



不同产地或提取工艺枸杞对原代胶质细胞抗氧化及抗炎作用的影响

郑桢雯[†], 术蓉[†], 孙中轻, 刘晋锋, 苏国辉, 赵健^{*}

香港大学李嘉诚医学院眼科学系, 脑与认知科学国家重点实验室, 香港 999077

[†] 同等贡献

^{*} 联系人, E-mail: datwai@hku.hk

2020-10-15 收稿, 2020-12-31 修回, 2021-01-04 接受, 2021-03-02 网络版发表

香港医疗卫生研究基金(HMRF14151281)和香港科技署院校中游研发计划(MRP-092-17X)资助

摘要 为探讨不同产地及提取方式的枸杞对小鼠原代脑胶质细胞抗氧化及抗炎作用的影响, 本研究以原代小鼠脑胶质细胞为研究对象, 4种不同产地及提取方式的枸杞提取物预处理2 h后, 用400 $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢干预建立氧化应激损伤模型. 建模6 h后, 采用q-PCR检测原代脑胶质细胞抗氧化及炎症相关的基因表达水平; 24 h后, 检测各组细胞上清液中乳酸脱氢酶(LDH)水平, 并通过Western blot检测原代胶质细胞SOD1、PRDX5及SOD2的蛋白表达水平. 结果显示, 与未加枸杞提取物的对照组相比, 宁夏枸杞水提取物组(NX)、新疆枸杞水提取物组(XJ)、枸杞糖肽组(LBP)的LDH水平无显著性差异, 青海枸杞水提取物组(QH)的乳酸脱氢酶(LDH)水平显著升高. 在过氧化氢刺激后, 枸杞糖肽组(LBP+H₂O₂)的细胞活性无明显降低. 同时, 在过氧化氢刺激下, 宁夏枸杞水提取物组(NX+H₂O₂)、新疆枸杞水提取物组(XJ+H₂O₂)的*Nrf-2*基因表达水平明显升高, LBP+H₂O₂组*SOD1*基因表达水平明显升高, 宁夏(NX+H₂O₂)、青海枸杞水提取物组(QH+H₂O₂)、LBP+H₂O₂组*PRDX5*基因表达水平明显升高. LBP+H₂O₂组的SOD2蛋白表达水平明显升高. NX+H₂O₂组、LBP+H₂O₂组炎症相关基因表达水平明显升高. 研究结果提示, 宁夏来源的宁夏枸杞水提取物和LBP有较好的抗氧化作用, 同时激活了细胞的免疫反应. 新疆来源枸杞水提取物抗氧化能力较宁夏来源枸杞水提取物略低, 作用较为温和, 对细胞免疫反应影响较小.

关键词 枸杞, 小鼠原代脑胶质细胞, 抗氧化, 炎症

枸杞为我国药食同源的传统中药, 其中宁夏枸杞为载入2010年版《中国药典》的道地药材品种, 药理研究显示其具有抗炎、抗氧化及神经保护作用^[1,2]. 枸杞主要种植于我国西北地区, 包括宁夏、青海及新疆. 随着人们对保健及食补养生的注重, 枸杞子的质量评价及其药用功效的研究日益增加. 不同产地、不同加工提取方式的枸杞, 其质量、营养成分有着一定的差异^[3]. 而先前的研究主要侧重于对化学有效成分的定量分析, 以及比较不同产地枸杞清除氧化自由基的能

力^[4,5], 鲜有研究对不同枸杞提取物在生物体内的作用效果进行对比分析.

胶质细胞为脑的重要组成部分, 是中枢神经系统(central nervous system, CNS)中一类重要的免疫及支持细胞, 与神经退行性病变, 如阿尔茨海默病、帕金森综合征、缺血性脑卒中等有着重要的联系^[6,7]. 其中, 中枢神经系统中的胶质细胞主要为小胶质细胞及星形胶质细胞. 研究表明, 在神经退行性疾病中, 脑内的小胶质细胞与星形胶质细胞之间相互影响、相互作用, 与

引用格式: 郑桢雯, 术蓉, 孙中轻, 等. 不同产地或提取工艺枸杞对原代胶质细胞抗氧化及抗炎作用的影响. 科学通报, 2022, 67: 376–384

Zheng C W, Zhu R, Sun Z Q, et al. Effects of Goji with different origins or different extraction methods on primary mixed glial cells (in Chinese). Chin Sci Bull, 2022, 67: 376–384, doi: [10.1360/TB-2020-1323](https://doi.org/10.1360/TB-2020-1323)

神经退行性病变病程的发展有着重要的联系^[8,9]。胶质细胞对维持中枢神经微环境稳态有着不可或缺的作用^[10]。在神经退行性病变疾病中,脑部处于炎症及氧化应激状态,被激活的胶质细胞分泌相应的调节因子,以应对炎症及氧化应激挑战。但是过度激活的胶质细胞可对神经元造成损害,加快神经退行性疾病的进程^[11]。所以,提高脑内胶质细胞的抗氧化及抗炎能力,稳定脑内微环境,为治疗脑神经退行性病变的思路之一。

本研究通过体外培养原代混合胶质细胞,比较不同产地及提取方式的红果枸杞提取物对胶质细胞活性的影响,同时对不同枸杞提取物对氧化应激状态下原代胶质细胞的抗氧化及抗炎能力的影响进行比较分析。意图在评估现有枸杞提取物的生物功效同时,为中药成分抗氧化及抗炎能力的深度开发和综合利用提供快速、可靠的生物检测平台。

1 材料及方法

1.1 材料

DMEM/F-12培养基、胎牛血清购自Gibco公司。木瓜蛋白酶购自Merck公司。30%过氧化氢购自Millipore公司。RNA提取试剂盒、RNA逆转录试剂盒、染料法荧光定量PCR试剂盒购自QIAGEN公司。PRDX5(peroxiredoxin 5)抗体、SOD1(superoxide dismutase 1)抗体、SOD2抗体、 β -Actin抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗购自Abcam公司。乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒、ECL化学发光检测试剂盒购自Thermo Fisher公司。

1.2 4种枸杞提取物来源及提取方式

4种枸杞提取物所用枸杞物种均为宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L.),由余仁生(香港)有限公司提供。宁夏枸杞水提物、枸杞糖肽提取物所用枸杞来源于宁夏回族自治区中卫市中宁县(105°26'~106°7'E, 37°9'~37°50'N);新疆枸杞提取物所用枸杞材料来源于新疆维吾尔自治区博尔塔拉蒙古自治州精河县(81°46'~83°51'E, 44°00'~45°10'N);青海枸杞提取物所用枸杞材料来源于青海省海西蒙古族藏族自治州(96°15'~98°15'E, 36°55'~38°22'N)。

宁夏枸杞水提物、青海枸杞水提物、新疆枸杞水提物提取方式:2.5 kg枸杞干果清洗后,在40℃的温水中

中浸泡15 min,煮沸1 h,过滤所得的药物残渣再次煮沸,合并两次所得浸膏,浓缩至1.25 kg。

枸杞糖肽(专利号:CN110840964A[P].2020-02-28):称量并清洗枸杞干果,浸提并收集枸杞原浆液,去除枸杞籽,将所述浆液离心处理,通过无机膜分离,收集滤液通过有机膜分离,单效浓缩,收集浓缩液,真空冷冻干燥得到枸杞糖肽。产品由宁夏天仁枸杞生物科技股份有限公司提供。

1.3 原代细胞培养

新生C57BL/6J品系小鼠(出生后1~4 d)剥离出大脑皮层组织,小心分离去除表面脑膜及血管,剪碎后转移到离心管中,加入3%木瓜蛋白酶,37℃水浴消化20 min,4℃1000 r/min离心5 min。弃上清,加入一定量培养基重悬细胞后接种到培养皿中,24 h后换液,其后每3 d更换1次培养基,7~10 d后胰酶消化传代至不同规格的孔板用于后续实验。

1.4 LDH法细胞毒性检测

将培养7~10 d后的混合胶质细胞,以 1×10^4 /孔的密度接种于96孔板,24 h后换低血清培养基饥饿过夜,次日加入不同浓度的枸杞提取物或(和)400 $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢培养24 h,每孔吸出定量的培养基至新的96孔板,加入按试剂盒说明书配置的LDH混合反应试剂,室温避光孵育30 min,加入终止反应液后,用酶标仪测定490及680 nm处的吸光度,实验重复3次。

1.5 分组

将培养7~10 d后的混合胶质细胞,以 3×10^5 /孔的密度接种于6孔板中,24 h后换低血清培养基饥饿过夜。次日,根据是否添加枸杞提取物处理,以及是否进行过氧化氢刺激进行(表1)。

1.6 实时荧光定量PCR(q-PCR)检测

将培养7~10 d后的混合胶质细胞,以 3×10^5 /孔的密度接种于6孔板中,24 h后换低血清培养基饥饿过夜,次日分别以浓度为500 $\mu\text{g/mL}$ 的不同枸杞提取物预处理2 h后,替换为同时含500 $\mu\text{g/mL}$ 的枸杞提取物及400 $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢的培养基培养6 h。用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)冲洗2次后,加入裂解液后刮取细胞,用总RNA提取试剂盒提取总RNA,紫外分光光度计检测RNA纯度与浓度,逆转录后得cDNA。PCR反

表1 不同实验组别细胞处理方式

Table 1 Treatment details in different groups

分组	处理方式
对照组	无任何处理
NX 组	加入500 $\mu\text{g/mL}$ 宁夏枸杞水提取物
QH 组	加入500 $\mu\text{g/mL}$ 青海枸杞水提取物
XJ 组	加入500 $\mu\text{g/mL}$ 新疆枸杞水提取物
LBP 组	加入500 $\mu\text{g/mL}$ 枸杞糖肽
H ₂ O ₂ 组	加入400 $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢
NX+H ₂ O ₂ 组	500 $\mu\text{g/mL}$ 宁夏枸杞水提取物预处理 2 h 后, 加入400 $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢
QH+H ₂ O ₂ 组	500 $\mu\text{g/mL}$ 青海枸杞水提取物预处理 2 h 后, 加入400 $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢
XJ+H ₂ O ₂ 组	500 $\mu\text{g/mL}$ 新疆枸杞水提取物预处理 2 h 后, 加入400 $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢
LBP+H ₂ O ₂ 组	500 $\mu\text{g/mL}$ 枸杞糖肽预处理 2 h 后, 加入400 $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢

应采用Step One Plus Real-Time PCR 系统(Applied Biosystems)进行荧光定量检测. 以 β -actin为内参, 分别设计SOD1、SOD2、Nrf-2、HO-1、PRDX5、PRDX6、IL-1 β 、IL-10、NLRP3引物, 具体引物序列见表2. 反应条件为: 95°C预变性10 min, 95°C变性15 s, 60°C退火延伸1 min, 共40个循环. 实验均重复3次, 数据采用 $\Delta\Delta C_T$ 方法进行统计分析.

1.7 Western blot 检测

经过上述干预24 h后提取各组细胞总蛋白, BCA (bicinchoninic acid)蛋白试剂盒计算蛋白含量, 制备12% SDS分离胶分离蛋白, 并通过湿法转移至PVDF膜. 5%脱脂奶粉封闭1 h后, 4°C孵育 β -actin(mouse anti-mouse, Abcam)、PRDX5(rabbit anti-mouse, Abcam)、SOD1(rabbit anti-mouse, Abcam)及SOD2(rabbit anti-mouse, Abcam)抗体过夜, 次日室温孵育相应HRP (horseradish peroxidase)标记的二抗(封闭液稀释)后, ECL(electrochemiluminescence)化学发光法检测相关蛋白表达. 凝胶成像分析系统扫描蛋白条带, 应用Image J 软件分析条带灰度值, 以目的蛋白与内参 β -actin的比值作为蛋白相对表达量. 实验重复3次, 计算均值及标准差.

1.8 统计学分析

数据采用GraphPad Prism 8.0统计软件进行处理. 检测指标多组间比较采用单因素方差分析进行统计学处理(One way ANOVA). $P < 0.05$ 认为有统计学差异.

表2 引物基因序列

Table 2 Primer sequences used for q-PCR

名称	GenBank 号	引物序列
β -actin	NM_007393	5'-GTGACGTTGACATCCGTAAAGA-3' 3'-GCCGGACTCATCGTACTCC-5'
SOD1	NM_011434	5'-AACCAGTTGTGTTGTCAGGAC-3' 3'-CCACCATGTTTCTTAGAGTGAGG-5'
SOD2	NM_013671	5'-CAGACCTGCCTTACGACTATGG-3' 3'-CTCGGTGGCGTTGAGATTGTT-5'
Nrf2	NM_010902	5'-TAGATGACCATGAGTCGCTTGC-3' 3'-GCCAACTTGCTCCATGTCC-5'
HO-1	NM_010442	5'-GATAGAGCGCAACAAGCAGAA-3' 3'-CAGTGAGGCCCATACCAAGAAG-5'
PRDX5	NM_012021	5'-GGCTGTTCTAAGACCCACCTG-3' 3'-GGAGCCGAACCTTGCCTTC-5'
PRDX6	NM_007453	5'-CGCCAGAGTTTGCCAAGAG-3' 3'-TCCGTGGGTGTTTACCATTG-5'
IL-1 β	NM_008361	5'-CTGTGACTCATGGGATGATGATG-3' 3'-CGGAGCCTGTAGTGCAGTTG-5'
IL-10	NM_010548	5'-CTTACTGACTGGCATGAGGATCA-3' 3'-GCAGCTCTAGGAGCATGTGG-5'
NLRP3	NM_145827	5'-ATTACCCGCCGAGAAAGG-3' 3'-TCGCAGCAAAGATCCACACAG-5'

2 结果

2.1 不同浓度的枸杞对原代胶质细胞活性的影响

在原代脑胶质细胞中分别加入浓度为100、300、500、1000、1500、2000 $\mu\text{g/mL}$ 的宁夏枸杞水提取物(NX)、新疆枸杞水提取物(XJ)、枸杞多糖肽(LBP), LDH检测结果显示, 与对照组相比, 各组LDH水平无明显增加. 而100、300、500、1000、1500、2000 $\mu\text{g/mL}$ 的青海枸杞提取物(QH)在原代脑胶质细胞中, LDH水平较相比对照组有较显著的升高(图1), 提示宁夏枸杞水提取物、新疆枸杞水提取物及枸杞多糖肽在100~2000 $\mu\text{g/mL}$ 范围内均无明显细胞毒性, 而青海枸杞水提取物在100~2000 $\mu\text{g/mL}$ 范围内对脑原代胶质细胞有一定的毒性作用.

2.2 4种枸杞提取物对过氧化氢刺激下原代胶质细胞存活率的影响

根据前期研究, 采用500 $\mu\text{g/mL}$ 的4种枸杞提取物对脑原代胶质细胞进行2 h的预处理后, 加入含有400 $\mu\text{mol/L}$ 的过氧化氢及500 $\mu\text{g/mL}$ 的枸杞提取物的培养液. 如图2所示, 加入过氧化氢后, 原代脑胶质细胞的

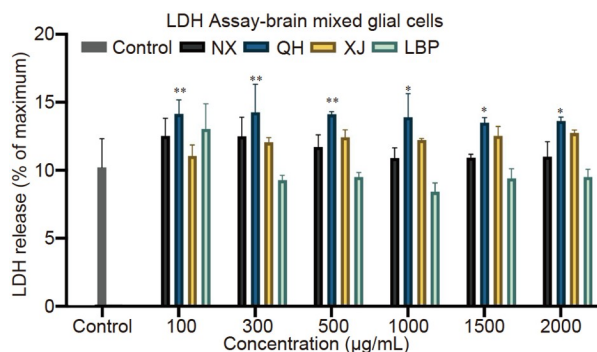


图1 (网络版彩色)不同浓度枸杞对脑原代胶质细胞活性影响。与对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

Figure 1 (Color online) Cell viability of the brain mixed glial cells after treatment of LBE with different concentrations. Compared to the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

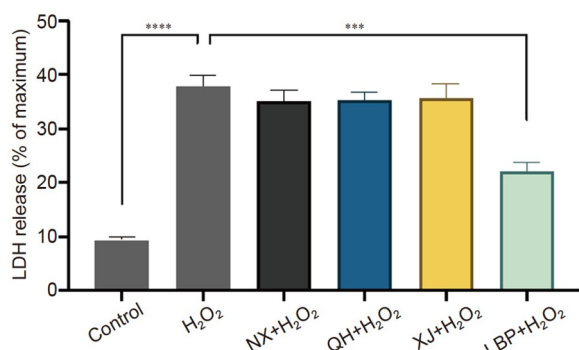


图2 (网络版彩色)500 µg/mL枸杞提取物对400 µmol/L过氧化氢刺激下脑原代胶质细胞活性的影响。与对照组相比, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$

Figure 2 (Color online) Cell viability of brain mixed glial cells after treatment with 500 µg/mL LBE and 400 µmol/L H₂O₂. Compared to the control group, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$

LDH释放量较对照组明显增加。用枸杞多糖肽预处理的脑原代胶质细胞LDH释放量较过氧化氢组明显降低,提示枸杞多糖肽对过氧化氢导致的细胞活性降低有明显的改善作用。而宁夏枸杞水提取物、青海枸杞水提取物、新疆枸杞水提取物较过氧化氢组的LDH释放量无明显变化(图2)。

2.3 4种枸杞提取物对原代胶质细胞抗氧化相关基因表达水平的影响

如图3(a)所示,加入过氧化氢后,宁夏枸杞水提取物组、新疆枸杞水提取物组的Nrf-2基因表达水平较过氧化氢组有所升高。加入宁夏、青海、新疆枸杞水提取物、枸杞多糖肽的组别中的HO-1(图3(b))基因表达水平均有所升高,但较对照组无显著性差异,过氧化氢刺激状

态下加入4种枸杞提取物,HO-1表达水平也都有所增加,但较过氧化氢组无显著性差异。

图3(c), (d)为超氧化物歧化酶SOD1和SOD2的表达水平,4种枸杞组的SOD1、SOD2较对照组表达水平有所上升但无显著性差异,过氧化氢刺激下的枸杞给药组SOD1表达水平升高,但只有LBP+H₂O₂组显著升高。过氧化氢刺激下宁夏枸杞水提取物、青海枸杞水提取物、LBP组细胞的SOD2基因表达水平略有上升,而新疆枸杞治疗组略有下降。

图3(e), (f)为PRDX5及PRDX6基因表达水平。其中PRDX5具有抗氧化、抑制过氧化物在细胞内累积的作用^[12],PRDX6负责调节氧化还原反应,保护细胞免受氧化应激损伤^[13]。在过氧化氢刺激的条件下,宁夏枸杞水提取物、青海枸杞水提取物、LBP能显著提高PRDX5的基因表达水平。青海枸杞水提取物较过氧化氢组相比能提高PRDX6的基因表达水平,但无显著性差异。

2.4 4种枸杞提取物对原代胶质细胞炎症相关基因表达水平的影响

如图4,加入4种枸杞后,宁夏枸杞水提取物、青海枸杞水提取物、LBP组的NLRP3及促炎细胞因子IL-1β的基因表达水平与过氧化氢组相比显著上升。在过氧化氢刺激的状态下,宁夏枸杞水提取物、青海枸杞水提取物、LBP组抗炎细胞因子IL-10的基因表达水平较过氧化氢组有所提高但无显著性差异。

2.5 4种枸杞提取物对原代胶质细胞抗氧化酶PRDX5、SOD1及SOD2蛋白表达水平的影响

如图5中Western blot结果所示,与过氧化氢组相比,4种枸杞提取物SOD1蛋白表达水平无显著性差异。LBP促进了过氧化氢刺激下PRDX5的表达,但与过氧化氢组相比无显著性差异。同时,在过氧化氢刺激下,宁夏枸杞、青海枸杞、新疆枸杞水提取物的SOD2表达量较过氧化氢组有所升高,但无显著性差异,而LBP则显著地促进了SOD2的表达。

3 讨论

枸杞作为我国的传统中药,具有滋补肝肾、益精明目的作用。药理学研究显示,枸杞具有多种药理作用,包括提高免疫力、清除自由基、抗氧化、抗肿瘤、保肝、保护神经等^[1,2]。在神经退行性病变的病程中,活性氧基团可造成神经细胞氧化损伤,并引起胶质

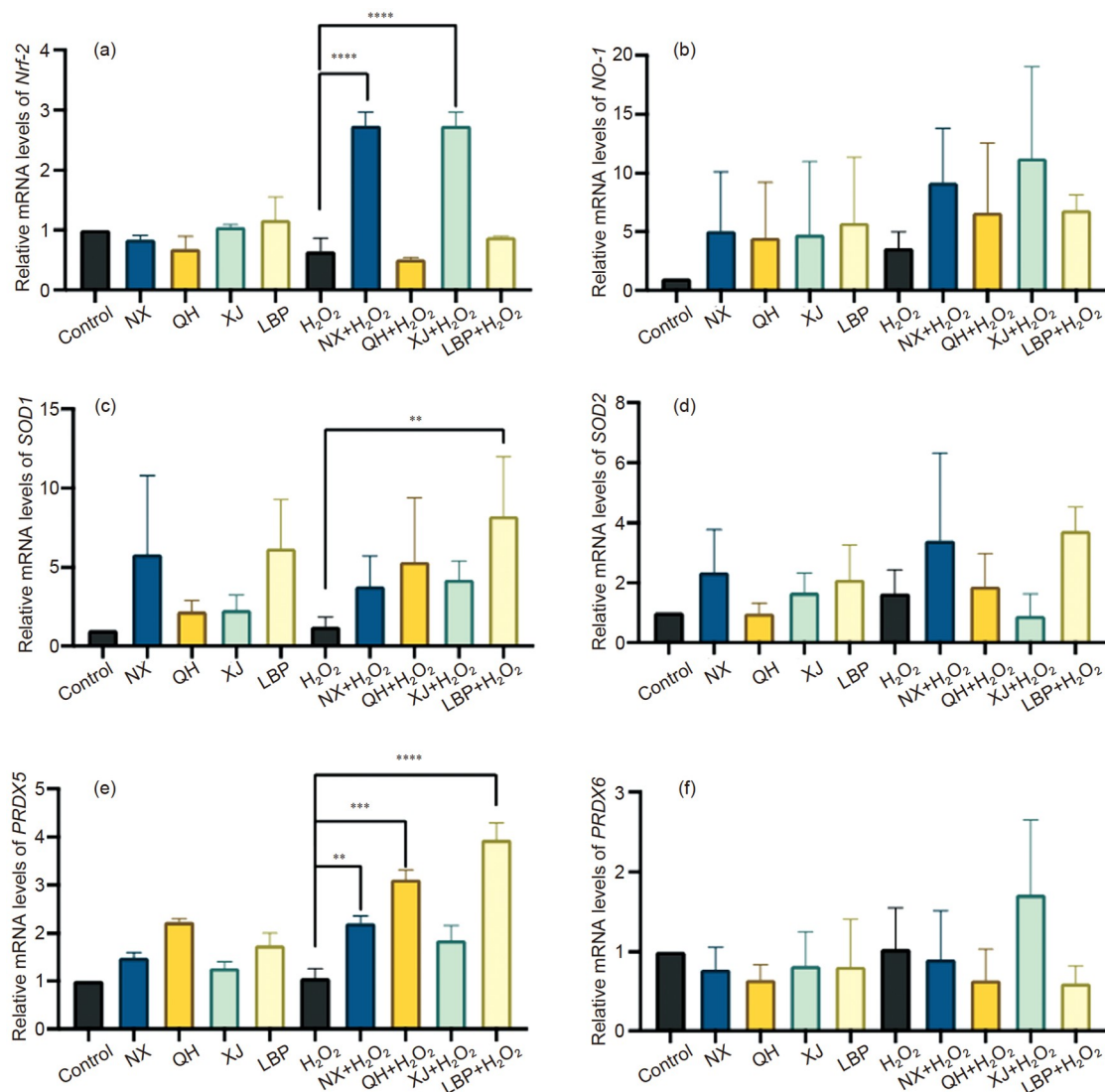


图3 (网络版彩色)4种枸杞提取物对原代胶质细胞及过氧化氢刺激下原代胶质细胞基因表达水平比较。(a, b) 原代胶质细胞*Nrf-2*及*HO-1*基因表达水平; (c, d) 原代胶质细胞*SOD1*及*SOD2*基因表达水平; (e, f) 原代胶质细胞*PRDX5*及*PRDX6*基因表达水平。 ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

Figure 3 (Color online) Gene expression level of brain mixed glial cells with the treatment of LBEs or co-treatment of LBEs and H₂O₂. (a, b) Gene expression level of *Nrf-2* and *HO-1*. (c, d) Gene expression level of *SOD1* and *SOD2*. (e, f) Gene expression level of *PRDX5* and *PRDX6*. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

细胞的激活、内环境紊乱,导致神经元死亡^[14]。本研究专注于不同枸杞提取物对原代脑胶质细胞在过氧化氢刺激下的细胞毒性、抗氧化基因和蛋白表达水平以及炎症相关基因表达水平的影响。宁夏来源的宁夏枸杞水提取物及枸杞糖肽具有较优的抗氧化能力。而相对于其他3种枸杞提取物,新疆枸杞水提取物对细胞免疫反应的刺激性最小,致炎性较低。

Nrf-2/HO-1通路为细胞抗氧化应激的重要通路。在氧化应激的情况下, Nrf-2与Keap1分离,游离的Nrf-2转

移到核内,并与抗氧化反应元件ARE相结合,调控抗氧化基因如HO-1的表达。HO-1可催化亚铁血红素转化为一氧化碳(CO)、铁离子及胆绿素,同时抑制促炎因子的生成,促进抗炎因子的产生^[15]。与过氧化氢组相比,4种枸杞提取物的Nrf-2及HO-1的基因表达水平大多有一定程度的上升,其中宁夏枸杞水提取物及新疆枸杞水提取物效果最优。

超氧化物歧化酶(SOD)为一类重要的抗氧化酶,其中SOD1分布于细胞质中,而SOD2主要位于线粒体的

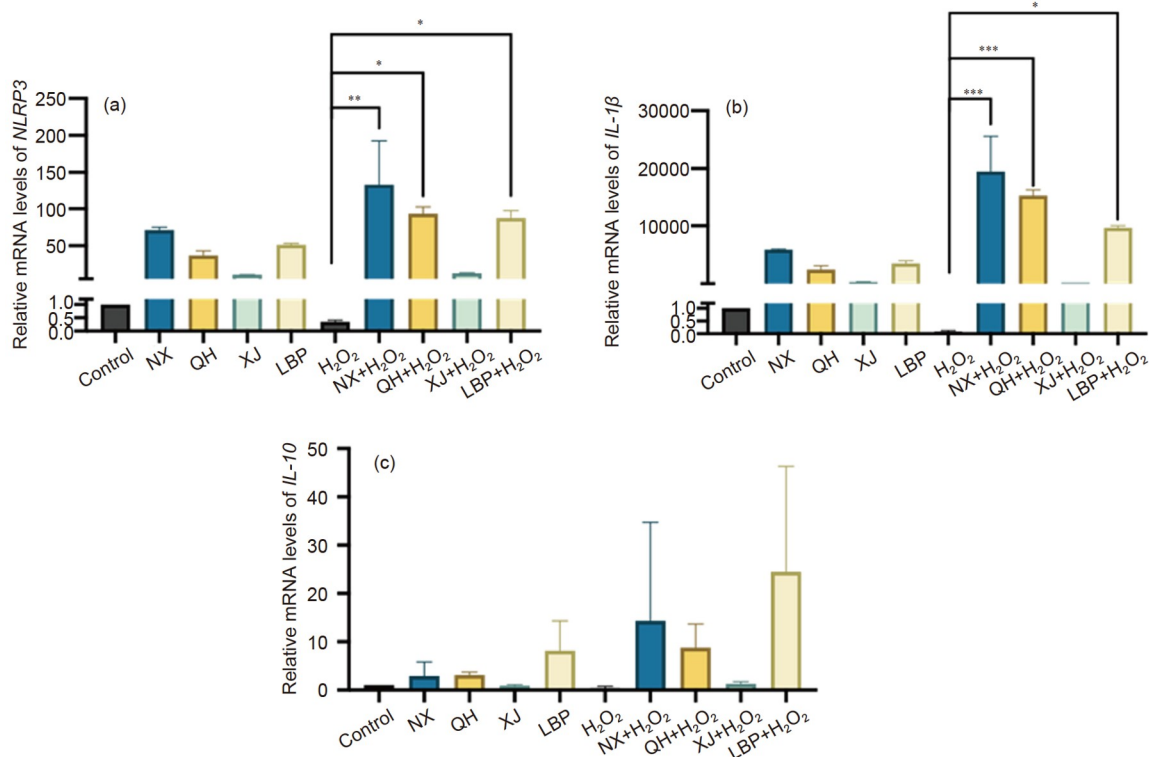


图4 (网络版彩色)4种枸杞对原代胶质细胞及过氧化氢刺激下原代胶质细胞炎症基因相关表达水平比较。(a) 原代胶质细胞 *NLRP3* 基因表达水平; (b) 原代胶质细胞 *IL-1β* 基因表达水平; (c) 原代胶质细胞 *IL-10* 基因表达水平。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

Figure 4 (Color online) Gene expression level of brain mixed glial cells with the treatment of LBEs or co-treatment of LBEs and H₂O₂. (a) Gene expression level of *NLRP3*; (b) gene expression level of *IL-1β*; (c) gene expression level of *IL-10*. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

基质层^[16]。其在神经退行性病变疾病中起到重要的作用。研究表明,提高内源性SOD,可有效减缓由氧化应激引起的病变^[16]。在本研究中,枸杞给药组和枸杞治疗组较对照组与过氧化氢组相比, *SOD1* 基因表达水平均有升高,但只有LBP组有显著性差异。而对SOD1的蛋白表达水平,4种枸杞治疗组与对照组相比均无显著性差异。然而,宁夏、新疆枸杞水提物、LBP给药组较对照组相比 *SOD2* 基因表达水平升高,在过氧化氢刺激条件下,宁夏枸杞水提物、LBP治疗组较过氧化氢组 *SOD2* 基因表达水平升高,但均无显著性差异。但在LBP治疗组中, *SOD2* 蛋白的表达量较过氧化氢组明显升高,提示枸杞糖肽可能通过提高SOD2蛋白的表达而对过氧化氢刺激下导致的细胞死亡产生保护作用。

同时,宁夏枸杞水提物、青海枸杞水提物、LBP可显著提高过氧化物酶PRDX5的基因表达水平,但在蛋白表达水平上未有显著性差异。新疆枸杞提高了PRDX6基因的表达水平,但无显著性差异。

对不同枸杞与炎症相关基因表达量的比较,在宁夏枸杞水提物、青海枸杞水提物、LBP组中,混合胶

质细胞抗炎因子IL-10的表达量均有所提高。同时, *NLRP3* 与促炎细胞因子IL-1β的基因表达量也有显著的提高,说明宁夏枸杞水提物、青海枸杞水提物、LBP较强烈地激活了胶质细胞的免疫反应。新疆枸杞水提物虽在抗炎细胞因子IL-10的表达量低于其他3种枸杞提取物,但其 *NLRP3*、IL-1β的表达量显著低于宁夏枸杞水提物、青海枸杞水提物和LBP组。这可见新疆枸杞水提物对胶质细胞的抗氧化能力促进作用虽稍弱于宁夏来源的宁夏枸杞水提物及LBP,但其对免疫系统的刺激性明显较其他3种枸杞小。

由于中药材的种类多样性及成分复杂性,现行的中药质量评价主要通过对特定药物成分进行定量分析。本研究通过加入枸杞提取物对原代脑胶质细胞进行预处理,而后对其在过氧化氢刺激下的应激状态进行检测,评价不同产地及不同提取方式的枸杞对细胞抗氧化、抗炎能力的影响。结合刘昌孝等人^[17]提出的中药质量标志物的理念,本研究以中枢神经系统的胶质细胞为快速生物评估体系,研究不同产地及提取方式枸杞子的药理作用,对药材质量与其生物有效性的关联

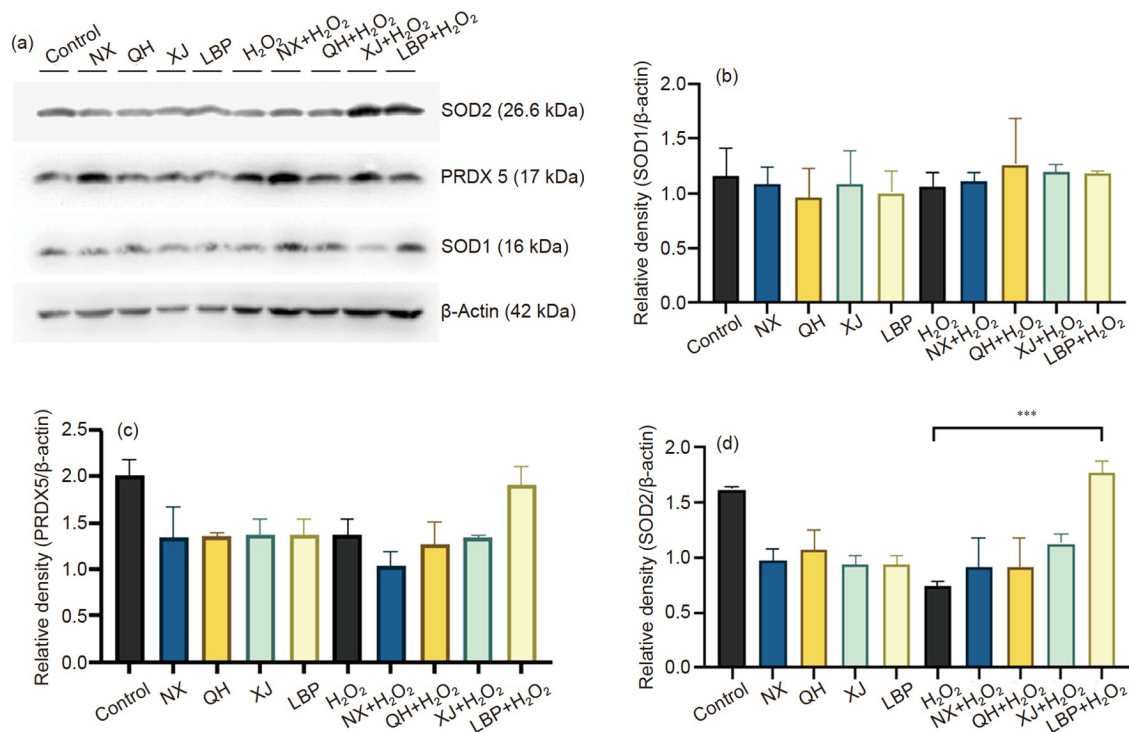


图 5 (网络版彩色)4 种枸杞对原代胶质细胞及过氧化氢刺激下原代胶质细胞 SOD1、PRDX5 及 SOD2 蛋白表达水平比较。(a) 不同组别脑胶质细胞 SOD1、PRDX5 及 SOD2 Western blot 蛋白条带; (b) SOD1 蛋白表达水平; (c) PRDX5 蛋白表达水平; (d) SOD2 蛋白表达水平。*** $P < 0.001$

Figure 5 (Color online) Protein level of SOD1, PRDX5, and SOD2 on brained mixed glial cells with the treatment of LBEs or co-treatment of LBEs and H₂O₂. (a) Representative Western blots result of the SOD1, PRDX5, and SOD2 protein; (b) relative density of SOD1; (c) relative density of PRDX5; (d) relative density of SOD2. *** $P < 0.001$

提供更为直接、有效的信息。当然证实药物对人体中
枢神经系统抗氧化及抗炎的作用, 还需通过动物实
验、临床研究等方面进行进一步的验证。

4 结论

综上所述, 宁夏、青海、新疆枸杞水提物, 枸杞多
糖肽对原代脑胶质细胞均无明显毒性。其中, 宁夏枸杞

水提物及同是宁夏来源枸杞糖肽对中枢神经氧化应激
状态及炎症有更好的治疗效果, 新疆来源的枸杞提取
物具有良好的抗氧化能力且免疫刺激较低, 更适合日
常保健服用。本研究为枸杞在中枢神经系统氧化应激
状态下对微环境的调节及神经元存活的改善, 提供了一
定的理论基础。同时, 研究中使用的生物评估体系,
为其他中药提取物的安全及有效性评价提供了参考。

参考文献

- Xing X, Liu F, Xiao J, et al. Neuro-protective Mechanisms of *Lycium barbarum*. *Neuromol Med*, 2016, 18: 253–263
- Wei X S, Wang H Y, Sun Z X, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Lycium barbarum* (in Chinese). *China Tradit Patent Med*, 2018, 40: 2513–2520 [魏雪松, 王海洋, 孙智轩, 等. 宁夏枸杞化学成分及其药理活性研究进展. *中成药*, 2018, 40: 2513–2520]
- Wang X F, Li J, Fang G M, et al. Research progress on quality evaluation of *Lycium barbarum* (in Chinese). *China Med Hera*, 2020, 17: 46–49 [王秀芬, 李静, 方光明, 等. 枸杞子质量评价研究进展. *中国医药导报*, 2020, 17: 46–49]
- Zhang C L, Lu L, Fang H J, et al. Determination of *Lycium barbarum* polysaccharide from different producing areas in northwest China and evaluation of antioxidant capacity (in Chinese). *Med J Nat Defend Forces Northwest China*, 2020, 41: 414–417 [张春丽, 路丽, 方慧君, 等. 西北地区不同产地枸杞多糖含量的测定及抗氧化能力评价. *西北国防医学杂志*, 2020, 41: 414–417]
- Peng H, Qin H W, Cheng Y J, et al. Optimization of the extraction process of *Lycium barbarum* polysaccharides and comparison of the quality of *Lycium barbarum* from different origins (in Chinese). *Jiangsu Agric Sci*, 2018, 46: 194–197 [彭浩, 秦宏伟, 程有君, 等. 枸杞多糖提取工艺优化

- 及不同产地枸杞质量比较. 江苏农业科学, 2018, 46: 194–197]
- 6 Greenhalgh A D, David S, Bennett F C. Immune cell regulation of glia during CNS injury and disease. *Nat Rev Neurosci*, 2020, 21: 139–152
- 7 Allen N J, Lyons D A. Glia as architects of central nervous system formation and function. *Science*, 2018, 362: 181–185
- 8 Lian H, Litvinchuk A, Chiang A C A, et al. Astrocyte-microglia cross talk through complement activation modulates amyloid pathology in mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 2016, 36: 577–589
- 9 Liddelow S A, Guttenplan K A, Clarke L E, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, 2017, 541: 481–487
- 10 Acosta C, Anderson H D, Anderson C M. Astrocyte dysfunction in Alzheimer disease. *J Neurosci Res*, 2017, 95: 2430–2447
- 11 Xu L, He D, Bai Y. Microglia-mediated inflammation and neurodegenerative disease. *Mol Neurobiol*, 2016, 53: 6709–6715
- 12 Knoop B, Goemaere J, Van der Eecken V, et al. Peroxiredoxin 5: Structure, mechanism, and function of the mammalian atypical 2-Cys peroxiredoxin. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15: 817–829
- 13 Fisher A B. Peroxiredoxin 6: A bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A₂ activities. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15: 831–844
- 14 Kwon S H, Hong S I, Ma S X, et al. 3',4',7-Trihydroxyflavone prevents apoptotic cell death in neuronal cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *Food Chem Toxicol*, 2015, 80: 41–51
- 15 Ahmed S M U, Luo L, Namani A, et al. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochim Biophys Acta*, 2017, 1863: 585–597
- 16 Prasad N, Ramteke P, Dholia N, et al. Therapeutic Interventions to Block Oxidative Stress-Associated Pathologies. *Immunity and Inflammation in Health and Disease*. Amsterdam: Elsevier, 2018. 341–362
- 17 Liu C L, Chen S L, Xiao X H, et al. A new concept on quality marker of Chinese materia medica: Quality control for Chinese medicinal products (in Chinese). *Chin Tradit Herbal Drugs*, 2016, 47: 1443–1457 [刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物(Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念. *中草药*, 2016, 47: 1443–1457]

Summary for “不同产地或提取工艺枸杞对原代胶质细胞抗氧化及抗炎作用的影响”

Effects of Goji with different origins or different extraction methods on primary mixed glial cells

Chengwen Zheng[†], Rong Zhu[†], Zhongqing Sun, Jinfeng Liu, Kwok Fai So & Kin Chiu^{*}

Department of Ophthalmology, LKS Faculty of Medicine, State Key Laboratory of Brain and Cognitive Sciences, The University of Hong Kong, Hong Kong 999077, China

[†] Equally contributed to this work

^{*} Corresponding author, E-mail: datwai@hku.hk

This article is to investigate the effect of wolfberry from different origins and extraction methods on mice primary brain glial cells and the antioxidant and anti-inflammatory effects of different *Lycium barbarum* extract on brain glial cells under oxidative stress.

Primary mice brain glial cells were collected from the cerebral cortex of the newborn C57BL/6J mice and cultured for 10 to 14 d. After pre-treating *Lycium barbarum* extracts (LBE) with different origins and extraction methods for 2 h, 400 $\mu\text{mol/L}$ hydrogen peroxide (H_2O_2) was treated to the primary mixed glial cells to establish an *in vitro* oxidative stress model. 4 kinds of LBEs at the dose of 500 $\mu\text{g/mL}$ were treated to the cells for 6 and 24 h. After 6 h of intervention with LBEs, gene expression levels of anti-oxidative and inflammatory-related genes were detected in primary brain glial cells using quantitative PCR. After 24 h of LBEs intervention, the levels of lactate dehydrogenase (LDH) in the cell supernatant were detected using LDH assay kit, while the protein expression levels of PRDX5, SOD1, and SOD2 of each group were detected using Western blot assay.

The results showed that, compared to the control group, the LDH release levels of mixed glial cells treated with 100 to 2000 $\mu\text{g/mL}$ Ningxia LBE (NX), Xinjiang LBE (XJ), and *Lycium barbarum* polysaccharide-glycoprotein (LBP) did not increase significantly whereas the LDH level of cells treated with Qinghai LBE (QH) was significantly increased at the dose of 100 $\mu\text{g/mL}$. Under the challenge of H_2O_2 , the cell viability of the LBP+ H_2O_2 group was significantly higher compared to the H_2O_2 group, whereas there was no statistical difference in cell viability between the H_2O_2 group and the other 3 LBE+ H_2O_2 groups. Compared to the H_2O_2 group, the Nrf-2 gene expression level of NX+ H_2O_2 group and XJ+ H_2O_2 group was significantly increased. The gene expression level of SOD1 of the LBP+ H_2O_2 group was significantly increased. Also, the PRDX5 gene expression levels of NX+ H_2O_2 , QH+ H_2O_2 , and LBP+ H_2O_2 groups were significantly increased. The expression level of SOD2 protein in the LBP+ H_2O_2 group was significantly increased. Gene expressions of inflammatory-related factors were significantly increased in NX+ H_2O_2 , QH+ H_2O_2 , and LBP+ H_2O_2 treatment groups.

The results indicate that 4 kinds of *Lycium barbarum* extracts show anti-oxidative and anti-inflammatory capacity under oxidative stress. LBP and Ningxia LBE, which are both originated from Ningxia, have better antioxidant effects among these 4 kinds of LBEs. However, at the same time, LBP and Ningxia LBE may activate the cellular immune response. Although Xinjiang LBE has a relatively weaker antioxidant capacity than Ningxia-derived *Lycium barbarum* extract, it has a milder effect without alerting the cellular immune response. This study compared the bioactivity of *Lycium barbarum* extracts with different origins and extraction methods. It may provide a fast *in vitro* evaluation way for the biosafety and the bio-effectiveness of traditional Chinese medicine.

***Lycium barbarum*, mouse primary brain glial cells, antioxidant, inflammation**

doi: [10.1360/TB-2020-1323](https://doi.org/10.1360/TB-2020-1323)