

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.13.002

小檗碱联合松果菊苷抗人脑胶质细胞衰老的实验研究*

胡周 赵丕文 杨阳 刘佳 卢涛[△] 赵俊云[△]

(北京中医药大学生命科学院 北京 102488)

摘要 目的:探究小檗碱联合松果菊苷抗人脑胶质细胞衰老的作用及其分子机制。**方法:**采用依托泊苷诱导人脑胶质细胞衰老,使用小檗碱与松果菊苷联合干预,采用 β -半乳糖苷酶染色法观察衰老阳性细胞比例,采用CCK-8法检测细胞活力,采用流式细胞术检测细胞周期,采用Western blot法检测细胞中衰老相关蛋白FoxO1、CAT、SOD2、Bcl-2的表达水平。**结果:**小檗碱联合松果菊苷可显著减少依托泊苷诱导的衰老阳性细胞比例,显著增强细胞活力,显著降低G2/M期细胞比例,显著提高FoxO1、CAT、SOD2、Bcl-2的蛋白水平。**结论:**小檗碱联合松果菊苷可显著抑制依托泊苷诱导的人脑胶质细胞衰老,可能与增强细胞活力、推进细胞周期进程、降低胞内氧化应激水平、抗凋亡等途径有关。

关键词:小檗碱;松果菊苷;人脑胶质细胞;细胞衰老

中图分类号:R-33;Q419;R339.38;R243 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2021)13-2406-04

Experimental Study of Berberine Combined with Echinacoside on the Senescence of Human Brain Glial Cells*

HU Zhou, ZHAO Pi-wen, YANG Yang, LIU Jia, LU Tao[△], ZHAO Jun-yun[△]

(School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 102488, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the anti-aging effect and molecular mechanism of Berberine combined with Echinacoside on human glial cells. **Methods:** Etoposide was used to induce senescence of human glial cells. Berberine and Echinacoside were combined to treat. The proportion of positive cells was tested by beta-galactosidase staining. Cell viability was detected by CCK-8 method. Cell cycle was detected by flow cytometry. The expression levels of senescence-related proteins FoxO1, CAT, SOD2 and Bcl-2 were detected by Western blot. **Results:** Berberine combined with Echinacoside could significantly reduce the proportion of etoposide-induced positive cells, sensibly enhance cell viability, markedly reduce the proportion of cells in G2/M phase, and significantly increase the expression levels of FoxO1, CAT, SOD2 and Bcl-2. **Conclusion:** Berberine combined with Echinacoside can significantly inhibit etoposide-induced senescence of human glial cells, which may be related to enhancing cell viability, promoting cell cycle progression, reducing intracellular oxidative stress level, and anti-apoptosis.

Key words: Berberine; Echinacoside; Anti-aging; HEB

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q419; R339.38; R243 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)13-2406-04

前言

脑老化是由于增龄性改变导致人脑出现的一系列形态结构和功能的退行性变化。脑老化进一步发展将导致脑血管疾病及痴呆、帕金森病等神经退行性疾病的发生发展^[1]。因此,如何延缓脑老化是减少和缓解老年性脑病的重要策略。在人脑中,神经细胞仅占约10%,而脑胶质细胞作为脑组织的绝大部分,对神经细胞起到了营养、保护、调节等重要作用^[2]。普遍的脑胶质细胞衰老会加速脑老化进程,出现稳态和神经传递调节相关基因的改变,进一步导致神经细胞损伤,大脑认知能力下降^[3],抗脑胶质细胞衰老对抗脑老化的发生具有重要意义。

黄连肉苁蓉作为传统中药已有千年历史,常用于各类方剂中配伍使用。黄连属毛茛科多年生草本植物,有清热燥湿,泻火解毒之功效,小檗碱(Berberine, Ber)是中药黄连中的主要有效成分之一^[4],具有抗菌、神经保护、降血脂与血糖等药理作用^[5-7]。肉苁蓉属列当科植物,有补肾阳,益精血之功效,在中药处方中作为抗衰老方剂使用仅次于人参,松果菊苷(Echinacoside, Ech)是肉苁蓉的肉质茎中主要活性成分,具有良好的抗氧化、抗衰老和神经保护等药理作用^[8-10]。本实验借鉴传统中药方剂,结合使用黄连与肉苁蓉中活性明显的有效成分单体Ber与Ech,观察其对抗脑老化的分子作用机制。

本研究采用拓扑异构酶II抑制剂依托泊苷(Etoposide, Eto)

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81673764)

作者简介:胡周(1996-),男,硕士研究生,主要研究方向:中医药神经保护, E-mail: 723265950@qq.com

[△] 通讯作者:赵俊云(1978-),女,研究生导师,副教授,主要研究方向:中医药抗衰老, E-mail: junyunzhao@126.com, 电话:13910597437;

卢涛(1968-),男,博士生导师,教授,主要研究方向:中药治疗老年性疾病机理研究, E-mail: taolu@bucm.edu.cn, 电话:010-64286956

(收稿日期:2021-01-31 接受日期:2021-02-27)

诱导构建人脑胶质细胞系 HEB 衰老模型,探讨 Ber 联合 Ech 抗 HEB 衰老的作用及其可能的作用机制,为阐明中药复方抗脑老化的分子基础及作用机制提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 细胞与试剂

HEB 细胞购自苏州北纳创联生物技术有限公司;Eto 购自北京议达成科技有限公司;Ber 购自北京银河天虹化工有限公司;Ech 购自成都瑞芬思科技生物有限公司;胎牛血清、DMEM 培养基购自 Gibco 公司;半乳糖苷酶染色试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;CCK-8 试剂盒购自美仑生物科技有限公司;流式试剂碘化吡啶(Propidium Iodide, PI)购自上海翊圣生物科技有限公司;抗体 FoxO1 Rabbit Polyclonal antibody、Catalase Mouse Monoclonal antibody、SOD2 Mouse Monoclonal antibody、Bcl-2 Rabbit Polyclonal antibody、Beta Actin Mouse Monoclonal antibody 购自 Proteintech 公司;BCA 蛋白定量试剂盒, RNaseA 购自索莱宝公司。

1.2 仪器

凝胶成像仪(BIO-RAD),流式细胞仪(CytoFLEX),二氧化碳培养箱(Panasonic),无菌操作台(上海智城仪器制造有限公司),酶标仪(奥地利/Molecular Devices)。

1.3 方法

1.3.1 β -半乳糖苷酶染色法检测衰老阳性细胞比例 HEB 接种于 24 孔板培养 12 h 后,加入终浓度为 10^{-4} μ M 的 Eto 处理,同时设置等体积的 DMSO 处理的 Control 组为对照,24 h 后, Ber 联合 Ech 组加入终浓度 5×10^{-5} μ M Ber 与 5×10^{-5} μ M Ech 处理, Ber 组加入终浓度 10^{-4} μ M Ber 处理, Ech 组加入终浓度 10^{-4} μ M Ech 处理, Control 组和 Eto 组加入等体积的 DMSO 对照,每组 4 个复孔,24 h 后吸弃培养液, PBS 洗涤 1 次,加入染色固定液室温反应 15 min, PBS 洗涤 3 次,每孔加入 500 μ L β -半乳糖苷酶染色工作液,封口膜封闭 37℃ 过夜,按(阳性细胞数/总细胞数) $\times$ 100% 计算的 HEB 染色阳性细胞比例。

1.3.2 CCK-8 法检测细胞活力水平 HEB 接种于 96 孔板培养 12 h 后,分组处理同上,每组 6 个复孔。24 h 后吸弃培养液,每孔加入 100 μ L CCK-8 溶液,1-2 h 后用酶标仪测 OD450,按(处理组 OD450/对照组 OD450) $\times$ 100% 计算细胞活力水平。

1.3.3 流式细胞术检测细胞周期 HEB 接种于 6 孔板培养 12 h 后,分组处理同上,每组 3 个复孔。24 h 后吸弃培养液,加入 0.05% 胰酶消化收集细胞,1000 rpm 离心 5 min,预冷的 PBS 清洗 2 次,用 70% 的冷乙醇吹打混匀后放入 4℃ 固定过夜。1000 rpm 离心 5 min 收集固定的细胞, PBS 清洗 1 次,加入 100 μ L RNaseA 于 37℃ 水浴 30 min,加入 400 μ L PI 避光反应 30 min 后进行流式分析。

1.3.4 Western blot 法检测衰老相关蛋白的表达水平 HEB 接种于 6 孔板培养 12 h 后,分组处理同上。24 h 后吸弃培养液, PBS 清洗 1 次,加入含 1% PSMF 的 RIPA 裂解液,于冰上裂解 15 min,收集裂解液,12000 rpm 4℃ 离心 10 min,取上清, BCA 法测定蛋白含量。进行 12% 分离胶 SDS-PAGE 电泳,转 PVDF 膜,5% 的脱脂奶粉(TBST 溶解)常温封闭 1 h,分别加入一抗 anti-FoxO1、anti-CAT、anti-SOD2、anti-Bcl-2,常温反应 1 h 后放

入 4℃ 过夜。TBST 清洗 3 次,每次 10 min,不同来源一抗加入相对应的二抗,常温反应 1 h 后 TBST 清洗 3 次,每次 10 min,用超敏发光液发光显影,采用 image J 软件分析灰度值。

1.3.5 统计学处理 应用 SAS8.2 统计学软件分析数据,实验重复三次,数据符合正态分布采用 t 检验两两比较,不符合正态分布采用非参检验。 $P < 0.05$ 时差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Ber 联合 Ech 显著降低细胞衰老阳性比例

β -半乳糖苷酶染色结果显示,Eto 处理 24 h 后,与 Control 组相比,Eto 组衰老阳性细胞比例显著上升($P < 0.01$);Ber 组与 Ech 均能降低 Eto 所诱导的衰老阳性细胞比例($P < 0.01$),且 Ber 联合 Ech 处理后相比于单独加药组减少阳性细胞比例更为显著($P < 0.01$),见图 1。

2.2 Ber 联合 Ech 显著促进细胞活力

CCK-8 结果显示,与 Control 组相比,Eto 组 HEB 细胞活力显著下降($P < 0.01$);与 Eto 组相比,Ech 组与 Ber 联合 Ech 处理组显著促进衰老 HEB 的细胞活力恢复($P < 0.01$),而 Ber 组与 Eto 组细胞活力没有统计学差异($P > 0.05$),见表 1。

2.3 Ber 联合 Ech 显著降低 G2/M 期细胞比例

流式细胞术结果分析显示,Eto 处理 24 h 后多数 HEB 细胞周期阻滞在 G2/M 期,Ech 组与 Ber 联合 Ech 处理组可显著降低 G2/M 期细胞比例($P < 0.05$),而 Ber 组 G2/M 期细胞比例与 Eto 组差异没有统计学意义($P > 0.05$),见表 2。

2.4 Ber 联合 Ech 显著提高 FoxO1、CAT、SOD2、Bcl-2 的蛋白水平

Western blot 后的条带灰度值分析显示,Eto 处理 24 h 后,HEB 细胞 FoxO1 ($P < 0.05$)、CAT ($P < 0.05$)、SOD2 ($P < 0.05$) 和 Bcl-2 ($P < 0.05$) 的蛋白表达显著下降;与 Eto 组相比,Ber 联合 Ech 处理可显著提高 FoxO1 ($P < 0.05$)、CAT ($P < 0.05$)、SOD2 ($P < 0.05$) 和 Bcl-2 ($P < 0.05$) 的蛋白表达,见图 2。

3 讨论

大量研究表明,衰老生物体的主要特点是衰老细胞的积累。细胞衰老的特征是一种持续性的细胞周期停滞状态和独特的衰老相关分泌表型的产生^[1]。在脑老化和神经退行性疾病中已检测到具有衰老特征的脑胶质细胞,发现其促进了脑功能障碍^[2]。本研究借鉴中医临床补肾抗衰老相关经验探讨抗脑胶质细胞衰老的作用及其分子机制。

Eto 作为特异性的拓扑异构酶抑制剂,通过稳定 DNA 拓扑异构酶 II 与 DNA 之间的共价复合物导致高水平的 DNA 损伤^[3],现常用于细胞衰老造模^[4]。本实验中用 10^{-4} μ M Eto 处理 HEB 细胞,光镜下可见衰老细胞核体积变大,细胞突起变短,衰老阳性细胞比例可达 48.9%,Ber 联合 Ech 处理显著降低了 Eto 所诱导的衰老阳性 HEB 细胞比例,表明 Ber 联合 Ech 处理能有效抗 Eto 诱导 HEB 细胞衰老。Eto 处理后细胞活力被显著抑制,HEB 细胞分裂能力下降,Ber 联合 Ech 增强了 HEB 细胞活力,这一方面可能与促进细胞增殖有关,另一方面可能与调控细胞周期进程有关。Eto 诱导 HEB 细胞阻滞于 G2/M 期的细胞数量上升,细胞周期停滞是衰老细胞的主要特点之一,而

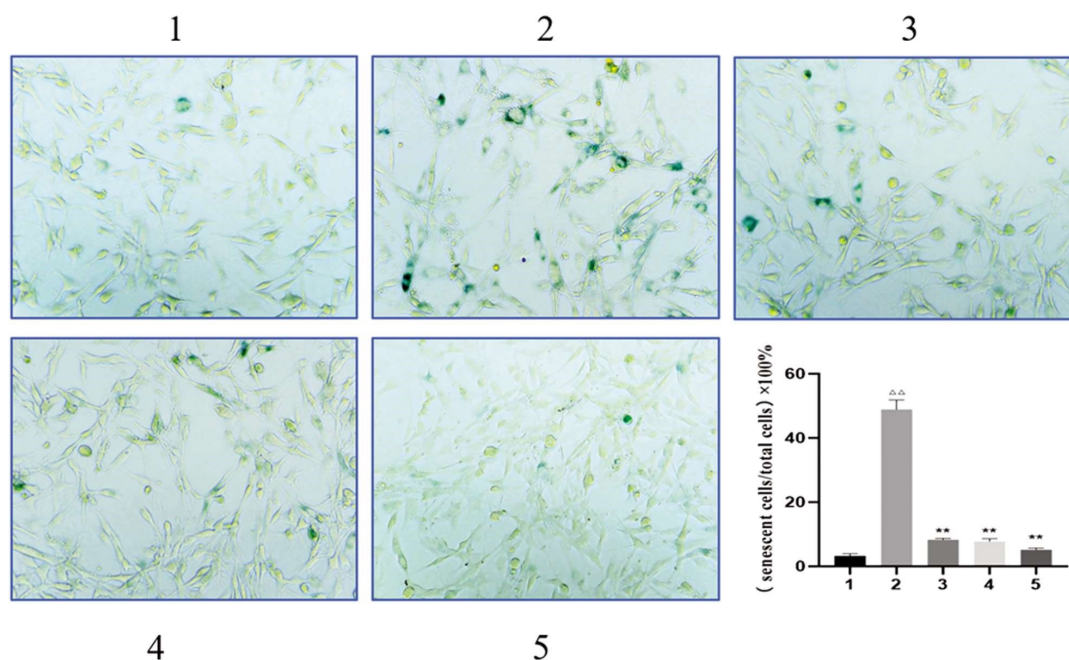


图 1 半乳糖苷酶细胞衰老染色

Fig.1 Galactosidase staining for cell senescence

Note:1. Control 2.Eto 3.Ber 4.Ech 5.Ber+Ech(200×)

Compared with the control group $\Delta\Delta$: $P<0.01$; Compared with the Eto group **: $P<0.01$.

表 1 细胞活力($n=6, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Cell viability($n=6, \bar{x} \pm s$)

Groups	Dose	Cell viability level (%)
Control	0	100± 5.98
Eto	$10^{-4} \mu\text{M}$	79.734± 8.56 $\Delta\Delta$
Ber	$10^{-4} \mu\text{M}$	76.962± 5.04
Ech	$10^{-4} \mu\text{M}$	95.696± 3.46**
Ber+Ech	$5 \times 10^{-5} \mu\text{M} + 5 \times 10^{-5} \mu\text{M}$	98.672± 4.28**

Note: Compared with the control group $\Delta\Delta$: $P<0.01$; Compared with the Eto group **: $P<0.01$.

表 2 细胞周期($n=3, \bar{x} \pm s$)

Table 2 Cell cycle($n=3, \bar{x} \pm s$)

Groups	Dose	Proportion of G2 / M phase(%)
Control	0	10.41± 1.07
Eto	$10^{-4} \mu\text{M}$	78.59± 1.92 $\Delta\Delta$
Ber	$10^{-4} \mu\text{M}$	82.02± 1.20
Ech	$10^{-4} \mu\text{M}$	68.2± 8.23*
Ber+Ech	$5 \times 10^{-5} \mu\text{M} + 5 \times 10^{-5} \mu\text{M}$	70.52± 5.00*

Note: Compared with the control group $\Delta\Delta$: $P<0.01$; Compared with the Eto group *: $P<0.05$.

Ber 联合 Ech 作用降低了 G2/M 细胞比例, 说明 Ber 联合 Ech 改善了即将衰老的 HEB 细胞周期阻滞状况, 恢复其细胞活力。FoxO1 是 FoxO 家族的代表成员, 与寿命密切相关。FoxO1 与 DNA 相互作用后可调节凋亡、自噬、抗氧化酶、细胞周期阻滞基因等多种靶标, 是具有复杂活性的超转录因子^[15,16], 对衰老、氧化应激抗性、胰岛素抵抗和代谢有重要调节作用^[17,18], 本研究中 Ber 联合 Ech 显著增加 FoxO1 的表达水平, 表明 Ber 联合 Ech 可能是通过调节凋亡、抗氧化酶的表达等而发挥抗 HEB 细胞衰老作用。大脑衰老的过程中发现随着年龄的增长细胞内

氧化应激水平逐渐增加^[19], CAT 与 SOD2 是 FoxO1 介导的抗氧化通路下游中的相关蛋白^[20], Hesameddin 等研究发现^[21], Ber 可通过增加肾脏组织中 CAT、SOD 的表达降低了肾脏组织中的氧化应激参数; Lin Li 等^[19]使用 Ech 促进 CAT、SOD 的升高保护视网膜神经节细胞免受缺血 / 再灌注所致大鼠视网膜的损伤。实验发现 Ber 联合 Ech 相比单独加药的促表达效果更为显著, 说明 Ber 联合 Ech 相互促进抗氧化应激作用, 介导 FoxO1 通路显著上调了抗氧化蛋白 CAT、SOD2 的表达。衰老细胞的积累会使细胞凋亡上升^[22], FoxO 通过线粒体依赖或非依赖

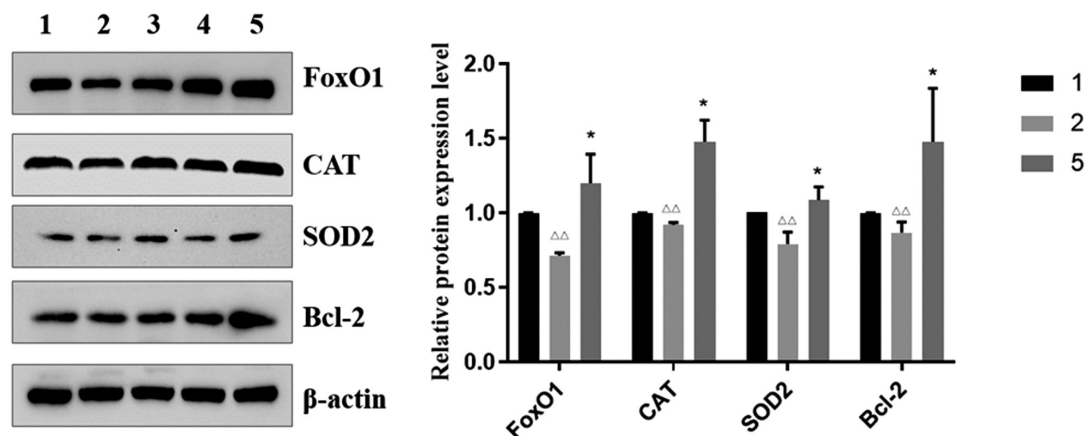


图2 蛋白表达

Fig.2 Protein expression

Note: 1. Control 2.Eto 3.Ber 4.Ech 5.Ber+Ech;

Compared with the control group ^{ΔΔ}: $P < 0.01$; Compared with the Eto group *: $P < 0.05$.

方式调控 Bcl-2 抗凋亡蛋白的表达^[23]。本实验中 Ber 联合 Ech 显著增加 Bcl-2 的表达水平,推测其抑制正常 HEB 细胞凋亡,从另一个角度说明减少了衰老细胞的积累,Ber 联合 Ech 处理发挥了抗 Eto 诱导的 HEB 细胞衰老作用。实验中发现 Ber 单独加药组对细胞周期调控、CAT、SOD 的促表达效果对比 Ech 组不明显,可能与在 10-4μM 药物处理浓度下 Ech 较于 Ber 介导 FoxO1 通路作用效果更显著有关。

综上,Ber 联合 Ech 可通过增强细胞活力、调节细胞周期进程、抑制细胞凋亡等途径,有效抵抗 Eto 体外诱导的 HEB 衰老,可作为中药复方抗脑老化机制研究的重要依据。后续还将采用多种细胞衰老模型及评价方法进一步深入探讨中药单体及复方抗衰老的作用机制。

参考文献(References)

- [1] Hou Y, Dan X, Babbar M, et al. Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease[J]. *Nat Rev Neurol*, 2019, 15(10): 565-581
- [2] Herrera M I, Mucci S, Barreto G E, et al. Neuroprotection in hypoxic-ischemic brain injury targeting glial cells [J]. *Curr Pharm Des*, 2017, 23(26): 3899-3906
- [3] Boisvert M M, Erikson G A, Shokhirev M N, et al. The aging astrocyte transcriptome from multiple regions of the mouse brain [J]. *Cell Rep*, 2018, 22(1): 269-285
- [4] 周瑞, 项昌培, 张晶晶, 等. 黄连化学成分及小檗碱药理作用研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(19): 4561-4573
- [5] Li T, Wang P, Guo W, et al. Natural berberine-based Chinese herb medicine assembled nanostructures with modified antibacterial application[J]. *ACS Nano*, 2019, 13(6): 6770-6781
- [6] Maleki S N, Aboutaleb N, Sourfi F. Berberine confers neuroprotection in coping with focal cerebral ischemia by targeting inflammatory cytokines[J]. *J Chem Neuroanat*, 2018, 87: 54-59
- [7] Hang W, He B, Chen J, et al. Berberine ameliorates high glucose-induced cardiomyocyte injury via ampk signaling activation to stimulate mitochondrial biogenesis and restore autophagic flux [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1121
- [8] Liu J, Yang L, Dong Y, et al. Echinacoside, an inestimable natural product in treatment of neurological and other disorders [J]. *Molecules*, 2018, 23(5): 1213
- [9] Li L, Wang Y, Qin X, et al. Echinacoside protects retinal ganglion cells from ischemia/reperfusion-induced injury in the rat retina [J]. *Mol Vis*, 2018, 24: 746-758
- [10] Wu C J, Chien M Y, Lin N H, et al. Echinacoside isolated from *cistanche tubulosa* putatively stimulates growth hormone secretion via activation of the ghrelin receptor[J]. *Molecules*, 2019, 24(4): 720
- [11] Muñoz-espín D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(7): 482-496
- [12] Baker D J, Petersen R C. Cellular senescence in brain aging and neurodegenerative diseases: evidence and perspectives [J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(4): 1208-1216
- [13] Montecucco A, Biamonti G. Cellular response to etoposide treatment [J]. *Cancer Lett*, 2007, 252(1): 9-18
- [14] Bang M, Kim D G, Gonzales E L, et al. Etoposide induces mitochondrial dysfunction and cellular senescence in primary cultured rat astrocytes[J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2019, 27(6): 530-539
- [15] Murtaza G, Khan A K, Rashid R, et al. FOXO transcriptional factors and long-term living [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 3494289
- [16] Xing Y Q, Li A, Yang Y, et al. The regulation of FOXO1 and its role in disease progression[J]. *Life Sci*, 2018, 193: 124-131
- [17] Xiong S, Salazar G, Patrushev N, et al. FoxO1 mediates an autocrine feedback loop regulating SIRT1 expression[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(7): 5289-5299
- [18] Jenwitheesuk A, Boontem P, Wongchitrat P, et al. Melatonin regulates the aging mouse hippocampal homeostasis via the sirtuin1-FOXO1 pathway[J]. *Excli j*, 2017, 16: 340-353
- [19] Mecocci P, Boccardi V, Cecchetti R, et al. A long journey into aging, brain aging, and alzheimer's disease following the oxidative stress tracks[J]. *J Alzheimers Dis*, 2018, 62(3): 1319-1335
- [20] Prasanna P L, Renu K, Valsala Gopalakrishnan A. New molecular and biochemical insights of doxorubicin-induced hepatotoxicity [J]. *Life sciences*, 2020, 250: 117599
- [21] Allameh H, Fatemi I, Malayeri A R, et al. Pretreatment with berberine protects against cisplatin-induced renal injury in male Wistar rats [J]. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 2020, 393 (10): 1825-1833
- [22] Cerella C, Grandjennette C, Dicato M, et al. Roles of apoptosis and cellular senescence in cancer and aging [J]. *Curr Drug Targets*, 2016, 17(4): 405-415
- [23] Farhan M, Wang H, Gaur U, et al. FOXO signaling pathways as therapeutic targets in cancer[J]. *Int J Biol Sci*, 2017, 13(7): 815-827