

归芪定年方通过调节JAK2/STAT通路活性延缓小鼠 肾系膜细胞衰老

孙文平¹, 伍志伟^{2,3*}, 薛娜²

(1. 甘肃省肿瘤医院, 兰州 730000; 2. 甘肃中医药大学, 兰州 730000;
3. 甘肃省高校重大疾病分子医学与中医药防治研究重点实验室, 兰州 730000)

[摘要] **目的:**探讨归芪定年方(GDP)对D-半乳糖(D-gal)诱导致衰老小鼠肾系膜细胞中Janus酪氨酸蛋白激酶2(JAK2)/信号转导与转录激活因子(STAT)信号通路相关分子表达水平的影响。**方法:**以D-gal 10 g·L⁻¹诱导复制小鼠肾系膜细胞衰老模型,经GDP 40 mg·L⁻¹水煎剂处理3 d后,衰老相关β-半乳糖苷酶(SA-β-gal)染色测定细胞衰老状态,流式细胞术检测细胞周期,细胞增殖与活性检测(CCK-8)法检测细胞存活率,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测肿瘤坏死因子-α(TNF-α),白细胞介素-6(IL-6),核转录因子-κB(NF-κB)和白细胞介素-1α(IL-1α) mRNA表达水平,蛋白免疫印迹法(Western blot)测定细胞中JAK2/STAT信号通路相关分子STAT1,磷酸化STAT1(p-STAT1),STAT3,p-STAT3蛋白水平。**结果:**CCK-8结果显示GDP最佳药物质量浓度为40 mg·L⁻¹。与空白组比较,模型组SA-β-gal细胞阳性率显著升高(P<0.01),G₀/G₁期细胞百分数明显升高(P<0.05),G₂/M期和S期细胞百分数显著降低(P<0.01),TNF-α,IL-6,NF-κB和IL-1α mRNA表达水平显著上调(P<0.01),STAT1,p-STAT1,STAT3和p-STAT3蛋白水平显著升高(P<0.01);与模型组比较,模型+GDP组SA-β-gal细胞阳性率明显降低(P<0.05),G₀/G₁期百分数明显降低(P<0.05),G₂/M期和S期细胞百分数显著增加(P<0.01),TNF-α,IL-6,NF-κB和IL-1α mRNA表达水平明显下调(P<0.05),STAT1,p-STAT1,STAT3和p-STAT3蛋白水平明显降低(P<0.05)。**结论:**GDP可延缓小鼠肾系膜细胞衰老的进程,其作用机制可能与下调细胞JAK2/STAT通路相关因子的表达水平相关。

[关键词] 归芪定年方; Janus酪氨酸蛋白激酶2(JAK2)/信号转导与转录激活因子(STAT)信号通路; 小鼠肾系膜细胞; D-半乳糖; 衰老

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2021)12-0067-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211292

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210416.1358.002.html>

[网络出版日期] 2021-4-16 16:54

Guiqi Dingnian Prescription Delays Senescence of Mouse Mesangial Cells by Regulating JAK2/STAT Pathway Activity

SUN Wen-ping¹, WU Zhi-wei^{2,3*}, XUE Na²

(1. Gansu Provincial Cancer Hospital, Lanzhou 730000, China; 2. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 3. Gansu University Key Laboratory for Molecular Medicine & Chinese Medicine Prevention and Treatment of Major Diseases, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Guiqi Dingnian prescription (GDP) on the expression of related molecules in Janus tyrosine kinase 2 (JAK2)/signal transducer and activator of transcription (JAK2/STAT) signaling pathway of D-galactose (D-gal)-induced senescent mesangial cells. **Method:** The senescent mouse mesangial cells induced by 10 g·L⁻¹ D-gal were continuously treated with 40 mg·L⁻¹ GDP for

[收稿日期] 20210119(005)

[基金项目] 甘肃省自然科学基金项目(1610RJZA064);甘肃省高校重大疾病分子医学与中医药防治研究重点实验室开放基金项目(FZYX14-1);甘肃省高等学校创新基金项目(2021-268)

[第一作者] 孙文平,主治医师,从事肿瘤与衰老研究,Tel:0931-2302543,E-mail:sunwenping82@163.com

[通信作者] *伍志伟,博士,副教授,从事细胞生物学与微生物学研究,Tel:0931-5161002,E-mail:wzhiwei@aliyun.com

three days. The senescence of the treated cells was determined by senescence-associated (SA)- β -gal staining. The cell cycle was detected by flow cytometry. The cell viability was analyzed using the cell counting kit-8 (CCK-8). The mRNA expression levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B), and IL-1 α were detected by real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR). The protein expression levels of STAT1, phosphorylated STAT1 (p-STAT1), STAT3, and p-STAT3 in the JAK2/STAT signaling pathway were determined by Western blot. **Result:** CCK-8 results showed that the optimal concentration of GDP was 40 mg·L⁻¹. Compared with the blank group, the positive rate of SA- β -gal in the model group was significantly higher ($P < 0.01$), the percentage of cells in G₀/G₁ phase was significantly increased ($P < 0.05$), the percentage of cells in G₂/M and S phase was significantly decreased ($P < 0.01$). The mRNA expression levels of TNF- α , IL-6, NF- κ B and IL-1 α were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the model + GDP group exhibited significantly decreased SA- β -gal-positive cells ($P < 0.05$), reduced cells in the G₀/G₁ phase ($P < 0.05$), increased cells in the G₂/M and S phases ($P < 0.01$), and down-regulated TNF- α , IL-6, NF- κ B, and IL-1 α mRNA expression ($P < 0.05$) and STAT1, p-STAT1, STAT3, and p-STAT3 protein expression ($P < 0.05$). **Conclusion:** GDP delays the senescence of mouse mesangial cells possibly by down-regulating the expression of related molecules in the JAK2/STAT pathway.

[Key words] Guiqi Dingnian prescription (GDP); Janus tyrosine kinase 2 (JAK2)/signal transducer and activator of transcription (JAK2/STAT) signaling pathway; mouse mesangial cells; D-galactose (D-gal); senescence

近年来,随着人口老龄化日益加剧,老龄问题为我国社会经济发展带来了新的考验。如何让老年人健康、有质量地生存,是国家、社会和人类面临的一个重要议题。目前,大多学者认为通过延缓衰老能使这一问题在很大程度上得到缓解。在其驱使下,依据衰老发生的机制,从自然界寻找具有延缓衰老功效的活性物质,已成为近年来研究的热点^[1]。

中医作为我国传统医学,在抗衰老方面有着自身的优势,形成了独特的方法和理论体系。从肾虚、脾胃虚弱、阴阳失调等理论出发,应用具有抗自由基、增强免疫、调节神经分泌等功能的中药复方或单体,在延缓衰老研究中取得了一定的成效^[2-3]。于博文等^[4]报道延缓内皮微粒(EMPs)诱导的人脐静脉内皮衰老细胞经人参-三七-川芎提取物处理后,经衰老相关 β -半乳糖苷酶(SA- β -gal)活性测定、流式细胞周期检测等分析发现,人参-三七-川芎提取物可通过EMPs作用延缓血管内皮细胞衰老;吴爽等^[5]以40代人胚肺二倍体成纤维衰老细胞为研究对象,经发酵黄芪处理后,通过细胞形态学观察,细胞增殖与活性检测(CCK-8)细胞计数,SA- β -gal活性分析及细胞周期相关蛋白CD1和CD4检测发现,黄芪发酵物通过促进细胞增殖、降低SA- β -gal活性和抑制衰老相关蛋白的表达,发挥抗细胞衰老的作用。然而,中医抗衰老理论通常以复方整体理念

为出发点,经药物配伍建立对立统一、相生相克的复杂治法,通过各味药及组分在体内的相互作用达到治疗的目的。同时,衰老是由多因素共同作用引起的一种复杂疾病,至今尚没有任何一种理论能够完全阐释其发生的机制。因此,选用复方制剂进行抗衰老治疗具有一定的优势。Janus酪氨酸蛋白激酶2(JAK2)/信号转导与转录激活因子(STAT)信号通路是细胞信号转导的一条重要通路,广泛参与体内外细胞的增殖、分化及免疫调节等过程,是众多细胞因子信号转导的重要途径。

传统医学认为“肾精不足、肾虚渐亏”所致的脏腑精气亏虚是导致人体衰老的根本原因^[6-7]。基于“益气活血抗衰老”之理论和细胞增殖与分化通路的前提研究,课题组推测归芪定年方(GDP)可能通过调控JAK2/STAT通路活性发挥抗衰老作用。本研究以D-半乳糖(D-gal)诱导建立小鼠肾系膜细胞衰老模型,经具有补肾益气、化瘀疏肝、润肠通便功效的GDP(由黄芪、当归、大黄、白术、麦冬、阿胶6味药组成)处理后,分析细胞内JAK2/STAT信号通路相关分子STAT1,磷酸化STAT1(p-STAT1),STAT3和p-STAT3和衰老相关分泌表型(SASP)因子表达水平,探讨GDP抗衰老的分子机制。

1 材料

1.1 细胞 小鼠肾系膜细胞株[青旗(上海)生物技术有限公司,批号BFN608006378]。

1.2 药材与试剂 黄芪(*Astragali Radix*), 当归(*Angelicae Sinensis Radix*), 大黄(*Rhei Radix et Rhizoma*), 白术(*Atractylodis Macrocephalae Rhizoma*), 麦冬(*Ophiopogonis Radix*), 阿胶(*Asini Corii Colla*)(甘肃中医药大学中药房提供,批号分别为20190627, 20190326, 20190101, 20190217, 20181223, 20181121),由甘肃中医药大学药学系李成义教授鉴定均符合2015年版《中华人民共和国药典》要求;高糖DMEM,0.25%胰酶,青-链霉素双抗,胎牛血清(FBS),Maxima SYBR Green/ROX 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)Master Mix [赛默飞世尔科技(中国)有限公司,批号分别为11965092, 15050057, 15140163, 10100147, k0221]; *D-gal*(美国Sigma公司,批号L3625);SA- β -gal 染色试剂盒,细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒,RIPA 裂解液,PVDF膜(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为C0602, C1052, P0013C, FFP24); β -肌动蛋白(β -actin), STAT1, p-STAT1, STAT3, p-STAT3 单克隆抗体,辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔抗小鼠免疫球蛋白G(IgG)(美国Cell Signaling Technology公司,批号分别为3700, 9176, 8062, 9139, 9145, 7074);聚氰基丙烯酸正丁酯(BCA)蛋白浓度测定试剂盒,十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶配制试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为PC0020, P1200);蛋白质/DNA/RNA 共提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司,批号DP423];Takara 增强化学发光法(ECL)化学发光试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司,批号T7104Q]。

1.3 仪器 IX51型倒置光学显微镜(日本Olympus株式会社);蛋白凝胶转印系统,iMARK型酶标仪,ChemiDoc XRS⁺型凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司);1-14K型高速低温冷冻离心机(美国Sigma公司);HZQ-F160A型恒温振荡器(上海一恒科学仪器有限公司);MCO-18AIC型二氧化碳培养箱(日本三洋公司);FACSCelesta型流式细胞仪(美国BD公司);CFX96型实时荧光PCR仪(美国伯乐公司)。

2 方法

2.1 GDP水煎剂的制备 将当归(6 g),白术(6 g),黄芪(10 g),生地黄(4 g),阿胶(2 g),麦冬(4 g)于一起混合均匀后,置于煎药容器,加生水1 L,浸泡1 h后煎煮,温火煎1 h,过滤收集药液;药液加热浓缩至100 mL后制成本研究所需水煎剂(相当于320 g·L⁻¹),置于4℃冰箱保存备用。

2.2 细胞培养与衰老细胞模型建立 小鼠肾系膜细胞接种于含10% FBS和100 U·mL⁻¹青-链霉素的高糖DMEM(常规培养基),于37℃ 5% CO₂环境下培养,每隔1 d换液1次,待细胞融合度至90%时,按1:4传代。传代细胞融合度为50%时,以含*D-gal* 10 g·L⁻¹的上述培养液持续诱导72 h,复制细胞衰老模型^[8]。

2.3 药物浓度与处理时间筛选 对数生长期小鼠肾系膜细胞以0.8×10⁵个/孔接种于96孔板,培养细胞至贴壁后,以含*D-gal* 10 g·L⁻¹常规培养基诱导培养72 h,200 μL/孔,每天换液1次;弃培养液,加入含不同浓度(0, 10, 20, 40, 50, 60, 70 mg·L⁻¹)GDP药剂的常规培养液,每组6个重复,200 μL/孔,每天换液1次;分别培养24, 48, 72, 96 h后,弃培养液,每孔加入含10% CCK-8的常规培养基200 μL,于37℃孵育1 h,450 nm下测定各孔吸光度*A*,计算细胞存活率,确定GDP最佳作用时间和浓度。

2.4 细胞分组与药物处理 对数生长期小鼠肾系膜细胞以1.2×10⁵个/孔接种于6孔板,将其分为空白组,模型组,GDP组和模型+GDP组,每组6个重复;加入常规培养基(2 mL/孔),待细胞培养至融合度为50%时,弃培养液;空白组和GDP组加入常规培养液,模型组和模型+GDP组加入含*D-gal* 10 g·L⁻¹常规培养液,2 mL/孔,每天换液1次,持续培养72 h。弃培养液,空白组和模型组加入常规培养液,GDP组和模型+GDP组加入含GDP 40 mg·L⁻¹常规培养液,2 mL/孔,每天换液1次,持续培养72 h。

2.5 细胞形态学观察 细胞培养结束后,将各组细胞置于光学显微镜下观察和记录细胞形态的变化。

2.6 SA- β -gal 染色 药物处理结束后,弃培养液,以磷酸盐缓冲液(PBS)缓冲液清洗细胞1次;加入SA- β -gal 染色液染色,具体操作参照SA- β -gal 染色试剂盒说明书;染色后,于37℃无CO₂条件下培养3~12 h;光学显微镜下观察细胞染色情况,随机选取5个视野,计数细胞数量,计算细胞阳性率。

2.7 细胞周期检测 以0.25%胰酶消化细胞,800 r·min⁻¹离心5 min(离心半径7.4 cm,下同),弃培养液,PBS清洗2次;加入70%乙醇于4℃过夜固定;应用细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒染色,于FACSCelesta流式细胞仪检测和分析细胞周期。

2.8 RNA和蛋白质提取 收集处理细胞,1 000 r·min⁻¹离心5 min,弃培养液;应用蛋白质/DNA/RNA 共提取试剂盒提取细胞总RNA和蛋白

质,具体操作参照试剂盒说明书。

2.9 Real-time PCR检测TNF- α , IL-6,核转录因子- κ B(NF- κ B)和IL-1 α mRNA表达 将提取的总RNA逆转录为cDNA,应用Real-time PCR技术检测TNF- α , IL-6, NF- κ B和IL-1 α mRNA的表达水平。PCR扩增条件(反应体系为25 μ L)为95 $^{\circ}$ C预变性5 min;95 $^{\circ}$ C变性15 s,58 $^{\circ}$ C退火25 s;72 $^{\circ}$ C延伸15 s,共40个循环,以 β -actin为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算mRNA的相对表达水平,引物序列由上海生工生物工程有限公司合成,引物序列见表1。

表1 PCR引物序列

Table 1 Primer sequence of PCR

基因	序列(5'-3')	长度/bp
TNF- α	上游5'-TGGCAAATGTGAGAAACGAG-3'	213
	下游5'-AAACCAGAACAGACCCAACG-3'	
IL-6	上游5'-CCACTTACAAGTCGGAGGCTTA-3'	197
	下游5'-CCAGTTGGTAGCATCCATCATTTC-3'	
NF- κ B	上游5'-ATGGCAGACGATGATCCCTAC-3'	418
	下游5'-TGTTGACAGTGGTATTTCTGGTG-3'	
IL-1 α	上游5'-GCACCTTACACCTACCAGA-3'	256
	下游5'-AAACTTCTGCCTGACGAGC-3'	
β -actin	上游5'-GTGCTATGTTGCTCTAGACTTCG-3'	278
	下游5'-ATGCCACAGGATTCCATACC-3'	

2.10 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测STAT1, p-STAT1, TAT3和p-STAT3蛋白表达 将上述提取蛋白应用BCA蛋白检测试剂盒检测定量,采用

SDS-PAGE电泳分离后,转印至PVDF膜;经封闭、一抗孵育(稀释度均为1:500),洗涤,二抗孵育(稀释度为1:800),洗涤后,应用Takara ECL化学发光试剂盒于凝胶成像系统中检测细胞内STAT1, p-STAT1, STAT3和p-STAT3的蛋白水平。

2.11 统计学方法 数据应用SPSS 18.0软件进行统计分析,结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析;计数资料以百分率表示,比较采用 χ^2 检验。检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 最佳药物浓度与处理时间筛选 以不同质量浓度(0, 10, 20, 40, 50, 60, 70 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)GDP分别处理D-gal诱导衰老型细胞24, 48, 72, 96 h后,经CCK-8活细胞检测分析结果表明,GDP质量浓度10~40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 在24~72 h培养期内具有促进诱导衰老细胞增殖作用,且随着药物浓度的提高,增殖作用逐渐增强,72 h后细胞增殖速度开始下降,与模型组相比差异具有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$);GDP 40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 在24~96 h培养期内与空白细胞的增殖速率基本保持一致;GDP 50~60 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 在24~48 h具有缓慢促进细胞的增殖作用,48 h后活细胞数量减少;GDP 60 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上整个培养期内均呈现抑制细胞增殖效应。由此得出本实验最佳质量浓度为40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,最佳处理时间为72 h。后续2.2~2.6项实验条件均为质量浓度40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,作用时间为72 h。见表2。

表2 GDP对诱导衰老型小鼠肾系膜细胞存活率的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effect of GDP on the survival rate of inducing senescent mesangial cells from mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

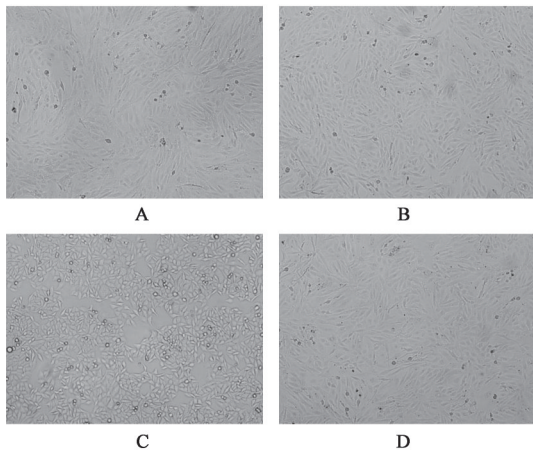
组别	质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	%
空白		24.87 \pm 0.68	72.14 \pm 4.13 ¹⁾	144.67 \pm 6.89 ²⁾	278.55 \pm 9.87 ²⁾	154.31 \pm 10.23 ²⁾	
模型		24.61 \pm 0.93	39.23 \pm 0.94	52.92 \pm 3.19	47.65 \pm 1.79	31.89 \pm 0.67	
GDP	10	25.04 \pm 0.86	51.08 \pm 2.10	92.18 \pm 5.67 ¹⁾	163.84 \pm 7.13 ²⁾	121.63 \pm 5.82 ²⁾	
	20	24.37 \pm 1.17	55.39 \pm 0.99	102.33 \pm 4.95 ²⁾	187.58 \pm 7.25 ²⁾	142.36 \pm 4.97 ²⁾	
	40	23.96 \pm 1.02	63.76 \pm 1.59 ¹⁾	126.20 \pm 8.13 ²⁾	251.16 \pm 8.38 ²⁾	149.74 \pm 6.14 ²⁾	
	50	25.02 \pm 1.96	44.48 \pm 1.67	72.06 \pm 2.94 ¹⁾	64.33 \pm 5.19	51.06 \pm 2.49 ¹⁾	
	60	25.32 \pm 1.09	42.34 \pm 2.08	57.68 \pm 3.72	54.08 \pm 3.49	44.61 \pm 1.93	
	70	25.62 \pm 1.58	36.78 \pm 1.34	34.79 \pm 2.17	32.88 \pm 2.95	27.05 \pm 1.21	

注:与模型组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$ 。

3.2 对细胞形态的影响 经D-gal诱导后,细胞呈现体积增大、空泡化、排列不规则、双核和多形核细胞数量增加、折光形增强等衰老迹象^[9]。经GDP 40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 培养液培养后,细胞排列逐渐整齐,双核

和多形核细胞数量减少,体积较小、梭形、边界清晰的正常细胞数量增加。见图1。

3.3 对SA- β -gal染色的影响 空白组,GDP组,模型组和模型+GDP组SA- β -gal染色细胞阳性率分别



A. 空白组; B. GDP组; C. 模型组; D. 模型+GDP组(图2,3同)
图1 GDP对诱导衰老小鼠肾系膜细胞形态的影响(TEM, ×200)
Fig. 1 Effect of GDP on morphology of inducing senescent mesangial cells from mice (TEM, ×200)

为12.59%±1.17%, 13.07%±1.32%, 93.21%±7.56%和37.66%±5.84%;与空白组比较, GDP组差异无统计学意义, 模型组SA-β-gal细胞阳性率显著升高($P < 0.01$);与模型组比较, 模型+GDP组SA-β-gal细胞阳性率明显降低($P < 0.05$)。见图2。

3.4 对细胞周期的影响 与空白组比较, 模型组G₀/G₁期细胞百分数明显升高($P < 0.05$), G₂/M期和S期细胞百分数显著降低($P < 0.01$);与模型组比较, 模型+GDP组细胞G₀/G₁期百分数明显降低($P < 0.05$), G₂/M期和S期细胞百分数显著增加($P < 0.01$)。见表3。

3.5 对TNF-α, IL-6, NF-κB和IL-1α mRNA表达水平的影响 与空白组比较, 模型组细胞内TNF-α,

表4 GDP对诱导衰老小鼠肾系膜细胞TNF-α, NF-κB, IL-1α和IL-6 mRNA表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Effect of GDP on expression levels of TNF-α, NF-κB, IL-1α and IL-6 mRNA of inducing senescent mesangial cells from mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/mg·L ⁻¹	TNF-α	NF-κB	IL-1α	IL-6
模型	1×10 ⁴	2.81±0.38 ²⁾	3.14±0.86 ²⁾	4.79±0.91 ²⁾	3.68±0.80 ²⁾
GDP	40	0.97±0.02 ⁴⁾	1.07±0.06 ⁴⁾	1.02±0.06 ⁴⁾	1.13±0.92 ⁴⁾
模型+GDP	1×10 ⁴ +40	1.75±0.21 ³⁾	1.98±0.59 ^{1,3)}	2.15±0.37 ^{1,3)}	2.01±0.64 ^{1,3)}

注:空白组mRNA表达为1。

3.6 对STAT1, p-STAT1, STAT3和p-STAT3蛋白表达水平的影响 与空白组比较, 模型组细胞内STAT1, p-STAT1, STAT3和p-STAT3蛋白水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较, 模型+GDP组衰老细胞内STAT1, p-STAT1, STAT3和p-STAT3蛋白水平明显降低($P < 0.05$)。见表5,图3。

4 讨论

衰老是生物体随着年龄的增长而缓慢出现的

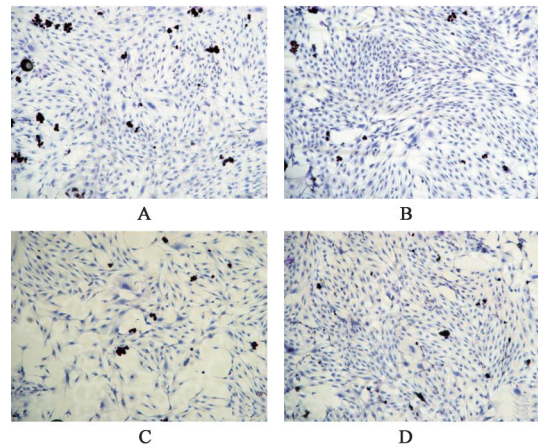


图2 GDP对诱导衰老小鼠肾系膜细胞中SA-β-gal活性的影响(SA-β-gal, ×200)
Fig. 2 Effect of GDP on SA-β-gal activity in inducing senescent mesangial cells from mice (SA-β-gal staining, ×200)

表3 GDP对诱导衰老小鼠肾系膜细胞周期的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effect of GDP on cycle of inducing senescent mesangial cells from mice ($\bar{x} \pm s, n=6$) %

组别	剂量/mg·L ⁻¹	G ₀ /G ₁ 期细胞	G ₂ /M期细胞	S期细胞
空白		63.26±3.12	14.19±0.95	22.55±1.38
模型	1×10 ⁴	91.63±5.33 ¹⁾	3.21±0.21 ²⁾	5.16±0.32 ²⁾
GDP	40	64.39±4.25 ³⁾	11.67±0.89 ⁴⁾	23.94±1.69 ⁴⁾
模型+GDP	1×10 ⁴ +40	71.26±6.42 ³⁾	12.29±0.36 ⁴⁾	16.45±0.83 ⁴⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组相比³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表4,5同)。

IL-6, NF-κB和IL-1α mRNA表达水平显著上调($P < 0.01$);与模型组比较, 模型+GDP组衰老细胞内TNF-α, IL-6, NF-κB和IL-1α mRNA表达水平明显下调($P < 0.05$)。见表4。

一种结构和功能不可逆的衰退过程,是机体在内外环境作用下引起的体内生化反应的综合体现,通常伴随着分子、细胞、组织和器官损伤的不断累积,从而导致机体功能减退^[10]。肾脏是人体中具有多种生理功能的重要脏器之一,在维持健康和衰老进程中发挥着重要的作用。而肾系膜细胞为肾脏中功能最为活跃的组成部分,其表型与功能改变引起的细胞增殖能力减退是造成器官衰老、机能衰退的根

表 5 GDP 对诱导衰老小鼠肾系膜细胞 STAT1, p-STAT1, STAT3 和 p-STAT3 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 5 Effect of GDP on expression levels of STAT1, p-STAT1, STAT3 and p-STAT3 protein of inducing senescent mesangial cells from mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	STAT1/ β -actin	p-STAT1/ β -actin	STAT3/ β -actin	p-STAT3/ β -actin
空白		0.19±0.01	0.16±0.01	0.11±0.01	0.13±0.01
模型	1×10^4	0.81±0.04 ²⁾	0.64±0.03 ²⁾	0.71±0.05 ²⁾	0.68±0.06 ²⁾
GDP	40	0.17±0.02 ⁴⁾	0.13±0.01 ⁴⁾	0.19±0.01 ⁴⁾	0.13±0.02 ⁴⁾
模型+GDP	$1 \times 10^4+40$	0.26±0.01 ³⁾	0.23±0.01 ³⁾	0.32±0.02 ³⁾	0.35±0.01 ³⁾

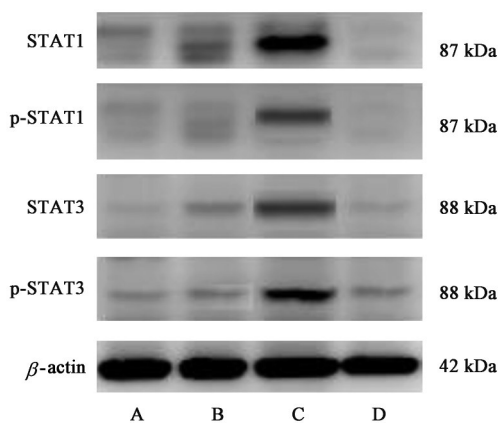


图 3 小鼠肾系膜细胞中 STAT1, p-STAT1, STAT3 和 p-STAT3 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of STAT1, p-STAT1, STAT3 and p-STAT3 protein expression in mouse mesangial cells

本原因之一^[11-12]。因此,以肾系膜细胞为研究对象,探析机体衰老和药物抗衰老机制具有重要意义。

中医作为我国医学之精粹,在衰老与抗衰老方面有着其独特的见解和治则。中医学经过多年的临床实践与总结逐渐形成了肾虚致衰、脾胃虚弱致衰和阴阳平衡致衰三大学说体系。肾虚致衰学说认为“肾为先天之本,主生长发育,肾气盛则寿延,肾气衰则寿夭,肾主骨生髓”,意为肾气虚衰与肾精亏耗是导致衰老的主因^[2,13]。在抗衰老方面,以治未病为前提,采用平衡阴阳、调和气血、补益脏腑之精气,从而达到阴平阳秘、气血调和的功效^[14]。治法治则与现代医学中衰老与抗衰老机制不谋而合,具有异曲同工之效。基于以上学说与理论,本研究选用具有补肾益气、化瘀疏肝、润肠通便功效的 GDP 为研究对象,以肾系膜细胞为载体,探讨其抗衰老机制。研究表明,10~60 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 GDP 药剂具有促进小鼠肾系膜细胞增殖的功能,其中 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 GDP 促增殖作用极显著,这一结果表明, GDP 具有延缓肾细胞衰老的功效。

衰老的发生是多因素共同作用的一个复杂过程。D-gal 经体内半乳糖氧化酶作用形成细胞内醛类, H_2O_2 和超氧阴离子蓄积,从而通过核酸、蛋白

质、脂质的氧化应激-自由基损伤等作用引起细胞形态、功能异常,最终导致细胞衰老^[15]。目前,中医临床通常选用具有抗脂质过氧化、调节机体免疫功能、清除自由基、减少 DNA 损伤功效的单味或多味药物来治疗,经实验研究证实其作用确凿、疗效显著^[16-19]。细胞衰老往往伴随着细胞形态结构改变、细胞增殖周期停滞、衰老相关分泌表型、大分子损伤等特征^[20]。本研究结果表明,经 D-gal 诱导致衰老小鼠肾系膜细胞呈现体积增大、空泡化、排列不规则、双核和多形核细胞数量增加、折光形增强, G_0/G_1 期细胞百分数增加, G_2/M 期和 S 期细胞百分数减小, SA- β -gal 染色细胞阳性率增高;经 GDP 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理后,排列整齐、体积较小、梭形、边界清晰的正常细胞数量增加, G_0/G_1 期衰老细胞百分数减小, G_2/M 期和 S 期细胞百分数增加, SA- β -gal 细胞阳性率下降,与前期研究结论基本一致^[21]。

随着生物技术的快速发展和研究手段的不断革新,衰老机制的研究进入了空前阶段。继上世纪提出的“自由基氧化应激学说”之后,“DNA 损伤学说”“端粒学说”“细胞凋亡学说”等一系列突破性研究成果相继出现,为进一步诠释衰老发生的相关机制奠定了坚实的理论基础^[22-23]。以 NF- κ B, SASP, 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)等细胞转导信号通路为主的衰老机制研究成为目前研究的热点^[24], LIU 等^[25]研究发现活化的 NF- κ B 可诱导衰老相关分泌表型因子 IL-1 α , IL-6, TNF- α 的表达,进而上调 JAK2/STAT 信号通路中 STAT1, STAT3, p-STAT1, p-STAT3 和抗氧化酶基因的表达水平,促进了机体的衰老进程;抑制 NF- κ B 可防止皮肤衰老,促使细胞增殖,并延缓细胞衰老^[26]。本研究结果表明,经 D-gal 诱导后,小鼠肾系膜细胞内 STAT1, STAT3, p-STAT1, p-STAT 蛋白和 SASP 因子 NF- κ B, IL-1 α , IL-6, TNF- α mRNA 水平均上调,经 GDP 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理后,其相应因子水平得到下调。

综上所述, GDP 可能通过调控 JAK2/STAT 通路中 STAT1, STAT3, p-STAT1, p-STAT3 和衰老相关分

泌表型因子NF- κ B, IL-1 α , IL-6和TNF- α 的水平,从而达到延缓小鼠肾系膜细胞的衰老过程。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] BAAR M P, BRANDT R M C, PUTAVET D A, et al. Targeted apoptosis of senescent cells restores tissue homeostasis in response to chemotoxicity and aging [J]. *Cell*, 2017, 169(1): 132-147.
- [2] LI M W, LU J Z. Research progress in mechanisms of aging and in TCM anti-aging [J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med*, 2016, 18(9):215-218.
- [3] 熊倩薇,唐雪,蒙雨丹,等. 基于分子机制探讨中药抗衰老[J]. *中药药理与临床*, 2020, 36(3):272-276.
- [4] 于博文,胡艳红,杨静,等. 人参-三七-川芎提取物对内皮微粒介导HUVECs衰老的干预作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20210506.
- [5] 吴爽,李学锋,王秋彤,等. 发酵黄芪对人胚肺二倍体成纤维细胞增殖及衰老相关蛋白表达的影响[J]. *长春中医药大学学报*, 2020, 36(4):676-679.
- [6] XU J, LIU Q, ZHAI Y, et al. Metabolomics study of erzhiwan against normal rat kidney cell senescence based GC-MS [J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med*, 2019, 35(4):458-464.
- [7] SHAN S, YAN X J, LIU H N. Research progress of pathogenesis of aging [J]. *J New Chin Med*, 2020, 52(7):12-15.
- [8] WANG J, YING Y Y, CHEN Z H, et al. Guilu Erxian Glue inhibits chemotherapy-induced bone marrow hematopoietic stem cells senescence in mice may via p16INK4a-Rb signaling pathway [J]. *Chin J Integr Med*, 2020, doi: 10.1007/s11655-020-3098-3.
- [9] FU X, HUA F, HU Z, et al. Cellular aging and aging-related diseases [J]. *Prog Physiol Sci*, 2012, 43(5): 376-380.
- [10] LÓPEZ-OTÍN C, BLASCO M A, PARTRIDGE L, et al. The hallmarks of aging [J]. *Cell*, 2013, 153(6): 1194-1217.
- [11] XU S, CUI H, ZHAO W, et al. Advances in the molecular mechanism of cellular senescence [J]. *J Guangdong Med Univ*, 2020, 38(1):1-10.
- [12] RATTAN S I. Aging is not a disease: implications for intervention [J]. *Aging Dis*, 2014, 5(3): 196-202.
- [13] XU W, WANG W. Research status of anti-senility and anti-senility and health care for middle-aged and old people [J]. *Chin J Convalescent Med*, 2018, 27(9): 912-915.
- [14] 中国整形美容协会抗衰老分会. 中医抗衰老技术规范指南 [J]. *中华老年病研究电子杂志*, 2016, 3(4):7-9.
- [15] 王晓宁,郑燕芳,余文珍,等. 石斛合剂等降糖中药方对衰老糖尿病大鼠胰腺PCNA、NF- κ Bp65的影响 [J]. *世界中医药*, 2016, 11(2):296-300.
- [16] LUO A, PU X, ZHANG K, et al. Molecular mechanism of Guiqi polysaccharides in delaying cell senescence [J]. *Acta Agricul Boreali-occ Sinica*, 2020, 29(10):1-10.
- [17] AILAITI T, WU J, WANG J. Effect of resveratrol on senescence, proliferation and apoptosis of human umbilical vein endothelial cells under oxidative stress [J]. *Chin Med*, 2020, 15(12):1952-1954.
- [18] HUANG H, ZHANG X, ZHU Z, et al. Metformin inhibits the senescence and senescence-associated secretory phenotype of gastric cancer BGC823 cells induced by doxorubicin [J]. *Chin J Cancer Biother*, 2020, 27(8):874-878.
- [19] 叶刚,杨锐,杨怀铭. 云南红景天对衰老模型大鼠的抗衰老作用 [J]. *中国老年学杂志*, 2014, 34(14): 3960-3962.
- [20] GORGOLIS V, ADAMS P D, ALIMONTI A, et al. Cellular senescence: defining a path forward [J]. *Cell*, 2019, 179(4):813-827.
- [21] ZHOU M, KUANG J, HU H, et al. Effect and mechanism of *Inula britannica* flower total flavonoids on the expression of lncRNA TERRA in the senescent skin fibroblasts [J]. *Med J Chin PLA*, 2020, doi: 11.1056.R.20201104.0946.002.html.
- [22] HALLIWELL B. The wanderings of a free radical [J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 46(5):531-542.
- [23] 房其军,刘建璟,万毅刚,等. 基于自噬信号通路探究褐藻多糖硫酸酯改善人近端肾小管上皮细胞衰老的分子机制 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(24):6003-6011.
- [24] 刘小虎,赵志慧,周玥,等. PI3K/Akt/mTOR自噬通路在人参皂苷Rg₁延缓D-gal诱导的卵巢早衰小鼠模型卵巢早衰中的作用 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(24):6036-6042.
- [25] LIU S F, YE X, MALIK A B. Inhibition of NF- κ B activation by pyrrolidine dithiocarbamate prevents *in vivo* expression of proinflammatory genes [J]. *Circulation*, 1999, 100(12):1330-1337.
- [26] ZHANG G, LI J, PURKAYASTHA S, et al. Hypothalamic programming of systemic aging involving IKK- β , NF- κ B and GnRH [J]. *Nature*, 2013, 497(7448):211-216.

[责任编辑 王鑫]