

# 三七总皂苷对衰老大鼠肝脏内质网应激介导炎症反应的影响

张登青<sup>1</sup>, 袁琴<sup>1</sup>, 袁成福<sup>1</sup>, 何毓敏<sup>1</sup>, 刘朝奇<sup>1</sup>, 王婷<sup>1</sup>, 张长城<sup>1</sup>, 袁丁<sup>2\*</sup>

(1. 三峡大学医学院, 湖北宜昌 443002; 2. 三峡大学附属仁和医院, 湖北宜昌 443001)

**[摘要]** 目的:研究三七总皂苷(PNS)对自然衰老模型大鼠肝脏内质网应激相关因子葡萄糖调节蛋白78(GRP78),磷酸化真核翻译起始因子2 $\alpha$ (p-eIF2 $\alpha$ ),磷酸化PKR样内质网调节激酶(p-PERK)以及炎症相关因子磷酸化核转录因子- $\kappa$ B(p-NF- $\kappa$ B),肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ),白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )调节作用,探索PNS对衰老大鼠肝脏内质网应激介导炎症反应的保护机制。方法:将50只SPF级SD大鼠随机10只1组,分为5组。分别为青年组(9月龄),自然衰老组(24月龄),PNS低、中、高剂量组。从18月龄起,PNS组大鼠按低、中、高剂量分别灌胃给予10, 30, 60 mg·kg<sup>-1</sup>的PNS,每周灌胃6日,停灌1日,直至24月龄。末次给药后禁食不禁水12 h,将老鼠处死,迅速取出肝脏,过液氮后置于-80℃冰箱保存。苏木素-伊红(HE)染色法观察不同组肝组织形态变化,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肝脏组织中内质网应激相关因子GRP78, p-eIF2 $\alpha$ , p-PERK及炎症相关因子p-NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 的蛋白变化。结果:自然衰老大鼠肝脏与青年组相比内质网应激相关因子GRP78, p-eIF2 $\alpha$ , p-PERK及炎症相关因子p-NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 蛋白含量有所上升( $P < 0.01$ ),低剂量PNS灌胃大鼠肝脏变化不明显,中、高剂量PNS显著降低衰老大鼠肝脏内质网应激相关因子及炎症相关因子的蛋白表达( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。结论:PNS有保护自然衰老大鼠肝脏内质网应激导致炎症的作用。

**[关键词]** 三七总皂苷; 衰老; 肝; 内质网应激; 炎症

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)19-0140-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017190140

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170711.1354.032.html>

**[网络出版时间]** 2017-07-11 13:54

## Effect of Panax Notoginseng Saponins on Endoplasmic Reticulum Stress Mediated Inflammatory Response in Livers of Aging Rats

ZHANG Deng-qing<sup>1</sup>, YUAN Qin<sup>1</sup>, YUAN Cheng-fu<sup>1</sup>, HE Yu-min<sup>1</sup>, LIU Chao-qi<sup>1</sup>,  
WANG Ting<sup>1</sup>, ZHANG Chang-cheng<sup>1</sup>, YUAN Ding<sup>2\*</sup>

(1. Medical College of China Three Gorges University, Yichang 443002, China; 2. Affiliated Renhe Hospital of China Three Gorges University, Yichang 443001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of Panax Notoginseng saponins (PNS) on endoplasmic reticulum stress factors of glucose regulated protein 78 ku (GRP78), phosphorylated eukaryotic translation initiation factor (p-eIF2 $\alpha$ ), phosphorylated PKR like endoplasmic reticulum regulating kinase (p-PERK) and inflammatory factors of phosphorylated nuclear factor-Kappa B (p-NF- $\kappa$ B), tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), and interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) in liver tissues of natural aging rats, and explore the protective mechanism of PNS on the endoplasmic reticulum stress mediated inflammatory response in aging rats' livers. **Method:** The 50 SPF SD rats were randomly divided into youth group (9 months), natural aging groups (24 months), low-, medium-and high-dose PNS groups,  $n = 10$  in each group. PNS was given at 10, 30, 60 mg·kg<sup>-1</sup> respectively in PNS groups from 18 months old to 24 months old, 6 days a week by intragastric administration. The rats were executed 12 hours

**[收稿日期]** 20170511(012)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81273895)

**[第一作者]** 张登青,在读硕士,从事中药药理研究, Tel:15571769247, E-mail:ZhangdengqingZDQ@163.com

**[通讯作者]** \*袁丁,博士,教授,从事中药药理与中药化学研究, Tel:15572799866, E-mail:xyyyd@ctgu.edu.cn

after the last medication (food fasting, but water was given), and their livers were taken out immediately and stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  refrigerator after treatment by liquid nitrogen. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the morphological changes of liver tissues in different groups, and Western blot was used to detect the protein changes of endoplasmic reticulum stress related factors GRP78, p-eIF2 $\alpha$ , p-PERK and inflammatory related factors p-NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  in liver tissues. **Result:** As compared with the young rats' livers, the contents of GRP78, p-eIF2 $\alpha$ , p-PERK, p-NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$  in the natural aging rats' livers were increased ( $P < 0.01$ ); the liver changes were not obvious in low-dose PNS group; the protein expression levels of endoplasmic reticulum stress related factors and inflammatory related factors in livers were decreased significantly in middle- and high-dose PNS groups ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ). **Conclusion:** PNS can protect the naturally aging rats from inflammation induced by endoplasmic reticulum stress related factors and inflammatory related factors in livers.

[ **Key words** ] Panax Notoginseng saponins (PNS); aging; liver; endoplasmic reticulum stress; inflammation

现代人生活水平提高,人口老龄化逐渐加重,组织器官衰老问题层出不穷。肝脏是人体重要的代谢器官,在维持机体稳态上有重要作用,因此也是个体衰老中最容易受累的器官<sup>[1]</sup>。三七,又名田七,为五加科植物三七 *Panax notoginseng* 的干燥根和根茎。三七总皂苷(Panax Notoginseng saponins, PNS)是从三七的主根或根茎加工制成的总皂苷,含有多种单体皂苷。已有研究发现 PNS 可以减轻 *D*-半乳糖建立的衰老大鼠模型的氧化损伤,并能保护肝细胞线粒体 DNA(mtDNA)<sup>[2-3]</sup>,也有研究发现 PNS 可以促进 *D*-半乳糖建立衰老大鼠模型清除自由基来延缓衰老<sup>[4]</sup>。除了衰老的“自由基学说”,衰老与炎症反应也密切相关,衰老可以诱发炎症,可以引起肝脏中炎症因子上调。近些年发现内质网应激也参与到炎症反应中<sup>[2]</sup>,与衰老诱导的炎症相互联系。本实验通过建立自然衰老大鼠模型,观察 PNS 用药组与自然衰老组大鼠肝形态学变化,检测大鼠肝组织中葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78),磷酸化真核翻译起始因子 2 $\alpha$  (p-eIF2 $\alpha$ ),磷酸化 PKR 样内质网调节激酶 (p-PERK)以及磷酸化核转录因子- $\kappa$ B (p-NF- $\kappa$ B),肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ),白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )蛋白含量水平,来研究三七总皂苷对衰老大鼠肝的保护作用,探讨其对衰老所致肝脏炎症的保护机制。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF 级 SD 雄性大鼠,9 月龄,体重(250 $\pm$ 30)g 10 只;18 月龄,体重(550 $\pm$ 50)g 40 只,均购于北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2012-0001,由湖北省宜昌市三峡大学实验动物中心提供饲养环境。此实验过程、实验研究都遵循中国实验动物学会伦理委员会制定的指

导原则和要求。

**1.2 药物与试剂** 三七总皂苷(纯度 >95%,成都植标化纯生物技术有限公司,批号 PCS0841);小鼠抗  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)单克隆抗体,兔抗 GRP78 多克隆抗体和兔抗 IL-1 $\beta$  多克隆抗体(美国 Proteintech 公司,批号分别为 66009-1-1g, sc-13968, sc-7884);兔抗 p-PERK 多克隆抗体和兔抗 p-eIF2 $\alpha$  多克隆抗体(中国苏州睿瀛公司,批号分别为 RLP1055, RLP0093);兔抗 p-NF- $\kappa$ B 多克隆抗体(美国 Cell Signaling 公司,批号 #3031);兔抗 TNF- $\alpha$  多克隆抗体(美国 Abcam 公司,批号 ab6671);HRP 标记山羊抗小鼠二抗和 HRP 标记山羊抗兔二抗(武汉科瑞有限公司,批号分别为 125435, 125510);HRP 标记驴抗兔荧光二抗和 HRP 标记驴抗鼠荧光二抗(美国 Jackson ImmunoResearch 公司,批号分别为 127803, 127820);ECL 化学发光剂(碧云天生物技术有限公司,批号 P0018-1);PMSF,磷酸化蛋白抑制剂 A 液和 B 液(武汉谷歌生物科技股份有限公司,批号分别为 G2008, G2007-1, G2007-2);RIPA 裂解液(北京普利莱生物技术有限公司,批号 C1053)。

**1.3 仪器** PowerPac<sup>TM</sup> Basic 型电泳仪, Mini PROTEAN3 Cell 型电泳槽及蛋白电泳技术平台(美国 Bio-Rad 公司);BioshineChemiQ4800 型化学发光凝胶成像自动显影仪(上海欧翔科学仪器有限公司);Odyssey 型双色红外激光成像系统(美国 Licor 公司);JA2003 型电子分析天平(上海天平仪器厂);TP1020 型自动脱水机,EG1150H 型蜡包埋机,EG1150C 型超薄切片机(德国 Leica 公司);CS-V1 型摊片烤片机(孝感市宏业医用仪器有限公司);BX53 型显微镜(日本 Olympus 公司)。

## 2 方法

**2.1 动物分组及给药** 将 10 只 9 月龄大鼠作为青年组,40 只 18 月龄大鼠随机分为衰老组,PNS 低、中、高剂量组,每组 10 只。PNS 低、中、高剂量组按 10,30,60 mg·kg<sup>-1</sup> (按照成人体重剂量换算) 分别灌胃,每周灌胃 6 d,停灌 1 d,连续灌胃至鼠龄 24 月,衰老组灌胃等量的生理盐水,与 PNS 组平行灌胃。

**2.2 苏木素-伊红 (HE) 染色观察肝脏的形态变化**  
迅速将大鼠处死后取出肝组织,取形态较好一部分切块,放入 4% 中性多聚甲醛中固定,24 h 后换成 75% 乙醇,自动脱水机脱水,浸蜡,包埋。手动切片,常规 HE 染色,封片。显微镜下观察。

**2.3 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 GRP78, p-PERK, p-eIF2 $\alpha$ , p-NF- $\kappa$ B, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  蛋白表达**

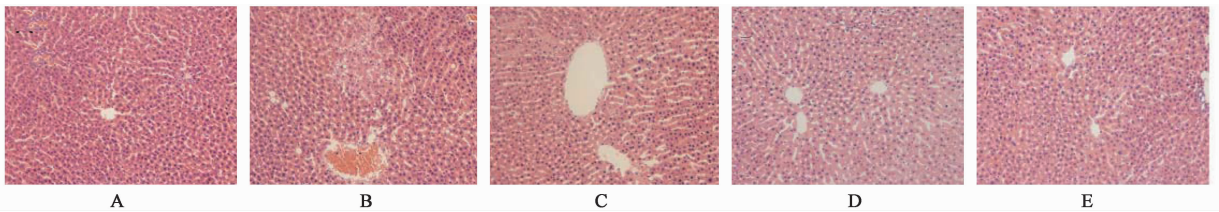
取肝组织 50 ~ 100 mg 于 1.5 mL EP 管中,每管加入 PBS 1 mL,置于冰上快速剪碎,3 000 r·min<sup>-1</sup>,4 °C 离心 5 min,弃去上清,震荡混悬,反复至上清接近无色,弃去最后上清液。根据每管沉淀量加入适量蛋白裂解液,PMSF 为蛋白磷酸酶抑制剂 (100:1:1) 混合液,用电动匀浆器于冰中匀浆,12 000 r·min<sup>-1</sup>,4 °C 离心 10 min,取上清,分装,每组取 1 支分别加入 5 × 上样缓冲液,混匀,95 °C

煮沸 10 min,配制 SDS-PAGE 凝胶电泳,用 PVDF 膜以及 NC 膜转膜,一抗 (GRP78 1:5 000, p-PERK 1:1 000, p-eIF2 $\alpha$  1:1 000, p-NF- $\kappa$ B 1:1 000, IL-1 $\beta$  1:500, TNF- $\alpha$  1:500) 4 °C 孵育过夜,二抗 (HRP 标记山羊抗小鼠二抗和 HRP 标记山羊抗兔二抗 1:3 000, HRP 标记驴抗兔荧光二抗和 HRP 标记驴抗鼠荧光二抗 1:10 000) 室温孵育 1 h, ECL 化学发光显影,或 Odyssey 双色红外激光成像系统直接成像。Image-Pro Plus 6.0, GraphPad Prism 5 软件进行分析处理。

**2.4 统计学方法** 结果均采用  $\bar{x} \pm s$  表示,运用 GraphPad Prism 5.0 统计学软件将多组样本间运用单因素方差分析,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 PNS 对各组大鼠肝脏形态的影响** HE 染色法观察结果显示,9 月龄大鼠肝脏,中央静脉周围细胞排列整齐,肝索成放射状排列。24 月龄大鼠肝脏,中央静脉周围肝细胞排列混乱,细胞内有空泡形成,并且炎性细胞增多。三七总皂苷低、中、高剂量组中央静脉周围细胞与 24 月龄相比整齐,且细胞内空泡有所减小,肝索距离也有所减小,炎性细胞也减少。见图 1。



A. 青年组; B. 自然衰老组; C ~ E. PNS 低、中、高 (10, 30, 60 mg·kg<sup>-1</sup>) 剂量组 (图 2, 3 同)

图 1 PNS 对各组大鼠肝脏形态的影响 (HE, × 200)

Fig 1 Effect of PNS on liver morphology in rats of different groups (HE, × 200)

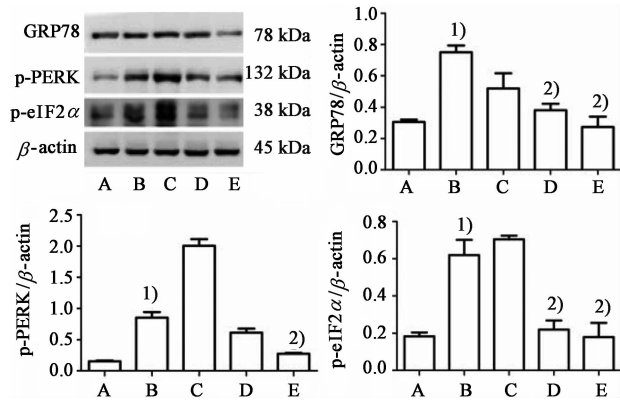
**3.2 PNS 对各组大鼠肝脏内质网应激相关因子 GRP78, p-eIF2 $\alpha$  和 p-PERK 蛋白表达的影响** 自然衰老组大鼠与青年组大鼠肝脏相比 GRP78, p-eIF2 $\alpha$  和 p-PERK 蛋白水平显著升高 ( $P < 0.01$ )。PNS 组大鼠自 18 月龄灌胃低、中、高剂量 PNS 6 个月后,灌胃低剂量 PNS 大鼠与自然衰老组大鼠肝组织相比,GRP78, p-eIF2 $\alpha$ , p-PERK 蛋白水平变化不明显。灌胃中、高剂量组相比自然衰老组 GRP78, p-eIF2 $\alpha$  蛋白水平显著下降 ( $P < 0.01$ )。而中剂量组 p-PERK 蛋白水平下降不明显,高剂量组 p-PERK 蛋白水平下降明显 ( $P < 0.01$ )。见图 2。

**3.3 PNS 对各组大鼠肝脏炎症相关因子 p-NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  蛋白表达的影响** 自然衰老组大鼠

与青年组大鼠肝脏相比 p-NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  蛋白水平显著升高 ( $P < 0.01$ )。PNS 组大鼠灌胃低、中、高剂量 PNS 后,灌胃低剂量 PNS 大鼠与自然衰老组大鼠肝组织相比 p-NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  蛋白水平变化不明显。灌胃中、高剂量组 p-NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$  蛋白水平显著降低 ( $P < 0.01$ ), 且高剂量组 p-NF- $\kappa$ B 蛋白水平下降明显 ( $P < 0.001$ )。中剂量组 IL-1 $\beta$  蛋白水平下降不明显,高剂量组 IL-1 $\beta$  蛋白水平下降明显 ( $P < 0.01$ )。见图 3。

## 4 讨论

衰老是一个慢性应激状态,随着衰老发生内质网分子伴侣损伤增多,内质网蛋白加工,处理错误和未折叠蛋白能力下降,引发内质网应激增加。有



与青年组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与自然衰老组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$  (图 3 同)  
图 2 PNS 对各组大鼠肝脏组织 GRP78, p-eIF2α 和 p-PERK 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )  
Fig 2 Effect of PNS on expression of endoplasmic reticulum stress related factors GRP78, p-eIF2α and p-PERK protein in liver tissue of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

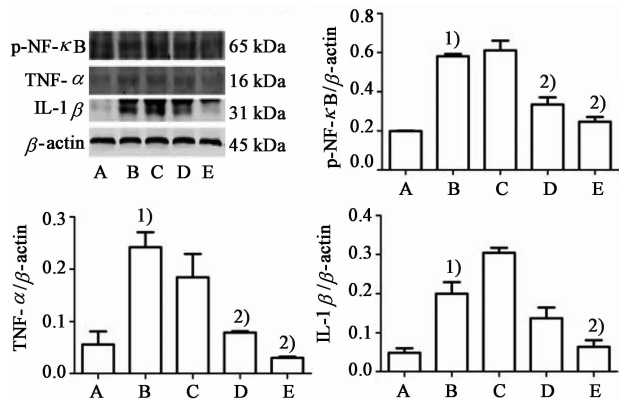


图 3 PNS 对各组大鼠肝脏组织 p-NF-κB, TNF-α 和 IL-1β 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )  
Fig 3 Effect of PNS on expression of p-NF-κB, TNF-α and IL-1β protein in liver tissue of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

研究发现衰老肝细胞 PERK/eIF2α 信号通道上调, 衰老肝细胞比年轻肝细胞显示更高的 p-eIF2α<sup>[5-6]</sup>。因此笔者可以猜测衰老肝组织可以通过内质网应激, 尤其激活 PERK/eIF2α 信号通路, 诱导炎症反应的发生。

内质网应激是由于未折叠蛋白反应 (unfolded protein response, UPR) 的激活, 介导 GRP78 及相关内质网膜上 3 种感知蛋白 1 型内质网转膜蛋白激酶 (inositol requiring enzyme 1, IRE1), p-PERK 和活化转录因子 6 (activating transcription factor 6, ATF6) 的活化, 产生一系列的级联反应<sup>[7-8]</sup>。其中 PERK 是一种 I 型跨膜蛋白, 当 PERK 激活就可以活化 eIF2α 并使其磷酸化从而抑制蛋白翻译, 使内质网应激反应减轻<sup>[9-10]</sup>。当内质网应激时间过长或者强度过大就可以导致炎症的发生, 从而激活 NF-κB。特别是

PERK 的活化可以抑制 NF-κB 抑制蛋白 (inhibitory protein of NF-κB, IκB) 的蛋白翻译, 使 NF-κB 得以游离进核, 同时也有研究表明 PERK 能够通过过表达一种 Tribble 同源蛋白 3 (tribbles homolog 3, TRIB3) 的应激相关蛋白, 这种蛋白能明显增强 NF-κB 活化。激活的 NF-κB 会引起后续的炎症发生<sup>[11]</sup>。

越来越多的研究发现, 衰老与炎症反应密切相关<sup>[12]</sup>, 并且随着衰老的发生, 炎症相关标志物如 IL-1β, TNF-α 水平不断升高。NF-κB 是参与调控众多炎症因子基因表达的一种核转录因子, 是调控炎症信号通路的开关, 能够调控 IL-1β 和 TNF-α 的激活, 引起炎症反应, 衰老影响 NF-κB 的激活<sup>[13]</sup>。

有研究发现三七可以从多角度发挥抗衰老作用, 包括清除自由基、抑制细胞凋亡、增强记忆功能、抗运动性疲劳、增强免疫功能等, PNS 是三七的主要活性成分, 其抗衰老作用更加突出<sup>[14]</sup>。

PNS 可以显著抑制促炎因子 IL-1β, TNF-α 表达<sup>[15]</sup>, 通过抑制 NF-κB 活性降低 TNF-α 表达抗炎作用, 说明 PNS 也可以通过抑制炎症减缓衰老。还有研究发现, PNS 可以抑制毒胡萝卜素引起的肝细胞内质网应激<sup>[16]</sup>, 进一步说明 PNS 可以影响肝脏的内质网应激作用。本实验通过检测衰老大鼠肝脏内质网应激及炎症相关因子来探讨 PNS 抗衰老大鼠肝脏炎症的机制。

通过研究发现自然衰老大鼠肝脏中炎症相关因子 p-NF-κB, TNF-α, IL-1β 与青年组相比显著升高, 内质网应激相关因子 GRP78, p-eIF2α, p-PERK 也显著升高。表明随着年龄的增加, 肝脏的内质网应激水平不断上升, 过高的内质网应激, 就会诱导炎症的发生。通过笔者研究发现 PNS 可以抑制衰老大鼠肝内质网应激水平, 并且可以降低衰老大鼠肝脏炎症因子 IL-1β, TNF-α 表达, 说明 PNS 对自然衰老大鼠肝脏内质网导致的炎症反应, 有一定的保护作用。综上所述, PNS 能够保护自然衰老大鼠肝脏内质网应激所致的炎症反应。这为今后临床治疗提供了实验基础。

[参考文献]

[1] 王敏君. 肝细胞的衰老特性及衰老逆转的研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2014.  
[2] Hotamisligil G S. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease [J]. Cell, 2010, 140(6): 900-917.  
[3] 谢甦, 李丽红, 李丽. 三七总皂苷抗衰老的实验研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2008, 3(2): 86-88.

- [ 4 ] 屈泽强, 谢智光, 王乃平, 等. 三七总皂苷抗衰老作用的实验研究[J]. 广州中医药大学学报, 2005, 22(2):130-133.
- [ 5 ] 冯利杰, 沈玉先, 李俊. 内质网应激与炎症[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(6):756-760.
- [ 6 ] Hussain S G, Ramaiah K V A. Reduced eIF2alpha phosphorylation and increased proapoptotic proteins in aging[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 355(2):365-370.
- [ 7 ] ZHANG K Z, Kaufman R J. Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum[J]. J Biol Chem, 2004, 279(25): 25935-25938.
- [ 8 ] Ron D. Translational control in the endoplasmic reticulum stress response[J]. J Clin Invest, 2002, 110(10):1383-1388.
- [ 9 ] Harding H P, ZHANG Y H, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase [J]. Nature, 1999, 397(6716): 271-274.
- [10] DENG J, LU P D, ZHANG Y H, et al. Translational repression mediates activation of nuclear factor kappa B by phosphorylated translation initiation factor 2[J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(23):10161-10168.
- [11] JIANG H Y, Wek S A, Mcgrath B C, et al. Phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2 is required for activation of NF-kappaB in response to diverse cellular stresses [J]. Mol Cell Biol, 2003, 23(16):5651-5663.
- [12] Rabek J P, Boylston W H, Papaconstantinou J. Carbonylation of ER chaperone proteins in aged mouse liver[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 305(3):566-572.
- [13] Lawrence T, Fong C. The resolution of inflammation; anti-inflammatory roles for NF-kappaB [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2010, 42(4):519-523.
- [14] 殷捷鸿. 中药三七抗衰老作用研究进展[J]. 中国老年学, 2016, 36(12):3060-3061.
- [15] 黄家林, 田代雄. 三七总皂苷抗炎免疫药理研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(11):4657-4660.
- [16] 余晶, 邱华, 龙富立, 等. 三七总皂苷对毒胡萝卜素引起的肝细胞内质网应激的作用[J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(7):1572-1574.

[责任编辑 邹晓翠]