

引用格式:

韩少凡, 程满, 王懿文, 陈彦超, 朱登峰, 彭国平, 饶力群, 汪启明. 灰毡毛忍冬乙醇提取物减缓 D-半乳糖致小鼠胚胎成纤维细胞氧化应激的效果[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2023, 49(1): 43–51.
HAN S F, CHENG M, WANG Y W, CHEN Y C, ZHU D F, PENG G P, RAO L Q, WANG Q M. Effect of ethanol extract of *Lonicera macranthoides* on oxidative stress of mouse embryonic fibroblasts induced by D-galactose[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2023, 49(1): 43–51.
投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



灰毡毛忍冬乙醇提取物减缓 D-半乳糖致小鼠胚胎成纤维细胞氧化应激的效果

韩少凡¹, 程满², 王懿文¹, 陈彦超¹, 朱登峰³, 彭国平¹, 饶力群¹, 汪启明^{1*}

(1.湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2.中国科学院生物物理研究所, 北京 100101; 3.隆回县农业农村局, 湖南 隆回 422200)

摘要: 为探讨灰毡毛忍冬乙醇提取物对 D-半乳糖诱导小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)氧化应激的保护作用及其潜在机制, 通过广泛靶标代谢组测序和高效液相色谱法检测灰毡毛忍冬乙醇提取物中活性物质, 采用 20 mg/mL 的 D-半乳糖处理 MEF 细胞, 建立细胞衰老模型, 试验设置对照组(0 mg/mL 的 D-半乳糖)、模型组(20 mg/mL 的 D-半乳糖)、灰毡毛忍冬乙醇提取物组(100、500、1000 μg/mL 的灰毡毛忍冬乙醇提取物添加 20 mg/mL 的 D-半乳糖)、阳性对照组(50 μg/mL 的三七总皂苷添加 20 mg/mL 的 D-半乳糖), 按照试验分组, 将细胞在 37 ℃、5%的 CO₂ 培养箱中培养 48 h, 检测细胞抑制率、超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量、线粒体膜电位(MMP)和线粒体活性氧(mtROS)水平, 以及 p53、p16、线粒体复合体基因、Bcl-2、Caspase-3 的表达水平。结果表明: 灰毡毛忍冬乙醇提取物中含有酚酸、黄酮、有机酸、萜类等大量活性物质; 与对照组相比, 模型组细胞抑制率显著增加, 细胞数量显著减少, MMP 下降, mtROS 水平增加, SOD 含量降低, MDA 含量增加, 线粒体复合体蛋白 NDUFV1 和抑凋亡蛋白 Bcl-2 明显下降, Caspase-3 明显上升; 与模型组相比较, 灰毡毛忍冬乙醇提取物组和阳性对照组有效降低了细胞抑制率, 显著提高了细胞数量和 SOD 活性, 降低了 MDA 含量, 提高 MMP 水平, 降低 mtROS 含量, 有效降低 p53、p16、Caspase-3 的蛋白水平, 升高 Bcl-2、NDUFV1 的蛋白水平。说明在 MEF 细胞中, 灰毡毛忍冬乙醇提取物可通过增加线粒体复合体 I 蛋白富集和减缓细胞凋亡来减弱 D-半乳糖所诱导的氧化应激效应。

关键词: 灰毡毛忍冬; 乙醇提取物; D-半乳糖; 小鼠胚胎成纤维细胞; 线粒体; 氧化应激

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2023)01-0043-09

Effect of ethanol extract of *Lonicera macranthoides* on oxidative stress of mouse embryonic fibroblasts induced by D-galactose

HAN Shaofan¹, CHENG Man², WANG Yiwen¹, CHEN Yanchao¹, ZHU Dengfeng³,
PENG Guoping¹, RAO Liqun¹, WANG Qiming^{1*}

(1.College of Biological Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 2.Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 3.Agricultural and Rural Bureau of Longhui County, Longhui, Hunan 422200, China)

Abstract: In order to investigate the protective effect of the ethanol extract of *Lonicera macranthoides* on oxidative stress induced by D-galactose in mouse embryonic fibroblasts(MEF) and its potential mechanism, the active substances in the

收稿日期: 2022-07-17

修回日期: 2022-10-20

基金项目: 湖南省高层次聚集工程创新创业人才项目(2021RC5006); 湖南农业大学“双一流”建设基金(SYL2019021)

作者简介: 韩少凡(1997—), 女, 河南驻马店人, 硕士研究生, 主要从事生物化学与分子生物学研究, HSF970605@163.com; *通信作者, 汪启明, 博士, 副教授, 主要从事生物化学与分子生物学研究, wqmqmx21@126.com

ethanol extract of *Lonicera macranthoides* were detected by extensive target metabolome sequencing and high performance liquid chromatography. The MEF cells were treated with 20 mg/mL D-galactose to establish a cell aging model. According to experimental groups, the MEF cells of the control group(0 mg/mL D-galactose), model group(20 mg/mL D-galactose), *Lonicera macranthoides* ethanol extract group(100, 500, 1000 μ g/mL ethanol extract of *Lonicera macranthoides* added with 20 mg/mL D-galactose) and positive control group(50 μ g/mL *Panax notoginseng* saponin added with 20 mg/mL D-galactose) had been grew for 48 hours, observed the number of cells with ordinary light microscope, detected the inhibition rate of cells with CCK-8 method, detected the activity of superoxide dismutase(SOD) and the content of malondialdehyde(MDA) with biochemical method, detected the level of mitochondrial membrane potential(MMP) and mitochondrial reactive oxygen species(mtROS) with flow cytometry, and detected the expression of p53, p16. Besides, the expression of mitochondrial complex gene, Bcl-2, Caspase-3, and the expression of mitochondrial complex protein, Bcl-2, Caspase-3 were detected by Western Blot. The results showed that the ethanol extract of *Lonicera macranthoides* contained phenolic acids, flavonoids, organic acids, terpenoids and other active substances. Compared with the control group, the inhibition rate of cells in the model group was significantly increased and compared with the model group, the ethanol extract group of *Lonicera macranthoides* and the positive control group effectively reduced the cell inhibition rate($P < 0.05$), significantly increased the number of cells($P < 0.05$, $P < 0.01$) and SOD activity, decreased the content of MDA($P < 0.05$, $P < 0.01$), increased MMP, decreased the level of mtROS($P < 0.01$), effectively reduced the protein levels of p53, p16, Caspase-3, and increased the protein levels of Bcl-2 and NDUFV1($P < 0.05$). It showed that in MEF cells, the ethanol extract of *Lonicera macranthoides* can resist the oxidative stress induced by D-galactose by increasing the concentration of mitochondrial complex I protein and slowing down cell apoptosis.

Keywords: *Lonicera macranthoides*; ethanol extract; D-galactose; mouse embryonic fibroblasts; mitochondrion; oxidative stress

细胞是组成生物体的基本单位, 细胞衰老最终引起器官的功能异常, 从而导致生物体的衰老^[1-2]; 因此, 建立细胞水平的衰老模型对于研究生物体衰老具有重要意义。研究^[3-4]发现, D-半乳糖可以加快细胞衰老, 使细胞渗透压失衡、细胞肿胀, 最终导致代谢失调。D-半乳糖作为促衰老剂在国内外被广泛研究。D-半乳糖处理可导致机体产生氧化应激反应, 从而使线粒体功能失调和细胞凋亡, 最终使机体功能衰退^[5]。

灰毡毛忍冬是山银花的一种药源植物, 主要种植于湖南、重庆、贵州等地, 具有消炎解热、抗病毒、抗氧化、抗衰老等功能^[6]。目前, 山银花中已有 200 多种物质被鉴定, 主要包括有机酸(如绿原酸、奎宁酸、咖啡酸等), 黄酮类化合物(如木犀草素、木犀草苷等), 三萜及皂苷类(如灰毡毛忍冬皂苷乙、川续断皂苷乙等), 环烯醚萜类(如马钱子苷、四乙酰断马钱子苷等)^[7]。山银花黄酮类化合物可减轻过氧化氢(H_2O_2)诱导的内皮细胞和心肌细胞氧化损伤^[8]。宫瑾瑾等^[9]研究发现, 金银花提取物可以增加 SOD 含量, 降低 MDA 含量, 提高抗氧化能力, 其抗氧化的主要成分为绿原酸。路国辉等^[10]研究发现, 金银花提取物可以减缓大鼠 PC12 细胞的损伤, 发挥功能的

主要物质也是绿原酸。朱振宝等^[11]研究发现, 金银花醇提物的抗氧化作用高于水提物。金银花与山银花功效相似, 但灰毡毛忍冬调控氧化应激的机制还不清楚。本试验以灰毡毛忍冬乙醇提取物为材料, 采用 HPLC、CCK-8、生化法、荧光定量 PCR、蛋白质印迹法, 研究灰毡毛忍冬调控细胞氧化应激的作用, 旨在分析山银花抗氧化、抗衰老的机制。

1 材料与仪器

1.1 供试材料

灰毡毛忍冬采自湖南邵阳隆回山银花种植基地。

1.2 细胞、药物与试剂

小鼠胚胎成纤维细胞 (mouse embryonic fibroblast, MEF)第五代来自中国科学院生物物理研究所线粒体生物学研究组。

三七总皂苷购自北京索莱宝公司(批号 S4820, 纯度 $\geq 95\%$); D-半乳糖购自 Thermo; 超氧化物歧化酶测定试剂盒和细胞丙二醛测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所; CCK-8 细胞增殖-毒性检测试剂购自日本同仁化学研究所; Bcl-2、Caspase-3、NDUFV1、SDHB、UQCRCFS1、ATP5H、 β -actin 抗体来自 ABclonal; COX4 购自 HuaXing

公司; GAPDH 抗体来自 Zenbioscience; 二抗来自 Jackson Immuno Research。

2 方法

2.1 灰毡毛忍冬成分分析

2.1.1 灰毡毛忍冬乙醇提取物的制备

参照文献[12]制备醇提取液。将山银花药材于 45 °C 烘干 3 h, 经中药粉碎机粉碎过筛(孔径 0.425 mm), 称取粉末 100 g, 加入 1 L 50%乙醇, 浸泡 24 h, 用纱布过滤后加入 1 L 50%乙醇, 60 °C 浸泡 3 h, 再过滤。将 2 次滤液约 2 L 于 65 °C 旋转蒸发浓缩至无醇味, 加蒸馏水定容至 100 mL, 即得到质量浓度为 1 g/mL 的提取物。用时将灰毡毛忍冬乙醇提取物过 0.45 μm 的滤膜 2 次。

2.1.2 HPLC 测定灰毡毛忍冬乙醇提取物中的绿原酸

将绿原酸的储备液用 70%甲醇配制为最终质量浓度为 0.4 mg/mL 的溶液, 再用 70%甲醇稀释成试验所需浓度。进样之前用 0.45 μm 的滤膜过滤 2 次。洗脱液 A 为乙腈; 洗脱液 B 为 0.5%的乙酸: 0 min 时为 12%, 10~20 min 时为 20%, 45 min 时为 30%, 然后在 5 min 内返回到 12%。以 1 mL/min 的流速和 30 °C 的恒定柱温进样 10 μL 样品提取物。获取 330 nm 处的色谱图, 用于测定绿原酸的含量。

2.1.3 广泛靶标代谢组分析灰毡毛忍冬乙醇提取物

测序公司为武汉迈特维尔生物科技有限公司。将样品从-80 °C 冰箱取出, 解冻后旋涡混匀, 取 200 μL 样品于 2 mL EP 管中, 加入 200 μL 70%甲醇内标提取液, 旋涡混匀。

12 000g、4 °C 离心 10 min, 取上清液, 用 0.22 μm 滤膜过滤, 放置于样品瓶中保存, 用于超高效液相色谱和串联质谱测试(LC-MS/MS)。

色谱柱为 Agilent SB-C₁₈(1.8 μm, 2.1 mm×100 mm)。流动相 A 相为超纯水, 加入 0.1%的甲酸; B 相为乙腈, 加入 0.1%的甲酸。洗脱梯度: 0 min B 相比例为 5%; 9 min 内 B 相比例线性增加至 95%, 保持 1 min; 10.00~11.10 min, B 相比例降低为 5%, 平衡 14 min。进样流速 0.35 mL/min; 柱温 40 °C; 进样量 4 μL。

质谱条件: 电喷雾离子源温度为 550 °C, 离子喷雾电压 5500 V(正离子模式)/-4500 V(负离子模式), 离子源气体 I、离子源气体 II 和气帘气分别设

置为 50、60、25 psi, 碰撞诱导电离参数设为最高, 在 QQQ 和 LIT 模式下分别用 10 和 100 μmol/L 聚丙二醇溶液进行仪器调协和质量校准。QQQ 扫描使用 MRM 模式, 将碰撞气体设置为中等, 通过进一步的去簇电压(DP)和碰撞能优化(CE), 完成各个 MRM 离子对的 DP 和 CE。根据每个时期洗脱的代谢物, 在每个时期检测一组特定的 MRM 离子对。使用 Analyst 1.6.3 处理质谱数据。

2.1.4 广泛靶标代谢组分析灰毡毛忍冬花蕾

测序公司为武汉康之代谢生物科技有限公司, 试验步骤同 2.1.3。

2.2 细胞培养及传代

将 MEF 细胞置于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中培养, 放置在 37 °C、5%的 CO₂ 培养箱中培养至 80%左右进行传代。吸走原来的培养基, 用 1×PBS 清洗, 再加入 1 mL 胰酶浸润所有细胞, 吸去胰酶, 消化 3 min 后用含有 10%胎牛血清的培养基重悬, 按 1:3 进行传代。试验分为 4 组: 对照组, 正常 10%胎牛血清的 DMEM; D-半乳糖组, 10%胎牛血清 DMEM 含 20 mg/mL D-半乳糖; 山银花乙醇提取物组, 含 20 mg/mL D-半乳糖的 10%胎牛血清的 DMEM 中加入 100、500、1000 μg/mL 的灰毡毛忍冬乙醇提取物; 阳性对照组, 含 20 mg/mL D-半乳糖的 10%胎牛血清的 DMEM 中加入 50 μg/mL 的三七总皂苷。统一在 37 °C、5%的 CO₂ 培养箱中培养 48 h。

2.3 显微镜观察细胞形态

将 3 代细胞以 4×10⁴/mL 接种于 12 孔板, 按 2.2 处理后, 放置普通光学显微镜下观察细胞形态。

2.4 CCK-8 法检测细胞增殖活性

将计数的 MEF 细胞按照 4×10⁴/mL 铺于 96 孔板, 每组设置 6 个重复, 使用正常培养基培养, 2 h 后细胞贴壁, 更换培养基, 按 2.2 处理, 每孔添加 10 μL CCK-8 再培养 2 h, 在酶标仪上检测 450 nm 处的吸光值, 按公式(1)计算细胞抑制率。

$$a=(b-c)/(b-d) \times 100\% \quad (1)$$

式中: *a* 为抑制率; *b* 为对照 OD 值; *c* 为试验 OD 值; *d* 为空白 OD 值。

试验设置 3 组生物学重复, 采用 GraphPad Prism 7 进行统计分析; 组间比较采用单因素方差分析。

2.5 流式细胞术检测 MMP 和 mtROS 水平

将 MEF 细胞以 4×10^4 /mL 接种于 12 孔板, 正常培养 2 h 后更换培养基, 按 2.2 处理后上机检测。3 次重复。

2.6 SOD 活性和 MDA 含量检测

2.6.1 Wst-1 法检测 SOD 含量

将计数的 MEF 细胞按 4×10^4 /mL 接种于 12 孔板, 等待 2 h 后待其贴壁, 按 2.2 处理 48 h 后弃去培养基, 用 PBS 洗涤, 胰酶消化 3 min, 1 mL 培养基重悬, 500g 离心 5 min, 弃去上清, 破碎细胞(在装有细胞的 EP 管中加入蒸馏水, 放入液氮 5 s 后立即转入 -20°C 冰箱 30 s, 室温解冻, 反复 3 次), 用 BCA 法测定蛋白浓度, 按试剂盒操作说明加入相应的溶液, 37°C 反应 20 min, 在 450 nm 处测定吸光度。分别按公式(2)(3)计算 SOD 抑制率和 SOD 活力。

$$e=(b-f)-(c-e)/(b-f) \quad (2)$$

$$h=(e/50\%) \times (i/j)/k \quad (3)$$

式中: b 为对照 OD 值; c 为试验 OD 值; e 为 SOD 抑制率; f 为对照空白 OD 值; g 为试验空白 OD 值; h 为 SOD 活力; i 为反应体系; j 为稀释倍数; k 为待测样本蛋白浓度。

2.6.2 微板法检测 MDA 含量

将计数的 MEF 细胞按 4×10^4 /mL 接种于 12 孔板, 等待 2 h 后待其贴壁, 更换试验所需培养基。按 2.2 处理 48 h 后弃去培养基, 用 PBS 洗涤 1 次, 胰酶消化 3 min, 1 mL 培养基重悬, 500g 离心 5 min, 弃上清, 加提取液 500 μL , 混匀, 再将细胞破碎(超

声, 功率 300 W, 冰水浴, 每 3~5 s 超声 1 次, 间隔 4 次, 每次间隔 30 s), 取 100 μL 于 1.5 mL EP 管中(用针头扎 1 个小孔), 空白管、标准管、测定管各添加 1 mL 工作液, 其澄清液、贮备液、显色液的体积比为 0.2 : 3 : 1, 涡旋混匀, 95°C 水浴 40 min, 取出后用流水冷却, 4000g 离心 10 min, 吸取 250 μL 反应液至 96 孔板中, 用酶标仪测定 530 nm 处的吸光度。按公式(4)计算 MDA 含量。

$$l=(c-d/m-d) \times n/k \quad (4)$$

式中: l 为 MDA 含量; c 为试验 OD 值; d 为空白 OD 值; m 为标准 OD 值; n 为标准品浓度; k 为待测样本蛋白浓度。

2.7 qPCR 检测相关基因表达

将 MEF 细胞以 4×10^4 /mL 接种于 12 孔板, 正常培养基培养 2 h 后按 2.2 处理 48 h, 吸走培养基, 加 1 mL PBS 清洗 3 次, 再加 1 mL Trizol 裂解 5 min, 转移至 1.5 mL EP 管中, 加 200 μL 氯仿, 充分混匀, 静置 3 min, 在 4°C 、12 000g 离心 15 min, 取 400 μL 上清液加入等体积提前预冷的异丙醇, 混匀, -30°C 沉淀 10 min, 12 000g 离心 10 min, 倒掉上清液, 添加预冷的 1 mL 75% 的乙醇清洗 1 次, 5000g 离心 5 min, 弃上清液, 室温风干 3 min, 每个样品加 20 μL DEPC 配置的超纯水溶解, 用酶标仪检测浓度和纯度, 采用 HiScript III 1st Strand cDNA 合成逆转录试剂盒将 RNA 反转成 cDNA, 通过 NCBI(national center for biotechnology information)设计引物(表 1); 最后通过荧光定量 PCR 检测特定基因的表达量, 计算出相对表达量。3 次重复。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 The sequence of qRT-PCR primers

引物名称	引物序列(5'-3')	引物名称	引物序列(5'-3')
GAPDH-F	TCCCACTTCCACCTTC	UQRFS1-F	TGCTTCTGCTGACGTACTGG
GAPDH-R	CTGTAGCCGTATTCATTGTC	UQRFS1-R	TATGGCGCACAAACAGAGGT
P53-F	CACCTCACTGCATGGACGAT	COX4-F	TCACTGCGCTCGTTCTGATT
P53-R	GTGGAAGCCATAGTTGCCCT	COX4-R	TGGCCTTCATGTCCAGCATT
P16-F	TTCTTGGTGAAGTTCGTGCG	ATP5H-F	GTGGAGGTCATGCCCCAAA
P16-R	CGTGAACGTTGCCATCATC	ATP5H-R	TAAGCCCAGTCAATCGCAGG
18S-F	TTATGGTTCCTTTGGTTCGCTC	β -actin-F	GATATCGCTGCGCTGGTTCG
18S-R	CGGGTTGGTTTTGATCTGAT	β -actin-R	GATATCGCTGCGCTGGTTCG
NDUFV1-F	AAGCCATCGCTCGTCTCATT	Caspase-3-F	TGGCTTGCCAGAAGATACCCG
NDUFV1-R	TCTCCCTTCACAAATCGGGC	Caspase-3-R	CCACGACCCGTCCTTTGAAT
SDHB-F	AGTGCGGACCTATGGTGTG	Bcl-2-F	TGGCATCTTCTCCTTCCAGCC
SDHB-R	AGACTTTGCTGAGGTCCGTG	Bcl-2-R	ACGACGGTAGCGACGAGAG

2.8 WB(Western Blot)检测 Bcl-2、Caspase-3 以及线粒体超级复合体蛋白的表达量

将 MEF 细胞以 $4 \times 10^4/\text{mL}$ 接种于 12 孔板, 处理 48 h 后采用 WB 方法检测 Bcl-2、Caspase-3 以及线粒体超级复合体蛋白; 运用凝胶成像仪显影拍照; 采用 Image J 分析条带。3 次重复。

2.9 数据处理与分析

采用 SPSS 18.0 和 Prism 7 进行统计处理, 数值以均值加减标准差表示; 组间比较采用单因素方差分析。

3 结果与分析

3.1 灰毡毛忍冬乙醇提取物的成分分析

3.1.1 广泛靶标代谢组分析灰毡毛忍冬花蕾和灰毡毛忍冬花蕾乙醇提取物成分

通过广泛靶标代谢组分析, 发现灰毡毛忍冬花蕾和灰毡毛忍冬花蕾乙醇提取物中均含有 12 种酚酸(如绿原酸、异绿原酸、隐绿原酸等)、30 种黄酮类化合物(如木犀草苷、木犀草素等)、5 种萜类(如灰毡毛忍冬皂苷甲、川续断皂苷乙等)、13 种有机酸(如奎宁酸、脱落酸、琥珀酸等)、18 种氨基酸及其衍生物(如 L-鸟氨酸、L-组氨酸等)、14 种核苷酸及其衍生物(如鸟苷、胞苷等)、6 种脂质(如反油酸、肉豆蔻酸、亚油酸等)、4 种维生素(如烟酰胺、维生素 C 等)、18 种生物碱(如腐胺、哌啶、吡啶等)。按照《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)^[6] 规定的方法测得绿原酸含量为 4.027%, 符合国家药典标准。

3.1.2 HPLC 测定灰毡毛忍冬乙醇提取物中绿原酸成分

采用高效液相色谱法检测绿原酸含量。绿原酸标准品的保留时间为 11 ~ 12 min, 样品中绿原酸的保留时间与标准品一致, 测得灰毡毛忍冬乙醇提取物中绿原酸的质量分数为 7 mg/g。

3.2 D-半乳糖诱导 MEF 细胞衰老模型的建立

3.2.1 不同质量浓度 D-半乳糖处理的 MEF 细胞抑制率

从表 2 可以看出, 细胞的抑制率随着 D-半乳

糖浓度的增加而增加, 当 D-半乳糖的质量浓度为 5 mg/mL 及以上时, 细胞抑制率明显高于对照组, D-半乳糖的浓度为 40 mg/mL 时, 抑制率为 70%左右, 已经影响细胞的正常生长。根据文献[13-15], 抑制率为 50%左右较为合适; 因此, 选取对 MEF 细胞起毒性作用的临界浓度 20 mg/mL 作为后续模型组浓度。

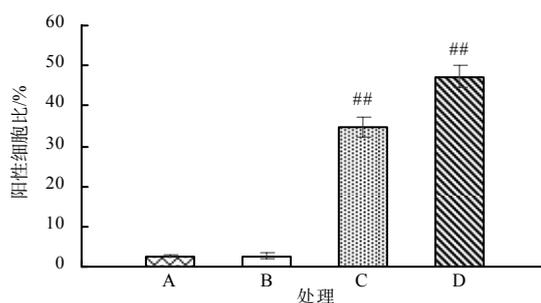
表 2 不同质量浓度的 D-半乳糖处理的 MEF 细胞抑制率($n=3$)

组别	D-半乳糖的质量浓度/ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	细胞抑制率/%
对照组	0	0
D-半乳糖组	5	(28.68±6.25) ^{##}
	10	(39.74±3.98) ^{##}
	20	(54.37±2.42) ^{##}
	40	(70.23±4.55) ^{##}

“##”示与对照组比较, 差异有统计学意义($P<0.01$)。

3.2.2 β -半乳糖苷酶染色结果

为进一步确定 MEF 细胞在不同质量浓度 D-半乳糖处理时的衰老程度, 对其用 β -半乳糖苷酶染色, 染色结果如图 1 所示, 与正常组相比, 20 mg/mL D-半乳糖处理的细胞中阳性细胞数明显增多, 高达 30%以上, 根据文献[13-14], 阳性细胞数达 30%以上可做模型组浓度。综合 3.2.1 的结果, 将 20 mg/mL 作为模型组浓度。



A 对照组; B 模型组; C 灰毡毛忍冬+D-半乳糖组; D 三七总皂苷+D-半乳糖组。“##”示与对照组比较, 差异有统计学意义($P<0.01$)。

图 1 不同质量浓度 D-半乳糖诱导 MEF 细胞衰老的鉴定结果

Fig.1 Identification of aging of MEF cells induced by different mass concentrations of D-galactose

3.3 灰毡毛忍冬乙醇提取物对 D-半乳糖诱导 MEF 细胞抑制率的影响

从表 3 可以看出, 与对照组相比, 模型组细胞

抑制率显著上升;与模型组相比,灰毡毛忍冬乙醇提取物和三七总皂苷的添加能够明显减缓 D-半乳糖对 MEF 细胞的抑制,且随着灰毡毛忍冬乙醇提取物质量浓度的增加,细胞抑制率逐渐降低,灰毡毛忍冬乙醇提取物组的质量浓度为 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时抑制率最低,为(20.87 \pm 6.31)%。

表 3 不同质量浓度灰毡毛忍冬乙醇提取物处理的 D-半乳糖诱导 MEF 细胞抑制率($n=3$)

Table 3 Inhibition rate of MEF cells induced by D-galactose treated with different mass concentrations of ethanol extracts of *Lonicera macranthoides*($n=3$)

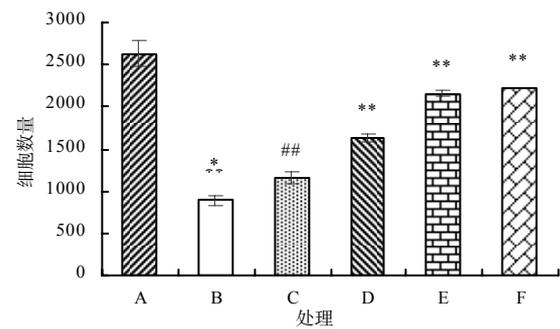
组别	质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	细胞抑制率/%
对照组		0
模型组		(55.37 \pm 6.13) ^{###}
灰毡毛忍冬乙醇提取物组	100	49.59 \pm 2.75
灰毡毛忍冬乙醇提取物组	500	(32.22 \pm 5.48) ^{**}
灰毡毛忍冬乙醇提取物组	1000	(20.87 \pm 6.31) ^{**}
三七总皂苷组	50	(18.24 \pm 4.29) ^{**}

“##”示与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.01$);“***”示与模型组比较,差异有统计学意义($P<0.01$)。

3.4 灰毡毛忍冬乙醇提取物对 D-半乳糖诱导 MEF 细胞数量的影响

从图 2 可以看出,与对照组相比,模型组细胞数量明显减少,但添加灰毡毛忍冬乙醇提取物和三七总皂苷后细胞数量明显增多。通过计数对比发现,随着灰毡毛忍冬乙醇提取物浓度的升高,细胞数量逐渐增多,呈剂量依赖性,说明灰毡毛忍冬乙醇提

取物可以改善由 D-半乳糖造成的细胞生长抑制。



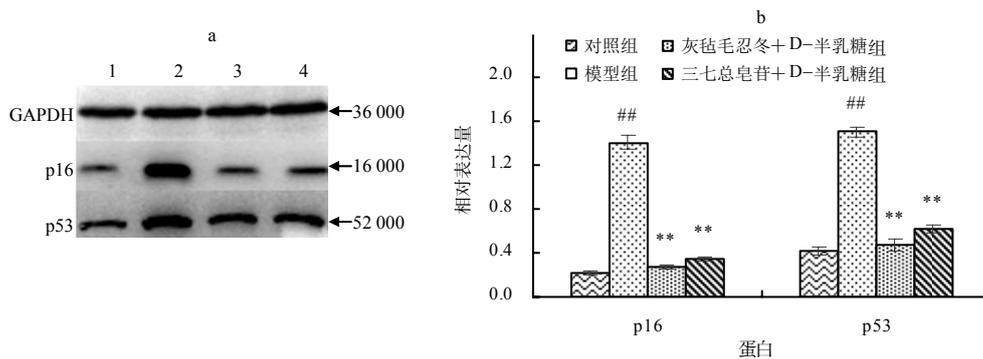
A 对照组; B 模型组; C 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 灰毡毛忍冬乙醇提取物+20 mg/mL D-半乳糖组; D 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 灰毡毛忍冬乙醇提取物+20 mg/mL D-半乳糖组; E 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 灰毡毛忍冬乙醇提取物+20 mg/mL D-半乳糖组; F 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 三七总皂苷+20 mg/mL D-半乳糖组。“##”示与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.01$);“*”“***”分别表示与模型组比较,差异有统计学意义($P<0.05$ 、 $P<0.01$)。

图 2 不同浓度灰毡毛忍冬乙醇提取物处理的 D-半乳糖诱导的 MEF 细胞数

Fig.2 The number of MEF cells induced by D-galactose treated with different mass concentrations of ethanol extracts of *Lonicera macranthoides*

3.5 灰毡毛忍冬乙醇提取物对 D-半乳糖诱导 MEF 细胞 p53、p16 蛋白的影响

从图 3 可以看出,与对照组相比,模型组 p16、p53 的相对表达量显著升高;与模型组相比,灰毡毛忍冬高剂量乙醇提取物组和三七总皂苷组显著降低 p16、p53 的表达。说明灰毡毛忍冬乙醇提取物可以抑制与衰老相关因子的蛋白的表达。



a 细胞周期抑制因子蛋白表达; b 蛋白富集统计图。a 图中泳道 1 为对照组,泳道 2 为模型组;泳道 3 为灰毡毛忍冬+D-半乳糖组;泳道 4 为三七总皂苷+D-半乳糖组。“##”示与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.01$);“***”示与模型组比较,差异有统计学意义($P<0.01$)。

图 3 灰毡毛忍冬乙醇提取物处理的 D-半乳糖诱导 MEF 细胞衰老相关蛋白的表达水平

Fig. 3 Expression of senescence related proteins in MEF cells induced by D-galactose treated with ethanol extract of *Lonicera macranthoides*

3.6 灰毡毛忍冬乙醇提取物对 MEF 衰老细胞 SOD 和 MDA 水平的影响

从表 4 可以看出,与对照组相比,模型组 SOD

水平显著下降,MDA 水平显著上升;与模型组相比较,添加 500、1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 灰毡毛忍冬乙醇提取物组和三七总皂苷组显著提升了 D-半乳糖诱导

MEF 细胞的 SOD 水平, 降低了 MDA 水平。说明灰毡毛忍冬乙醇提取物可以明显改善 D-半乳糖处理下的 MEF 细胞的氧化应激水平。

表 4 不同质量浓度的灰毡毛忍冬乙醇提取物处理的 D-半乳糖诱导 MEF 细胞 SOD 活性和 MDA 含量(n=5)
Table 4 SOD activity and MDA content in MEF cells induced by D-galactose treated with different mass concentrations of ethanol extracts of *Lonicera macranthoides*(n = 5)

组别	SOD 活性/(kU·g ⁻¹)	MDA 含量/(mol·g ⁻¹)
对照组	17.24±0.65	1.17±0.37
模型组	(14.33±0.51) ^{##}	(2.62±0.39) ^{##}
20 mg/mL D-半乳糖+灰毡毛忍冬乙醇提取物 100 μg/mL	14.88±0.35	2.37±0.15
20 mg/mL D-半乳糖+灰毡毛忍冬乙醇提取物 500 μg/mL	(15.67±0.52) ^{**}	(1.79±0.26) ^{**}
20 mg/mL D-半乳糖+灰毡毛忍冬乙醇提取物 1000 μg/mL	(16.82±0.29) ^{**}	(1.27±0.63) ^{**}
20 mg/mL D-半乳糖+三七总皂苷 50 μg/mL	(17.21±0.17) ^{**}	(1.02±0.64) ^{**}

“##”示与对照组比较, 差异有统计学意义(P<0.01); “**”示与模型组比较, 差异有统计学意义(P<0.01)。

3.7 灰毡毛忍冬乙醇提取物对 MMP 和 mtROS 水平的影响

从表 5 可以看出, 与对照组相比, 模型组 MMP 水平下降, mtROS 含量升高; 与模型组相比, 灰毡毛忍冬乙醇提取物和三七总皂苷组 MMP 水平显著升高, mtROS 含量显著降低。说明灰毡毛忍冬乙醇提取物在一定程度上对线粒体损伤有恢复作用。

表 5 高剂量(1000 μg/mL) 灰毡毛忍冬乙醇提取物处理的 D-半乳糖诱导的 MEF 细胞的 MMP 和 mtROS 水平

处理	mtROS 含量	MMP 水平
对照组	100.00	100.00
模型组	213.33 ^{##}	77.67 ^{##}
毡毛忍冬+D-半乳糖组	153.67 ^{**}	89.00 ^{**}
三七总皂苷+D-半乳糖组	132.33 ^{**}	90.66 ^{**}

“##”示与对照组比较, 差异有统计学意义(P<0.01); “**”示与模型组比较, 差异有统计学意义(P<0.01)。

3.8 灰毡毛忍冬乙醇提取物对线粒体超级复合体相关基因的影响

从图 4 可以看出, 相对于对照组, 模型组、灰毡毛忍冬乙醇提取物组、三七总皂苷组线粒体复合体基因 *NDUFV1*、*SDHB*、*UQCRCF1*、*COX4*、*ATP5H* 均无明显变化。说明在转录水平上, D-半乳糖对

MEF 细胞线粒体复合体无明显影响, 且添加灰毡毛忍冬乙醇提取物对 D-半乳糖致 MEF 细胞氧化应激亦没有明显的影响。

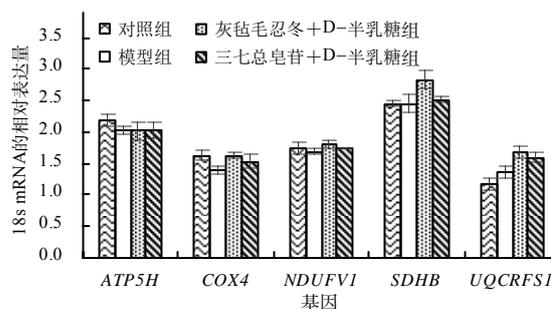
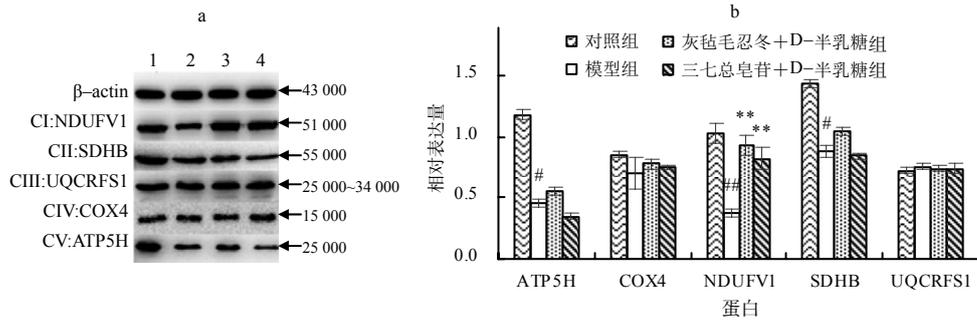


图 4 高剂量灰毡毛忍冬乙醇提取物处理的 D-半乳糖诱导 MEF 细胞线粒体复合体基因的表达
Fig.4 The mRNA expression of mitochondrial complex genes in MEF cells induced by D-galactose treated with high dose (1000 μg/mL) ethanol extract of *Lonicera macranthoides*

3.9 灰毡毛忍冬乙醇提取物对线粒体复合体相关蛋白的影响

从图 5 可以看出, 与对照组相比, 模型组 *NDUFV1*、*SDHB*、*ATP5H* 明显下降; 与模型组相比, 灰毡毛忍冬乙醇提取物组和三七总皂苷组 *NDUFV1* 明显上调, *ATP5H* 虽然有上升趋势, 但是不具有统计学意义。说明灰毡毛忍冬乙醇提取物可以增加 D-半乳糖诱导的 MEF 细胞复合体 I 亚基 *NDUFV1* 蛋白的富集丰度。



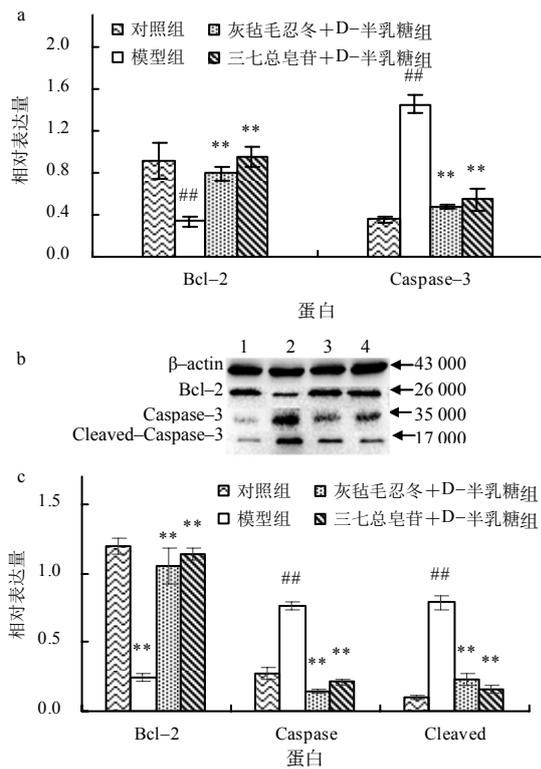
a 线粒体复合体蛋白表达;泳道1为对照组,泳道2为模型组;泳道3为灰毡毛忍冬+D-半乳糖组;泳道4为三七总皂苷+D-半乳糖组。b 蛋白富集定量统计图。“#”“##”示与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$);“**”示与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

图5 高剂量(1000 $\mu\text{g/mL}$)灰毡毛忍冬乙醇提取物处理的D-半乳糖诱导MEF细胞线粒体复合体在蛋白水平上的表达量

Fig.5 The protein level expression of mitochondrial complexes gene in MEF cells induced by D-galactose treated with high dose (1000 $\mu\text{g/mL}$) ethanol extract of *Lonicera macranthoides*

3.10 灰毡毛忍冬乙醇提取物对Bcl-2、Caspase-3 RNA和蛋白表达的影响

从图6可以看出,与对照组相比,模型组Bcl-2显著下降,Caspase-3显著上升($P < 0.01$);与模型组



b 图中泳道1为对照组,泳道2为模型组;泳道3为灰毡毛忍冬+D-半乳糖组;泳道4为三七总皂苷+D-半乳糖组。“##”示与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$);“**”示与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

图6 高剂量(1000 $\mu\text{g/mL}$)灰毡毛忍冬乙醇提取物处理的D-半乳糖诱导MEF细胞凋亡相关因子在RNA和蛋白水平上的表达量

Fig.6 Expression of apoptosis related factors in MEF cells induced by D-galactose treated with high dose(1000 $\mu\text{g/mL}$) ethanol extract of *Lonicera macranthoides* at RNA and protein levels

相比,灰毡毛忍冬乙醇提取物组和三七总皂苷组可以显著促进Bcl-2的表达,抑制Cleaved-Caspase-3的表达($P < 0.01$)。说明灰毡毛忍冬乙醇提取物在转录水平上对凋亡相关因子Bcl-2和Cleaved-Caspase-3起正调控作用,可以有效降低细胞的凋亡水平。

4 结论与讨论

D-半乳糖是一种天然存在于体内和许多食物中的还原糖。在高水平下,它可以在半乳糖氧化酶的催化下转化为醛糖和 H_2O_2 ,产生ROS。ROS升高可能导致氧化应激、线粒体功能障碍和细胞凋亡^[16]。本研究通过20 mg/mL 的D-半乳糖处理MEF细胞建立衰老模型,证明D-半乳糖可以导致ROS增加,产生氧化应激,主要特征为细胞存活率下降、细胞数减少、衰老细胞数增多、细胞周期抑制因子表达增强,这与赖亚宇等^[17]、王彩霞等^[18]的研究结果基本一致。氧化应激被认为是导致衰老和疾病的一个重要因素。SOD可以降低机体内多余的氧自由基的含量。自由基损伤的中间产物是MDA,因此SOD和MDA的水平可以间接地反映机体内ROS的水平^[19]。金银花中的黄酮成分可以显著增加免疫抑制小鼠的SOD含量,降低MDA水平,增加其抗氧化能力^[20]。本试验结果显示,D-半乳糖诱导的MEF细胞衰老与氧化应激损伤有关,灰毡毛忍冬抗衰老的效应与缓解MEF细胞的氧化应激存在一定的联系。

细胞内MMP和mtROS水平异常会引发线粒体功能障碍,导致衰老^[21-22]。本试验结果显示,D-半乳糖处理可以导致MEF细胞MMP降低和

mtROS 上升;而灰毡毛忍冬乙醇提取物处理可以减缓 D-半乳糖导致的 MMP 降低和 mtROS 上升,对 D-半乳糖诱导的 MEF 细胞线粒体功能障碍有改善作用。线粒体复合体 I(CI)的 FMN 位点是线粒体 ROS 产生的主要位置,当复合体 I 缺陷时,ROS 会大量增加,导致线粒体功能障碍^[23-25]。本研究发现,添加 D-半乳糖和灰毡毛忍冬乙醇提取物对 MEF 细胞的复合体基因转录水平表达无影响,但 MEF 细胞中添加 D-半乳糖可导致 CI 亚基 NDUFV1 蛋白丰度降低,且添加灰毡毛忍冬乙醇提取物可显著增加 CI 亚基 NDUFV1 的丰度,但复合体 II、III、IV、V 均无明显变化。基因的表达分为转录和翻译 2 个部分,真核基因的转录和翻译发生的位点和时间存在时空间隔,转录后的基因表达调控存在加工、翻译、翻译后加工及修饰等几个层面,所以 mRNA 水平的变化与蛋白质水平的变化存在差异^[26],推测 NDUFV1 基因转录后可能存在响应细胞氧化应激的蛋白丰度调控反应,但具体机制还不清楚,还需要进一步试验研究。

细胞凋亡是由基因控制的细胞自主的有序的死亡,是促凋亡因子和抗凋亡因子相互作用的结果。Bcl-2 作为抗凋亡因子具有抑制细胞色素 c 释放并且稳定线粒体功能的作用,保护细胞免受凋亡损害。促凋亡因子可以促进细胞色素 c 从线粒体释放,从而激活半胱氨酸天冬氨酸酶的级联反应,导致 Caspase-3 被激活,引发细胞凋亡^[27-28]。绿原酸可以抑制 ROS 和 Caspase-3 的产生,保护心肌细胞免受 H₂O₂ 导致的凋亡^[29]。三七总皂苷具有减缓氧化应激和细胞凋亡的作用^[30-32]。本研究发现,灰毡毛忍冬乙醇提取物能通过调控 Bcl-2/Caspase-3 信号通路增加 Bcl-2 的丰度,减低 Caspase-3 和 Cleaved-Caspase-3 的丰度,减缓细胞凋亡从而起到减弱氧化应激的作用。

综上所述,本研究初步证明了灰毡毛忍冬乙醇提取物能够通过增加线粒体复合体 I 蛋白的富集丰度来改善线粒体功能障碍,改变 Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白富集抑制细胞凋亡,从而减缓 D-半乳糖诱导的 MEF 细胞氧化应激。

参考文献:

- [1] SHEYDINA A, RIORDON D R, BOHELER K R. Molecular mechanisms of cardiomyocyte aging[J]. *Clinical Science(London, England)*, 2011, 121(8): 315-329.
- [2] 谭敦勇,李楚杰. 衰老分子机制研究的某些进展[J]. *中国病理生理杂志*, 2000, 16(1): 79-83.
- [3] WU D M, LU J, ZHENG Y L, et al. Purple sweet potato color repairs D-galactose-induced spatial learning and memory impairment by regulating the expression of synaptic proteins[J]. *Neurobiology of Learning and Memory*, 2008, 90(1): 19-27.
- [4] LEI M, HUA X D, XIAO M, et al. Impairments of astrocytes are involved in the D-galactose-induced brain aging[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 369(4): 1082-1087.
- [5] 刘建亚,冯文静,王仁萍,等. D-半乳糖致衰老动物模型及其机制研究进展[J]. *中华老年多器官疾病杂志*, 2018, 17(3): 224-227.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015.
- [7] 朱香梅,李晴,石雨荷,等. 山银花的研究进展及其质量标志物预测分析[J]. *世界中医药*, 2022, 17(13): 1860-1868.
- [8] 徐望龙,李云贵,孙林军,等. 山银花黄酮粗提物抗氧化活性的体外观察[J]. *中成药*, 2014, 36(6): 1292-1294.
- [9] 宫璀璨,郑玉霞,郑乃刚,等. 金银花在体内抗氧化作用的实验研究[J]. *实用医药杂志*, 2006, 23(5): 584-585.
- [10] 陆国辉,李艳茹. 金银花对 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞氧化损伤的保护作用及机制研究[J]. *中药药理与临床*, 2017, 33(5): 111-115.
- [11] 朱振宝,田宾,易建华. 金银花不同提取物的油脂抗氧化效果研究[J]. *食品与发酵工业*, 2008, 34(2): 69-72.
- [12] 郭汉青,庄坤,唐海灵,等. 基于 Wnt3a/β-catenin 通路研究金银花提取物对脱氧胆酸诱导胃黏膜肠上皮化的影响[J]. *毒理学杂志*, 2021, 35(4): 329-334.
- [13] 乔巨慧,赵大庆,刘美辰,等. 人参总皂苷对 D-半乳糖致 PC12 细胞衰老的改善作用及其机制研究[J]. *中国药房*, 2020, 31(24): 2993-2999.
- [14] 过华蕾,廖丽贞,陈燕玲,等. 白藜芦醇对抗 D-半乳糖诱导的心肌细胞衰老及其机制[J]. *中国病理生理杂志*, 2012, 28(12): 2141-2146.
- [15] 马艳霞,王明艳,姜泽群,等. 山茱萸活性成分对 D-半乳糖致衰老星形胶质细胞影响的实验研究[J]. *中国药理学通报*, 2014, 30(12): 1688-1692.
- [16] ULLAH F, ALI T, ULLAH N, et al. Caffeine prevents D-galactose-induced cognitive deficits, oxidative stress, neuroinflammation and neurodegeneration in the adult rat brain[J]. *Neurochemistry International*, 2015, 90: 114-124.