

何首乌高压蒸制法蒸制时间对何首乌抗衰老活性影响的研究*

王万根¹, 张宁华², 徐巧红³, 赵紫伟¹, 赵荣华¹, 俞捷^{1△}

(1. 云南中医学院, 云南昆明 650500; 2. 陕西中医学院, 陕西咸阳 712046;

3. 温岭市第一人民医院, 浙江温岭 317500)

摘要: **目的** 通过何首乌高压蒸制和传统炮制对人胚肺二倍体细胞(HEL)抗衰老活性研究, 筛选出高压蒸制法炮制何首乌的最佳炮制时间。**方法** 在二倍体细胞的培养液中加入一定溶度的不同炮制时间和传统炮制的何首乌提取物, 待细胞传至第 25 代以后, 观察二倍体细胞的状态, 检测二倍体细胞数量的变化以及细胞内超氧化物歧化酶(SOD)的含量。**结果** 3h 制品首乌的抗细胞衰减率为 38.04%, 其细胞衰亡速率最为缓慢, 为各供试样品中抗细胞衰减作用最为显著的炮制时间($P<0.001$)。3h 制品何首乌组细胞内 SOD 含量是 $(71.85\pm 5.04)U\cdot mL^{-1}$, 显著高于对照组细胞内 SOD 酶的活性, 提示该炮制品可显著提高细胞内 SOD 酶的活性($P<0.001$)。**结论** 3 h 制品何首乌可以显著延缓 HEL 细胞的衰老速度, 提高细胞中 SOD 的活性, 延缓二倍体细胞的老化, 可确定为何首乌抗衰老作用最佳的炮制时间。

关键词: 何首乌; 炮制; 人体胚肺二倍体细胞; 抗衰老

中图分类号: R283.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2013)02-0001-04

何首乌为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根。现代药理研究表明, 何首乌的药理作用比较广泛, 具有显著的抗衰老、益智、乌须发、调节血脂等作用^[1-2]。为了探究何首乌抗衰老作用最佳的炮制时间, 作者以人胚肺二倍体细胞(HEL)为载体, 对二倍体细胞数量、状态的变化, 及细胞内 SOD 活性进行检测^[3]。

1 材料

1.1 药材及炮制方法

本实验中何首乌药材采自云南省禄劝县, 经云南中医学院中药学院赵荣华教授鉴定, 为蓼科植物何首乌(*Polygonum multiflorum* Thunb.)的干燥块根。何首乌传统的炮制方法主要有黑豆汁蒸、黑豆汁炖、清蒸、豆汁黄酒蒸、水煮蒸。炮制时间长短也不同, 从 3~40h 不等^[4]。本课题组对创新何首乌炮制工艺有一定的前期研究, 发现现代的高压蒸制法与传统的黑豆汁蒸制法相比, 可最大程度保持游离蒽醌、结合蒽醌、二苯乙烯苷等何首乌中有效成分的含量^[5]。但传统的黑豆汁制法费时费力(总炮制时间

最少需要 7h)^[6], 而高压蒸制法制则可明显缩短炮制时间, 提示高压蒸制法可能成为何首乌炮制一种快捷、科学的新方法。课题组以何首乌有效成分含量和淀粉糊化程度为指标, 前期研究中筛选出的高压蒸制炮制方法为^[7]: 取 0.8~1cm 粒状何首乌 200g, 用 200mL 水浸润, 润透后, 置高压锅中, 150 kPa, 121 ℃加压炮制不同时间 1h、2h、3h、4h, 60 ℃鼓风干燥制得。本研究以不同炮制时间何首乌提取物对二倍体细胞衰老速率及细胞内超氧化物歧化酶(SOD)含量变化的影响为指标, 对高压蒸制法的炮制时间进行了进一步的研究。

1.2 实验试剂

胰蛋白酶: 1:250, 美国 Amresco 公司, 华美生物工程公司进口分装; HyClon 胎牛血清(FBS), 货号: SV30087.02, 购于赛默飞世尔生物化学制品有限公司; DMSO (dimethyl sulfoxide), 购于美国 Sigma 公司; 碳酸氢钠($NaHCO_3$)、HEPES、DMEM 粉末、丙酮酸钠(Sodium pyruvate)、L-谷氨酰胺(L-glutamine)、氯化钠(NaCl)均为化学纯或分析纯, 购于国内公

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(NO: 81060337); 2010-2011 年中医药行业科研专项(NO: 201107007)

收稿日期: 2013-02-27 修回日期: 2013-04-01

作者简介: 王万根(1988~), 男, 江西上饶人, 硕士研究生在读。研究方向: 中药资源开发与利用。

△通信作者: 俞捷, E-mail: yujie.ynzyxy@gmail.com

司;总超氧化物歧化酶(T-SOD)试剂盒,货号:A001-1,购于南京建成生物技术有限公司。

1.3 试验样品的制备

1.3.1 何首乌传统炮制方法

参照文献[8],取 500g 黑豆加水煮 4h 得黑豆汁 750mL,再加适量水煮 3h,得黑豆汁 500mL,合并 2 次黑豆汁即得黑豆汁。然后取制备得的黑豆汁 50mL 加水配成 200mL 浸润透后,常温蒸制 4h,取出放入干燥箱,于 80℃干燥。

1.4 刺激液的配制

1.4.1 何首乌生品、传统炮制品及高压蒸制(不同时间制品)水提液制备

称取生首乌 25g,加 10 倍量水煎煮 30min,过滤,药渣加 8 倍量水煎煮 20min,过滤,药渣加 6 倍量水煎煮 20min,过滤,合并 3 次滤液,浓缩,流膏体经冷冻干燥后得干燥粉末,提取率为 11.76%。传统炮制品、何首乌 1h、2h、3h、4h 制品提取方法同上,分别得到干燥粉末,提取率分别为 10.32%、9.04%、5.12%、12.08%、12.41%。

1.4.2 何首乌生品、传统炮制品及高压蒸制品水液提取物刺激液的配制

称取生品何首乌水提物 15mg,精密称定,置于 2mL 的离心管内,用适量含有 10% FBS 的 DMEM(高糖)培养液溶解,置于涡旋混合器上充分混匀,并稀释至 150mL。经 0.22 μ m 滤膜过滤,密封,4℃保存备用,浓度(含生药量):100 μ g $\cdot$ mL⁻¹。传统炮制品、1h、2h、3h、4h 制何首乌组刺激液的配制同生首乌组。

1.5 细胞的传代和培养

人胚肺细胞株(HEL)细胞系,购自中国科学院昆明动物研究所。将冻存的人胚肺二倍体细胞(HEL)从液氮灌中取出,迅速放入 37℃水浴中,振荡使其快速融化。移入 25cm² 培养瓶中,加入 5mL 含有 10% FBS 的 DMEM(高糖)培养液,置于培养箱(5%CO₂、37℃)中培养,次日换液 1 次,以后隔日换液 1 次,继续培养。根据细胞生长情况,待细胞长至 80%~90%融合(约 2d~3d),用胰蛋白酶消化,按 1:3 的比例传代,置培养箱中培养。重复以上步骤,得到第 25 代人体胚肺细胞。

2 方法

复苏第 24 代人胚肺二倍体细胞并随机分成实验组和对照组,实验组与对照组细胞数量相同,实

验组分别给予前文 1.3.2 中配制的含有 100 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 生药量的传统炮制首乌、生首乌、1h 制品何首乌、2h 制品何首乌、3h 制品何首乌和 4h 制品何首乌的完全培养液。对照组采用含有 10% FBS 的 DMEM(高糖)培养液。取衰老期第 24 代的 HEL 细胞用 0.02% EDTA-0.25%胰蛋白酶溶液消化,细胞记数后以 DMEM(高糖)培养液配成单个细胞悬液,以每孔 2 $\times$ 10⁴ 个细胞的密度接种于培养瓶中。将培养瓶移入 CO₂ 培养箱中,在 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度条件下,培养 48 h 使其充分贴壁生长,待细胞长至 80%融合时,通过换成含有待测物的刺激液对各组细胞进行抗衰老实验并观测,直至细胞寿命的终止。

2.1 细胞形态学观察与 SOD 的测定

各实验组每 6d 传代 1 次,从第 25 代开始,每次传代之前对各组细胞进行计数,并且观察各组细胞密度、形态结构和生长状态的变化。

在第 29 代时,分别收集各组细胞,调整细胞数为 5 $\times$ 10⁴/mL,细胞反复冻融,使细胞胀破,离心取上清液进行 SOD 含量的测定。二倍体细胞内 SOD 活性检测采用黄嘌呤氧化酶法。

2.2 统计学分析

数据符合正态分布、方差齐者用 one-factor ANOVA 检验,组间比较用 LSD 检验;数据符合正态分布、方差不齐者用 TamhaneT 2 检验;数据不符合正态分布者用秩和检验。

3 结果

3.1 各组药物对细胞形态学的影响

空白组中细胞形态良好,多边形,排列紧密呈一定方向感,边缘清晰,贴壁良好。生品何首乌组细胞多边形,生长密集,皿底部分出现空洞区域(比较大)有细胞死亡脱落迹象。1h 制品组细胞呈梭形排列,皿底有空洞区域,视野中有死亡的细胞,贴壁良好。2h 制品组细胞有部分细胞形态变圆,多角边,但细胞生长缓慢,皿底有空洞区域。3h 制品组细胞生长良好,形态正常,贴壁细胞呈梭形排列,皿底出现空洞区域较小,细胞生长密集,而且视野中死细胞的数量也很少,4h 制品组细胞生长良好,细胞长梭形结构清晰,皿底空洞区域较小。传统炮制品组细胞形态正常,可见少许空洞区域,细胞排列较为紧密。见图 1。

3.2 各组药物对细胞生长速率的影响

如表 1、表 2 所示,生首乌组、1h 制首乌组和空

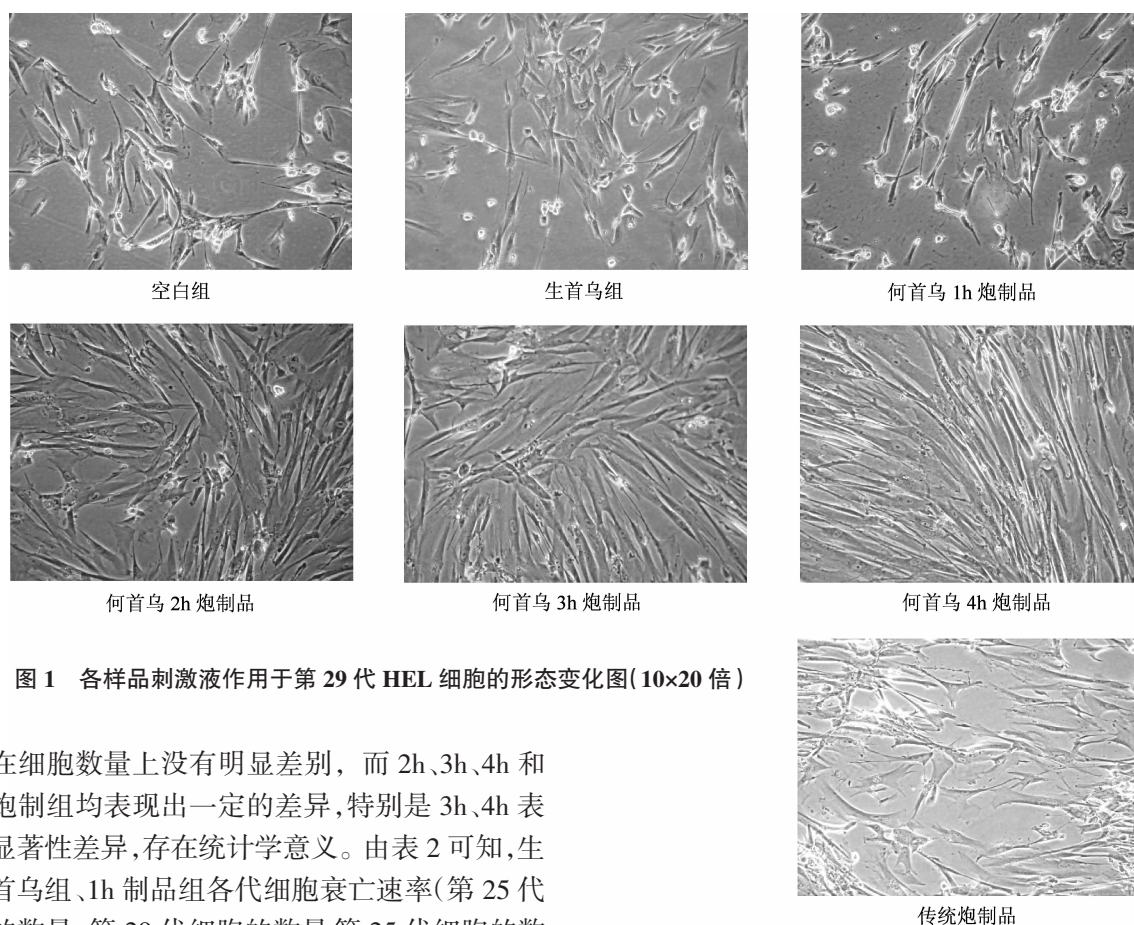


图 1 各样品刺激液作用于第 29 代 HEL 细胞的形态变化图(10×20 倍)

白组在细胞数量上没有明显差别,而 2h、3h、4h 和传统炮制组均表现出一定的差异,特别是 3h、4h 表现出显著性差异,存在统计学意义。由表 2 可知,生品何首乌组、1h 制品组各代细胞衰亡速率(第 25 代细胞的数量-第 29 代细胞的数量/第 25 代细胞的数

细胞代数	表 1 各实验组 HEL 细胞株的细胞计数记录($\bar{x} \pm s, n=3$)						10 ⁴ 个/mL
	空白组 细胞数量	生首乌组 细胞数量	1h 制品组 细胞数量	2h 制品组 细胞数量	3h 制品组 细胞数量	4h 制品组 细胞数量	传统炮制 组细胞数量
25	4.71±0.17	4.16±0.52	3.31±0.56**	3.52±0.05**	5.1±0.15*	5.55±0.12**	3.43±0.16**
26	2.18±0.12	2.50±0.53	2.34±0.18	3.09±0.39**	5.37±0.42***	5.26±0.74***	2.96±0.26*
27	1.06±0.14	1.39±0.25	1.81±0.17**	1.99±0.11***	4.83±0.23***	4.37±0.31***	1.85±0.31***
28	0.68±0.08	0.42±0.07	0.57±0.09	1.13±0.13***	2.36±0.16***	3.41±0.37***	1.09±0.17***
29	0.88±0.1	0.67±0.15	0.63±0.13	0.89±0.06	1.94±0.27***	1.68±0.39***	0.93±0.19

注: * $P<0.05$, ** $p<0.01$, *** $P<0.001$ 与相同代数空白组比较。

量) 较高于其余样品组, 其抗细胞衰减率分别为 16.11%、19.03%。与空白组正常细胞衰亡速率(18.68%)相比无明显差别,提示生品何首乌和 1 h 制品首乌抗衰老作用不明显;2h、3h、4h 制品首乌及传统炮制组能够使细胞衰减速率趋于缓和,其中 3 h 制品首乌的抗细胞衰减率为 38.04%,而传统炮制方法组的抗细胞衰减率为:27.11%。3h 制品首乌为各供试样品中抗细胞衰减作用最为显著,故其细胞衰亡速率最为缓和,提示此制品首乌抗细胞衰老作

表 2 各样品刺激液抗 HEL 细胞衰减率	
组别	各刺激液抗 HEL 细胞衰减率/%
空白组	18.68
生品何首乌组	16.11
1h 制品组	19.03
2h 制品组	25.28
3h 制品组	38.04
4h 制品组	30.27
传统炮制组	27.11

用较为显著。

3.3 各组药物对细胞内 SOD 酶的影响

从表 3 可知, 生品何首乌、1h 制品何首乌和正常组细胞三者间的 SOD 活力没有显著性差异 ($P>0.05$), 而 2h、3h、4h 制品何首乌组、传统炮制组与空白组细胞比较均可提高细胞内 SOD 活性, 其中 3 h 制品何首乌 SOD 活力最高, 与空白组细胞比较有显著性差异 ($P<0.001$), 说明 3 h 制品何首乌有提高 HEL 细胞中 SOD 活性、延缓人胚肺细胞衰亡的作用。SOD 是清除自由基的抗氧化酶, 在培养液中加入 3 h 制品何首乌后, 使 HEL 细胞内 SOD 的活性提高, 显著延缓 HEL 细胞衰亡速率, 促进了细胞代谢, 提高细胞活性, 起到抗衰老的药效作用。

表 3 何首乌不同炮制时间组对人胚肺 HEL 细胞中 SOD 活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	SOD 活力 ($U \cdot mL^{-1}$)
空白组	22.73 $\pm$ 3.04
生品何首乌组	22.42 $\pm$ 3.28
1h 制品组	24.25 $\pm$ 2.03
2h 制品组	39.83 $\pm$ 4.14***
3h 制品组	71.85 $\pm$ 5.04***
4h 制品组	61.76 $\pm$ 3.23***
传统炮制组	37.45 $\pm$ 4.67***

注: *** $P<0.001$ 与空白组比较。

何首乌能增强消化、循环、内分泌和免疫系统功能, 具延缓衰老、增强记忆、抑菌^[9]、抗肿瘤等效用, 被广泛运用于临床。但尚少见何首乌对生长

细胞的影响, 本研究运用现代高压蒸制的炮制方法^[6-7], 通过比较何首乌生品和不同炮制品的差别, 探索何首乌抗衰老药理作用的最佳炮制时间。探索发现 3 h 制品何首乌可以显著提高二倍体细胞生长的速度, 提高细胞中 SOD 的活性, 延长二倍体细胞的老化, 从而确定何首乌抗衰老作用最佳的炮制时间为 3h(炮制条件见 1.1)。

参考文献

- [1] 罗瑞芝, 贾伟, 赵利斌, 等. 何首乌研究进展[J]. 中草药, 2005, 36(7): 1097-1100.
- [2] 王文静, 薛咏梅, 赵荣华, 等. 何首乌的化学成分和药理作用研究进展[J]. 云南中医学院学报, 2007, 30(3): 60-63.
- [3] 孙立群, 王宗贵, 朱红权, 等. 红景天贰抗二倍体细胞衰老的实验研究[J]. 中国老年学杂志, 2001, 21(3): 225-226.
- [4] 李林福, 刘振丽, 宋志前, 等. 何首乌炮制研究进展[J]. 中国药房, 2007, 18(30): 2377-2378.
- [5] 解奉江, 张荣华, 赵声兰, 等. 清蒸与黑豆汁蒸何首乌中有效成分的比较[J]. 中草药, 2005, 36(7): 1004-1006.
- [6] Lin X Y. Comparative study on effective components of different processed products of Polygonum multiflorum [J]. J Med Theor & Prac, 2002, 15(12): 1466-1467.
- [7] 赵荣华, 赵声兰, 解奉江, 等. 何首乌清蒸工艺研究[J]. 中草药, 2007, 38(2): 210-212.
- [8] 苗明三, 方晓艳. 制何首乌多糖对衰老模型小鼠抗氧化作用的研究[J]. 中药药理与临床, 2002, 18(5): 23-24.
- [9] Rachel WL, G David L, Stephen PM, et al. Anti-inflammatory activity of Chinese medicinal vine plants [J]. J Ethnopharmacol, 2003, 85(1): 61-67.

(编辑: 迟越)

The Study on Anti-Senility Experiment of Diploid Cells by Polygoni Multiflori Radix and its Processed Products

WANG Wan-gen¹, ZHANG Ning-hua², XU Qiao-hong³, ZHAO Zi-wei¹, ZHAO Rong-hua¹, YU Jie¹

(1. Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming Yunnan 650500;

2. Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang Shanxi 712046;

3. The First People's Hospital of Wenling, Wenling Zhejiang 317500)

ABSTRACT: **Objective** The anti-senility effects of Polygoni Multiflori Radix (PMR) and its processed products including traditional processed products on human embryo lung diploid fibroblast cells were investigated in order to find the best processing time of PMR. **Methods** The diploid cells were counted and the SOD activity. It was tested after exposed by extracts of PMR and its processed products with different processing time including traditional processed products. **Results** The resistance attenuation rate of 3 h processed PMR group was 38.04% and the SOD activity in 3 h processed PMR group was (71.85 $\pm$ 5.04)U $\cdot$ mL⁻¹. The SOD activity and the resistance attenuation rate of diploid cells in 3 h processed PMR group were significantly higher than the control group ($P<0.001$). **Conclusion** 3 h processed PMR could delay the decline of human embryonic lung cells while increase SOD activity in HEL cells. Thus, the most appropriate processing time of PMR was 3 hours high-pressure steaming.

KEY WORDS: Polygoni Multiflori Radix; processing; HEL; anti-senility