

人参皂苷 Rb1 抗小鼠脑自然衰老及其对 mTOR/p70S6K 通路的影响

彭沛¹, 宋志明¹, 刘勇¹, 郝宝顺¹, 余舒杰¹, 周彬¹, 刘定辉¹, 牛海名¹, 熊肇军¹,
朱洁明¹, 吴伟康², 钱孝贤^{1, 2*}

(中山大学 1.附属第三医院心血管内科; 2.中西医结合研究所, 广东 广州 510630)

摘要:【目的】观察人参皂苷 Rb1 对小鼠脑组织自然衰老的作用,并探讨 mTOR/p70S6K 通路在其中的作用。【方法】27 只 C57/B6 雌性小鼠购于中山大学实验动物中心,其中 7 只 3 月龄 C57/B6 雌性小鼠为青年组,20 只 22 月龄 C57/B6 雌性小鼠为老年组,青年组小鼠予生理盐水(PBS)腹腔注射,老年组小鼠分别予 PBS(对照)、低剂量 Rb1(10 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、高剂量 Rb1(20 mg·kg⁻¹·d⁻¹)腹腔注射。6 周后处死小鼠,取脑组织匀浆,检测丙二醛(MDA)含量、单胺氧化酶(MAO)活性,western blot 技术检测血浆纤溶酶原激活物抑制剂-1(PAI-1)、p-mTOR/mTOR、p-p70S6K/p70S6K 蛋白表达情况。【结果】与青年小鼠比较,老年对照组小鼠脑组织中的 MDA 含量增多,MAO 活性增加,PAI-1 蛋白表达增多,mTOR 蛋白、p70S6K 蛋白磷酸化水平增加。与老年对照组比较,注射 Rb1 的两组小鼠脑组织 MAO 活性,mTOR 蛋白、p70S6K 蛋白磷酸化水平均降低;此外,高剂量 Rb1 组 MDA 含量、PAI-1 蛋白的表达降低。【结论】高剂量(20 mg·kg⁻¹·d⁻¹)人参皂苷 Rb1 可以减轻小鼠脑自然衰老;人参皂苷 Rb1 的这一抗衰老作用可能与 mTOR/p70S6K 通路密切相关。

关键词: 人参皂苷 Rb1; 自然衰老; 小鼠; 脑组织; mTOR/p70S6K

中图分类号: R339.3+8

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2015)02-0176-05

Effect of Ginsenoside Rb1 on the Brain Aging of Mouse and mTOR/p70S6K Pathway

PENG Pei¹, SONG Zhi-ming¹, LIU Yong¹, HAO Bao-shun¹, YU Shu-jie¹, ZHOU Bin¹, LIU Ding-hui¹,
NIU Hai-ming¹, XIONG Zhao-jun¹, ZHU Jie-ming¹, WU Wei-kang², QIAN Xiao-xian^{1,2}

(1.Department of Cardiology, The Third Affiliated Hospital, 2.Institute for Integrated Traditional Chinese and Western Medicine,
Sun Yat-sun University, Guangzhou 510630, China)

Corresponding to: QIAN Xiao-xian, E-mail: xiaoxianq@tom.com

Abstract: 【Objective】To observe the effect of Ginsenoside Rb1 on the brain aging of mouse, as well as to explore the role of mTOR/p70S6K pathway. 【Methods】Twenty-seven mice were obtained from the Animal Experiment Center of Sun Yat-sun University. Four-month-old mice were termed as the young group ($n = 7$), and 22-month-old mice as the old groups ($n = 20$). PBS was administered intraperitoneally to the young group, and old groups were injected intraperitoneally with PBS (old controls), low dose Rb1 (10 mg·kg⁻¹·d⁻¹) and high dose Rb1 (20 mg·kg⁻¹·d⁻¹), respectively. The mice were sacrificed 6 weeks after intraperitoneal administration. Mice brain tissues were obtained to examine the malondialdehyde (MDA) level, monoamine oxidase (MAO) activity and the protein expression of Plasminogen activator inhibitor 1(PAI-1), p-mTOR/mTOR (Mammalian Target Of Rapamycin) and p-p70S6K/p70S6K. 【Results】In the brain tissues of old controls, MDA level, MAO activity, expression of PAI-1 protein, phosphorylation level of mTOR and its target p70S6K protein increased significantly, compared with young group. However, the MAO activity, mTOR phosphorylation and p70S6K phosphorylation level were decreased in the brain tissue of both Rb1 group mice; Furthermore, the MDA level and PAI-1 expression level of high-dose-group mice brain decreased significantly compared with old controls. 【Conclusions】High-dose (20 mg·kg⁻¹·d⁻¹) Ginsenoside Rb1 had the effect to prevent mice brain natural aging-related changes. The anti-aging effect of Ginsenoside Rb1 may be highly associated with mTOR/p70S6K pathway.

Key words: ginsenoside Rb1; natural aging; mouse; brain tissue; mTOR/p70S6K

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2015, 36(2): 176-180]

收稿日期: 2014-12-02

基金项目:国家自然科学基金(81370447);广东省自然科学基金(S2012020010924);广东省科技计划项目(2011B031800024);广州市科技计划项目 2011J4100107)

作者简介:彭沛,硕士研究生,研究方向:动脉粥样硬化的防治,E-mail: 78266613@qq.com; * 通信作者:钱孝贤,教授,博士生导师,研究方向:动脉粥样硬化和心肌缺血的防治研究,E-mail: xiaoxianq@tom.com

随着生活水平的提高,衰老成为许多疾病的主要危险因素,如心血管疾病、癌症、神经退行性疾病等,严重危害健康,影响生活质量,所以,研究衰老相关机制,对防治衰老相关疾病至关重要^[1]。现代医学研究发现人参对中枢神经系统、心血管系统、消化系统、免疫系统、内分泌系统、泌尿生殖系统有广泛的作用,从而可提高人体力、智力的活动能力,增强机体对有害刺激的非特异性抵抗力;人参皂苷 Rb1 来源于五加科植物人参、三七、西洋参等植物中,已有研究证明其有抗衰老作用^[2]。mTOR (mammalian Target of Rapamycin, mTOR) 进化上十分保守,它与衰老密切相关^[3];在自然衰老的动物模型中, mTOR /p70S6K 通路磷酸化水平升高,一些抗衰老干预手段,如饮食限制(Dietary restriction, DR)可以逆转这一变化^[4]。本课题组已经证明人参皂苷 Rb1 通过抗氧化应激、调节 eNOS 通路等机制对抗脐静脉内皮细胞的衰老^[5-6],但是人参皂苷 Rb1 对自然衰老的小鼠脑组织的作用及其与 mTOR/p70S6K 通路的关系尚不清楚。本研究通过建立自然衰老的小鼠模型,观察人参皂苷 Rb1 对小鼠脑组织衰老的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6 小鼠,雌性,青年鼠 4 月龄,老年鼠 22 月龄,购自中山大学实验动物中心。

1.2 主要试剂

Rb1 购自四川维克奇生物,预染蛋白条带标志购自 Fermentas,抗血浆纤溶酶原激活物抑制剂-1(plasminogen activator inhibitor 1, PAI-1)抗体购自 Santa Cruz,抗 GAPDH 内参抗体购自 Proteintech,抗 p-mTOR 抗体、抗 mTOR 抗体、抗 p-p70S6K 抗体及抗 p70S6K 抗体购自 Cell Signaling Technology,小鼠及兔 II 抗购自武汉博士德,丙二醛(MDA)、单胺氧化酶(MAO)试剂盒购自南京建成,全蛋白提取试剂盒和蛋白定量试剂盒(BCA 法)购自南京凯基。

1.3 小鼠分组及给药情况

7 只 4 月龄小鼠为青年组,20 只 22 月龄小鼠随机分为 3 组,即老年对照组 6 只、低剂量人参皂苷 Rb1 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 给药组(以下简称低剂量组)8 只、高剂量人参皂苷 Rb1 ($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 给

药组(以下简称高剂量组)6 只。青年组及老年对照组予等体积 PBS,所有小鼠连续腹腔注射 6 周。

1.4 组织匀浆制备

腹腔注射 6 周后,处死小鼠,并取部分小鼠脑组织,使用玻璃匀浆器制成 10%组织匀浆生理盐水混悬液,用作 MDA 及 MAO 的测定。

1.5 脑组织中 MDA 的测定

采用 TBA 法测定 MAO 含量,操作过程严格按照说明书进行。

1.6 脑组织中 MAO 活性的测定

采用紫外比色法测定 MAO 含量,操作过程严格按照说明书进行。

1.7 免疫蛋白印迹

1.7.1 蛋白提取 取部分小鼠脑组织,加入 $1 \text{ mL}/100 \text{ mg}$ 蛋白裂解液,使用玻璃匀浆器匀浆(低温操作),将匀浆液转入 1.5 mL 预冷的离心管中,离心 $14\,000 \times g$, 4°C 离心 5 min ;小心吸取上清,分装保存于 -80°C 。

1.7.2 Western blotting 脑组织中 PAI-1, p-mTOR/mTOR, p-p70S6K/p70S6K 等蛋白的测定采用 western blotting 技术。经 BCA 方法定量后,总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,然后转移到 PVDF 膜上。用 5%脱脂奶粉室温封闭 1 h 后,加入相应抗体, 4°C 摇床过夜孵育;弃去 I 抗, $1 \times \text{TBST}$ 洗 3 次,每次 5 min ,加入小鼠或兔 II 抗,室温孵育 1 h 后, TBST 洗 3 次后 ECL 显影,最后放入 Fluor Chem M 成像系统中完成显影,并分析蛋白条带。

1.8 统计学处理

通过 SPSS13.0 统计软件进行分析,定量资料用均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示。4 组小鼠各指标均数的比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

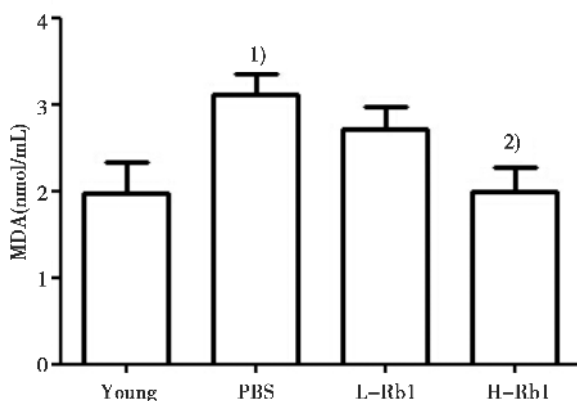
2 结 果

2.1 人参皂苷 Rb1 对小鼠脑组织 MDA 的作用

四组小鼠 MDA 平均含量之间的差别有统计学意义($P = 0.034$)。进一步两两比较,与青年小鼠比较,老年对照组小鼠脑组织中的 MDA 含量明显增加($P = 0.014$),而高剂量 Rb1 组 MDA 含量明显减少($P = 0.02$,图 1)。

2.2 人参皂苷 Rb1 对小鼠脑组织 MAO 的作用

四组小鼠 MAO 平均含量之间的差别有统计

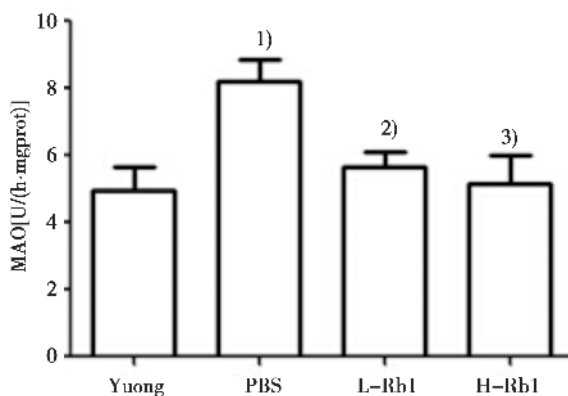


Mean $\pm$ SD. $n \geq 5$. $F = 3.465$. 1) $P < 0.05$ vs Young group; 2) $P < 0.05$ vs PBS group. Young: young group; PBS: old control; L-Rb1: low-dose-Rb1 group; H-Rb1: high-dose-Rb1 group.

图 1 人参皂苷 Rb1 对小鼠脑组织 MDA 的作用

Fig.1 The effect of Rb1 on MDA production in mice brain tissue

学意义($P = 0.017$)。进一步两两比较,与青年小鼠比较,老年对照组小鼠脑组织中的 MAO 活性明显升高($P = 0.005$),而注射 Rb1 的两组 MAO 活性均降低(H-Rb1 vs. PBS: $P = 0.007$; L-Rb1 vs. PBS: $P = 0.02$;图 2)。



Mean $\pm$ SD. $n \geq 4$. $F = 5.041$. 1) $P < 0.01$ vs. Young group; 2) $P < 0.05$ vs PBS group; 3) $P < 0.01$ vs. PBS group. Young: young group; PBS: old control; L-Rb1: low-dose-Rb1 group; H-Rb1: high-dose-Rb1 group.

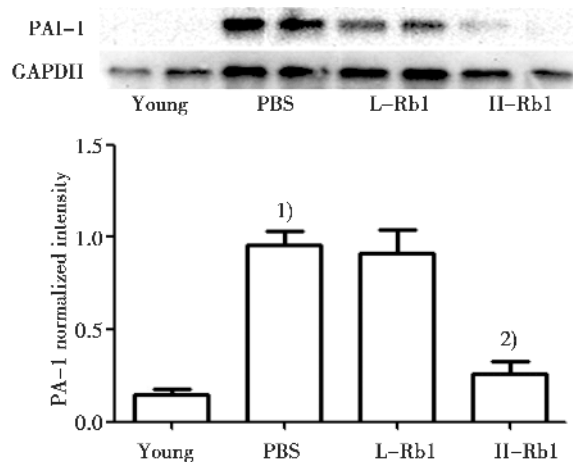
图 2 人参皂苷 Rb1 对小鼠脑组织 MAO 的作用

Fig.2 The effect of Rb1 on MAO production in mice brain tissue

2.3 人参皂苷 Rb1 对小鼠脑组织 PAI-1 蛋白表达的影响

四组小鼠 PAI-1 平均灰度值之间的差别有统

计学意义($P < 0.001$)。进一步两两比较,老年对照组小鼠脑组织中 PAI-1 蛋白表达较青年小鼠明显增多(PBS vs. Young: $P < 0.001$),高剂量 Rb1 组 PAI-1 蛋白的表达明显减少($P < 0.001$;图 3)。



Mean $\pm$ SD. $n \geq 6$. $F = 22.643$. 1) $P < 0.001$ vs Young group; 2) $P < 0.001$ vs PBS group. Young: young group; PBS: old control; L-Rb1: low-dose-Rb1 group; H-Rb1: high-dose-Rb1 group.

图 3 人参皂苷 Rb1 对小鼠脑组织 PAI-1 蛋白表达的影响

Fig.3 The effect of Rb1 on PAI-1 protein expression mice brain tissue

2.4 人参皂苷 Rb1 对小鼠脑组织 mTOR 磷酸化水平的影响

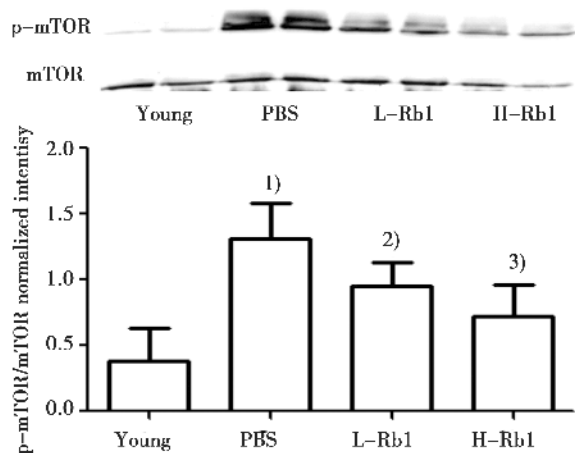
四组小鼠 p-mTOR/mTOR 平均灰度值之间的差别有统计学意义($P < 0.001$)。进一步两两比较,与青年鼠比较,老年对照组小鼠脑组织 mTOR 蛋白磷酸化水平增加($P < 0.001$),注射 Rb1 的两组均逆转了这一变化(L-Rb1 vs. PBS: $P = 0.011$, H-Rb1 vs. PBS: $P < 0.001$;图 4)。

2.5 人参皂苷 Rb1 对小鼠脑组织 p70S6K 磷酸化水平的影响

四组小鼠 p-p70s6k/p70s6k 平均灰度值之间的差别有统计学意义($P = 0.004$)。进一步两两比较,老年对照组小鼠脑组织 p70S6K 蛋白磷酸化水平较青年小鼠增加($P = 0.001$),低剂量组与高剂量组的 p70S6K 蛋白磷酸化水平下降均有统计学意义(L-Rb1 vs. PBS: $P = 0.025$, H-Rb1 vs. PBS: $P = 0.002$;图 5)。

3 讨论

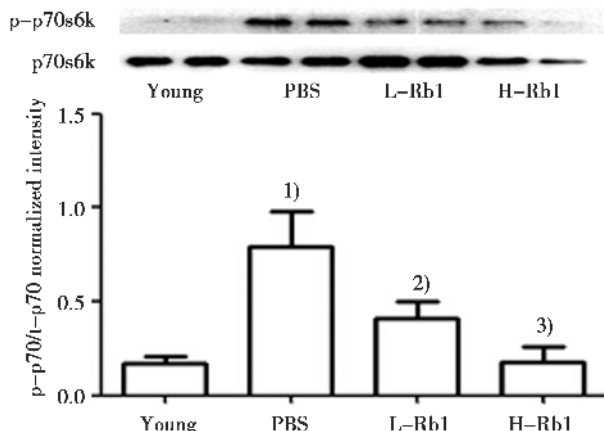
自然衰老,是指机体随着年龄的增长而自然



Mean $\pm$ SD. $n \geq 6$. $F = 18.359.1$) $P < 0.001$ vs Young group; 2) $P < 0.05$ vs. PBS group; 3) $P < 0.001$ vs. PBS group. Young: young group; PBS: old control; L-Rb1: low-dose-Rb1 group; H-Rb1: high-dose-Rb1 group.

图4 人参皂苷 Rb1 对小鼠脑组织 mTOR 磷酸化水平的影响

Fig.4 The effect of Rb1 on p-mTOR and total mTOR protein expression in mice brain tissue



Mean $\pm$ SD. $n \geq 6$. $F = 5.898.1$) $P < 0.01$ vs Young group; 2) $P < 0.05$ vs PBS group; 3) $P < 0.01$ vs. PBS group. Young: young group; PBS: old control; L-Rb1: low-dose-Rb1 group; H-Rb1: high-dose-Rb1 group.

图5 人参皂苷 Rb1 对小鼠脑组织 p70S6K 磷酸化水平的影响

Fig.5 The effect of Rb1 on p-mTOR and total mTOR protein expression in mice brain tissue

发生的组织结构、生理功能和心理行为上的退行性变。自然衰老的机体由于各个器官脏器发生退行性改变,导致功能异常,甚至引起疾病^[1]。我国

老年人口逐年增多,年龄相关疾病发生率也随之增加,严重影响着人们的生活,这就迫切需要对衰老进行研究,寻求解决办法。人参皂苷是人参的主要有效成分,现已知人参皂苷单体有 40 余种,Rb1 为其中最重要成分之一^[7-9];已有研究证明 Rb1 通过多种机制改善衰老^[10],但与其 mTOR/p70S6K 通路的关系在此之前未见报道。

在衰老进程中,氧化应激是普遍认为的重要环节。在生物体内,氧自由基作用于脂质发生过氧化反应,产生氧化终产物丙二醛 (MDA),因此 MDA 可以反映氧自由基的作用^[11]。

MAO 是位于线粒体外膜上的蛋白,在脑组织中的神经细胞及非神经细胞均有表达,且在丘脑、纹状体、皮质及脑干中含量最高。这是脑组织中与生物胺(如儿茶酚胺)降解有关的主要酶,它将内源性及外源性的胺类氧化,从而影响胺类神经递质的浓度。MAO 分为两种亚型,即 MAO-A 及 MAO-B。其中 MAO-B 水平随着年龄的增加而增加。如今普遍认为,MAO-B 活性增高两到三倍可能导致脑组织中的细胞退行性变,这与其氧化胺类时产生过氧化氢这一副产物有关;所以,脑组织中年龄相关的 MAO-B 活性增加在自然衰老及年龄相关的神经系统疾病(特别是帕金森氏病)中扮演着非常重要的角色。MAO 也因此成为治疗相关疾病药物的重要靶目标分子^[12]。

PAI-1 在衰老细胞及小鼠衰老模型中表达增多,血浆中的 PAI-1 蛋白水平随着年龄的增加而增高,阿尔兹海默病患者脑脊液中 PAI-1 蛋白含量增多,APP 转基因小鼠的 PAI-1 mRNA 水平增高^[13]。

基于以上证据,MDA 水平、MAO 活性、PAI-1 蛋白及 mRNA 水平可以反映脑组织的衰老。本研究证实了自然衰老的小鼠脑组织中 MDA 含量增加,MAO 活性明显升高,PAI-1 蛋白明显增多,表明模型成功;进一步利用自然衰老小鼠模型研究了人参皂苷 Rb1 的抗衰老作用,证实了人参皂苷 Rb1 可以逆转衰老带来的以上变化;提示人参皂苷 Rb1 可改善小鼠大脑的自然衰老。

雷帕霉素靶蛋白(TOR)进化上十分保守,从酵母菌、果蝇、哺乳动物,到人均有表达;mTOR 为哺乳动物雷帕霉素靶蛋白,是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,磷脂酰肌醇-3-OH 激酶(PI(3)K)家族中的一员,其感受营养及激素水平的变化,并相

应地对细胞做出调控。p70S6K 是 mTOR 下游的一个靶点, mTOR 通过磷酸化作用激活 p70S6K, 进而调控细胞的形态大小、转录、蛋白与脂质合成以及细胞代谢等^[3]。mTOR 通路持续激活将导致氧化应激和炎症反应, 引起衰老^[14]。

本研究发现, 老年对照组 mTOR 蛋白磷酸化水平显著增加, 注射 Rb1 的两组均逆转了这一变化, 证实了 mTOR/p70S6K 通路在小鼠脑组织自然衰老中的重要作用。我们初步探讨了人参皂苷 Rb1 与 mTOR/p70S6K 通路的关系, 结果发现老年对照组 p70S6K 蛋白磷酸化水平较青年小鼠显著增加, 低剂量组与高剂量组的 p70S6K 蛋白磷酸化水平下降均有统计学意义。结果提示人参皂苷 Rb1 的抗衰老作用可能部分或全部通过 mTOR/p70S6K 通路实现。

综上所述, 本研究通过小鼠自然衰老模型, 发现高剂量($20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)人参皂苷 Rb1 能降低脑组织 MDA 水平, 减弱 MAO 活性, 抑制 PAI-1 蛋白表达, 且这一抗衰老作用可能与 mTOR/p70S6K 通路密切相关。

参考文献

- [1] Niccoli T, Partridge L. Ageing as a risk factor for disease [J]. *Curr Biol*, 2012, 22(17): R741-R752.
- [2] 贾继明, 王宗权, 吴立军, 等. 人参皂苷 Rb1 的药理活性研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(12): 1371-1377.
Jia JM, Wang ZQ, Wu LJ, et al. Advance of pharmacological study on ginsenoside Rb1 [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2008, 33(12): 1371-1377.
- [3] Johnson SC, Rabinovitch PS, Kaeberlein M. mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease [J]. *Nature*, 2013, 493(7432): 338-345.
- [4] Katewa SD, Kapahi P. Dietary restriction and aging[J]. *Aging Cell*, 2009, 9(2): 105-112.
- [5] Liu DH, Chen YM, Liu Y, et al. Rb1 protects endothelial cells from hydrogen peroxide-induced cell senescence by modulating redox status [J]. *Biol Pharm Bull*, 2012, 34(7): 1072-1077.
- [6] Liu DH, Chen YM, Liu Y, et al. Ginsenoside rb1 reverses h2o2-induced senescence in human umbilical endothelial cells: involvement of eNOS pathway [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2012, 59(3): 222-230.
- [7] Cai BX, Jin SL, Luo D, et al. Ginsenoside Rb1 suppresses ultraviolet radiation-induced apoptosis by inducing DNA repair [J]. *Biol Pharm Bull*, 2009, 32(5): 837-841.
- [8] Cheng Y, Shen LH, Zhang JT. Anti-amnestic and anti-aging effects of ginsenoside Rg1 and Rb1 and its mechanism of action [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2005, 26(2): 143-149.
- [9] 江沛, 孙培吾, 麦惠成. 人参皂苷 Rb1 和 Rg1 对模拟移植肺的保护作用[J]. *中山医科大学学报*, 1997, 18(2): 85-88.
Jiang P, Sun PW, Mai HC. Protective effects of Ginsenoside Rb1 and Rg1 on transplanted lung of simulation [J]. *Acad J SUMS*, 1997, 18(2): 85-88.
- [10] 雷秀娟, 冯凯, 孙立伟, 等. 人参皂苷抗衰老机制的研究进展[J]. *氨基酸和生物资源*, 2010, 32(1): 44-47.
Lei XJ, Feng K, Sun LW, et al. Progress in Studying Anti-Aging Mechanism of Ginsenoside [J]. *Amino Acids & Biotic Resources*, 2010, 32(1): 44-47.
- [11] Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes [J]. *Free Radic Biol Med*, 1991, 11(1): 81-128.
- [12] Kumar MJ, Andersen JK. Perspectives on MAO-B in aging and neurological disease where do we go from here [J]. *Mol Neurobiol*, 2004, 30(1): 77-89.
- [13] Liu RM, van Groen T, Katre A, et al. Knockout of plasminogen activator inhibitor 1 gene reduces amyloid beta peptide burden in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Neurobiol Aging*, 2011, 32(6): 1079-1089.
- [14] Yang Z, Ming XF. mTOR signalling: the molecular interface connecting metabolic stress, aging and cardiovascular diseases [J]. *Obesity Rev*, 2012, 13(Suppl 2): 58-68.

(编辑 孙慧兰)