

• 药理与临床 •

银杏二萜内酯通过拮抗 PAFR 和调节 SIRT1/STAT3 抑制氧化应激诱导的 PC12 神经元衰老研究

杜雨芯¹, 操娇娇¹, 张倩霞², 杨颖博^{2,3}, 吴伟³, 肖保国^{4*}, 肖伟^{1,3*}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210046

2. 上海中医药大学中药研究所, 上海 201203

3. 江苏康缘药股份有限公司, 江苏 连云港 222001

4. 复旦大学附属华山医院 神经病学研究所, 上海 200040

摘要: **目的** 探讨银杏二萜内酯 (ginkgo diterpene lactone, GDL) 对氧化应激诱导的细胞衰老的保护作用及机制。方法 建立 H₂O₂ 诱导 PC12 神经元衰老细胞模型, 分别给予血小板活化因子拮抗剂 WEB-2086 或 GDL 预处理, 采用 CCK-8 试剂盒检测细胞活性; β -半乳糖苷酶染色法检测衰老细胞率; DAPI 染色法观察细胞平均核体积; Western blotting 检测 p21、p53、核纤层蛋白 B1 (Lamin B1)、血小板活化因子受体 (platelet activating factor receptor, PAFR)、沉默调节蛋白 1 (Sirtuin 1, SIRT1)、磷酸化信号转导和转录激活蛋白 3 (phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3, p-STAT3)、脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、神经营养因子 3 (neurotrophin 3, NT3) 和神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 蛋白表达; TUNEL 染色法观察细胞凋亡。**结果** 与对照组比较, 模型组显著降低了细胞的活性 ($P < 0.05$), 衰老细胞数显著增加 ($P < 0.01$), PAFR 表达显著升高 ($P < 0.001$)。与模型组比较, WEB-2086 显著抑制 PAFR 表达 ($P < 0.001$), 显著升高 SIRT1 蛋白表达 ($P < 0.05$), 显著减少 β -半乳糖苷酶衰老细胞率 ($P < 0.05$); GDL 显著升高了细胞活力 ($P < 0.05$), 显著上调 Lamin B1、SIRT1、BDNF、NT3 的表达 ($P < 0.05, 0.01$), 显著下调 PAFR、p-STAT3、p21、p53 蛋白表达 ($P < 0.05, 0.01$)。**结论** GDL 可以保护神经元并抑制细胞凋亡, 延缓 H₂O₂ 代表的氧化应激诱导 PC12 神经元的衰老, 其机制可能与拮抗 PAFR、调节 SIRT1/STAT3 信号通路有关。

关键词: 银杏二萜内酯; 血小板活化因子受体; 应激诱导的早衰; SIRT1/STAT3 信号通路; 凋亡

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2023)09-2793-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.09.012

Ginkgo diterpene lactones inhibit oxidative stress-induced PC12 neuronal aging by antagonizing PAFR and regulating SIRT1/STAT3

DU Yu-xin¹, CAO Jiao-jiao¹, ZHANG Qian-xia², YANG Ying-bo^{2,3}, WU Wei³, XIAO Bao-guo⁴, XIAO Wei^{1,3}

1. School of Pharmacy, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

2. Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

3. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

4. Institute of Neurology, Huashan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200040, China

Abstract: Objective To explore the protective effect and mechanism of ginkgo diterpene lactone (GDL) on cell senescence induced by oxidative stress. **Methods** The cell model of PC12 neuron aging induced by H₂O₂ was established, and platelet activating factor antagonist WEB-2086 or GDL was pretreated respectively, cell activity was detected by CCK-8 kit; β -Galactosidase staining was used to detect the aging cell rate; The average nuclear volume of cells was observed by DAPI staining; p21, p53, Lamin B1, platelet

收稿日期: 2023-02-15

基金项目: 2021 年国家中医药管理局青年岐黄学者项目

作者简介: 杜雨芯, 硕士研究生, 研究方向为神经保护及抗衰老。Tel: 18851865037 E-mail: duyuxin7022@163.com

*通信作者: 肖保国, 教授, 博士生导师, 研究方向为神经免疫炎症及神经保护。Tel: 13816927975 E-mail: bgxiao@shmu.edu.cn

肖伟, 中国工程院院士, 研究员, 博士生导师, 从事中药新药研发及过程控制研究。Tel: 18205135220 E-mail: kanionlunwen@163.com

activating factor receptor (PAFR), Sirtuin 1 (SIRT1), phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3 (p-STAT3), brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurotrophic factor 3 (NT3) and nerve growth factor (NGF) protein expressions were detected by Western blotting; Apoptosis was observed by TUNEL staining. **Results** Compared with control group, the activity of cells in model group was significantly decreased ($P < 0.05$), the number of aging cells was significantly increased ($P < 0.01$) and the expression of PAFR was significantly increased ($P < 0.001$). Compared with model group, WEB-2086 significantly inhibited the expression of PAFR ($P < 0.001$), significantly increased the expression of SIRT1 protein ($P < 0.05$), and significantly reduced the aging cell rate of β -galactosidase ($P < 0.05$). GDL significantly increased the cell viability ($P < 0.05$), significantly increased the expressions of Lamin B1, SIRT1, BDNF and NT3 ($P < 0.05, 0.01$), and significantly decreased the expressions of PAFR, p-STAT3, p21 and p53 ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** GDL can protect neurons, inhibit apoptosis and delay the aging of PC12 neurons induced by oxidative stress represented by H_2O_2 , and its mechanism may be related to antagonizing PAFR and regulating SIRT1/STAT3 signaling pathway. **Key words:** ginkgo diterpene lactone; platelet activating factor receptors; stress-induced premature senescence; SIRT1/STAT3 signaling pathway; apoptosis

衰老是一个不可避免又普遍存在的生命过程^[1],也是一个由多种生物和遗传途径调控的复杂的生理过程^[2]。衰老直接影响机体寿命,引发几乎所有年龄相关疾病,主要包括免疫系统疾病、神经退行性疾病、心血管疾病、肌肉骨骼疾病和癌症等^[2]。寻找靶向衰老机制和改善健康延长寿命的药物已成为该领域的研究热点^[2]。细胞衰老是衰老的一个重要特征,可分为复制性衰老(reproductive senescence, RS)、应激诱导的早衰(stress-induced premature senescence, SIPS)、胚胎发育过程中发生的程序性衰老(programmed senescence, PS)、癌基因诱导的衰老(oncogene-induced senescence, OIS)和治疗诱导的癌细胞衰老(treatment induces cancer cellular senescence, TIS)等^[3]。体外实验通常采用连续传代的RS细胞和药物刺激导致的SIPS细胞^[3-4]。RS过程相对缓慢,因此常用诱导SIPS的方式加速细胞衰老,其中 H_2O_2 是最常用的SIPS诱导剂之一,对多种细胞衰老都有效^[5],因此被选作本实验的细胞衰老诱导剂进行氧化应激诱导的衰老研究。

沉默调节蛋白1(Sirtuin 1, SIRT1)可以通过抑制氧化应激、减少炎症反应和恢复线粒体功能障碍等,治疗衰老相关疾病,被广泛研究为减轻衰老诱导的疾病的潜在治疗靶点^[6-7]。在氧化应激过程中,SIRT1/信号转导和转录激活蛋白3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)信号通路发挥着重要的作用,调节细胞的增殖和凋亡^[8-10]。因此推测 H_2O_2 诱导的衰老机制可能与SIRT1/STAT3信号通路有关。此外,血小板活化因子受体(platelet activating factor receptor, PAFR)也是参与氧化应激的一个重要靶点,拮抗PAFR可以抑制血小板聚集,减轻炎症、氧化应激和细胞凋

亡^[11],同样具有重要的研究价值。研究发现,PAFR与SIRT1具有反向相关性^[12-13],这预示着拮抗PAFR可能通过调节SIRT1来减轻衰老。神经营养因子是一种蛋白质家族,可以促进神经元存活,改善突触功能和神经递质释放,并促进中枢和外周神经系统内轴突的可塑性和生长,常见于神经损伤的研究^[14]。据报道,SIRT1可以激活脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF),促进神经元生长和损伤修复^[15]。因此本研究还检测了BDNF以及与其功能相似的神经营养因子3(neurotrophin 3, NT3)。这2种神经营养因子常在神经损伤研究联合检测^[16]。

中医药因其滋补保健且无严重不良反应的特点,在抗衰老研究中越来越受到重视。研究报道,具有抗氧化活性的中药天然产物可以通过一系列信号系统防治氧化应激和氧化还原来源的应激源诱发的多种疾病(包括衰老),并改善能够减缓细胞衰老的许多存活基因和功能,发挥其抗衰老作用^[17]。银杏二萜内酯(ginkgo diterpene lactone, GDL)注射液是国际上首个以PAFR为靶点的上市创新中药,主要由银杏内酯A(ginkgolide A, GA)、银杏内酯B(ginkgolide B, GB)、银杏内酯K(ginkgolide K, GK)组成,能够抑制血小板聚集和氧自由基,常用于治疗脑缺血再灌注损伤^[18],具有活血通络的功效^[19]。虽然GDL常用于研究氧化应激的病理损伤^[20],其拮抗PAFR在治疗神经退行性疾病中也有明确的效果^[21],但国内外暂未报道其在抗衰老中的作用,因此推测GDL可能成为一种潜在的具有抑制氧化应激诱导的衰老的药物。本研究探讨GDL是否具有拮抗氧化应激诱导的神经元衰老的作用,并进一步研究其作用的机制,以拓展GDL的其他药用价值。

1 材料

1.1 细胞

PC12 细胞由康缘药业股份有限公司赠送。

1.2 药品与试剂

3% H₂O₂ (批号 STBH9407)、Triton X-100 (批号 SLBW7103) 购自美国 Sigma 公司; GDL 按银杏二萜内酯葡胺注射液比例配制, 由 GB、GK、GA 按配比 62 : 3 : 35 组成; GA (批号 110862-201612, 质量分数为 97.4%) 购自中国食品药品鉴定研究院; GB (批号 J13HB174184, 质量分数 ≥ 98%)、GK (批号 J12HB184945, 质量分数 ≥ 98%) 购自上海源叶生物科技有限公司; 血小板活化因子拮抗剂 WEB-2086 (批号 SC-201007) 购自美国 Santa Cruz 公司; DMEM 培养基 (2318854) 购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, 批号 M0525C)、青霉素和链霉素 (批号 PWL062-Nov-10G)、二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO, 批号 O1028A) 购自大连美仑生物技术有限公司; 胰酶细胞消化液 (批号 C0203)、PBS (批号 ST447-1L)、CCK-8 试剂盒 (批号 C0043)、β-半乳糖苷酶染色试剂盒 (批号 C0602)、磷酸酶抑制剂 (批号 P1045)、蛋白酶抑制剂 PMSF (批号 ST505)、RIPA 裂解液 (批号 P0013B)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号 P0012)、5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (批号 P0015L)、脱脂奶粉 (批号 P0216)、BeyoECL Moon 增强化学发光试剂盒 (批号 P0018FM)、抗体稀释液 (批号 AZ050) 购自上海碧云天生物技术公司; 生物微量 NT 硝化纤维素膜 (批号 57444203) 购自美国 Pall Corporation 公司; p53 抗体 (1 : 1000, 批号 2524)、核纤层蛋白 B1 (Lamin B1) 抗体 (1 : 1000, 批号 13435)、SIRT1 抗体 (1 : 1000, 批号 9475)、p-STAT3 抗体 (1 : 1000, 批号 9145)、β-actin 抗体 (1 : 1000, 批号 3700)、抗兔二抗 (1 : 1000, 批号 7074)、抗小鼠二抗 (1 : 1000, 批号 7076) 购自美国 CST 公司; p21 抗体 (1 : 1000, 批号 ab109199)、PAFR 抗体 (1 : 1000, 批号 ab104162)、BDNF 抗体 (1 : 400, 批号 ab108319)、NT3 抗体 (1 : 1000, 批号 ab263864)、神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 抗体 (1 : 1000, 批号 ab52918) 购自英国 Abcam 公司; TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (批号 C10618)、DAPI 核酸染料 (批号 D1306) 购自美国 Invitrogen 公司; 4%多聚甲醛 (批号 69120900) 购自 Biosharp 公司; 甘油 (批号 P1870750) 购自 General-Reagent 公司。

1.3 仪器

Flex Station3 型酶标仪 (美国 Molecular Devices

公司); Countess® II 型细胞计数仪 (美国 Invitrogen 公司); OKIL 型倒置显微镜、D-35578 型荧光显微镜 (德国 Leica 公司); TU-10 型恒温金属浴 (上海一恒科技有限公司); XS105 型电子分析天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司); Multifuge X1R 型高速冷冻离心机、1384 型生物安全柜、371 型 CO₂ 培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); ChemiDoc™ XRS+ 多功能化学发光仪、PowerPac™ HC 蛋白印迹转印系统 (美国 Bio-Rad 公司); DHG-9140A 型电热恒温鼓风干燥箱 (上海精宏实验设备有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

PC12 细胞复苏后, 用含 10% FBS 的 DMEM 培养基培养。待细胞长满 80%, 弃去培养液, 加入 PBS 轻轻荡洗, 弃去荡洗液, 加入胰酶, 消化细胞, 弃去消化液, 并加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基终止消化, 离心弃上清, 加入含 10% FBS、1% 青霉素和链霉素的 DMEM 培养基, 轻轻吹打成单细胞悬液, 传代于新的培养皿中, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 每 2 天更换 1 次培养液, 取对数生长期的 PC12 细胞用于实验。

2.2 CCK-8 检测细胞活性

取对数生长期的 PC12 细胞, 以 2×10⁵ 个/mL 接种于 96 孔板, 待细胞完全贴壁后, 用 0~600 μmol/L H₂O₂ 处理 24 h, 或在 300 μmol/L H₂O₂ 处理前 3 h 加入 0~100 μg/mL GDL, 对照组为不含药物的培养基, 随后各孔更换新鲜培养基并加入 10 μL CCK-8 工作液, 在 37 °C 培养箱中避光孵育 4 h。用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

2.3 β-半乳糖苷酶染色

取对数生长期的 PC12 细胞, 以 2×10⁵ 个/mL 接种于 24 孔板的爬片上, 待细胞贴壁后, 用 300 μmol/L H₂O₂ 处理 24 h, 或在 300 μmol/L H₂O₂ 处理前 3 h 加入 30 μmol/L PAF 抑制剂 WEB-2086 或 50 μg/mL GDL, 另设置不含药物的对照组。给药结束后用 PBS 洗涤爬片 3 次, 用试剂盒中的固定液常温孵育 15 min, 然后在 37 °C 的染色溶液中孵育 24 h。最后, 用 PBS 洗涤 3 次, 覆盖载玻片后用正置显微镜直接成像, 用 Image J 软件分析, 计算 β-半乳糖苷酶阳性细胞率。

$$\beta\text{-半乳糖苷酶阳性细胞率} = \text{阳性细胞数} / \text{细胞总数}$$

2.4 DAPI 荧光染色

取对数生长期的 PC12 细胞, 以 2×10⁵ 个/mL

接种于 24 孔板的爬片上, 待细胞贴壁后, 用 300 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理 24 h, 或在 300 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理前 3 h 加入 50 $\mu\text{g/mL}$ GDL, 另设置不含药物的对照组。给药结束后用 PBS 洗涤爬片 3 次, 用 4% 多聚甲醛常温孵育 15 min, 随后用 PBS 清洗 3 次, 最后直接用 DAPI 染料进行染色, 室温孵育 5 min。最后, 用 PBS 洗涤样品 3 次, 覆盖载玻片后用 50% 甘油封片。在荧光显微镜下直接成像, 用 Image J 软件进行分析, 计算平均细胞核体积。

平均细胞核体积 = 细胞核体积 / 细胞总数

2.5 Western blotting 检测 p16、p21、p53、Lamin B1、PAFR、SIRT1、p-STAT3、BDNF、NT3 和 NGF 蛋白表达

取对数生长期的 PC12 细胞, 以 6×10^5 个/mL 接种于培养皿中, 待细胞贴壁后, 用 300 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理 24 h, 或在 300 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理前 3 h 加入 30 $\mu\text{mol/L}$ PAF 抑制剂 WEB-2086 或 50 $\mu\text{g/mL}$ GDL, 另设置不含药物的对照组。给药结束后加入细胞裂解液, 于冰上裂解 30 min, 4 $^\circ\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 测定蛋白含量。加入 $5 \times$ SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液, 蛋白变性后, 蛋白样品经 10% 或 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 孵育对应的一抗过夜, 然后孵育二抗, 利用 BeyoECL Moon 增强化学发光试剂

盒显影, 采用凝胶成像仪、Quantity One 软件进行可视化, Image J 软件分析目标条带灰度值。

2.6 TUNEL 检测细胞凋亡

取对数生长期的 PC12 细胞, 以 2×10^5 个/mL 接种于 24 孔板的爬片上, 待细胞贴壁后, 用 300 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理 24 h, 或在 300 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理前 3 h 加入 50 $\mu\text{g/mL}$ GDL, 另设置不含药物的对照组。给药结束后, PBS 洗涤 1 次, 用 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min, 再用 PBS 洗涤 1 次; 用含 0.3% Triton X-100 的 PBS 室温孵育 5 min, 按说明书配制 TUNEL 检测液, 37 $^\circ\text{C}$ 避光孵育 60 min。清洗后与 DAPI 共染 5 min。最后覆盖载玻片, 用 50% 甘油封片。在倒置荧光显微镜下观察染色结果, 采用 Image J 软件将 TUNEL 染色图片与 DAPI 染色图片进行 Merge。采用 Image J 软件进行分析, 计算细胞凋亡率。

细胞凋亡率 = 凋亡细胞数 / 总细胞数

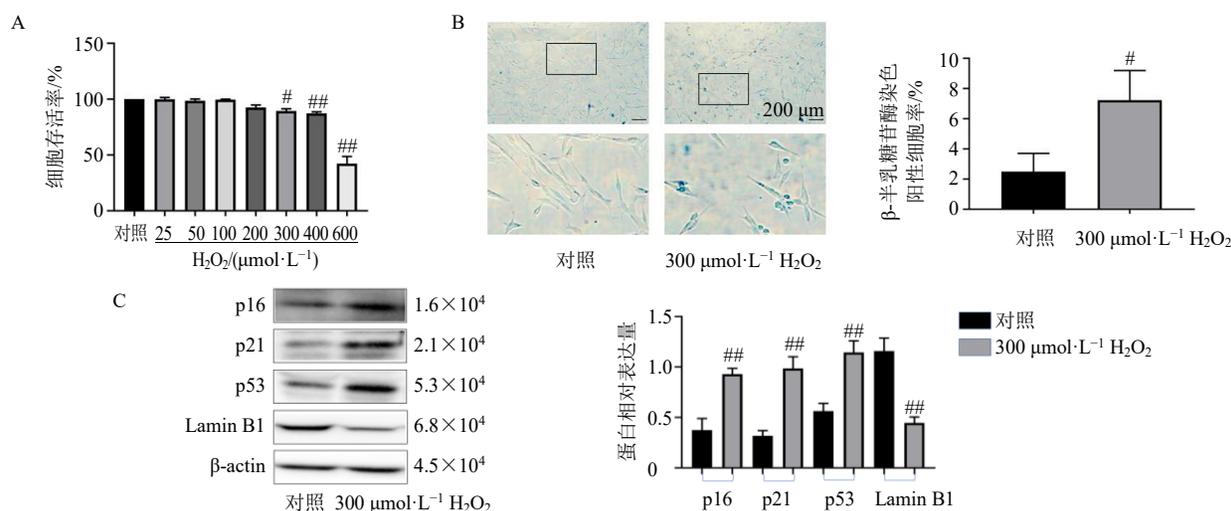
2.7 统计学分析

数据处理采用 GraphPad prism 8.0.2 软件, 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 Students' *t* 检验两组间的数据比较, 当 3 组或 3 组以上比较时用单因素方差分析后, 采用 Dunnett's 检验。

3 结果

3.1 H_2O_2 诱导 PC12 神经元衰老模型的建立

如图 1-A 所示, 与对照组比较, 300~600 $\mu\text{mol/L}$



A-不同浓度 H_2O_2 处理 24 h 对 PC12 细胞活力的影响 ($n=4$) B-300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 对 PC12 细胞 β -半乳糖苷酶染色阳性细胞率的影响 ($n=3$, $\times 200$, 下图为框内放大 3.5 倍) C-300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 对 PC12 细胞 p16、p21、p53 和 Lamin B1 蛋白表达的影响 ($n=3$) 与对照组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$

A-effect of H_2O_2 with different concentrations on viability of PC12 cells for 24 h ($n=4$) B-effect of 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 on β -galactosidase staining positive rate of PC12 cells ($n=3$, $\times 200$, the picture below shows the enlargement of frame by 3.5 fold) C-effect of 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 on p16, p21, p53 and Lamin B1 protein expressions in PC12 cells ($n=3$) [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs control group

图 1 H_2O_2 诱导细胞衰老的模型条件

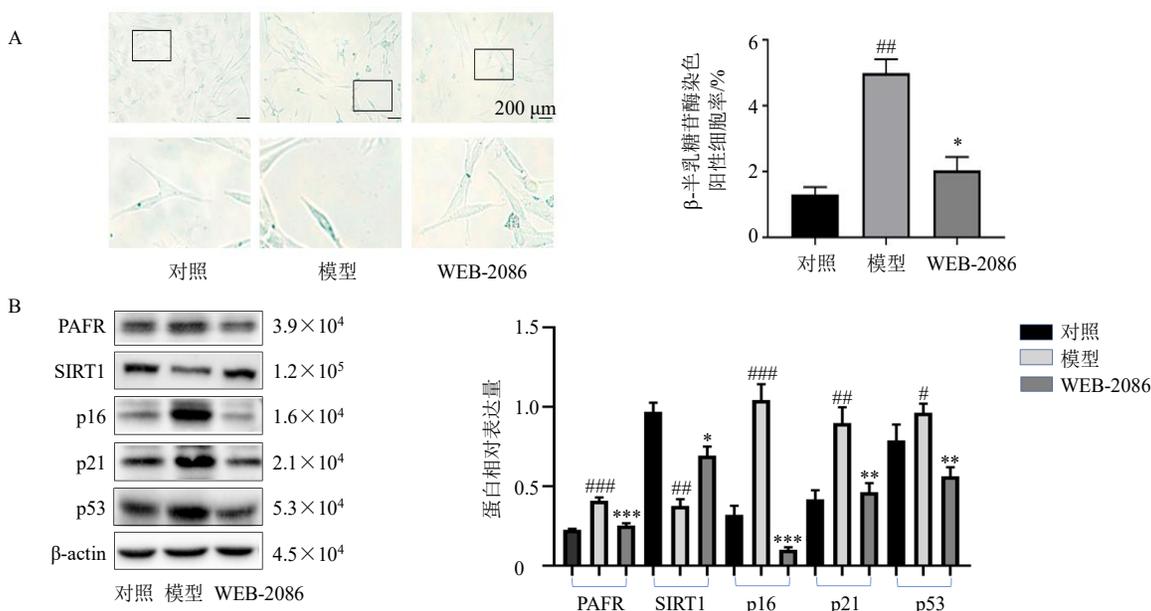
Fig. 1 Model conditions for H_2O_2 -induced cellular senescence

H₂O₂ 明显抑制细胞活力 ($P < 0.05, 0.01$); 300 μmol/L H₂O₂ 可显著增加 β-半乳糖苷酶染色阳性细胞数量 ($P < 0.05$, 图 1-B), 显著激活 p16、p21、p53 蛋白表达 ($P < 0.01$), 并抑制 Lamin B1 蛋白表达 ($P < 0.01$, 图 1-C)。因此本实验选择 300 μmol/L H₂O₂ 处理细胞 24 h 建立 PC12 神经元衰老模型。

3.2 PAFR 与 SIRT1 以及衰老的关系

如图 2 所示, 与对照组比较, H₂O₂ 可以显著激

活 PAFR ($P < 0.001$), 并抑制 SIRT1 的表达 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 30 μmol/L 血小板活化因子拮抗剂 WEB-2086 显著抑制 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞中 PAFR、p16、p21 和 p53 的激活 ($P < 0.01, 0.001$), 上调 SIRT1 表达 ($P < 0.05$), 减少 β-半乳糖苷酶染色阳性细胞数量 ($P < 0.05$)。因此推测拮抗 PAFR 可能上调 SIRT1, 延缓氧化应激诱导的细胞衰老。



A-WEB-2086 对 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞 β-半乳糖苷酶染色阳性细胞率的影响 ($n=3, \times 200$, 下图为框内放大 3.5 倍) B-WEB-2086 对 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞 SIRT1 及衰老相关蛋白 p16、p21 和 p53 表达的影响 ($n=3$) 与对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

A-effect of WEB-2086 on β-galactosidase staining positive cells rate in H₂O₂-induced PC12 cells ($n = 3, \times 200$, the picture below shows the enlargement of frame by 3.5 fold) B-effect of WEB-2086 on SIRT1 and aging-related proteins p16, p21 and p53 expressions in H₂O₂-induced in PC12 cells ($n = 3$) # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group

图 2 拮抗 PAFR 可能延缓细胞衰老

Fig. 2 Antagonizing PAFR may delay cell senescent

3.3 GDL 抑制 H₂O₂ 诱导的 PC12 神经元衰老

3.3.1 GDL 给药条件 在 H₂O₂ 处理前给予不同质量浓度 GDL 干预 3 h, 随后再与 H₂O₂ 共同处理细胞 24 h, 细胞活力出现不同程度恢复 (图 3), 与模型组比较, 50 μg/mL GDL 显著上调细胞活力 ($P < 0.05$)。因此后续实验 GDL 质量浓度选择 50 μg/mL, 预给药 3 h 后继续给药 24 h。

3.3.2 GDL 减轻细胞衰老 β-半乳糖苷酶染色及 DAPI 核染结果 (图 4-A) 显示, GDL 可以减少 H₂O₂ 诱导的 β-半乳糖苷酶染色阳性细胞数 ($P < 0.01$), 并且抑制细胞核体积增大 ($P < 0.05$)。如图 4-B 所示, GDL 可以逆转 H₂O₂ 诱导的 p16、p21 和 p53 表达的升高以及 Lamin B1 表达的减少 ($P < 0.05, 0.01$)。

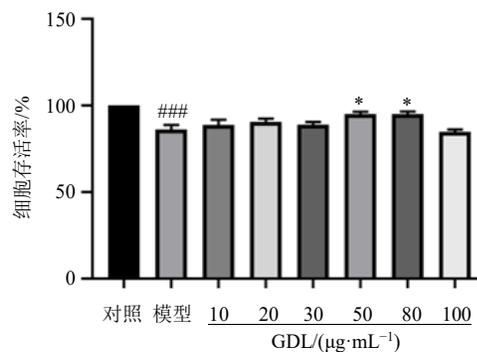
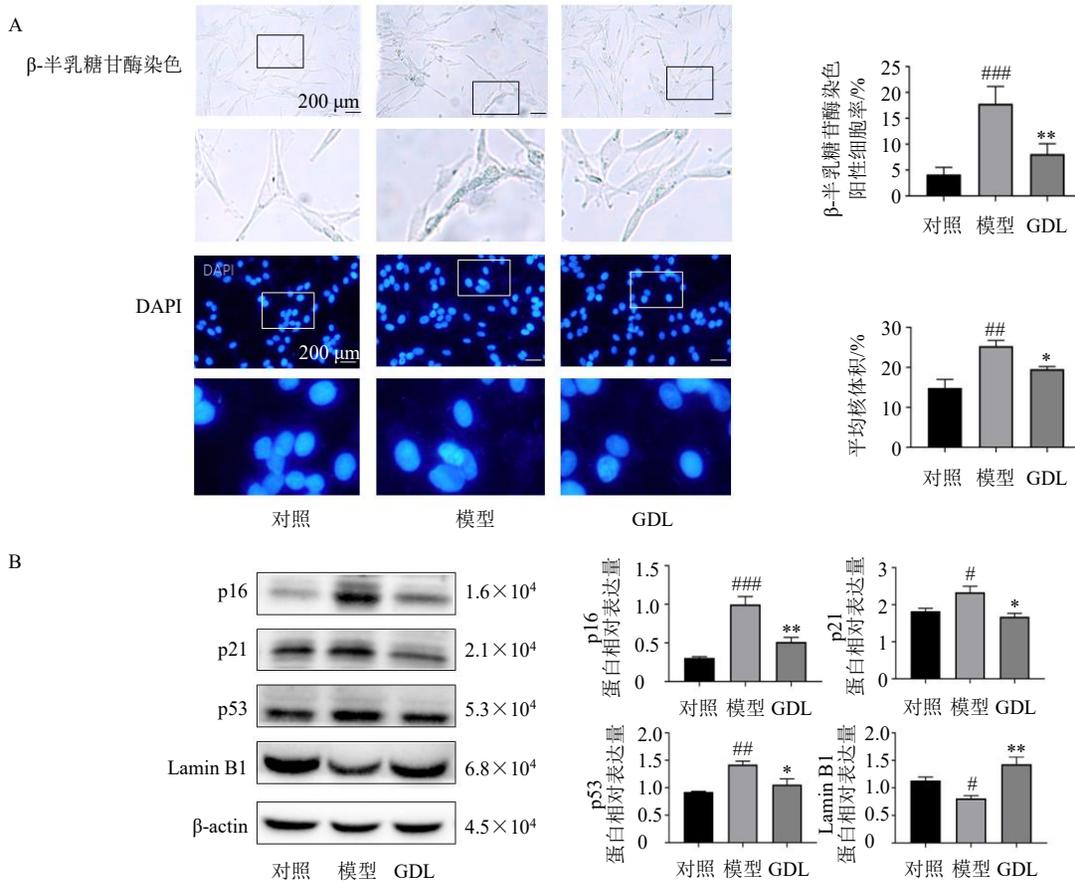


图 3 不同质量浓度的 GDL 对衰老细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 3 Effects of different concentrations of GDL on senescent cell viability ($\bar{x} \pm s, n = 5$)



A-GDL 对 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞 β-半乳糖苷酶染色阳性细胞率及平均核体积的影响 (n=3, ×200, 下图分别为框内放大 3.5、3 倍) B-GDL 对 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞 p16、p21、p53 和 Lamin B1 蛋白表达的影响 (n=3)

A-effect of GDL on positive rate of β-galactosidase staining and average nuclear volume of H₂O₂-induced PC12 cells (n = 3, × 200, the following images are enlarged by 3.5 and 3 times respectively in the frame) B-effect of GDL on p16, p21, p53 and Lamin B1 protein expressions in H₂O₂-induced PC12 cells (n = 3)

图 4 GDL 的抗衰老作用

Fig. 4 Anti-aging effects of GDL

上述结果表明, GDL 可以抑制 PC12 神经元因氧化应激引起的衰老。

3.4 GDL 抑制 PAFR 表达并调节 SIRT1/STAT3 信号通路

SIRT1/STAT3 是重要的氧化应激通路。如图 5 所示, GDL 可以拮抗 H₂O₂ 诱导的 PAFR 表达 (P<0.05), 上调 SIRT1 表达 (P<0.01), 下调 p-STAT3

表达 (P<0.05), 即 GDL 可能通过拮抗 PAFR, 抑制 SIRT1/STAT3 信号通路的激活。

3.5 GDL 对神经元细胞的保护作用

3.5.1 GDL 抑制 PC12 神经元的凋亡 SIRT1/STAT3 信号通路的激活可以诱导细胞凋亡。用 TUNEL 染色法检测细胞凋亡, 如图 6 所示, 与对照组比较, 模型组凋亡细胞数量增多 (P<0.01); 与

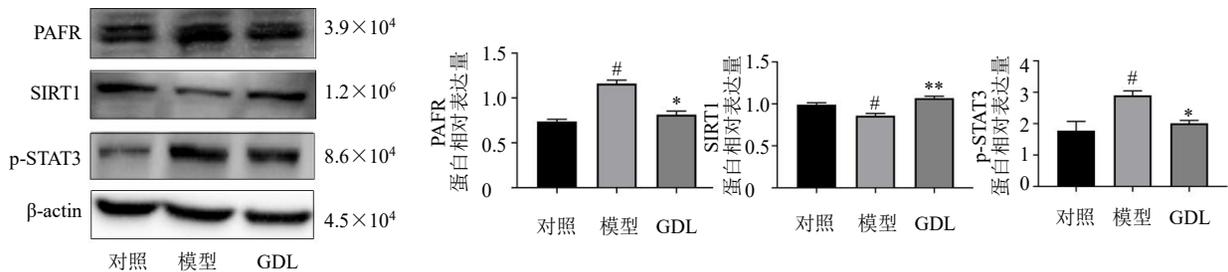


图 5 GDL 拮抗 PAFR 并调节 SIRT1/STAT3 信号通路 (x̄ ± s, n = 3)

Fig. 5 GDL antagonizes PAFR and regulates SIRT1/STAT3 signaling pathway (x̄ ± s, n = 3)

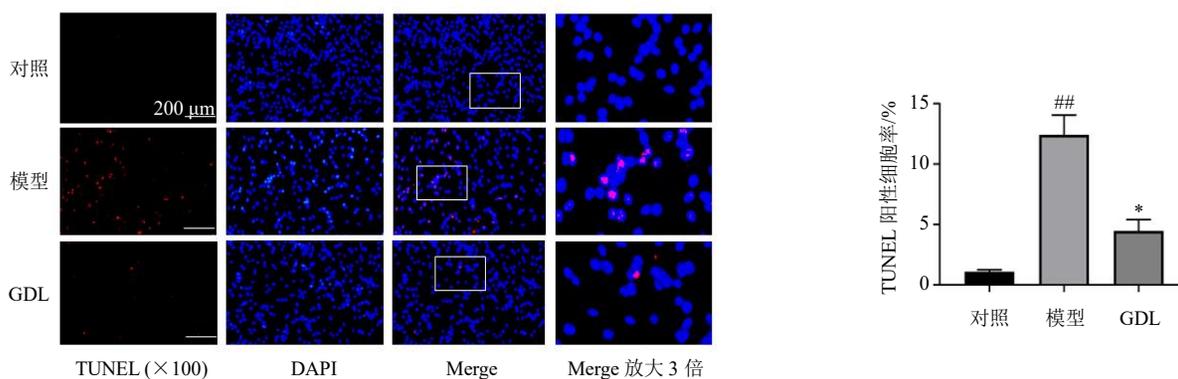


图6 GDL抑制PC12神经元的凋亡 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 GDL inhibits apoptosis of PC12 neurons ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

模型组比较, GDL组凋亡细胞数量明显减少 ($P < 0.05$), 提示GDL抑制氧化应激引起的细胞凋亡。

3.5.2 GDL促进神经营养因子的分泌 神经营养因子可以促进神经元的生长和损伤修复, 在神经元

的生长过程中起保护作用。如图7所示, 与对照组比较, 模型组BDNF和NT3蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, GDL可以显著上调BDNF和NT3的表达 ($P < 0.05$); 各组NGF无明显变化。

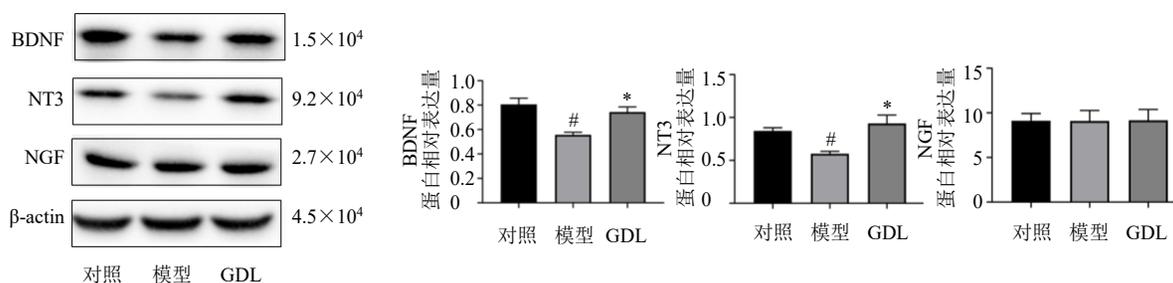


图7 GDL促进神经营养因子的分泌 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 GDL promotes secretion of neurotrophic factors ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

衰老的主要特征之一是细胞衰老, 是一种对不同损伤刺激做出反应的永久性细胞周期停滞状态。衰老细胞的过度积累会对再生能力造成负面影响, 促进衰老相关疾病的发作并发展促炎环境^[22]。与正常细胞相比, 衰老细胞可以表现出更多的衰老特征: 在细胞形态学上, 细胞体积增大且形状不规则^[23], 生长在固体表面时明显扁平, 细胞核增大、形状不规则和异染色质聚集^[24]。其次, 衰老细胞还具有细胞周期阻滞的特点, 其特征是p16、p21、p53蛋白标记增加^[23,25-26]。同时衰老细胞磷酸化视网膜母细胞瘤蛋白减少, 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cystein-asparatase protease-3, Caspase-3) 蛋白表达升高^[27]、核膜结构蛋白Lamin B1减少导致核完整性和稳定性下降, 继而导致其他核变化^[4]; 并且衰老细胞pH依赖的β-半乳糖苷酶活性也会增加。H₂O₂通常被作

为诱导氧化应激的条件, 现已被发现其可使细胞呈现出衰老的普遍特征, 已被广泛用于制备细胞衰老模型^[28-30]。本实验结果显示, 细胞经过H₂O₂处理后β-半乳糖苷酶染色率、细胞核体积及p21、p53表达增加, 同时Lamin B1表达降低, 表明成功构建了H₂O₂诱导的PC12细胞衰老模型。而GDL的干预可有效降低模型组β-半乳糖苷酶阳性细胞率, 下调p21、p53并上调LaminB1的表达, 抑制细胞核体积的增大。GDL具有抗氧化应激诱导的PC12神经元衰老的作用。

SIRT1参与细胞调节衰老和老化的过程, 是一个抗衰老的重要靶点^[31-32]。不仅如此, SIRT1还参与氧化应激过程, 其中SIRT1/STAT3信号通路调控细胞增殖和凋亡, 已被广泛应用于氧化应激病理研究。另一个调节氧化应激重要的靶点PAFR, 已被发现可被SIRT1下调, 抑制氧化应激, 预防PAFR引

起的相关疾病^[13-14]。本研究发现, 血小板活化因子拮抗剂抑制剂 WEB-2086 可以显著增加 SIRT1 的表达; H₂O₂ 激活 PAFR 后可以抑制 SIRT1 的表达。因此在 PAFR/SIRT1 通路中, PAFR 也可能位于上游, 调节 SIRT1 蛋白。因此 H₂O₂ 诱导的氧化应激衰老过程, 可能与 SIRT1/STAT3 信号通路有关, 并受 PAFR 的调控。

衰老细胞仍具有活性, 一般认为其对凋亡有抵抗力, 它们的代谢与自噬调节密切相关。尽管如此, 仍有少数氧化应激诱导早衰的研究发现, 细胞衰老显现出凋亡的特征^[33]。据报道, 下调 SIRT1 可以促进 STAT3 的磷酸化^[34], 随后 STAT3 信号的传导激活下游的 p53, 诱导细胞衰老、促进凋亡^[35]。这与本实验结果一致, H₂O₂ 诱导的神经元衰老可以激活 p53 的表达, 增加 TUNEL 凋亡染色。而 GDL 的干预可以逆转这一现象, 抑制 PC12 细胞的凋亡。

神经营养因子是一种可以促进神经元生长、保护神经元的蛋白家族。除了参与氧化应激的 SIRT1/STAT3 信号通路外, SIRT1/BDNF 信号通路^[16]也参与了本实验 PC12 细胞的衰老过程。除了 BDNF, 本研究还检测了常用于同时检测的 NT3 和 NGF 的表达。结果发现, 在 PC12 细胞的衰老过程中, GDL 可以促进 BDNF 和 NT3 的分泌, 对神经元起到保护作用, 但 NGF 不参与此过程。

综上, GDL 可以促进神经营养因子的分泌, 减轻神经元凋亡, 具有延缓氧化应激诱导的细胞衰老的作用, 其机制可能与调控 PAFR 和 SIRT1/STAT3 信号通路有关。本研究推测了 PAFR 与 SIRT1/STAT3 信号通路和氧化应激诱导的细胞衰老之间的关系, 验证了 GDL 在氧化应激诱导的细胞衰老中的作用, 为天然药物在抗衰老的应用中提供了新的见解, 为拓展 GDL 的药用价值提供了理论和实验依据。然而, 本研究仅进行了体外实验, 缺乏体内研究, 下一步将建立动物实验模型, 进一步确认 PAFR 与衰老的关系以及 GDL 的抗衰老作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Gonos E S, Chondrogianni N, Djordjevic A M. Where ageing goes nowadays: Mechanisms, pathways, biomarkers and anti-ageing strategies [J]. *Mech Ageing Dev*, 2019, 177: 1-3.

[2] Li Z, Zhang Z K, Ren Y K, et al. Aging and age-related diseases: From mechanisms to therapeutic strategies [J].

Biogerontology, 2021, 22(2): 165-187.

- [3] 张凌云, 刘纓. 细胞衰老检测指标及衰老模型研究进展 [J]. *生命科学研究*, 2022, 26(3): 264-270.
- [4] 刘艳飞, 高蕊, 徐凤芹, 等. 血管衰老相关细胞模型的研究进展 [J]. *中国病理生理杂志*, 2022, 38(3): 572-576.
- [5] 王晓睿. 衰老细胞模型构建及抗衰老活性物质初步筛选研究 [D]. 大连: 大连理工大学, 2017.
- [6] Yi J J, Luo J Y. SIRT1 and p53, effect on cancer, senescence and beyond [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1804(8): 1684-1689.
- [7] Cui Z F, Zhao X T, Amevor F K, et al. Therapeutic application of quercetin in aging-related diseases: SIRT1 as a potential mechanism [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 943321.
- [8] Li L G, Wei W, Zhang Y F, et al. SirT1 and STAT3 protect retinal pigmented epithelium cells against oxidative stress [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(2): 2231-2238.
- [9] Zhang Y, You S L, Tian Y C, et al. WWP2 regulates SIRT1-STAT3 acetylation and phosphorylation involved in hypertensive angiopathy [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(16): 9041-9054.
- [10] Qiong H, Han L, Zhang N X, et al. Glycyrrhizin improves the pathogenesis of psoriasis partially through IL-17A and the SIRT1-STAT3 axis [J]. *BMC Immunol*, 2021, 22(1): 34.
- [11] Honda Z I, Ishii S, Shimizu T. Platelet-activating factor receptor [J]. *J Biochem*, 2002, 131(6): 773-779.
- [12] Kim Y H, Bae J U, Lee S J, et al. SIRT1 attenuates PAF-induced MMP-2 production via down-regulation of PAF receptor expression in vascular smooth muscle cells [J]. *Vascul Pharmacol*, 2015, 72: 35-42.
- [13] Kim Y H, Bae J U, Kim I S, et al. SIRT1 prevents pulmonary thrombus formation induced by arachidonic acid via downregulation of PAF receptor expression in platelets [J]. *Platelets*, 2016, 27(8): 735-742.
- [14] Keefe K M, Sheikh I S, Smith G M. Targeting neurotrophins to specific populations of neurons: NGF, BDNF, and NT-3 and their relevance for treatment of spinal cord injury [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(3): 548.
- [15] Tian A Y, Li W, Zai Q, et al. 3-N-Butyphthalide improves learning and memory in rats with vascular cognitive impairment by activating the SIRT1/BDNF pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(1): 525-533.
- [16] Ciafrè S, Ferraguti G, Tirassa P, et al. Nerve growth factor in the psychiatric brain [J]. *Riv Psichiatr*, 2020, 55(1): 4-15.
- [17] Bjorklund G, Dadar M, Martins N, et al. Brief challenges on medicinal plants: An eye-opening look at ageing-related disorders [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2018, 122(6):

- 539-558.
- [18] Jiang S, Ma X J, Chen Y Y, *et al.* Effects of ginkgo diterpene lactone on brain inflammation and oxidative stress in rats with cognitive impairment of cerebral small vessel disease [J]. *Am J Transl Res*, 2021, 13(6): 6382-6390.
- [19] 王奎龙, 李卓琼, 曹泽斌, 等. 银杏二萜内酯A, B, K 抗血小板聚集作用机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(24): 4722-4726.
- [20] Liu Q, Jin Z Q, Xu Z L, *et al.* Antioxidant effects of ginkgolides and bilobalide against cerebral ischemia injury by activating the Akt/Nrf2 pathway *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2019, 24(2): 441-452.
- [21] Braquet P, Hosford D. Ethnopharmacology and the development of natural PAF antagonists as therapeutic agents [J]. *J Ethnopharmacol*, 1991, 32(1/2/3): 135-139.
- [22] Hernandez-Segura A, Nehme J, Demaria M. Hallmarks of cellular senescence [J]. *Trends Cell Biol*, 2018, 28(6): 436-453.
- [23] González-Gualda E, Baker A G, Fruk L, *et al.* A guide to assessing cellular senescence *in vitro* and *in vivo* [J]. *FEBS J*, 2021, 288(1): 56-80.
- [24] Kusumoto D, Seki T, Sawada H, *et al.* Anti-senescent drug screening by deep learning-based morphology senescence scoring [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 257.
- [25] Guo B, Guo Q, Wang Z, *et al.* D-Galactose-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the cochlear basilar membrane: An *in vitro* aging model [J]. *Biogerontology*, 2020, 21(3): 311-323.
- [26] 许多, 刘梅, 尹琼玉, 等. 氧化苦参碱对缺血再灌注损伤小鼠原代海马神经元的保护作用及机制研究 [J]. *临床神经外科杂志*, 2020, 17(4): 430-433.
- [27] Shen C Y, Jiang J G, Yang L, *et al.* Anti-ageing active ingredients from herbs and nutraceuticals used in traditional Chinese medicine: Pharmacological mechanisms and implications for drug discovery [J]. *Br J Pharmacol*, 2017, 174(11): 1395-1425.
- [28] Giri S, Takada A, Paudel D, *et al.* An *in vitro* senescence model of gingival epithelial cell induced by hydrogen peroxide treatment [J]. *Odontology*, 2022, 110(1): 44-53.
- [29] Kim H J, Kim W J, Shin H R, *et al.* ROS-induced PADI2 downregulation accelerates cellular senescence via the stimulation of SASP production and NF- κ B activation [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2022, 79(3): 155.
- [30] Berenjabad N J, Nejati V, Rezaie J. Angiogenic ability of human endothelial cells was decreased following senescence induction with hydrogen peroxide: Possible role of vegfr-2/Akt-1 signaling pathway [J]. *BMC Mol Cell Biol*, 2022, 23(1): 31.
- [31] Chen C, Zhou M, Ge Y C, *et al.* SIRT1 and aging related signaling pathways [J]. *Mech Ageing Dev*, 2020, 187: 111215.
- [32] Hwang J W, Yao H W, Caito S, *et al.* Redox regulation of SIRT1 in inflammation and cellular senescence [J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 61: 95-110.
- [33] Lorda-Diez C I, Solis-Mancilla M E, Sanchez-Fernandez C, *et al.* Cell senescence, apoptosis and DNA damage cooperate in the remodeling processes accounting for heart morphogenesis [J]. *J Anat*, 2019, 234(6): 815-829.
- [34] Liu J, Jiao K L, Zhou Q, *et al.* Resveratrol alleviates 27-hydroxycholesterol-induced senescence in nerve cells and affects zebrafish locomotor behavior via activation of SIRT1-mediated STAT3 signaling [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 6673343.
- [35] Saint-Germain E, Mignacca L, Vernier M, *et al.* SOCS1 regulates senescence and ferroptosis by modulating the expression of p53 target genes [J]. *Ageing*, 2017, 9(10): 2137-2162.

[责任编辑 李亚楠]