

·基础研究·

红花黄色素对衰老模型小鼠脑细胞凋亡的影响*

欧芹¹ 魏晓东¹ 张鹏霞¹ 孙佳彬²

摘要 目的:探讨红花黄色素对衰老模型小鼠脑细胞凋亡及其相关因素的影响及其作用机制。方法:采用D—半乳糖制作衰老模型小鼠作研究对象,用大孔树脂法提取红花黄色素,同时观察不同剂量红花黄色素对脑细胞凋亡及Bcl—2的影响作用。结果:红花黄色素能显著降低脑细胞凋亡率,提高Bcl—2的表达,以大剂量和中剂量组效果比较显著($P<0.01, P<0.05$)。结论:红花黄色素是红花延缓衰老作用的有效成分,衰老导致脑细胞凋亡大量出现,红花黄色素减少脑细胞凋亡率,以红花黄色素大剂量组效果最佳。

关键词 红花黄色素;脑细胞凋亡;衰老模型

中图分类号:R285.5, Q255, R49 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2006)-06-0504-02

An experimental study of safflower yellow pigment on cerebrocellular apoptosis in senile model mice/OU Qin, WEI Xiaodong, ZHANG Pengxia, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2006, 21(6):504—505

Abstract Objective: To investigate the effect of safflower yellow pigment on cerebrocellular apoptosis and correlate factor in senile model mice. **Method:** We established senile model mice with D-galactose. The safflower yellow pigment was extracted by means of big aperture resin. The effects of various dosage of safflower yellow pigment on cerebrocellular apoptosis and Bcl-2 were observed. **Result:** Safflower yellow pigment could obviously decrease cerebrocellular apoptosis and enhanced the levels of Bcl-2. **Conclusion:** Safflower yellow pigment is an active component of carthamin tinctorius in delayed senescence, it can inhibit apoptosis starting and obviously decrease cerebrocellular apoptosis.

Author's address Dept. of Biochemistry of Basic Medical College of Jiamusi University, Jiamusi, 154007

Key words safflower yellow pigment; cerebrocellular apoptosis; senile model

细胞凋亡是机体细胞程序性死亡,凋亡在神经系统发育、神经退行性病变中的重要作用已成为不争的事实^[1]。目前的研究表明,神经细胞的凋亡在继发性损伤中发挥重要作用,药物对预防脊髓损伤显示出积极的作用^[2]。临床常用红花防治血栓形成、减少缺血后脑损伤的发生等^[3-5],红花黄色素(safflower yellow pigment, SYP)是其药理活性较强的水溶性成分,有镇痛、降低心肌耗氧、缓解垂体后叶素所致大鼠心肌急性缺血性损伤作用^[6]。社会对康复医学的需求和认识也为康复医学工程的发展带来了良好的机遇^[7],许多因素可改善患者的临床症状和脑细胞功能^[8-10],本实验旨在通过观察SYP对衰老模型小鼠脑细胞凋亡及Bcl—2表达的影响,并通过不同SYP剂量比较探讨其量效关系,探讨SYP对神经细胞的保护作用,为在脑细胞功能康复中的应用提供实验依据。

1 实验材料

1.1 动物分组及给药

昆明种小鼠72只,雌雄各半(由本校实验动物中心提供),其中体重18—20g,60只,体重25—

28g,12只,标准喂养,自然光照,自由饮水。

1.2 实验药物

市售红花,符合药典规定标准。以1:10(W:W)比例加入蒸馏水,室温搅拌60min,倾出提取液,再反复提取2次,离心,滤除药渣后减压蒸馏浓缩至相当于0.5生药/ml,为红花水提液,加5倍无水乙醇4℃放置12h,过滤后得滤液,通过大孔吸附树脂柱,用水洗脱层析后,得黄色素水溶液^[11],将浓度调至0.5生药/ml。

1.3 主要试剂

大孔吸附树脂,原位细胞凋亡检测试剂盒、DAB染色剂, Bcl—2蛋白表达试剂盒。

2 实验方法

2.1 分组及给药

* 基金项目:黑龙江省教育厅科学技术研究项目(10531151)

1 佳木斯大学基础医学院生物化学教研室,154007

2 上海市静安区中心医院免疫研究中心

作者简介:欧芹,女,教授

收稿日期:2005-09-22

随机分青年对照组、衰老模型组、SYP组,SYP组又分为大剂量、中剂量和小剂量组;体重25—28g的为中年对照组。衰老模型组每日上午按100mg/kg背部皮下注射D-半乳糖,同时灌服温开水。模型给药组除注射D-半乳糖外,各组每日上午分别按相当于生药量12g/kg、6g/kg、3g/kg灌服SYP,连续给药30d。

2.2 动物处理

实验30d,在最后一次给药后次日断头处死,4℃取肝脏、脑备用。取脑中部,生理盐水冲洗后迅速置4%多聚甲醛液中固定,经脱水、透明、石蜡包埋,制作冠状切片,常规HE染色,行光镜检查。

2.3 检测指标和方法

凋亡细胞检测采用TUNEL法,按试剂盒说明操作。每张切片随机计算5个高倍视野以染色阳性细胞所占的百分数表示。Bcl-2蛋白表达采用免疫组织化学法,DAB染色,苏木素复染,每高倍视野染色阳性细胞数表示(个/mm²)。

2.4 统计学分析

所有数据以均数±标准差表示,多个样本比较采用单因素方差分析,多样本两两比较采用q检验,两两比较采用t检验。

3 结果与讨论

SYP对衰老模型小鼠脑细胞凋亡率(percent of programmed cell death, PPCD)和Bcl-2蛋白表达的影响,结果见表1。

表1 SYP对衰老小鼠脑PPCD和Bcl-2蛋白表达的影响 (x±s)

组别	例数	小鼠脑细胞凋亡率 (%)	Bcl-2 蛋白阳性细胞 (个/mm ²)
青年对照组	12	1.14±0.82	89±21
中年对照组	12	1.68±0.75	76±17
衰老模型组	12	7.62±1.07 ^{①③}	56±16 ^①
SYP大剂量组	12	3.64±0.92 ^{①③⑤}	83±196
SYP中剂量组	12	4.26±0.78 ^{①③⑤}	74±15 ^{②④}
SYP小剂量组	12	5.95±1.28 ^{①③④⑦⑧}	66±14 ^{①⑥}

①与青年组比较 P<0.01;②与青年组比较 P<0.05;③与中年组比较 P<0.01;④与衰老模型组比较 P<0.05;⑤与衰老模型组比较 P<0.01;⑥与SYP大剂量组比较 P<0.05;⑦与SYP大剂量组比较 P<0.01;⑧与SYP中剂量组比较 P<0.05

细胞凋亡可参与许多与年龄相关的神经退化性疾病的致病机制,也成为生物衰老过程中的一个显著特征。虽然对神经系统损伤和细胞凋亡的康复尚缺乏满意的特异性治疗方法,但许多研究也证实了中医治疗、中药在改善大脑记忆功能、拮抗脑细胞凋亡方面有明显效果^[9-12]。我们的研究结果表明,磷脂酶A₂(phospholipase A₂, PLA₂)活性随着增龄而升高,导致膜磷脂,尤其是心磷脂随之减少,线粒体膜

摄钙能力降低,而当细胞内钙超载时激活PLA₂,导致膜磷脂的进一步降解,加速细胞内钙超载^[13]。本实验结果表明随衰老,PPCD增加,而Bcl-2降低,主要是由于衰老时自由基含量的增加,细胞内Ca²⁺持续增加而诱导细胞凋亡的发生,SYP可减少自由基对线粒体膜的损伤,进一步保护线粒体发挥正常功能,通过降低PLA₂活性,增加线粒体内Ca²⁺的缓冲容量,而稳定的胞内Ca²⁺与Bcl-2的高表达一般同时存在。大量关于Bcl-2的研究证明,Bcl-2的蛋白产物具有保护各种细胞免于各种诱因所致的细胞凋亡,是细胞凋亡的重要抑制因子^[14]。体外研究发现Bcl-2过量表达能延长神经元的生存,而神经元高表达Bcl-2可抑制病理或生理因素所致的神经元凋亡。SYP能通过有效地上调脑皮质Bcl-2的表达,保护膜磷脂的正常组成,维持钙稳态,促进神经功能的恢复,防止细胞凋亡。进而改善脑功能。

参考文献

- [1] 朱兴族. 神经退行性疾病病理机理及药物作用新靶点[J]. 世界科技研究与发展,1999,21(6):42—46.
- [2] 王金光,郑启新,郭晓东,等.应用β-七叶皂甙钠治疗大鼠脊髓损伤的实验研究[J].中国康复医学杂志,2005,20(1):15—17.
- [3] 刘盛军,屠德敬.红花注射液治疗急性脑梗死疗效观察[J].实用中西医结合临床,2004,4(2):17—34.
- [4] 肖玲,何耀,苏波,等.红花注射液治疗糖尿病周围神经病变疗效观察[J].吉林中医药,2004,24(2):31—32.
- [5] 罗嘉,周黎明,方治平,等.红花注射液对大鼠局灶性脑缺血后细胞凋亡的影响[J].四川中医,2004,22(2):27—28.
- [6] 郑为超,陈铎葆,张雷,等.红花总黄素对垂体后叶素所致大鼠急性心肌缺血保护作用的实验研究[J].中国中医药科技,2005,12(1):36—37.
- [7] 张济川,金德闻.我国康复医学工程事业发展面临的机遇和挑战[J].中国康复医学杂志,2005,20(4):288—289.
- [8] 刘翼程,骆明军,陈帮国,等.针刺对血管性痴呆颅脑MRI和临床症状的影响[J].中国康复医学杂志,2005,20(1):58—59.
- [9] 张鹏霞,汤晓丽,朴金花,等.何首乌对D-半乳糖致衰老大鼠的抗衰益智作用机制的研究[J].中国康复医学杂志,2005,20(4):251—253.
- [10] 王鸿飞,战丽彬,郑连杰,等.滋补脾阴方药对大鼠脊髓损伤后IL-β、caspase-3表达及细胞凋亡的影响[J].中国康复医学杂志,2005,20(7):511—513.
- [11] 金鸣,高子淳,李金荣,等.大孔树脂色谱法制备红花黄色素和羟基黄色素A[J].中草药,2004,35(1):25—28.
- [12] 赖新生,王黎,唐纯志.电针对实验性血管性痴呆大鼠学习记忆能力和脑组织细胞凋亡的影响[J].中国康复医学杂志,2003,18(3):140—143.
- [13] 欧芹,朴金花,张鹏霞,等.红花黄色素对衰老模型小鼠肝线粒体膜磷脂影响的实验研究[J].中医药学报,2004,32(1):48—50.
- [14] 葛成国,靳凤烁,李黔生,等.过表达Bcl-2雪旺细胞凋亡能力的实验研究[J].中国康复医学杂志,2004,19(2):95—97.