

# 钩藤散对 NIH-3T3 细胞衰老模型增殖与凋亡的影响

黄厚才\*, 钟荣玲, 曹鹏, 宋捷, 杨德功, 夏智  
(江苏省中医药研究院, 南京 210028)

**[摘要]** 目的: 观察钩藤散对 NIH-3T3 细胞衰老模型增殖与凋亡的影响。方法: NIH-3T3 细胞接种在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养至 20 代, 然后分为年轻、空白、模型 3 个组, 传至 30 代时, 用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理,  $\beta$ -半乳糖苷酶染色试剂盒染色, 观察衰老细胞形态、衰老指征, 确认衰老模型是否成功建立; 用钩藤散(17, 8.5, 4.25, 2.15 g·kg<sup>-1</sup>) ig SD 大鼠, 每天 2 次, 连续给药 3 d, 于末次 ig 1 h 后麻醉、腹主动脉采血, 制备含药血清; 用钩藤散含药血清处理衰老模型, 观察衰老细胞形态、衰老指征、增殖与凋亡等指标。结果: 模型组细胞较对照组形态有显著改变, 细胞衰老比例明显增加 ( $P < 0.05$ ), 因此 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化应激方法可成功建立细胞衰老模型; 钩藤散含药血清能明显减少细胞形态的改变、改善衰老指征、促进细胞增殖 ( $P < 0.01$ )、降低细胞凋亡 ( $P < 0.01$ ), 尤其 10 倍剂量组最为明显。结论: 钩藤散能有效促进细胞增殖, 降低细胞凋亡, 从而防止衰老。

**[关键词]** 钩藤散; NIH-3T3; 衰老模型; 增殖; 凋亡

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)03-0160-04

## Effects of Gouteng San on the Proliferation and Apoptosis of NIH-3T3 Cell Aging Model

HUANG Hou-cai\*, ZHONG Rong-ling, CAO Peng, SONG Jie, YANG De-gong, XIA Zhi  
(Jiangsu Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the regulatory effect of Gouteng San on the proliferation and apoptosis of NIH-3T3 cell lines. **Method:** NIH-3T3 cells were cultivated in DMEM with 10% fetal calf serum and three groups such as youth, blank and model group were used. Cells at generation 30 were treated with hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and then  $\beta$ -galactosidase dyeing kit was applied to observe cell morphology and aging indications to assure whether the aging mode was successfully established. Oral administration of Gouteng San was started for three constitutive days, twice daily. One hour after last administration, rats were anesthetized, and we drew blood from abdominal aorta for the preparation of Gouteng San medicated serum. NIH-3T3 cells were treated with Gouteng San medicated serum to observe cell morphology, aging indications, proliferation and apoptosis. **Result:** The cell morphology of model was changed and the proportion of cell senescence was increased significantly in model group than in normal control group ( $P < 0.05$ ). Therefore the aging model was successfully established by inducing NIH-3T3 cells aging via oxidative stress with hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Gouteng San medicated serum can significantly attenuate the change of cell morphology, improve aging indications, foster proliferation, ( $P < 0.01$ ) and reduce cell apoptosis ( $P < 0.01$ ), with a distinct effect at 10 times doses. **Conclusion:** Gouteng San can promote proliferation and reduce apoptosis, thus prevent aging.

**[Key words]** Gouteng San; NIH-3T3; aging model; proliferation; apoptosis

**[收稿日期]** 20110617(004)

**[基金项目]** 江苏省中医药局项目(HL07093)

**[通讯作者]** \* 黄厚才, 硕士研究生, 高级畜牧师, 从事实验动物管理与动物实验, Tel: 13372018795, E-mail: huanghoucai@sina.com

钩藤散由钩藤、茯苓、陈皮、麦冬、人参、防风、甘草等 7 味药材组成, 以前的研究显示其具有抗衰老作用, 为了进一步探讨其作用机制, 本实验采用过氧化氢通过氧化应激的方法来诱导 NIH-3T3 细胞衰老, 建立体外细胞衰老模型, 观察其对细胞衰老模型

的影响。

## 1 材料

**1.1 中药** 钩藤散由钩藤 15 g,茯苓 15 g,陈皮 15 g,麦冬 15 g,人参 10 g,防风 10 g,甘草 5 g 等 7 味药材组成,由本院中药制剂室按传统方法水提、浓缩、消毒等制成钩藤散浸膏。临用将浸膏加蒸馏水配至 100 mL,变成 0.85 g 生药/mL 浸膏溶液,实验中所用剂量均以生药量计。

**1.2 动物和细胞株** SD 大鼠,220 g,6 周龄,清洁级,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,许可证号 SCXK(沪)2007-0005。NIH-3T3 细胞由美国 ATCC 细胞库提供。

**1.3 试剂**  $\beta$ -半乳糖苷酶,碧云天公司;DMEM 培养液,美国 Invitrogen 产,内含 10% 新生胎牛血清,100Ku/L 青/链霉素,pH 7.2;胰蛋白酶,华美生物工程公司进口分装;MTT,Sigma 公司。

**1.4 仪器** OLYMPUS 倒置显微镜(日本产),Canto 流式细胞仪(美国产),SW-CJ-2FD 医用型净化工作台(苏净集团安泰公司产),三气培养箱(Heraeus 公司产),酶标仪(芬兰产)。

## 2 方法

### 2.1 NIH-3T3 细胞衰老模型的建立

**2.1.1 细胞培养及分组** NIH-3T3 细胞接种在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,在温度 37 °C、饱和湿度的培养箱中培养。从 20 代开始,细胞随机分成 3 组:年轻组(20 代细胞)、空白对照组(空白血清组)、模型组( $H_2O_2$  处理)。然后细胞培养,3~4 d 换液 1 次,细胞达到融合时,用 0.025% 胰酶后 1:4 传代,细胞至 30 代时随机收获部分细胞作各项实验。

**2.1.2  $H_2O_2$  刺激细胞** 将  $H_2O_2$  用 DMEM 完全培养液按不同浓度梯度稀释后,加入细胞中,形成 0,300,600,1 000,1 500,2 000  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度梯度,培养 2 h 后,弃去上清液。用 PBS 或 DMEM 洗 3 遍,加入 DMEM 完全培养液继续培养。

**2.2 细胞增殖(代谢活力)实验** MTT 法。取 42 代细胞接种 96 孔培养板,每孔加入 5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  MTT 10  $\mu\text{L}$ ,37 °C 孵育 4~6 h,终止培养,小心吸弃孔内上清液后每孔加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO,室温震荡 15 min,待蓝紫色甲臜颗粒充分溶解后,酶联检测仪 492 nm 波长下测定吸光度(A)。

**2.3 检测指标** 在连续培养到第 10 天,用胰酶消化 6 孔板中细胞,取其中 5 000 个细胞接种到 24 孔板中培养 24 h,用碧云天公司的细胞衰老  $\beta$ -半乳糖

苷酶染色试剂盒染色细胞。在高倍显微镜下观察染色细胞,染上蓝色的细胞即是衰老细胞。

**计数** 数出 400 个细胞及其中含有的衰老细胞,即可得出该  $H_2O_2$  浓度作用下的细胞衰老比例。

### 2.4 含药血清对 NIH-3T3 细胞衰老模型的影响

**2.4.1 含药血清的制备** 将大鼠随机分为 5 组:人的 20 倍等效剂量组(17 g 生药/kg 体重)、10 倍等效剂量组、5 倍等效剂量组、2.5 倍等效剂量组及空白对照组,每组 10 只。各剂量组每天 ig2 次,间隔 12 h,连续给药 3 d,于末次 ig 1 h 后麻醉腹主动脉采血,4 °C 过夜,3 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min,小心分离血清,于 56 °C 下 30 min 灭活,经 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜滤过除菌,-20 °C 保存。同等条件下,以等体积的蒸馏水 ig,制备空白对照血清。

**2.4.2 实验分组和处理** NIH-3T3 细胞从第 24 代开始与钩藤散含药血清共同培养,按钩藤散含药血清不同的作用浓度将细胞分为 5 组:① 模型组(即 0.6  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $H_2O_2$  作用组):DMEM 培养液;② 钩藤散 2.5 倍剂量组:DMEM 培养液 + 2.5 倍剂量钩藤散含药血清共同培养细胞;③ 钩藤散 5 倍剂量组:DMEM 培养液 + 5 倍剂量钩藤散含药血清共同培养细胞;④ 钩藤散 10 倍剂量组:DMEM 培养液 + 10 倍剂量钩藤散含药血清共同培养细胞;⑤ 钩藤散 20 倍剂量组:DMEM 培养液 + 20 倍剂量钩藤散含药血清共同培养细胞。各组设 3 个平行对照组。

**2.4.3 细胞代谢活力测定** MTT 法,操作方法同 2.3。

**2.4.4 倒置显微镜下观察 NIH-3T3 细胞的形态** 方法同 2.3。

**2.4.5  $\beta$ -半乳糖苷酶的细胞化学染色** 方法同 2.3。

**2.4.6 流式细胞仪检测凋亡** 按试剂盒说明,胰酶消化收集  $1\times 10^6$  个细胞,PBS 清洗后弃去上清。再用 100  $\mu\text{L}$  结合缓冲液重悬,每管加入 2  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC,2  $\mu\text{L}$  PI 双染。避光孵育 15 min 后流式细胞仪检测。以上实验重复 3 次。

**2.5 统计数据** 实验数据以 SPSS17.0 进行统计处理,数据以  $\bar{x}\pm s$  表示,组间比较进行 *t* 检验。 $P < 0.05$  有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 NIH-3T3 细胞衰老模型

**3.1.1 细胞的形态变化** 年轻组细胞胞体呈梭形或不规则三角形,胞质向外伸出 2~3 个长短不同的突起,中央有卵圆形核,核仁清晰可见。空白对照组

细胞形态与年轻组差不多,但细胞体积较年轻组增大,部分细胞胞浆内的颗粒增多。模型组的细胞形态不规则,绝大多数的细胞体积明显增大,胞体变平,核浆比例缩小,胞浆内的颗粒丰富。见图 1。

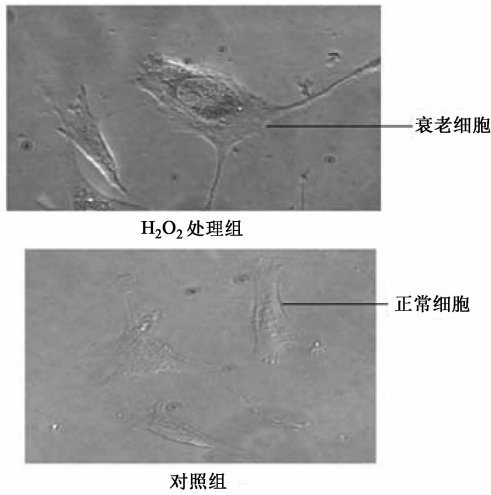


图 1 过氧化氢诱导的细胞衰老模型

**3.1.2  $\beta$ -半乳糖苷酶细胞化学染色**  $\beta$ -半乳糖苷酶染色阴性细胞的细胞核复染为红色,而阳性细胞的胞浆染为青绿色。年轻组  $\beta$ -半乳糖苷酶染色阳性细胞数的百分比为  $2.00\% \pm 1.00\%$ ,空白对照组: $2.624\% \pm 0.208\%$ ,模型组: $75.00\% \pm 2.64\%$ ,与年轻组比有显著差异( $P < 0.05$ )。

**3.1.3 不同浓度  $H_2O_2$  刺激对 NIH-3T3 细胞代谢活力的影响** 不同浓度  $H_2O_2$  刺激下,细胞代谢活力随浓度递增而呈梯度抑制,且从  $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度开始代谢活力受抑制程度有显著差异( $P < 0.01$ ),由此可见细胞增殖随浓度递增而愈来愈受抑制。见表 1。

表 1 不同浓度  $H_2O_2$  对 NIH-3T3 细胞代谢活力的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

$H_2O_2$ 浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	A
0(空白)	$1.72 \pm 0.29$
50	$1.41 \pm 0.02$
150	$1.31 \pm 0.06$
300	$0.88 \pm 0.01^{2)}$
600	$0.62 \pm 0.04^{2)}$
1 000	$0.53 \pm 0.03^{2)}$

注:与空白比<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ,<sup>3)</sup>  $P < 0.001$ 。

由以上各项指标可以看出,用  $H_2O_2$  可以可靠、便捷地建立体外细胞衰老模型。

**3.2 钩藤散含药血清对 NIH-3T3 细胞衰老模型的影响**

**3.2.1 对 NIH-3T3 细胞形态的影响** 倒置显微镜

下观察  $H_2O_2$  作用 3 次后的细胞形态不规则,绝大多数的细胞体积明显增大,胞体变平,核浆比例缩小,胞浆内的颗粒丰富。钩藤散 10 倍剂量组含药血清处理后与模型组比较大体积的细胞数明显减少,细胞形态较规则,胞体不如模型组扁平,但胞浆内的颗粒仍然很丰富。钩藤散 20 倍剂量组含药血清处理组细胞体积明显比模型组小,细胞体呈梭形或不规则三角形,胞浆内见少量的颗粒分布。钩藤散 5 倍剂量组含药血清处理组细胞形态与钩藤散 2.5 倍剂量组含药血清处理组细胞无明显区别。

**3.2.2 钩藤散含药血清对 NIH-3T3 细胞代谢活力的影响** 由表 2 可知,不同浓度的钩藤散含药血清对  $0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} H_2O_2$  作用下的 NIH-3T3 细胞代谢活力均有较好的效果,平均值显著高于空白组,因此钩藤散对细胞增殖有明显促进作用,且以 10 倍剂量组效果最佳。

表 2 钩藤散含药血清对 NIH-3T3 细胞代谢活力及  $\beta$ -半乳糖苷酶染色阳性细胞率的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	代谢活力/A	阳性细胞率/%
模型	$0.62 \pm 0.04$	$75.73 \pm 0.90$
钩藤散(2.5 倍)	$1.64 \pm 0.08^{3)}$	$8.47 \pm 0.73^{3)}$
钩藤散(5 倍)	$1.99 \pm 0.30^{2)}$	$6.66 \pm 0.75^{3)}$
钩藤散(10 倍)	$2.01 \pm 0.39^{2)}$	$4.77 \pm 0.57^{3)}$
钩藤散(20 倍)	$2.34 \pm 0.02^{3)}$	$2.91 \pm 0.53^{3)}$

注:与模型组比<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ,<sup>3)</sup>  $P < 0.001$ (表 3 同)。

**3.2.3 对细胞衰老指征的影响** 本研究发 NIH-3T3 细胞经过  $H_2O_2$  作用 3 次后的细胞(即模型组细胞)在光镜下可见形态不规则,绝大多数的细胞体积明显增大,胞体变平,核浆比例缩小,胞浆内的颗粒丰富, $\beta$ -半乳糖苷酶染色阳性细胞数最多。不同浓度的钩藤散含药血清处理后,细胞的上述衰老指征得到不同程度的改善:光镜下可见细胞体积减小,细胞颗粒减少; $\beta$ -半乳糖苷酶染色阳性细胞数减少。其中以 10 倍剂量钩藤散含药血清处理组的细胞衰老指征改善最明显,见表 2。

**3.2.4 对细胞凋亡率的影响** 我们采用流式细胞术分析了不同时间检测点细胞凋亡率,由表 3 可以看出,钩藤散含药血清对双氧水诱导的 NIH-3T3 细胞凋亡在 24,36,48,72 h 具有梯度依赖性的抑制,差异有非常显著性意义( $P < 0.01$ ),以 10 倍剂量组细胞凋亡率最低。

## 4 讨论

近年研究发现, $H_2O_2$  与多种疾病如自身免疫

表 3 钩藤散含药血清组对双氧水诱导的 NIH-3T3 细胞凋亡率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	24 h	36 h	48 h	72 h
模型	10.12 ± 0.16	15.96 ± 0.32	22.35 ± 0.12	29.11 ± 0.24
钩藤散(2.5 倍剂量)	8.42 ± 0.13	9.46 ± 0.24 <sup>1)</sup>	7.62 ± 0.26 <sup>1)</sup>	8.11 ± 0.43 <sup>2)</sup>
钩藤散(5 倍剂量)	9.89 ± 0.45	8.23 ± 0.36 <sup>1)</sup>	7.69 ± 0.58 <sup>1)</sup>	9.78 ± 0.45 <sup>2)</sup>
钩藤散(10 倍剂量)	6.42 ± 0.79 <sup>2)</sup>	7.54 ± 0.88 <sup>2)</sup>	3.87 ± 0.86 <sup>2)</sup>	2.65 ± 0.96 <sup>2)</sup>
钩藤散(20 倍剂量)	7.25 ± 0.49	8.63 ± 0.78 <sup>1)</sup>	9.24 ± 0.25 <sup>1)</sup>	9.58 ± 0.58 <sup>2)</sup>

病、肿瘤、炎症以及细胞程序性死亡(PCD)等病理过程关系密切<sup>[1-2]</sup>。氧化应激水平的升高,尤其是膜脂质过氧化增高会扰乱神经元的能量代谢、离子稳态,损伤膜的离子依赖性 ATP 酶及葡萄糖和谷氨酸载体,使神经元对细胞外毒素及凋亡的敏感性增加<sup>[3]</sup>。可见,氧应激在引起神经元凋亡的过程中有重要作用。

小鼠胚胎成纤维细胞(NIH-3T3)是目前国际上公认的用于体外研究细胞复制衰老的模型。过氧化氢是一种氧化剂,它作用后的细胞群与衰老对照组的细胞有相似的形态学改变,提示 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 能在相对较短的时间内有效地诱导细胞衰老。本实验用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 3 次后观察到 NIH-3T3 细胞体积增大、形态不规则,胞体变平,细胞颗粒明显增加;β-半乳糖苷酶染色阳性细胞的百分比增加,且细胞增殖随 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度递增而呈梯度抑制。因此,体外细胞衰老模型的建立是成功的。

细胞凋亡(apoptosis)是在基因控制下的自我消亡过程,虽然在正常生理及发育过程中,细胞凋亡是必需的,但过度的细胞凋亡则可造成病理过程,如 Parkinson disease (PD), Alzheimer's disease (AD) 和 Huntington 舞蹈病<sup>[4]</sup>。Mochiluki 等<sup>[5]</sup>首先报道采用 TUNEL 染色法对 PD 病人脑组织尸解发现有凋亡现象。有学者认为研究 PD 与凋亡关系应该采用动物模型或细胞培养模型<sup>[6]</sup>。MTT 比色法,是一种检测细胞存活和生长的方法。用酶联免疫检测仪测定其光吸收值,可间接反映活细胞增殖情况。

本实验结果显示,细胞形态的改变:钩藤散 10 倍剂量组含药血清处理后与模型组比,较大体积的细胞数明显减少,细胞形态较规则,胞体不如模型组扁平,但胞浆内的颗粒仍然很丰富;细胞增殖:不同浓度的钩藤散含药血清对 0.6 mol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用

下的 NIH-3T3 细胞增殖均有较好的效果,特别是 10 倍剂量组效果最佳( $P < 0.01$ )。衰老指征:不同浓度的钩藤散含药血清处理后,细胞的衰老指征得到不同程度的改善:细胞体积及细胞颗粒减少,β-半乳糖苷酶染色阳性细胞数减少,且以 10 倍剂量钩藤散含药血清处理组的细胞衰老指征改善最明显;细胞凋亡:在 24 ~ 72 h 具有梯度依赖性的抑制,并且 10 倍剂量钩藤散含药血清组效果最为明显( $P < 0.01$ )。

#### [参考文献]

- [1] Ara J, Ali R. Polynucleotide specificity of anti-reactive oxygen species (ROS) DNA antibodies [J]. Clin Exp Immunol, 1993, 94(1):134.
- [2] Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system [J]. Neurochem, 1992, 59(5):1609.
- [3] Mattson M P, Pedersen W A, Duan W C, et al. Cellular and molecular mechanisms underlying perturbed energy metabolism and neuronal degeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases [J]. Ann NY Acad Sci, 1999, 893:154.
- [4] 杨新玲,蒋雨平,翁建英,等. 硫丹对 PC12 细胞增殖的影响及诱导其凋亡的研究 [J]. 中国临床神经学, 2004, 12(1):5.
- [5] Mochiluki H, Gotik, Mori H, et al. Histochemical detection of apoptosis in Parkinson's disease [J]. J Neural Sci, 1996, 137:120.
- [6] Rossiter J P, Roiopelle R J, Bisby M A. Axotomy-induced apoptic cell death of neonatal rat facial, motoneurons: time course analysis and relation of NADPH-diaphorase activity [J]. Exp Neurol, 1996, 138:47.

[责任编辑 聂淑琴]