

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.06.010

天冬总皂苷对衰老大鼠心脏 P16 基因表达的影响

李艳菊¹, 丁文², 刘洋³, 李琴山⁴

(1. 贵阳医学院附属医院血液科, 贵阳 550004; 2. 文登市整骨医院 CT 室, 文登 264400;

3. 北京工业大学生命科学与生物医学工程系, 北京 100022; 4. 北京协和医学院生化教研室, 北京 100730)

【摘要】目的:研究天冬总皂苷对衰老大鼠心脏的保护作用及其对 P16 基因表达的影响。方法:通过皮下注射 D-半乳糖建立衰老大鼠模型的同时,以天冬总皂苷灌胃进行治疗;采用硫代巴比妥酸法和黄嘌呤氧化法分别测定血清和心脏组织中丙二醛(Malondialdehyde, MDA)含量和超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)活性;采用光镜观察各组大鼠心脏形态学改变;应用 Real-time PCR 检测各组心脏组织 P16 mRNA 的表达。结果:天冬总皂苷给药组与模型组相比,血清与心脏中 SOD 活性均明显增高、MDA 含量显著降低($P<0.05$),并呈剂量依赖性;模型组心肌细胞嗜酸性染色增强,心肌细胞数量未见明显改变,但可见部分心肌细胞体积增大,心肌细胞间质内结缔组织增生,给药组能有效改善上述改变;与模型组相比,给药组能够使大鼠心脏组织内的 P16 mRNA 表达下降($P<0.05$)。结论:天冬总皂苷增加自由基清除酶活力、降低 P16 mRNA 的表达可能是其改善衰老大鼠心脏的机制之一。

【关键词】天冬;衰老;心脏;P16

【中国图书分类法分类号】R654.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-08-16

Effect of total saponins of *Asparagus racemosus* on expression of P16 gene in the heart of aging ratsLI Yanju¹, DING Wen², LIU Yang³, LI Qinshan⁴

(1. Department of Hematology, Affiliated Hospital, Guiyang Medical College; 2. Department of CT, Wendeng Orthopedics Hospital; 3. Department of Life Science and Biomedical Engineering, Beijing University of Technology; 4. Department of Biochemistry, Peking Union Medical College)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of total saponins of *Asparagus* on the expression of P16 gene in the heart of aging rats, and to discuss its mechanism. Methods: Rats were injected with D-galactose daily for the construction of aging rat models, then rats in model group were orally administered with total saponins of *Asparagus*. The contents of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in the serum and the heart were measured by hydroxylamine and chromatometric methods. The morphological changes of the heart was observed by microscope. The expression of P16 mRNA in the heart was detected by Real-time PCR. Results: Compared with those in model group, the activity of SOD was significantly higher and the content of MDA was significantly lower in the serum and the heart in treatment group ($P<0.05$); the heart had obvious pathological injury; the expression of P16 mRNA in the heart of treatment group was decreased significantly ($P<0.05$). Conclusion: Total saponins of *Asparagus* can improve the heart's function among aging rats, which may associate with the increase of SOD content and decrease of P16 expression.

【Key words】*Riadix asparag*; aging; heart; P16

天冬(*Riadix asparag*)为百合科植物天门冬[*Asparagus cochinchinensis* (Lour.) Merr.]的干燥块根^[1]。其味甘、苦,性寒,归肺肾经。作为一种传统的中药,具有广泛的临床应用价值,已被列入中国、印度及英国的药典中^[2]。天冬块根中的主要成分为天冬总皂苷,近年来,国内外研究发现天冬具有类激素、抗氧化、增强免疫力、抗炎、抗肿瘤等多种作用^[3-8],

但对天冬总皂苷抗衰老的研究,未见国内外相关报道。本实验通过皮下注射 D-半乳糖建立衰老大鼠模型,观察天冬总皂苷对衰老大鼠心脏形态结构、自由基活性及 P16 mRNA 表达的影响,探讨天冬总皂苷保护衰老大鼠心脏的作用及其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 选用清洁级 SD 大鼠(购自第三军医大学动物实验中心,动物编号:2007-0005),周龄为8~9周,

作者介绍:李艳菊(1981-),女,主治医师,博士,

研究方向:中药抗衰老。

基金项目:贵州省卫生厅基金资助项目(编号:gzwkj2011-1-023);贵州省科技计划基金资助项目(编号:黔科合 SY[2010]3075)。

体重为 160~180 g,按照处理方式的不同随机分为 5 组:正常组、模型组、天冬总皂苷 3 g/kg 组、天冬总皂苷 6 g/kg 组、天冬总皂苷 12 g/kg 组,每组 10 只雄性大鼠。

1.1.2 药品与仪器 天冬总皂苷购于上海尚谊化工科技有限公司;超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase,SOD)测定试剂盒、丙二醛(Malondialdehyde,MDA)试剂盒(南京建成公司);Trizol 试剂、RT-PCR 试剂盒(大连宝生物公司);引物序列由 primer 3 设计,上海英俊公司合成;倒置相差荧光显微镜(德国 Lica 公司);721 紫外-可见分光光度计(上海光电研究所);实时定量 PCR 仪(美国通用生物有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 各实验组大鼠给药 实验分 5 组,每组 10 只雄性大鼠:①正常组;②模型组:每日皮下注射 D-半乳糖 400 mg/kg,连续注射 3 个月^[9];③给药组:大鼠衰老模型+不同剂量天冬总皂苷灌胃;用生理盐水溶解天冬总皂苷,配成浓度为 1.2 g/ml 的药液,分别以 3、6、12 g/kg(天冬总皂苷低剂量组、天冬总皂苷中剂量组、天冬总皂苷高剂量组)浓度灌胃,共 3 个月。

1.2.2 SOD 和 MDA 表达的测定 ①血清中 SOD 和 MDA 水平的测定:治疗结束后对大鼠进行麻醉,心脏取血,3 000 r/min 离心 15 min 提取大鼠血清,按照试剂盒说明书测定各组血清中 SOD 和 MDA 的水平;②心脏组织中 SOD 和 MDA 的测定:治疗结束后对大鼠进行麻醉,提取心脏组织,准确称取组织重量,加 9 倍生理盐水,制成 10%匀浆,2 500 r/min,离心 10 min,取上清,再用生理盐水以 1:9 稀释成 1%组织匀浆。按照试剂盒说明添加各种试剂,混匀,室温静置 10 min,550 nm,1 cm 光径,蒸馏水调零,测各管 A 值。每毫克组织蛋白在 1 ml 反应液中 SOD 抑制率达 50%时所对应的 SOD 量为 1 个 SOD 活力单位(U)。

1.2.3 心脏组织光镜定量分析 分别取各组大鼠的左前壁心肌组织制作病理切片,于显微镜下观察各组心脏的病理学改变。

1.2.4 Real-time PCR 测定心脏中 P16 mRNA 表达 大鼠心脏总 RNA 采用 Trizol 法提取,采用实时定量-逆转录聚合酶链反应进行基因片段扩增并定量。大鼠 P16 及内参基因(β -actin)引物如下:P16 上游引物为 5'-CTCCTTGGCTTCACTT-CTGG-3',下游引物为 5'-CTCCCTCCCTCTGCTAACCT-3'; β -actin 上游引物为 5'-GTAGCCATCCAGGCTGTGTT-3',下游引物为 5'-ACCCTCATAGATGGGCACAG-3'。反应条件:(1)Real-time PCR:95 ℃,5 s,59 ℃,20 s,72 ℃,20 s,40 循环。(2)Melt curve:95 ℃,5 s,65 ℃,5 s,60 循环。PCR 反应各管所加模板 RNA 的量约为 1 μ g。最终通过 Real-time PCR 仪记录的 Ct 值而对起始模板相对定量。

1.3 统计学方法

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 13.0 软件进行组间 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SOD 和 MDA 表达的测定

检测各组血清中和心脏组织中 SOD 活性和 MDA 含量的变化:天冬总皂苷中、高剂量组大鼠血清中和心脏组织中 SOD 活性明显高于模型组,MDA 含量明显低于模型组($P < 0.01$),并呈剂量依赖性(表 1、2)。

2.2 光镜分析结果

正常组心肌细胞排列紧密有序;模型组心肌细胞嗜酸性染色增强,心肌细胞数量未见明显改变,但可见部分心肌细胞体积增大,心肌细胞间质内结缔组织增生,脂肪浸润,心肌细胞间质的小血管可呈明显的充血状态,有些心肌细胞可见心肌细胞核增多、聚集现象;给药组能有效改善上述改变。

2.3 Real-time PCR 测定心脏中 P16 mRNA 表达

检测各组心脏组织中 P16 mRNA 表达的变化:模型组 P16 mRNA 的表达高于正常组,天冬总皂苷高剂量组中 P16 mRNA 明显低于模型组($P < 0.01$)(表 3)。

表 1 天冬总皂苷对大鼠血清中 SOD 活性和 MDA 含量的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Effect of total saponins of <i>Asparagus racemosus</i> on the contents of SOD and MDA in the serum ($\bar{x} \pm s$)				
组别	剂量(g/kg)	例数(n)	SOD(U/ml)	MDA(nmol/ml)
正常组	0	10	95.235 $\pm$ 7.352	5.124 $\pm$ 0.221
模型组	0	10	67.471 $\pm$ 8.242 [#]	7.313 $\pm$ 0.422 [#]
天冬总皂苷低剂量组	3	10	75.231 $\pm$ 6.124 ^Δ	6.913 $\pm$ 0.314 ^Δ
天冬总皂苷中剂量组	6	10	86.742 $\pm$ 7.321 [*]	5.856 $\pm$ 0.423 [*]
天冬总皂苷高剂量组	12	10	93.563 $\pm$ 7.421 [*]	5.421 $\pm$ 0.353 [*]

注:#,与正常组相比, $P < 0.05$;Δ,与模型组比, $P < 0.05$;*,与模型组相比, $P < 0.01$

表 2 天冬总皂苷对大鼠心脏中 SOD 活性和 MDA 含量的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Effect of total saponins of <i>Asparagus racemosus</i> on the contents of SOD and MDA in the heart ($\bar{x} \pm s$)				
组别	剂量(g/kg)	例数(n)	SOD(U/mg prot)	MDA (nmol/mg prot)
正常组	0	10	0.772 $\pm$ 0.052	15.436 $\pm$ 0.768
模型组	0	10	0.415 $\pm$ 0.036 [#]	21.478 $\pm$ 2.089 [#]
天冬总皂苷低剂量组	3	10	0.498 $\pm$ 0.043 ^Δ	19.242 $\pm$ 1.435 ^Δ
天冬总皂苷中剂量组	6	10	0.586 $\pm$ 0.042 [*]	18.279 $\pm$ 0.967 [*]
天冬总皂苷高剂量组	12	10	0.667 $\pm$ 0.066 [*]	16.146 $\pm$ 1.245 [*]

注:#,与正常组相比, $P < 0.05$;Δ,与模型组相比, $P < 0.05$;*,与模型组相比, $P < 0.01$

表 3 天冬总皂苷对大鼠心脏中 P16 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)Tab.3 Effect of total saponins of *Asparagus racemosus* on expression of P16 mRNA in the heart ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(n)	剂量(g/kg)	P16/ β -actin
正常组	10	0	52.145 $\pm$ 6.236
模型组	10	0	167.251 $\pm$ 10.467 ^a
天冬总皂苷高剂量组	10	12	67.974 $\pm$ 5.783 ^Δ

注: #, 与正常组相比, $P < 0.05$; Δ , 与模型组比, $P < 0.05$

3 讨 论

随着我国老年人群比重的逐年增加, 老年人群慢性心脏功能减退的比率明显升高。积极寻找与研发有效的治疗心脏衰老的方法具有重要的临床意义。目前衰老的学说较多, 其中占主要地位的为氧自由基学说^[10-13], 此学说于 1956 年由哈曼(Harman)提出^[14], 他认为机体存在氧自由的生成和清除的平衡系统, 随着年龄的增长, 这种平衡系统失衡, 导致自由基过量产生, 造成衰老, 基于自由基学说的原理, 本实验采用 D-半乳糖连续皮下注射 3 个月, 根据过多的 D-半乳糖在体内氧化产生大量的自由基超过机体的清除能力, 过多的自由基引发脂质过氧化的链式反应, 产生大量的脂质过氧化物 MDA, 加重对细胞的损伤, 引起的代谢紊乱使机体过氧化反应增强制作心脏衰老动物模型, 本研究发现天冬总皂苷能够改善衰老心脏的细胞形态, 降低 MDA 含量、升高 SOD 的活性, 天冬总皂苷的抗过氧化反应可能是其抗衰老的机制之一。

近年来的研究认为衰老是一种与基因相关的疾病, 抑癌基因 P16 在衰老细胞中起重要的作用。P16 基因与个体发育、分化、生长、衰老都有密切关系^[15], 它在复制衰老时多呈高表达。研究发现, 细胞衰老时, P16 基因的 mRNA 转录及蛋白表达水平增高, 抑制细胞有丝分裂, 刺激发生反应而产生 RB 蛋白的磷酸化, 从而维持了衰老细胞不可逆的生长停滞状态^[16,17], 所以本实验初步探讨天冬总皂苷是否具有影响 P16 基因表达的作用, 结果发现天冬总皂苷能够下调 P16 基因表达, 这可能是其抗衰老的另一机制之一。

本研究证明天冬总皂苷能够增加自由基清除酶活力、降低 P16 基因的表达, 改善衰老心脏, 进而为天冬总皂苷预防心脏衰老提供实验依据。

参 考 文 献

[1] 中华人民共和国国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 37.

- Chinese National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the people's republic of China[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 37.
- [2] Bopana N, Saxena S. *Asparagus racemosus*—ethnopharmacological evaluation and conservation needs[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2007, 110(1): 1–15.
- [3] Meena J, Ojha R, Muruganandam A V, et al. *Asparagus racemosus* competitively inhibits in vitro the acetylcholine and monoamine metabolizing enzymes[J]. Neurosci Lett, 2011, 503(1): 6–9.
- [4] Thakur M, Connellan P, Deseo M A, et al. Characterization and in vitro immunomodulatory screening of fructo-oligosaccharides of *Asparagus racemosus* Willd[J]. Int J Biol Macromol, 2012, 50(1): 77–81.
- [5] Sharma P, Chauhan P S, Dutt P, et al. A unique immuno-stimulant steroidal sapogenin acid from the roots of *Asparagus racemosus*[J]. Steroids, 2011, 76(4): 358–364.
- [6] Narayanan A S, Raja S S, Ponnurugan K, et al. Antibacterial activity of selected medicinal plants against multiple antibiotic resistant uropathogens: a study from Kolli Hills, Tamil Nadu, India[J]. Benef Microbes, 2011, 2(3): 235–243.
- [7] Palanisamy N, Manian S. Protective effects of *Asparagus racemosus* on oxidative damage in isoniazid-induced hepatotoxic rats: an in vivo study[J]. Toxicol Ind Health, 2012, 28(3): 238–244.
- [8] Sidiq T, Khajuria A, Suden P, et al. A novel sarsapogenin glycoside from *Asparagus racemosus* elicits protective immune responses against HBsAg[J]. Immunol Lett, 2011, 135(1–2): 129–135.
- [9] Kalamade V I, Pillai M M, Kalamade I S. Effect of *Bacopa monniera* (Linn.) on lipid peroxidation and lipofuscinogenesis in prostate gland of D-galactose induced aging mice, *Mus musculus*[J]. Indian J Exp Biol, 2008, 46(7): 547–549.
- [10] Datta H S, Mitra S K, Rangesh P, et al. Theories and management of aging: modern and ayurveda perspectives[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2009. [Epub ahead of print] doi: 10.1093/ecam/nep005.
- [11] Felippi C C, Oliveira D, Ströher A, et al. Safety and efficacy of antioxidants-loaded nanoparticles for an anti-aging application[J]. J Biomed Nanotechnol, 2012, 8(2): 316–321.
- [12] Poljšak B, Dahmane R. Free radicals and extrinsic skin aging[J]. Dermatol Res Pract, 2012. [Epub ahead of print] doi: 10.1155/2012/135206.
- [13] Dai D F, Rabinovitch P S, Ungvari Z. Mitochondria and cardiovascular aging[J]. Circ Res, 2012, 110(8): 1109–1124.
- [14] Doonan R, McElwee J J, Matthijssens F, et al. Against the oxidative damage theory of aging: superoxide dismutases protect against oxidative stress but have little or no effect on life span in *Caenorhabditis elegans* [J]. Genes & Dev, 2008, 22(23): 3236–3241.
- [15] Baker D J, Wijshake T, Tchkonja T, et al. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders[J]. Nature, 2011, 479(7372): 232–236.
- [16] Rayess H, Wang M B, Srivatsan E S. Cellular senescence and tumor suppressor gene p16[J]. Int J Cancer, 2012, 130(8): 1715–1725.
- [17] Fukuyo Y, Takahashi A, Hara E, et al. E2FBP1 antagonizes the p16 (INK4A)–Rb tumor suppressor machinery for growth suppression and cellular senescence by regulating promyelocytic leukemia protein stability[J]. Int J Oral Sci, 2011, 3(4): 200–208.

(责任编辑: 关蕴良)