基础研究 文章编号:0253-3626(2011)04-0419-04

人参皂苷 Rg1 延缓 D- 半乳糖大鼠脑衰老作用及机制的初步研究

彭 彬[1],陈茂山[1],蒲 莹[1],王亚平[2]

(1. 川北医学院组织学与胚胎学教研室,南充 637007; 2. 重庆医科大学干细胞与组织工程研究室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨人参皂苷 Rg1 延缓 D-半乳糖所致大鼠脑衰老后的学习记忆能力、SOD 活性、MDA 含量及衰老相关基因 $P16^{INK4a}$、$P21^{Waf1}$ mRNA 及蛋白的表达水平。方法:将 15 只 3 月龄 SD 大鼠随机分为对照组、脑衰老组[120 mg/(kg·d)D-半乳糖颈背部皮下注射 6 周]、Rg1 抗脑衰老组[同衰老模型组处理,并于第 3 周起腹腔注射人参皂苷 Rg1 20 mg/(kg·d)共注射 4 周]。Morris 水迷宫评估各组大鼠的空间学习记忆能力;比色法测定脑皮质内的 SOD 活性及 MDA 含量;实时荧光定量RT-PCR 检测海马组织内 $P16^{INK4a}$、$P21^{Cip1/Waf1}$ mRNA 的表达水平;Western blot 检测衰老相关基因 $P16^{INK4a}$、$P21^{Cip1/Waf1}$ 蛋白的表达。结果:与脑衰老组相比,Rg1 抗脑衰老组大鼠学习记忆能力显著提高,脑组织内 SOD 活性显著升高,MDA 含量显著降低,$P16^{INK4a}$、$P21^{Cip1/Waf1}$ mRNA及蛋白的表达水平也显著降低。结论:Rg1 具有延缓 D-半乳糖大鼠脑衰老的作用。其机制可能与增强脑组织的抗氧化能力,下调脑组织内 $P16^{INK4a}$、$P21^{Waf1}$ mRNA 及蛋白的表达水平有关。

【关键词】大鼠;人参皂苷 Rg1;脑衰老;D-半乳糖

【中国图书分类法分类号】R282.71 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-09-14

Anti- aging effects of Ginsenoside Rg1 and it's mechanisms on brain aging rats induced by D-galactose

PENG Bin, et al

(*Department of Histology and Embryology, North Sichuan Medical College*)

【Abstract】*Objective*: To explore the effects of Ginsenoside Rg1 on the spatial learning and memory capacity, the activities of SOD, the amounts of MDA, the expression of $P16^{INK4a}$ and $P21^{Cip1/Waf1}$ mRNA and protein in brain aging rats induced by D-galactose. *Methods*: 15 normal adult SD rats were randomly divided into control group, brain aging model group and Rg1 anti-brain aging group. In the brain aging model group and the Rg1 anti-brian aging group, D-galactose(120 mg/(kg·d)) was given to rats for 6 weeks by subcutaneous injection. Ginsenoside Rg1(20 mg/(kg·d)) was also given to rats by intra-peritoneal injection for 4 weeks after 2 weeks in the Rg1 anti-aging group, and saline was given to the control group by subcutaneous and intra-peritoneal injection or to the aging group by intra-peritoneal injection. Learning and memory abilities were measured by a Morris water maze test 42 days after modeling. The activities of SOD and the amounts of MDA in brain were quantified by chromatometry. The changes in the expressions of $P16^{INK4a}$ and $P21^{Cip1/Waf1}$ mRNA or protein in brain were determined by real time quantitative RT-PCR and Western blot. *Results*: Compared with the brain aging group, the spatial learning and memory capacities were significantly enhanced; the SOD activities were significantly increased while the MDA level was significantly reduced and the expressions of the $P16^{INK4a}$ or $P21^{Cip1/Waf1}$ mRNA and protein in brain were reduced in the Rg1 anti-brian aging group. *Conclusion*: Improvement of the antioxidation ability, downregulation of the expressions of aging-associated $P16^{INK4a}$ and $P21^{Cip1/Waf1}$ mRNA and protein in brain may be the underlying anti-aging mechanism of Ginsenoside Rg1.

【Key words】rats; ginsenoside Rg1; brain aging; D-galactose

人参(Panax ginseng)是我国传统的名贵中药,素有“百草药王”的美称,人参皂苷 Rg1 是人参中的主要药物活性成分之一。现代研究认为:人参具有抗疲劳、抗衰老、抗癌、增强记忆力、提高免疫力等作用[1,2],但作用机理与相关成分不清楚。当今世界和我国人口已进入老龄化社会,脑衰老伴随的生理功能和行为能力改变严重影响了老年人群的生活质量。探讨延缓脑衰老的机理,寻找有效的抗衰老药物已成为医学生物学领域的研究热点之一。本研究采用 D- 半乳糖大剂量连续注射制备大鼠脑衰老模型,探讨 Rg1 对衰老大鼠学习记忆能力、脑组织内 SOD、MDA 水平及衰老相关基因 $P16^{INK4a}$、$P21^{Cip1/Waf1}$ mRNA 及蛋白表达水平的影响,旨在为阐述脑衰老

作者介绍:彭 彬(1972-),女,副教授,博士,
研究方向:神经干细胞衰老生物学。

通信作者:王亚平,男,教授,Email:ypwangcq@yahoo.cn。

机理和探讨 Rg1 抗脑衰老的可能机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

人参皂苷 Rg1（宏久生物科技股份有限公司，纯度 98%），D-半乳糖（Amersco 公司），SOD 活性检测试剂盒，MDA 浓度比色法定量检测试剂盒（美国 Genmed 公司），DC 蛋白定量试剂盒（美国 Bio-Rad 公司），TRIZOL 试剂（美国 Invitrogen 公司），RT 试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒（美国 MBI 公司），BM2000marker（Biomed 公司），PCR 引物由上海生工公司合成，兔抗鼠 $P16^{INK4a}$、$P21^{Cip1/Waf1}$ 一抗，羊抗兔二抗（Santa Cruz 公司），细胞核蛋白/浆蛋白抽提试剂盒（北京博迈德公司），ECL 发光试剂盒（Pierce 公司）。SLY-WMS 型 Morris 水迷宫（北京硕林苑科技有限公司），酶标仪（Model 550），荧光定量 PCR 仪（ABI7900）。

1.2 实验动物分组、模型制备及给药

3 月龄清洁级雄性 SD 大鼠 15 只，体重 212~253 g，由成都中医药大学实验动物中心提供。随机将大鼠分为空白对照组、脑衰老模型组和人参皂苷 Rg1 抗脑衰老组，每组 5 只。脑衰老模型组和人参皂苷 Rg1 抗脑衰老组每日颈背部皮下注射 D- 半乳糖 120 mg/kg，连续注射 42 d[3,4]；空白对照组颈背部皮下注射等量等时的生理盐水。人参皂苷 Rg1 抗脑衰老组，从模型复制的第 15 天起每日腹腔注射 20 mg/kg，连续注射 28 d。空白对照组和脑衰老模型组腹腔注射等量生理盐水 28 d。室温维持在 20℃~25℃，自然照明，自由饮水和摄食。

1.3 Morris 水迷宫测试

采用 SLY-WMS 型电脑自动程控 Morris 水迷宫检测各组大鼠的空间学习记忆能力[5]。首先进行 7 d 的定位航行训练，大鼠轮流从 4 个象限的固定入水点入水，记录从入水至爬上平台的时间。在第 8 天移除平台，进行空间探索试验，记录大鼠从某一固定入水点（随机选择）入水，记录从入水至第 1 次跨越原平台位置的时间（逃避潜伏期）以及 120 s 内在原平台所在象限逗留时间百分比及跨越原平台位置次数。

1.4 SOD、MDA 的检测

所有动物在 Morris 水迷宫测试后的第 2 天被断头处死，夹取大脑皮层组织制备组织匀浆。用 Bradford 方法测定组织蛋白质含量，按照试剂盒说明书的步骤采用比色法进行SOD、MDA 含量测定。

1.5 荧光定量 RT-PCR 检测 $P16^{INK4a}$、$P21^{Cip1/Waf1}$mRNA 表达水平

1.5.1 总 RNA 制备及 cDNA 的合成 所有动物断头处死后，在冰上迅速分离出 1 侧（左侧或右侧，随机选择）海马组织，加入 1 ml Trizol，分别提取各组动物海马组织总 RNA。紫外分光光度计测定总 RNA 的 OD_{260}/OD_{280} 值，取适量 RNA 用 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性。按 RT-PCR 试剂盒操作步骤将总 RNA 反转录为相应的 cDNA，逆转录反应条件：42℃孵育 40 min，99℃孵育 5 min 后终止反应，冰上冷却。合成的 cDNA 置于 -70℃保存备用。

1.5.2 PCR 反应 引物的设计、合成均由上海生工公司合成（表 1），取上述逆转录产物进行荧光定量 PCR，反应使用 96 孔板，以 1 个孔中加入双蒸水替代逆转录得到的模板 cDNA 为阴性对照，用内参基因 β-actin 对 RNA 含量的变异进行校正。反应体系为：上、下游引物各 0.25 μl，模板 cDNA 2 μl，MaximaTM SYBR Green qPCR Master Mix（2.5 ×）12.5 μl，DDW 10 μl，共 25 μl，稍离心混匀，反应步骤如下：循环参数为：94℃预变性 5 min，94℃变性 15 s，60℃ 60 s，延伸（采集荧光）1 min，共 40 个循环，最后制备融解曲线。将所扩增的产物进行琼脂糖凝胶电泳分析。

1.6 Western blot 检测 $P16^{INK4a}$、$P21^{Cip1/Waf1}$ 蛋白的表达

细胞核/浆蛋白抽提收集各组大鼠另一侧海马组织（约 70 mg）的总蛋白，BCA 法定量后经 SDS-PAGE，电转膜，免疫抗体反应，最后化学增强发光法显带，具体步骤按文献[6]操作。

1.7 统计学处理

所有的数据以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，运用 SPSS11.0 统计软件进行单因素方差分析，以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 人参皂苷 Rg1 对脑衰老大鼠学习记忆功能的影响

在空间探索试验中，与对照组相比，脑衰老模型组在 2 min 的测试时间内跨越原平台所在位置的次数和在原平台所在象限停留的时间均显著降低（$P<0.05$）；逃避潜伏期（首次穿越原平台所在位置的时间）显著增加（见表 2）。与脑衰老模型组比较，Rg1 抗脑衰老模型组在 2 min 的测试时间内跨越原平台所在位置的次数和在原平台所在象限停留的时间

表 1 PCR 反应引物序列

引物	正向	反向	产物大小（bp）
$p16^{INK4a}$	5' GGGAGGGCTTCCTAGACAC 3'	5' GCGCAGAGTTATGCCTGTC 3'	193
$p21^{Cip1/Waf1}$	5' GTGATGTCCGACCTGTTCC 3'	5' GCAAAGTTCCACCGTTCTC 3'	139
β-actin	5' GAGGGAAATCGTGCGTGAC 3'	5' CGTTGCCGATAGTGATGACC 3'	264

表 2 各组大鼠 Morris 水迷宫空间探索试验结果（$\bar{x} \pm s$，$n=5$）

组别	逃避潜伏期（s/2 min）	跨越原平台次数（次/2 min）	原平台象限停留时间百分比（%）
空白对照组	11.62 ± 4.27	5.17 ± 1.83	37.91 ± 7.74
脑衰老模型组	36.71 ± 17.01*	3.17 ± 1.94*	27.76 ± 3.24*
Rg1抗脑衰老组	9.04 ± 3.25**	5.00 ± 1.10**	40.32 ± 6.35**

注：*$P<0.05$ 与空白对照组比较；**$P<0.05$ 与脑衰老模型组比较

均显著增加（$P<0.05$）；逃避潜伏期（首次穿越原平台所在位置的时间）显著降低（$P<0.05$）（见表 2）。

2.2 人参皂苷 Rg1 对脑衰老大鼠脑皮质 SOD、MDA 的影响

与空白对照组比较，D- 半乳糖连续注射 6 周所致脑衰老模型组大鼠脑皮质内的 SOD 活性显著下降了 22.2%，而 MDA 含量则显著升高了 76.2%。与衰老模型组比较，Rg1 抗脑衰老组大鼠脑皮质内的 SOD 活性显著升高了 30.2%，而 MDA 的含量显著下降了 48.5%（见表 3）。

表 3 各组大鼠大脑皮质组织中 SOD、MDA 水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	SOD（U/mg）	MDA（nmol/mg）
空白对照组	247.72 ± 15.21	2.27 ± 0.17
脑衰老模型组	192.43 ± 23.42*	4.00 ± 0.45*
Rg1抗脑衰老模型组	250.50 ± 32.12**	2.06 ± 0.24**

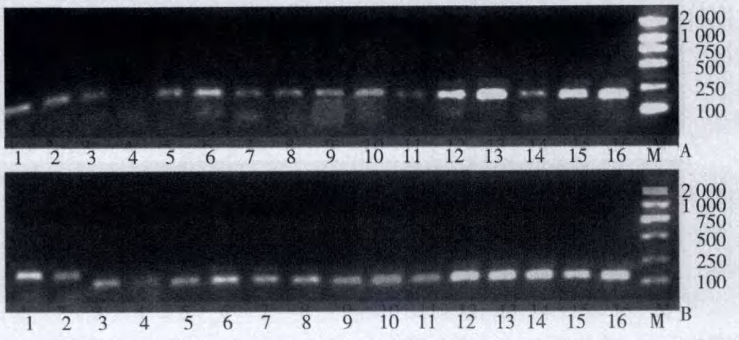
注：*$P<0.05$ 与空白对照组比较；**$P<0.05$ 与脑衰老模型组比较

2.3 人参皂苷 Rg1 对大鼠脑组织内 $P16^{INK4a}$、$P21^{Cip1/Waf1}$ mRNA 表达水平的影响

目的基因 $P16^{INK4a}$、$P21^{Cip1/Waf1}$ 与内参基因 β-actin 的扩增动力学曲线呈 S 型光滑扩增曲线，指数增长期明显；其融解曲线只有单峰值，反应具有很好的特异性（图略）。将所扩增的产物进行琼脂糖凝胶电泳显示所得的产物为目的条带，$P16^{INK4a}$、$P21^{Cip1/Waf1}$ 与在各组中均有表达（见图 1）。脑衰老模型组海马内 $P16^{INK4a}$、$P21^{Cip1/Waf1}$ mRNA 的表达水平高于对照组，分别是对照组的 2.81 倍、1.74 倍；Rg1 抗脑衰老组海马组织内 $P16^{INK4a}$、$P21^{Cip1/Waf1}$ 表达与对照组无明显差异（见表 4）。

2.4 $P16^{INK4a}$、$P21^{Cip1/Waf1}$ 蛋白的表达水平的变化

脑衰老组海马内的 $P16^{INK4a}$、$P21^{Cip1/Waf1}$ 蛋白表达水平显著高于对照组；Rg1 抗脑衰老组与对照组海马内的 $P16^{INK4a}$、$P21^{Cip1/Waf1}$ 蛋白表达水平无显著性差异；Rg1 延缓衰老组海马内的 $P16^{INK4a}$、$P21^{Cip1/Waf1}$ 蛋白表达水平显著低于衰老组（见图 2）。



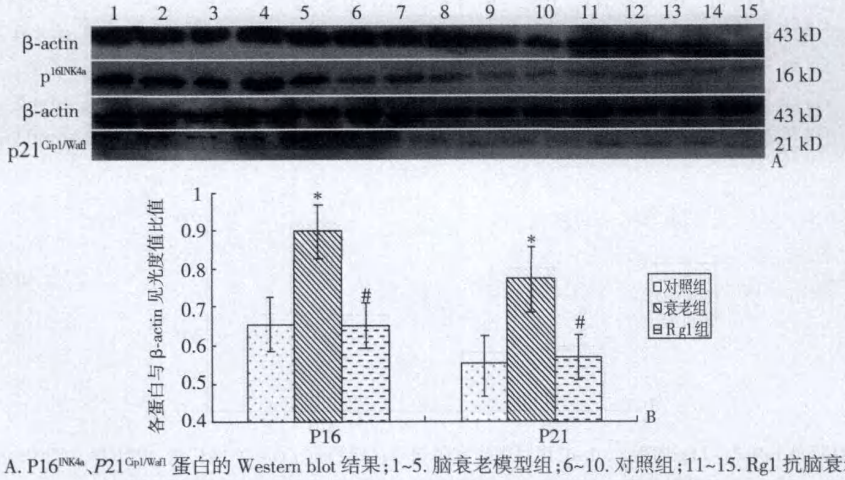
A. $P16^{INK4a}$；B. $P21^{Cip1/Waf1}$；M.Marker；1、2. β-actin；3~7. Rg1 抗脑衰老组；8~11. 对照组；12~16. 衰老模型组

图 1 Real time RT-PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳检测

表 4 各组大鼠 $P16^{INK4a}$、$P21^{Cip1/Waf1}$ mRNA 表达的差异（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	$P16^{INK4a}$ 平均 CT	$P21^{Cip1/Waf1}$ 平均 CT	b-actin 平均 CT	$P16^{INK4a}$ △CT	$P16^{INK4a}$ △△CT	$P16^{INK4a}$ $2^{-\triangle\triangle CT}$	$P21^{Cip1/Waf1}$ △CT	$P21^{Cip1/Waf1}$ △△CT	$P21^{Cip1/Waf1}$ $2^{-\triangle\triangle CT}$
空白对照组	31.21 ± 2.01	28.86 ± 1.01	25.59 ± 1.14	5.64 ± 0.32	-	-	3.23 ± 0.08	-	-
脑衰老模型组	29.33 ± 1.52	27.58 ± 2.11	25.17 ± 1.33	4.06 ± 0.28	−1.51 ± 0.09	2.81 ± 0.06*	2.41 ± 0.12	−0.81 ± 0.03	1.74 ± 0.06*
Rg1抗脑衰老模型组	30.83 ± 1.61	28.49 ± 1.45	25.11 ± 1.25	5.73 ± 0.31	0.07 ± 0.01	0.95 ± 0.02	3.39 ± 0.41	0.17 ± 0.01	0.89 ± 0.03

注：△CT =CT（目的基因）−CT（内参基因）；△△CT=△CT（实验组）−△CT（对照组）；$2^{-\triangle\triangle CT}$ 表示实验组目的基因的表达相对于对照组变化的倍数；*$P<0.05$，与对照组比较



A. $P16^{INK4a}$、$P21^{Cip1/Waf1}$ 蛋白的 Western blot 结果；1~5. 脑衰老模型组；6~10. 对照组；11~15. Rg1 抗脑衰老组；

B. $P16^{INK4a}$、$P21^{Cip1/Waf1}$ 蛋白相对表达水平分析；*与对照组相比 $P<0.05$，# 与衰老组相比 $P<0.05$

图 2 $P16^{INK4a}$、$P21^{Cip1/Waf1}$ 蛋白的表达

3 讨 论

人参应用于中医临床已有两千多年的历史，中国最早的药书《神农本草经》中就描述了人参的促智、抗衰老等药理功能[2,7]。随着现代科技的发展，人们已从人参植物中分离出了 40 多种人参皂苷单体。但是人参皂苷真正用于制作抗衰老药物的还很少，其作用机制尚不十分清楚，目前主要有自由基损伤学说、端粒丢失学说、基因调控学说等[8]，并有研究显示细胞周期蛋白依赖激酶抑制因子 $P16^{INK4a}$、$P21^{Cip1/Waf1}$ 等是细胞衰老的主要效应物[9]。因此，本研究从 Rg1 抗自由基损伤和调控衰老相关基因 $P16^{INK4a}$、$P21^{Cip1/Waf1}$ mRNA 及蛋白表达水平两方面的作用，对其延缓脑衰老的机制进行了研究。

本研究采用 D-半乳糖连续 42 d 注射建立大鼠脑衰老模型。D-半乳糖是机体的正常营养成分，当半乳糖过多时，可由半乳糖氧化酶催化生成醛糖和过氧化氢，产生超氧阴离子自由基。空间探索试验及脑组织内 SOD 的活性、MDA 的含量检测结果显示，长期低剂量注射 D-半乳糖引起了大鼠空间学习记忆能力降低、脑皮质细胞抗氧化能力下降等脑衰老表现。与脑衰老模型组比较，经人参皂苷 Rg1 处理的抗衰老组动物的空间学习记忆能力显著高于脑衰老组，脑组织内的 SOD活性显著升高，MDA 含量显著降低，说明 Rg1 人参皂苷 Rg1 可通过提高脑组织的 SOD 活性，增强对脑组织对自由基的清除能力。自由基损伤学说是目前公认的衰老学说之一。自由基可造成机体内的 DNA、蛋白质和脂类的损伤[10]，过量的氧自由基可引起神经元的损伤，造成动物学习记忆能力下降等类似于自然衰老的改变[4]。

细胞衰老最主要的特征是细胞在很长一段时间内仍维持代谢活性，但因阻滞于 G_1 期，失去了对有丝分裂原的反应和合成 DNA 的能力，不能进入分裂期[2]。$P16^{INK4a}$ 蛋白在正常生长细胞中表达水平较低，但在细胞多次复制接近衰老时其表达水平逐渐增高，2004 年有学者提出 $P16^{INK4a}$ 可作为测定细胞衰老的分子标记[11]。$P21^{Cip1}$ 则是细胞周期依赖激酶的非特异性抑制剂，具有抑制 Rb 磷酸化，阻遏 E2F 释放，使细胞周期停留 G_1/S 点不能进入 S 期的作用。已有大量研究表明，一旦收到来自 $P16^{INK4a}$、$P21^{Cip1}$ 途径的衰老信号后，$P16^{INK4a}$、$P21^{Cip1}$ 蛋白就成为控制衰老过程的中心环节，细胞则进入衰老程序，停止增殖并且发生一系列形态和功能上的变化[12-14]。

本研究结果显示，D-半乳糖诱导脑衰老组大鼠脑组织内的 $P16^{INK4a}$、$P21^{Cip1/Waf1}$ mRNA 和蛋白表达均高于对照组，这与上述细胞衰老过程中细胞周期调控基因及蛋白的变化一致。Rg1 抗脑衰老组大鼠脑组织内 $P16^{INK4a}$、$P21^{Cip1/Waf1}$mRNA 和蛋白的表达则均低于脑衰老组。这提示 Rg1 可通过下调 D-半乳糖脑衰老大鼠 $P16^{INK4a}$、$P21^{Cip1/Waf1}$mRNA 及蛋白的表达，阻止脑组织内的细胞进入衰老程序而发挥其延缓脑衰老的作用。

参 考 文 献

[1] Cheng Y, Shen L H, Zhang J T. Anti-amnestic and anti-aging effects of ginsenoside Rg1 and Rb1 and its mechanism of action[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2005, 26(2): 143-149.

[2] 崔 巍，赵洪艳，王燕嬉. 人参皂甙抗衰老的研究进展[J]. 中国老年学杂志，2006，26(17)：1578-1581.

[3] Shang Y Z, Gong M Y, Zhou X X, et al. Improving effects of SSF on memory deficits and pathological changes of neural and immunological systems in senescent mice[J]. Acta-Pharmacol-Sin, 2001, 22(12): 1078-1083.

[4] 秦红兵，杨朝晔，范忆江，等. D-半乳糖诱导衰老小鼠模型的建立与评价[J]. 中国组织工程研究与临床康复，2009，13(7)：1275-1278.

[5] 苏章杰，韩大东，张 涛，等. 中药回神颗粒对弥漫性轴索损伤大鼠学习记忆功能的影响[J]. 中华医学杂志，2008，88(42)：3003-3007.

[6] 萨姆布鲁克 E F，费里奇 T，曼尼阿蒂斯著. 见金冬雁，黎孟枫译. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京：科学出版社，1992.888-8971.

[7] Cheng Y, Shen L H, Zhang J T. Anti-amnestic and anti-aging effects of ginsenoside Rg1 and Rb1 and its mechanism of action[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2005, 26 (2): 143-149.

[8] 周文丽，张建鹏，冯伟华，等. 脑衰老机制与脑疾病的关系[J]. 生命的化学，2008，28(4)：435-438.

[9] 郑文婕，童坦君，张宗玉. 细胞衰老的重要通路：$p16^{INK4a}$/Rb 和 $p19^{ARF}$/p53/ $p21^{Cip1}$ 信号途径[J]. 生命的化学，2002，22(4)：314-316.

[10] Limoli C L, Kaplan M I, Giedzinski E, et al. Attenuation of radiation reduced genomic instability by free radical scavengers and cellular proliferation[J]. Free Radio boil Med, 2001, 31(1): 10-19.

[11] Janakiraman K, Chad T, Matthew R, et al. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging[J]. J Clin Invest, 2004, 114(9): 1299-1307.

[12] Guney I, Wu S, Sedivy J M. Reduced c-Myc signaling triggers telomere independent senescence by regulating Bmi 1 and p16(INK4a)[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(10): 3645-3650.

[13] Cammarano M S, Nekrasova T, Noel B, et al. Pak4 induces premature senescence via a pathway requiring $p16^{INK4}$/$P19^{ARF}$ and mitogen activated protein kinase signaling[J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(21): 9532-9542.

[14] Gong Y H, Yue J P, Wu X D, et al. NSPc1 is a cell growth regulator that acts as a transcriptional repressor of $p21^{Waf1/Cip1}$ via the RACE element [J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34(21): 6158-1669.

（责任编辑：冉明会）