

· 药理 ·

人参-三七-川芎提取物延缓高糖诱导的小鼠血管衰老的机制探讨

方靖漪¹, 王雪², 雷燕^{1,2*}, 杨静², 修成奎², 田伟³

(1. 广东药科大学 中医药研究院, 广州 510006; 2. 中国中医科学院 医学实验中心, 北京 100700;
3. 首都医科大学 附属北京中医医院, 北京 100010)

[摘要] 目的:从单磷酸腺苷活化蛋白激酶/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(AMPK/mTOR)通路探讨人参-三七-川芎提取物对高糖诱导的小鼠血管衰老的保护作用。方法:130只雄性C57BL/6小鼠先随机分为空白组和高糖组,高糖组腹腔注射链脲佐菌素(STZ),并用高脂饮食连续性喂养7个月后再随机分组,分为模型组、人参-三七-川芎提取物低剂量组(0.819 g·kg⁻¹)、人参-三七-川芎提取物高剂量组(1.638 g·kg⁻¹)及二甲双胍组(150 mg·kg⁻¹),灌胃给药,每天1次,连续9周,期间检测小鼠体质量和血糖变化。给药结束后,苏木素-伊红(HE)染色检测小鼠胸主动脉形态,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小鼠胸主动脉周期蛋白依赖激酶抑制因子2A(p16),周期依赖性蛋白激酶抑制因子1A(p21),AMPK,p-AMPK,mTOR,p-mTOR,肝激酶B1(LKB1),p-LKB1,核糖体蛋白s6激酶(p70s6k),p-p70s6k蛋白表达情况。结果:与空白组相比,模型组小鼠体质量显著降低、血糖显著升高($P < 0.01$),在药物干预9周后,各给药组小鼠体质量无明显差异,血糖值较模型组明显下降($P < 0.05, P < 0.01$)。与空白组相比,模型组内膜损伤严重且有增生,中膜明显增生且排列不整齐,给药各组内膜损伤不明显,中膜少量增生,p16,p21,mTOR,p-mTOR,p70s6k,p-p70s6k蛋白表达明显升高($P < 0.05, P < 0.01$),AMPK,p-AMPK,LKB1,p-LKB1蛋白表达明显下降($P < 0.05, P < 0.01$)。药物干预后,各给药组p16,p21,mTOR,p-mTOR,p70s6k,p-p70s6k蛋白表达明显下降($P < 0.05, P < 0.01$),AMPK,p-AMPK,LKB1,p-LKB1蛋白表达明显升高($P < 0.05, P < 0.01$)。结论:高糖能够诱导小鼠主动脉衰老,人参-三七-川芎提取物可能通过AMPK/mTOR通路改善由高糖诱导的小鼠主动脉衰老。

[关键词] 高糖;血管衰老;人参-三七-川芎提取物;单磷酸腺苷活化蛋白激酶(AMPK);哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)

[中图分类号] R285;R285.5;R543 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2019)04-0082-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190439

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181106.0952.001.html>

[网络出版时间] 2018-11-06 17:55

Extracts from Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma in Delaying High Glucose-induced Vascular Senescence in Mice

FANG Jing-yi¹, WANG Xue², LEI Yan^{1,2*}, YANG Jing², XIU Cheng-kui², TIAN wei³

(1. Research Institute of Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;
2. Experimentalt Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
3. Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100010, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effect of extracts from Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma on vascular senescence induced by high glucose in mice from adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase/mechanistic target of rapamycin (AMPK/mTOR) pathway. **Method:** A total of 130 male C57BL/6 mice were randomly divided into control group and high glucose group. The high glucose group was intraperitoneally injected with streptozocin (STZ) and fed with a high-fat diet continuously for seven months. Mice were divided into 4 groups: model group, low-dose extracts from

[收稿日期] 20181009(022)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81673822,81503448)

[第一作者] 方靖漪,在读硕士,从事中药药理学研究,E-mail:fangjy0407@163.com

[通信作者] *雷燕,研究员,博士生导师,从事中西医结合心血管研究,E-mail:13651217893@163.com

Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma ($0.819 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) group, high-dose extracts from Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma group ($1.638 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) and metformin group ($150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), and intragastrically administered once a day for nine weeks. The changes in body weight and blood glucose were measured. At the end of the administration, htoxylin eosin (HE) was performed for the detection of aortic morphology, and the expressions of cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (p16), cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21), AMPK, p-AMPK, mTOR, p-mTOR, liver kinase B1 (LKB1), p-LKB1, Ribosomal protein s6 kinase (p70s6k) and p-p70s6k proteins in mouse aorta were detected by Western blot. **Result:** Compared with blank group, mice in model group had lower body weight and higher blood glucose ($P < 0.01$). After 9 weeks of drug intervention, there was no significant difference in body weight among groups, and the blood glucose level was significantly lower than that in model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Model group showed a severe intima injury and hyperplasia, middle membrane was obviously proliferated and irregularly arranged. After drug intervention, the intimal damage of each group was not obvious, and the middle membrane was slightly proliferated. The protein expressions of p16, p21, mTOR, p-mTOR, p70s6k and p-p70s6k in model group were significantly higher than those in control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the protein expressions of AMPK, p-AMPK, LKB1 and p-LKB1 were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). After drug intervention, the protein expressions of p16, p21, mTOR, p-mTOR, p70s6k, p-p70s6k in each group were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while the protein expressions of AMPK, p-AMPK, LKB1, p-LKB1 were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** High glucose can induce vascular senescence, and extracts from Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma can improve vascular aging induced by high glucose through AMPK/mTOR pathway.

[Key words] high glucose; vascular aging; extracts from Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma; AMP-activated protein kinase (AMPK); mechanistic target of rapamycin (mTOR)

血管衰老是血管发生的退行性变化,主要表现为血管僵硬增加、顺应性降低和动脉管壁的增厚,其病理改变主要涉及到血管内皮细胞、血管平滑肌细胞和细胞外基质^[1]。糖尿病、心血管疾病等都存在血管老化的病理改变^[2]。近 30 年来,糖尿病患者的数量增长极为迅速,研究发现,高糖能够导致血管细胞衰老及血管的老化发生^[3-4],引起内皮完整性破坏、通透性增强、内皮细胞 β -半乳糖苷酶活性升高等一系列变化^[5]。单磷酸腺苷活化蛋白激酶/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (AMPK/mTOR) 通路是影响衰老的主要信号通路之一^[6],研究发现激活该通路可改善血管内皮细胞的功能障碍与衰老^[7-8],抑制平滑肌细胞 VSMC 的增殖、表型转化^[9]。肝激酶 B1 (LKB1) 是 AMPK 主要的上游激酶,磷酸化后直接激活 AMPK 使其在细胞生长,在新陈代谢和调节细胞极性中发挥关键作用。核糖体蛋白 S6 激酶 (p70s6K) 作为 mTOR 的下游底物,有助于 mTOR 调控蛋白质的翻译过程。mTOR/p70S6K 通路磷酸化水平升高, mTOR 通路持续激活将导致氧化应激和炎症反应,引起衰老^[10]。AMPK/mTOR 通路与糖代谢密切相关^[11-12],但高糖诱导的血管衰老是否经由

AMPK/mTOR 通路尚不明确。本课题组前期已证明人参-三七-川芎提取物能够在一定程度上延缓血管老化^[13-14]。因此,本实验建立高糖诱导的病理性血管衰老模型,通过观察小鼠主动脉结构变化,检测小鼠主动脉中周期蛋白依赖激酶抑制因子 2A (p16), 周期依赖性蛋白激酶抑制因子 1A (p21), AMPK, p-AMPK, mTOR, p-mTOR, LKB1, p-LKB1, p70s6k, p-p70s6k 蛋白表达情况,探讨 AMPK/mTOR 通路与高糖诱导的小鼠主动脉衰老之间的关系以及人参-三七-川芎提取物对高糖诱导的小鼠主动脉衰老的影响。

1 材料

1.1 动物 130 只 4 周龄雄性 C57BL/6 小鼠, SPF 级,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物合格证号为 SCXK(京)2016-0011,饲养于中国中医科学院中医基础理论研究所动物中心,温度 $18 \sim 22 \text{ }^\circ\text{C}$,相对湿度 40% ~ 60%。本研究经过中国中医科学院中医基础理论研究所实验动物伦理委员会批准,编号 2017-066。

1.2 药物 人参、三七、川芎按照 2:3:4 破碎成最粗粉,70% 乙醇提取,回收乙醇,浓缩、减压干燥得干

膏粉。每 1 g 干膏相当于 4.286 g 生药量,由北京因科瑞斯医药科技公司制备提供,药物为道地药材,单味药成分(人参皂苷 Rb_1 , 人参皂苷 Rg_1 , 人参皂苷 Re , 三七皂苷及阿魏酸)检测符合 2015 年版《中国药典》的规定和标准;二甲双胍(美国 Sigma 公司,批号 BCBT7573);链脲佐菌素(STZ,美国 Sigma 公司,批号 WXBC3087V)。

1.3 试剂 苏木精(美国 Amresco 公司,批号 20160702H132);伊红(美国 Sigma 公司,批号 020140505654);动物总蛋白提取试剂盒(英文特生物科技有限公司,批号 SD-001/SN-002);BCA 蛋白定量试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号 PC0020);光谱彩虹预染蛋白 Marker(美国 Thermo Fish 公司,批号 26625);超敏发光试剂盒(德国 Millipore 公司,批号 WBKLS0100);p16, p21, AMPK, mTOR, β -肌动蛋白(β -actin)兔单克隆抗体(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab51243, ab188224, ab32047, ab32028, ab16039);p-AMPK, p-mTOR, LKB1, p-LKB1 兔单克隆抗体, p70s6k, p-p70s6k 兔多克隆抗体(美国 Cell Signaling 公司,批号分别为 2535, 5536, 3047, 3482, 2708, 9208);辣根酶标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 ZB-2301)。

1.4 仪器 SK-0180-E 型水平摇床[大龙兴创实验仪器(北京)有限公司];TGL-16G 型高速离心机(上海安亭科学仪器厂);Mini PROTEAN Tetra Cell 型电泳仪, Trans-Blot SD Cell 型转膜仪, ChemiDoc 凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司);SQP 型电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]。

2 方法

2.1 造模 小鼠适应性喂养 1 周后连续喂养高脂饲料 1 个月。腹腔注射溶于无菌柠檬酸盐缓冲液的 STZ 溶液,第 1 天注射 $130 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ^[15], 3 d 后测定小鼠血糖,随机血糖水平 $> 16.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的小鼠为高糖模型^[16],未造成糖尿病模型的小鼠 5 d 后再补注 1 次 STZ 溶液($80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)^[15]。糖尿病小鼠喂食高脂饲料,空白组小鼠喂食普通饲料,7 个月月开始药物干预。

2.2 分组及干预 造模完成后空白组余 18 只,糖尿病小鼠剩余 68 只,按照血糖和体质量分层,随机分为 4 组,分别为模型组,人参-三七-川芎提取物低、高剂量组,二甲双胍组,每组 17 只。人参-三七-川芎提取物低、高剂量组分别给药 0.819, 1.638 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ^[17],分别相当于临床等效剂量及其两倍

量。二甲双胍组每日剂量为 $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ^[18]。药物剂量根据小鼠与成人体质量等效剂量换算。模型组和空白组给予相同体积的纯净水。每日给药 1 次,共给药 9 周。

2.3 体质量及血糖检测 在造模及给药过程中每周记录 1 次体质量值,每 3 周测量 1 次随机血糖值。

2.4 苏木素-伊红(HE)染色 小鼠胸主动脉切片依次放入二甲苯、乙醇、去离子水中脱蜡,苏木素液染色,1% 盐酸-乙醇分化,返蓝,伊红染色,常规脱水、透明、中性树胶封片。显微镜下观察血管壁形态。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 p16, p21, AMPK, p-AMPK, mTOR, p-mTOR, LKB1, p-LKB1, p70s6k, p-p70s6k 蛋白的表达 小鼠胸主动脉用动物总蛋白提取试剂盒提取。按 BCA 法对样品蛋白总浓度进行测定,加入 $5 \times$ Loading buffer, $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 加热 5 min。待分离胶与浓缩胶凝固后上样,进行电泳及转膜,之后用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1~2 h, TBST 洗 5 次,每次 5 min,一抗稀释比例 1:2 000, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜。TBST 洗涤 5 次,每次 5 min,二抗稀释比例为 1:3 000,室温孵育 1 h, TBST 洗涤 5 次,每次 5 min。将膜平铺在板上,滴加配置好的 ECL 反应液,曝光及扫描。以 β -actin 为内参, Image Lab 软件进行图像分析。以目标蛋白的灰度值与相应的 β -actin 的灰度值的比值反映目标蛋白的半定量的表达。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 23.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对小鼠一般状态的影响 空白组小鼠毛发紧密光滑,色泽黑,精神状态好;模型组生出少许白色毛发、无光泽,行动迟缓,精神萎靡;人参-三七-川芎提取物低、高剂量组和二甲双胍组给药后状态良好。给药过程中空白组,模型组,人参-三七-川芎提取物低、高剂量组和二甲双胍组小鼠死亡只数分别为 4, 6, 5, 4, 6 只。

3.2 人参-三七-川芎提取物对小鼠体质量的影响 药物干预之前模型组,人参-三七-川芎提取物低、高剂量组和二甲双胍组小鼠的体质量都显著低于空白组($P < 0.01$)。总体上各组小鼠的体质量随实验进程均有所增加,空白组小鼠体质量增加较为明显,而其他各组体质量增加趋势则较为缓慢。干预 9 周后,空白组体质量显著高于其他组($P < 0.01$),模型组,人参-三七-川芎提取物低、高剂量组和二甲双胍组小鼠体质量之间无明显差异。相较于干预前,各

组虽有增长但无明显差异。见表 1。

3.3 人参-三七-川芎提取物对小鼠血糖的影响
药物干预之前模型组, 人参-三七-川芎提取物低、高剂量组和二甲双胍组的血糖都高于空白组 ($P < 0.01$)。干预过程中, 空白组和模型组小鼠血糖值基本稳定, 其余各组小鼠的血糖值在总体上随实验

进程均有所降低。干预 9 周后, 模型组较空白组有显著性差异 ($P < 0.01$), 人参-三七-川芎提取物低、高剂量组和二甲双胍组较模型组有显著性差异 ($P < 0.05$)。相较于干预前, 人参-三七-川芎提取物低剂量组和二甲双胍组的血糖均显著下降 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 1 人参-三七-川芎提取物对小鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 11$)

Table 1 Effect of extracts from Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma on weight of mice ($\bar{x} \pm s, n = 11$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	干预前	干预 3 周后	干预 6 周后	干预 9 周后
空白	-	30.65 ± 2.16	30.80 ± 3.54	31.85 ± 3.35	33.48 ± 3.87
模型	-	26.64 ± 1.60 ¹⁾	26.22 ± 1.84 ¹⁾	27.25 ± 2.23 ¹⁾	27.79 ± 3.05 ¹⁾
人参-三七-川芎提取物	0.819	27.34 ± 1.53	27.52 ± 1.36	27.89 ± 1.38	28.86 ± 3.84
	1.638	26.71 ± 1.57	26.71 ± 1.60	26.78 ± 1.79	27.51 ± 3.67
二甲双胍	0.15	27.21 ± 1.64	27.98 ± 1.97	28.32 ± 1.59	28.94 ± 1.72

注: 与空白组相比¹⁾ $P < 0.01$ 。

表 2 人参-三七-川芎提取物对小鼠血糖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 11$)

Table 2 Effect of extracts from Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma on glucose of mice ($\bar{x} \pm s, n = 11$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	干预前	干预 3 周后	干预 6 周后	干预 9 周后
空白	-	5.87 ± 1.03	6.20 ± 1.42	6.37 ± 1.76	6.20 ± 1.49
模型	-	25.63 ± 4.32 ¹⁾	25.99 ± 6.13 ¹⁾	26.24 ± 6.61 ¹⁾	25.20 ± 8.52 ¹⁾
人参-三七-川芎提取物	0.819	25.23 ± 5.65	21.30 ± 6.35	21.55 ± 8.79	19.12 ± 10.60 ²⁾
	1.638	26.78 ± 5.29	20.23 ± 6.10 ²⁾	20.68 ± 7.14 ²⁾	18.92 ± 7.40 ^{2,4)}
二甲双胍	0.15	26.34 ± 4.33	19.62 ± 7.12 ²⁾	19.36 ± 5.16 ²⁾	10.45 ± 2.61 ^{2,4)}

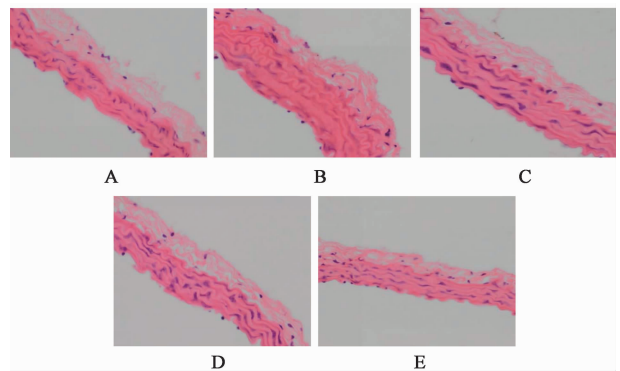
注: 与空白组相比¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组相比²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$; 与干预前相比⁴⁾ $P < 0.01$ 。

3.4 对小鼠血管组织病理学的影响 空白组小鼠血管内膜光滑连续, 细胞排列整齐, 各层结构完整清楚, 形态分布规则; 模型组内皮增生且不完整, 可见明显损伤突起, 中膜增生且排列不整齐; 各给药组内皮损伤程度较轻, 中膜少量增厚, 各层结构较为清楚, 排列较为整齐。见图 1。

3.5 对小鼠主动脉中 p16, p21, AMPK, p-AMPK, mTOR, p-mTOR, LKB1, p-LKB1, p70s6k, p-p70s6k 蛋白表达的影响 与空白组相比, 模型组 p16, p21 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$), p-mTOR/mTOR, p-p70s6k/p70s6k 平均灰度值显著升高 ($P < 0.01$), p-AMPK/AMPK, p-LKB1/LKB1 灰度值显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 人参-三七-川芎提取物低、高剂量组和二甲双胍组中 p16, p21, p-mTOR, p-p70s6k 的蛋白表达均明显下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), p-AMPK, p-LKB1 的蛋白表达均明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 3, 图 2。

4 讨论

AMPK 即 AMP 依赖的蛋白激酶, 是生物能量代



A. 空白组; B. 模型组; C. 人参-三七-川芎提取物低剂量组; D. 人参-三七-川芎提取物高剂量组; E. 二甲双胍组 (图 2 同)

图 1 人参-三七-川芎提取物对小鼠主动脉病理形态学的影响 (HE, ×400)

Fig. 1 Effect of extracts from Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma in aorta of mice (HE, ×400)

谢调节的关键分子, AMPK 是一种关键的能量感应激酶, 可调节体细胞繁殖和存活的相关过程和途径。mTOR 即哺乳动物雷帕霉素靶蛋白/雷帕霉素机能

表 3 各组小鼠主动脉中 p16, p21, p-AMPK, AMPK, p-mTOR, mTOR, p-LKB1, LKB1, p-p70s6k, p70s6k 蛋白表达情况 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Protein expressions of p16, p21, p-AMPK, AMPK, p-mTOR, mTOR, p-LKB1, LKB1, p-p70s6k, p70s6k in aorta of mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	p16/ β -actin	p21/ β -actin	p-AMPK /AMPK	p-mTOR /mTOR	p-LKB1 /LKB1	p-p70s6k /p70s6k
空白	-	0.06 ± 0.04	0.04 ± 0.01	2.62 ± 1.02	0.21 ± 0.08	1.84 ± 0.39	0.23 ± 0.06
模型	-	0.17 ± 0.03 ¹⁾	0.12 ± 0.01 ¹⁾	0.05 ± 0.02 ¹⁾	1.95 ± 0.46 ¹⁾	0.19 ± 0.11 ¹⁾	1.62 ± 0.39 ¹⁾
人参-三七-川芎 提取物	0.819	0.06 ± 0.02 ³⁾	0.04 ± 0.02 ³⁾	1.77 ± 0.79 ³⁾	1.26 ± 0.62 ²⁾	0.80 ± 0.16 ³⁾	0.35 ± 0.06 ³⁾
	1.638	0.07 ± 0.03 ³⁾	0.06 ± 0.02 ²⁾	1.41 ± 0.44 ²⁾	0.79 ± 0.45 ³⁾	1.27 ± 0.11 ³⁾	0.25 ± 0.19 ³⁾
二甲双胍	0.15	0.05 ± 0.01 ³⁾	0.05 ± 0.02 ²⁾	2.27 ± 0.67 ³⁾	0.21 ± 0.10 ³⁾	1.10 ± 0.40 ³⁾	0.38 ± 0.13 ³⁾

注:与空白组相比¹⁾ $P < 0.01$;与模型组相比²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ 。

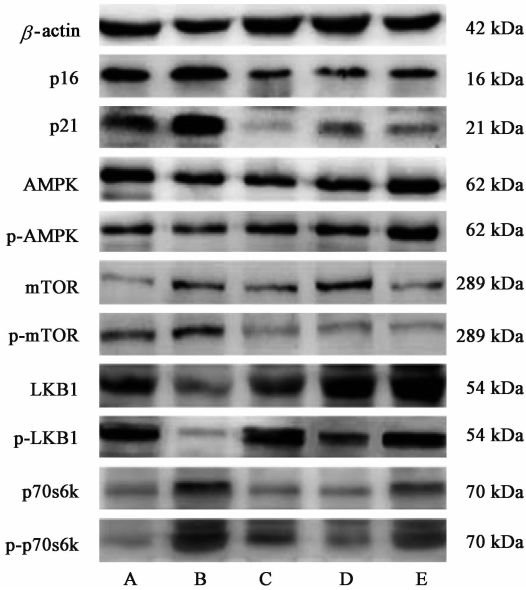


图 2 小鼠主动脉 p16, p21, AMPK, p-AMPK, mTOR, p-mTOR, LKB1, p-LKB1, p70s6k, p-p70s6k 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of protein expressions of p16, p21, AMPK, p-AMPK, mTOR, p-mTOR, LKB1, p-LKB1, p70s6k and p-p70s6k in aorta of mice

靶蛋白,是细胞内一类丝/苏氨酸(Ser/Thr)蛋白激酶。研究发现 mTOR 在衰老、糖尿病等多种疾病的发展中都发挥着重要的作用。mTOR 通过与特定的衔接蛋白相互作用,形成 2 种不同的多蛋白复合物—mTOR 复合物 1(mTORC1)和 mTOR 复合物 2(mTORC2),发挥其主要功能^[19]。AMPK 可直接磷酸化 mTORC1 的亚基 Raptor,也通过增加 TSC2 对 mTORC1 活性的抑制,来抑制 mTORC1 的活性^[20],从而延长小鼠等许多物种的寿命^[21-22]。有研究表明雷帕霉素治疗通过改善氧化应激,促进 AMPK 活化,调控与细胞周期相关的蛋白表达从而改善老年小鼠动脉功能^[23]。高糖作用于体外培养的人原代近端小管细胞,可以诱导其早衰,且衰老过程中伴随着 AMPK/mTOR 通路的下调^[24]。本研究发现,模型组的 p-AMPK/AMPK, p-mTOR/mTOR 灰度值较空

白组均有显著性差异, p-AMPK 蛋白表达显著下降,而 p-mTOR 的蛋白表达显著上升,表明 AMPK/mTOR 通路在小鼠主动脉衰老过程中起到一定作用。中药干预后, p-AMPK/AMPK, p-mTOR/mTOR 平均灰度值较模型组也有明显差异, p-AMPK 蛋白表达量上升, p-mTOR 的蛋白表达含量下降,提示人参-三七-川芎 提取物发挥作用可能是通过 AMPK/mTOR 通路实现的。

LKB1 作为 AMPK 主要的上游激酶,磷酸化后直接激活 AMPK 和其他 12 种相关激酶家族,使其在细胞生长,新陈代谢和调节细胞极性中发挥关键作用。mTOR 可以控制多种真核生物的细胞生长,是 LKB1/AMPK 通路控制的主要生长调节途径之一。p70S6K 是 mTOR 的下游底物,当 AMPK 被激活时,可通过增加 mTOR 的磷酸化抑制 mTOR 的活性,进而磷酸化其下游靶蛋白 p70S6K 来发挥相关作用^[25]。从蛋白表达含量结果来看,模型组的 p-LKB1/LKB1, p-p70s6k/p70s6k 灰度值与空白组比较有显著差异,侧面印证 AMPK/mTOR 通路在小鼠主动脉衰老过程中的作用,而中药干预后其蛋白表达含量较模型组也有明显差异,提示在中药干预过程 AMPK/mTOR 通路通过其上下游发挥作用,进而干预高糖诱导的小鼠主动脉衰老进程。

本研究通过高糖诱导构建血管衰老模型,7 个月持续性的高糖刺激下,发现主动脉衰老标志物 p16 和 p21 的蛋白表达显著上调,说明高糖能够导致小鼠主动脉老化。药物干预后,人参-三七-川芎 提取物组和二甲双胍组 p16 和 p21 的蛋白表达较模型组均有显著性下调,提示人参-三七-川芎 提取物对高糖诱导的小鼠主动脉衰老有一定疗效。

本研究发现造模之后小鼠体质量较空白组明显下降,血糖值明显上升,符合糖尿病的症状。在药物干预后中药高剂量组的血糖值较模型组也有显著性下调,人参-三七-川芎 提取物低剂量组的血糖在药

物开始干预时有下降但无明显差异,干预 9 周后也出现显著性差异,提示人参-三七-川芎提取物有一定的降糖作用,但疗效相比于二甲双胍相比仍有差距。通过 HE 染色观察主动脉形态,发现模型组内皮不完整,有明显损伤突起,中膜增生且排列不整齐,符合衰老血管的基本特征^[7],各给药组内皮损伤程度较轻,中膜少量增厚,各层结构较为清楚,排列较为整齐,提示人参-三七-川芎提取物可以改善衰老小鼠主动脉的病理学改变。

综上所述,本研究发现高糖能够诱导小鼠主动脉衰老,而人参-三七-川芎提取物能够改善由高糖引起的小鼠主动脉衰老,且可能是通过 AMPK/mTOR 通路及其上下游的共同作用来发挥作用的。

[参考文献]

[1] Paneni F, Costantino S, Cosentino F. Molecular pathways of arterial aging [J]. Clin Sci, 2015, 128 (2): 69-79.

[2] Veerasamy M, Ford G A, Neely D, et al. Association of aging, arterial stiffness, and cardiovascular disease [J]. Cardiol Rev, 2014, 22 (5): 223-232.

[3] Servillo L, D'Onofrio N, Longobardi L, et al. Stachydrine ameliorates high-glucose induced endothelial cell senescence and SIRT1 downregulation [J]. J Cell Biochem, 2013, 114 (11): 2522-2530.

[4] 颜建云,周芹,于汇民,等. 高糖激活 WNT 信号通路促进血管平滑肌细胞钙化[J]. 南方医科大学学报, 2015,35(1):29-33.

[5] 曾理,丁群芳,许婷媛,等. DNA 双链损伤修复机制在糖尿病致动脉粥样硬化中的作用研究[J]. 四川大学学报:医学版,2017,48(2):191-196.

[6] 宋朝春,魏冉磊,樊晓兰,等. 衰老及抗衰老药物的研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35 (1): 163-170.

[7] Donato A J, Morgan R G, Walker A E, et al. Cellular and molecular biology of aging endothelial cells [J]. J Mol Cell Cardiol, 2015, 89: 122-135.

[8] LI G H, LIN X, ZHANG H, et al. Ox-Lp (a) transiently induces HUVEC autophagy via an ROS-dependent PAPR-1-LKB1-AMPK-mTOR pathway [J]. Atherosclerosis, 2015, 243(1): 223-235.

[9] ZHAN J, WANG Y, WANG Y, et al. Adiponectin attenuates the osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells through the AMPK/mTOR pathway [J]. Exp Cell Res, 2014, 323(2): 352-358.

[10] YANG Z, MING X. mTOR signalling: the molecular interface connecting metabolic stress, aging and cardiovascular diseases [J]. Obes Rev, 2012, 13: 58-68.

[11] Umezawa S, Higurashi T, Nakajima A. AMPK: therapeutic target for diabetes and cancer prevention [J]. Curr Pharm Des, 2017, 23 (25): 3629-3644.

[12] Maiese K. Novel nervous and multi-system regenerative therapeutic strategies for diabetes mellitus with mTOR [J]. Neural Regen Res, 2016, 11 (3): 372-385.

[13] 王强,雷燕,欧阳竞锋,等. 人参三七川芎提取物对复制性衰老内皮细胞微丝形态学的影响[J]. 中医杂志,2015,56(8):699-703.

[14] 修成奎,雷燕,王强,等. 人参三七川芎提取物对复制性衰老血管平滑肌细胞 SM22 α 蛋白的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(11):102-106.

[15] Rodriguez-Sosa M, Cabellos-Avelar T, Sanchez-Zamora Y, et al. Proinflammatory cytokine MIF plays a role in the pathogenesis of type-2 diabetes mellitus, but does not affect hepatic mitochondrial function [J]. Cytokine, 2017, 99: 214-224.

[16] 钟丹,殷瑜,戈梅,等. 益生菌促进阿卡波糖降低糖尿病小鼠餐后血糖的研究[J]. 中国医药生物技术, 2016,11(5):441-445.

[17] 景晓杨,雷燕,修成奎. 人参三七川芎提取物对衰老大鼠免疫器官及行为学的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(22):184-187.

[18] LI M, Sharma A, YIN C, et al. Metformin ameliorates hepatic steatosis and improves the induction of autophagy in HFD-induced obese mice [J]. Mol Med Rep, 2017, 16 (1): 680-686.

[19] Almeida A J P O, Ribeiro T P, Medeiros I A D. Aging: molecular pathways and implications on the cardiovascular system [J]. Oxid Med Cell Longev, 2017, 2017 (6): 1-19.

[20] Templeman N M, Murphy C T. Regulation of reproduction and longevity by nutrient-sensing pathways [J]. J Cell Biol, 2018, 217 (1): 93-106.

[21] QIN N, WEI L W, LI W Y, et al. Local intra-articular injection of resveratrol delays cartilage degeneration in C57BL/6 mice by inducing autophagy via AMPK/mTOR pathway [J]. J Pharmacol Sci, 2017, 134 (3): 166-174.

[22] Apfeld J. The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in *C. elegans* [J]. Genes Dev, 2004, 18 (24): 3004-3009.

[23] Lesniewski L A, Seals D R, Walker A E, et al. Dietary rapamycin supplementation reverses age-related vascular dysfunction and oxidative stress, while modulating nutrient-sensing, cell cycle, and senescence pathways [J]. Aging Cell, 2017, 16 (1): 17-26.

[24] DONG D, CAI G, NING Y, et al. Alleviation of senescence and epithelial-mesenchymal transition in aging kidney by short-term caloric restriction and caloric restriction mimetics via modulation of AMPK/mTOR signaling [J]. Oncotarget, 2017, 8 (10): 16109-16121.

[25] Johnson S C, Rabinovitch P S, Kaeberlein M. mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease [J]. Nature, 2013, 493 (7432): 338-345.

[责任编辑 孙丛丛]