的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Bcl-2/Bax
模型	-	0.17 ± 0.07
维生素 E	0.27	1.60 ± 0.57 ²⁾
LW-PSB 治疗	0.50	10.22 ± 2.45 ^{2,4)}

4 讨论

衰老,是人类生命进程中的一个必然过程,人体脏腑经脉的盛衰与人的生理年龄密切相关。伴随着衰老的不仅是容颜老去、精体力不足,还包括各种脏器的老化及功能衰退,并伴发一系列老年病。衰老涉及生命过程的方方面面,其中细胞凋亡在衰老过程和疾病发生中扮演着重要的角色,其可通过引起细胞特征性形态改变、功能失活和衰老性生长停滞而导致细胞衰老;同时,细胞凋亡与衰老过程中组织器官功能的退化,衰老相关疾病的发生发展密切相关^[5]。

本实验采用 sc D-半乳糖的方法建立衰老模型

小鼠,该方法被广泛用于衰老机制的研究和抗衰老药物的筛选。对小鼠 *sc* 大剂量 *D*-半乳糖,可使机体细胞内半乳糖浓度增高,在醛糖还原酶的催化下,还原成半乳糖醇。半乳糖醇因不能被细胞进一步代谢而堆积在细胞内,影响正常渗透压,导致细胞肿胀和功能障碍,最终导致衰老的发生^[6-7],从而诱导小鼠出现类似正常衰老动物的病理改变,如认知功能障碍、免疫功能下降、寿命缩短,以及各项生化指标的改变^[8]。

随着机体年龄增长,各组织器官衰老及功能退化,势必影响细胞凋亡基因表达。研究表明^[9],Bcl-2 基因家族与细胞凋亡有着密切的关系,在这个基因家族组群中,尤以 Bcl-2、Bax 基因的作用最为引人注目,它们是在细胞凋亡过程中起关键性作用的一对功能基因。Bcl-2 基因广泛存在于大脑皮层、脑海马、小脑和脊髓组织中,其表达产物为 Bcl-2 蛋白。Bcl-2 基因的表达具有抑制细胞凋亡、延长细胞生存期的作用^[10]。Bax 基因的作用与 Bcl-2 基因的作用恰恰相反,它是一个典型的凋亡基因,Bax 的表达可导致细胞凋亡^[11]。Bcl-2、Bax 基因及其表达产物通过控制线粒体释放辅因子在体内共同调节细胞的凋亡^[12]。细胞存亡及衰老决定于凋亡抑制基因及凋亡基因表达的孰多孰少。在体内,Bcl-2/Bax 组成一个平衡体系,Bcl-2 过多细胞凋亡被抑制,而 Bax 过剩则细胞凋亡加速。Bcl-2 和 Bax 的表达水平及 Bcl-2/Bax 决定细胞生存方向,成为影响细胞生存的关键因素。*D*-半乳糖可损伤成熟的脑海马神经元,导致神经前体细胞增殖能力和长期生存能力下降^[13],以达到诱导神经损伤的目的而模拟正常衰老啮齿动物的脑内变化。本实验结果显示,经 LW-PSB 作用后,衰老模型小鼠脑海马区神经元 Bcl-2 mRNA 表达上调($P < 0.01$),Bax mRNA 表达下调($P < 0.01$),Bcl-2/Bax 显著升高($P < 0.01$),表明 LW-PSB 抗衰老作用是通过影响凋亡调控基因 Bcl-2 和 Bax mRNA 的表达而实现的,这仅是 LW-PSB 抗衰老作用机制的一部分,关于其具体的作用机制有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 赵越.六味地黄汤的中药生物制剂及制备方法[P].中国专利:ZL2006 10123868.6,2010-09-08.
- [2] 臧建伟,胡旭光,唐春萍,等.六味地黄汤生物制剂的抗衰老作用[J].中草药,2007,38(1):99.
- [3] 朱颖,夏少秋,吴亚军,等.六味地黄生物制剂对果蝇寿命和繁殖力的影响[J].时珍国医国药,2010,21(10):2473.
- [4] 夏少秋,朱颖,吴亚军,等.六味地黄生物制剂正丁醇提取物延缓果蝇衰老作用的研究[J].中成药,2010,32(8):1417.
- [5] Kushner E J, MacEneaney O J, Weil B R, et al. Aging is associated with a proapoptotic endothelial progenitor cell phenotype[J]. J Vasc Res, 2011, 48:408.
- [6] 刘洋,程清洲,彭超华,等.*D*-半乳糖致小鼠衰老模型的制作及效果评价[J].武汉工业学院学报,2009,28(1):32.
- [7] 张良和,张红英,孙晓宇.马齿苋乙醇提取物对 *D*-半乳糖致衰老小鼠学习记忆能力的影响[J].中国实验方剂学,2011,17(4):232.
- [8] Ho S C, Liu J H, Wu R Y. Establishment of the mimetic aging effect in mice caused by *D*-galactose[J]. Biogerontology, 2003, 4(1):15.
- [9] Yoshimura A, Masui A, Jinde S, et al. Influence of age or circadian time on Bcl-2 and Bax mRNA expression in the rat hippocampus after corticosterone exposure[J]. Brain Res Bull, 2007, 73(4/6):254.
- [10] Dejean L M, Ryu S Y, Peixoto P M, et al. MAC and Bcl-2 family proteins conspire in a deadly plot[J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1797(6/7):1231.
- [11] Zhang Y Y, Dong Y L, Wu X, et al. The mitochondrial pathway of anesthetic Isoflurane-induced apoptosis[J]. J Biol Chem, 2010, 285(6):4025.
- [12] Chipuk J E, Green D R. How do Bcl-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? [J]. Trends Cell Biol,2008, 18(4):157.
- [13] 刘雁勇,张卿,杨楠,等.神经节苷脂 GM1 对 *D*-半乳糖致衰老模型小鼠脑海马区神经发生的保护作用[J].中国康复医学杂志,2007,22(7):589.

[责任编辑 聂淑琴]