

银杏二萜内酯 K 对 *D*-半乳糖诱导的小鼠原代星形胶质细胞抗衰老作用

操娇娇^{1,3}, 杜雨芯^{1,3}, 张倩霞², 吴 伟³, 杨颖博³, 肖保国^{4*}, 肖 伟^{1,3}, 王振中^{1,3*}

1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210000

2. 上海中医药大学中药研究所, 上海 200120

3. 中药制药过程与智能制造技术全国重点实验室, 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

4. 上海复旦大学神经病学研究所, 上海 200040

摘要: **目的** 研究银杏二萜内酯 K (ginkgolide K, GK) 对 *D*-半乳糖诱导的小鼠原代星形胶质细胞抗衰老作用及可能机制。**方法** 以小鼠原代星形胶质细胞为研究对象, 建立 *D*-半乳糖诱导的衰老模型, 设置对照组、模型组和 GK 组, GK (50 $\mu\text{g/mL}$) 预处理 3 h 后, 以 150 mmol/L *D*-半乳糖造模 6 d, 采用 β -半乳糖苷酶染色法检测衰老星形胶质细胞; Western blotting 法测定衰老标志蛋白 (p21、p53 和 Lamin B1)、沉默信息调节因子 1 (silent information regulator 1, SIRT1)、脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、自噬标志蛋白微管相关蛋白 1 轻链 3-II/I (microtubule associated protein 1 light chain 3-II/I, LC3-II/I) 和自噬选择性底物 p62 表达; ELISA 检测衰老相关分泌表型 [白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)] ; 免疫荧光检测增殖标志分子 Ki67 表达。**结果** 与对照组比较, *D*-半乳糖显著诱导原代星形胶质细胞 β -半乳糖苷酶阳性表达 ($P < 0.001$), 促进衰老标志蛋白 p21、p53 的上调和 Lamin B1 的下调 ($P < 0.05$ 、 0.01), 减少增殖标志分子 Ki67 的表达 ($P < 0.01$), 表明成功构建了公认的细胞衰老模型。与模型组比较, GK 显著减少 β -半乳糖苷酶阳性表达 ($P < 0.001$), 下调 p21、p53 和上调 Lamin B1 蛋白的表达 ($P < 0.05$ 、 0.01), 增加 Ki67 的表达 ($P < 0.01$), 表明 GK 具有抗衰老作用。此外, GK 显著促进 BDNF 蛋白表达 ($P < 0.05$), 减少 TNF- α 的分泌 ($P < 0.05$), 上调 SIRT1 和自噬标志蛋白 LC3-II/I 表达 ($P < 0.05$ 、 0.01), 减少 p62 蛋白表达 ($P < 0.01$)。**结论** GK 可有效抑制原代星形胶质细胞的衰老, 其作用机制可能与上调 SIRT1、BDNF 表达和促进细胞自噬有关, 从而多维度协同达到抗细胞衰老的效应。

关键词: 银杏二萜内酯 K; 原代星形胶质细胞; *D*-半乳糖; 衰老; 自噬; 沉默信息调节因子 1; 脑源性神经营养因子

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2023)11-3578-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.11.019

Ginkgolide K inhibits *D*-galactose-induced senescence in murine primary astrocytes

CAO Jiao-jiao^{1,3}, DU Yu-xin^{1,3}, ZHANG Qian-xia², WU Wei³, YANG Ying-bo³, XIAO Bao-guo⁴, XIAO Wei^{1,3}, WANG Zhen-zhong^{1,3}

1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210000, China

2. Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Chinese Medicine, Shanghai 200120, China

3. National Key Laboratory on Technologies for Chinese Medicine Pharmaceutical Process Control and Intelligent Manufacture, Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

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

Abstract: **Objective** To study the anti-aging effect and possible mechanism of ginkgolide K (GK) on murine primary astrocytes induced by *D*-galactose. **Methods** The aging model induced by *D*-galactose was established in murine primary astrocytes, and the aging astrocytes were set up in control group, model group and GK group. After pretreatment with GK (50 $\mu\text{g/mL}$) for 3 h, the aging astrocytes were modeled with 150 mmol/L *D*-galactose for 6 d, and β -galactosidase staining was used to detect the aging astrocytes. Western blotting was used to detect the aging marker proteins (p21, p53 and Lamin B1), silent information regulator 1 (SIRT1), brain-

收稿日期: 2023-03-27

基金项目: 2021 年国家中医药管理局岐黄学者项目

作者简介: 操娇娇, 硕士研究生, 研究方向为中药新药研发及应用。E-mail: jill_cao@163.com

*通信作者: 王振中, 教授, 硕士生导师, 研究方向为中药新药研发及应用。E-mail: kyzywzz@163.com

肖保国, 教授, 研究方向为神经保护和髓鞘再生。E-mail: bgxiao@shmu.edu.cn

derived neurotrophic factor (BDNF), autophagy marker protein microtubule associated protein 1 light chain 3-II/I (LC3-II/I) and autophagy selective substrate p62 expressions. ELISA was used to detect aging-related secretory phenotype [interleukin-6 (IL-6), IL-1 β , tumor necrosis factor- α (TNF- α)]; The expression of Ki67 was detected by immunofluorescence. **Results** Compared with control group, *D*-galactose significantly induced the positive expression of β -galactosidase in primary astrocytes ($P < 0.001$), promoted the up-regulation of aging marker proteins p21 and p53 and the down-regulation of Lamin B1 ($P < 0.05, 0.01$), and reduced the expression of proliferation marker molecule Ki67 ($P < 0.01$), which indicated that a recognized cell aging model was successfully established. Compared with model group, GK significantly reduced the positive expression of β -galactosidase ($P < 0.001$), down-regulated the expressions of p21, p53 and up-regulated Lamin B1 protein expression ($P < 0.05, 0.01$), and increased the expression of Ki67 ($P < 0.01$), indicating that GK had anti-aging effect. In addition, GK significantly promoted the expression of BDNF protein ($P < 0.05$), decreased the secretion of TNF- α ($P < 0.05$), increased the expressions of SIRT1 and autophagy marker protein LC3-II/I ($P < 0.05, 0.01$), and decreased the expression of p62 protein ($P < 0.01$). **Conclusion** GK can effectively inhibit the aging of primary astrocytes, and its mechanism may be related to up-regulating the expressions of SIRT1 and BDNF and promoting autophagy, so as to achieve the anti-aging effect in multiple dimensions.

Key words: ginkgolide K; primary astrocytes; *D*-galactose; aging; autophagy; silent information regulator 1; brain-derived neurotrophic factor

脑细胞主要由神经元和神经胶质细胞(小胶质细胞、星形胶质细胞和少突胶质细胞等)组成。星形胶质细胞是中枢神经系统中最丰富的细胞类型,在维持中枢神经系统复杂功能和脑环境的稳态中发挥着极其重要作用^[1],包括调节突触传递、维持血脑屏障、为神经元提供结构支撑、营养支持等作用^[2]。细胞衰老是人体衰老的基本机制之一,是与年龄相关的神经退行性疾病的核心组成部分。衰老细胞特征包括细胞周期停滞、细胞衰老相关分泌表型、DNA 损伤、衰老相关 β -半乳糖苷酶的表达、细胞周期抑制蛋白的表达等。这些表征的衰老细胞可损害脑组织的结构和功能,引发突触损失和认知能力下降,增加衰老相关疾病的发病率,或推动年龄相关的疾病进一步恶化^[3]。因此,靶向星形胶质细胞的衰老治疗可能是缓解年龄相关神经退行性疾病发生和进展的一种有潜力的治疗方式。

银杏二萜内酯 K (ginkgolide K, GK) 是从银杏叶中分离出来的二萜内酯类成分, GK 作为银杏二萜内酯 B (ginkgolide B, GB) 的同系物,也是血小板活化因子受体 (platelet-activating factor, PAF) 的拮抗剂,其抗氧化应激和对急性缺血性卒中的抗血小板聚集和神经保护作用备受关注^[4-7]。本研究通过 *D*-半乳糖诱导原代星形胶质细胞衰老模拟脑内星形胶质细胞衰老,探索 GK 抗衰老的作用,同时初步探索其可能的抗衰老作用机制。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 ICR 新生鼠购自上海必凯科翼生物科技有限公司,实验动物许可证号为 SCXK (沪) 2018-

0006。动物实验通过上海中医药大学动物实验伦理审查(批准号 PZSHUTCM220110002)。

1.2 药品与试剂

GK (质量分数 $\geq 98\%$) 由江苏康缘药业股份有限公司中药制药过程与智能制造技术全国重点实验室制备; *D*-半乳糖 (质量分数 $\geq 99\%$, 批号 JF68252A) 购自上海泰坦科技股份有限公司; DMEM 培养基 (批号 MA0212) 购自大连美仑生物技术有限公司; 胎牛血清 (批号 10099-141C) 购自美国 Gibco 公司; PBS (批号 ST447)、胰酶细胞消化液 (批号 C0203)、 β -半乳糖苷酶染色试剂盒 (批号 C0602)、RIPA 裂解液 (批号 P00138)、PMSF (批号 ST505)、蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物 (批号 P1045)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号 P0012)、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (批号 P0015L)、ECL 化学发光液 (批号 P0018FS) 购自中国碧云天生物技术有限公司; NC 膜 (批号 66485)、PVDF 膜 (批号 6054520) 购自美国 Pall 公司; p53 抗体 (批号 2524S)、核纤层蛋白 B1 (Lamin B1) 抗体 (批号 13435S)、沉默信息调节因子 1 (silent information regulator 1, SIRT1) 抗体 (批号 9475S)、脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 抗体 (批号 47808S)、Ki67 抗体 (批号 9449S)、胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 抗体 (3670S)、 β -actin 抗体 (批号 4970S)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (批号 7074S)、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体 (批号 7076P2) 购自美国 CST 公司; p21 抗体 (批号 ab109199)、p62 抗体 (批号 ab109012) 购自英国

Abcam 公司;微管相关蛋白 1 轻链 3-II/I(microtubule associated protein 1 light chain 3-II/I, LC3-II/I) 抗体(批号 NB100-2220) 购自美国 Novus 公司; Cy3 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体(批号 A0521) 购自中国碧云天生物技术有限公司; 小鼠白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6) ELISA 试剂盒(批号 DY406-05)、小鼠肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA 试剂盒(批号 DY410-05)、小鼠 IL-1 β ELISA 试剂盒(批号 DY401-05) 购自美国 R&D Systems 公司。

1.3 仪器

Synergy H1 型多模式微孔检测系统(美国 Bio-Tek 公司); Universal Hood II Chemi Doc XRS 系统、PowerPac HC 蛋白印迹转印系统(美国 Bio-Rad 公司); DM6B 型荧光显微镜(德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 原代星形胶质细胞的提取与培养

在超净台无菌环境下, 取出生 24 h 内新生小鼠, 置洁净大皿, 75%乙醇消毒后, 用经高温高压灭菌后的手术剪, 快速剪下整个头, 再剪开头盖骨, 用镊子小心取下 2 片皮层, 置于无血清的 DMEM 培养基中, 待 10 只新生鼠全部取完, 用洁净的巴氏管吹打皮层, 直至在灯光下观察无明显团块或聚集, 培养基呈混悬状, 300 $\times$ g 离心 5 min, 弃无血清 DMEM 培养基。加入含 10%胎牛血清和 1%双抗的 DMEM 完全培养基适量, 继续用巴氏管吹打混匀, 经 70 μ m 细胞滤膜滤过, 除去未吹散的团块, 加入含 10%胎牛血清和 1%双抗的 DMEM 培养基至 60 mL, 混匀, 每只大皿加 6 mL 含细胞的完全培养基。放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培养箱中孵育, 细胞在培养箱中孵育 24~36 h 后, 轻轻摇晃后将所有培养上清回收, 2500 r/min 快速离心, 除去沉淀, 上清重新加入大皿, 不足 6 mL 则用新鲜完全培养液补充。每隔 1 d 置换一半新鲜培养液, 至第 7 天, 细胞铺满皿底, 摇床置培养箱中 360 r/min 摇晃 3~4 h 除去小胶质细胞和其他杂细胞。加入 3 mL PBS 清洗 2 次, 胰酶消化 1 min, 吹下细胞后 800 r/min 离心 3 min, 吸去上清, 加入 2 mL 新鲜完全培养液, 细胞计数后根据所需, 即可种板进行后续实验。GFAP 免疫荧光染色显示星形胶质细胞纯度 >95%。

2.2 β -半乳糖苷酶衰老染色

将原代星形胶质细胞以 1.6×10^5 个/孔接种于 6 孔板, 待细胞生长至铺满皿底 80%时即可实验。加

入 GK (50 μ g/mL) [8]预处理 3 h, 然后添加 150 mmol/L D-半乳糖造模 6 d, 另设置不含药物的对照组。实验结束后, 除去培养基, 用 1 mL PBS 清洗 1 次, 吸净 PBS。每孔加入 1 mL β -半乳糖苷酶染色固定液室温固定 15 min, PBS 清洗 3 次后, 每孔加入 1 mL 染色工作液, 用保鲜膜封住, 37 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日除去染色工作液, 加入 1 mL PBS, 于显微镜下观察并拍照, 使用 Image J 软件对蓝色染色区域进行定量分析。

2.3 Western blotting 检测 p53、p21、Lamin B1、BDNF、SIRT1、p62 和 LC3II/I 蛋白表达

将原代星形胶质细胞以 1.6×10^6 个/皿接种于大皿, 待细胞生长至铺满皿底 80%时即可实验。GK (50 μ g/mL) 预处理 3 h, 然后添加 150 mmol/L D-半乳糖造模 6 d, 另设置不含药物的对照组。收集细胞, 加入含蛋白酶、磷酸酶抑制剂和 PMSF 的 RIPA 缓冲液裂解, 然后用 BCA 法测定蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 加入 5%脱脂奶粉, 室温封闭 2 h, TBST 洗涤, 加入相应一抗, 4 $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜; TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 加入二抗 (1:1000), 室温孵育 2 h, TBST 洗涤 3 次, 加入 ECL 发光试剂显影, 应用 ECL 化学发光成像系统拍照, 采用 Image J 图像分析软件分析条带灰度值。

2.4 免疫荧光检测 Ki67 蛋白表达

24 孔板每孔放置 1 片爬片, 将原代星形胶质细胞以 4×10^4 个/孔接种, 待细胞生长至铺满皿底 80%时即可实验。GK (50 μ g/mL) 预处理 3 h, 然后添加 150 mmol/L D-半乳糖造模 6 d, 另设置不含药物的对照组。除去培养液, 500 μ L PBS 清洗 1 遍, 吸净 PBS, 加入 300 μ L 4%多聚甲醛固定 20 min, PBS 洗涤 3 遍, 每次 5 min; TritonX-100 通透 30 min, PBS 洗涤 2 遍; 加入 1%牛血清白蛋白封闭 1 h, 加入一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; PBS 洗涤 3 遍, 每次 5 min, 加入二抗, 室温避光孵育 2 h; PBS 洗涤 3 遍, 每次 5 min, 加入 100 μ L DAPI 染核 5~10 min; PBS 洗涤 1 遍, 载玻片滴 10 μ L 封片液 (PBS-甘油 1:1), 取出爬片, 倒扣于载玻片上, 于荧光显微镜下观察并拍照, 使用 Image J 软件进行分析。

2.5 ELISA 检测 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 水平

将原代星形胶质细胞以 1.6×10^5 个/孔接种于 6 孔板, 待细胞生长至铺满皿底 80%时即可实验。GK (50 μ g/mL) 预处理 3 h, 然后添加 150 mmol/L D-半乳糖

造模 6 d, 另设置不含药物的对照组。收集上清液, 按照试剂盒说明书检测 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 水平。

2.6 统计学分析

所有数据表示为 $\bar{x} \pm s$, 运用 GraphPad Prism 8 软件进行统计学处理。各组数据首先用 Shapiro-Wilk 检验和 Brown-Forsythe 检验进行正态性检验和方差齐性检验, 符合正态性分布且具有方差齐性的数据将各组数据多组间进行单因素方差分析 (One-way ANOVA)。

3 结果

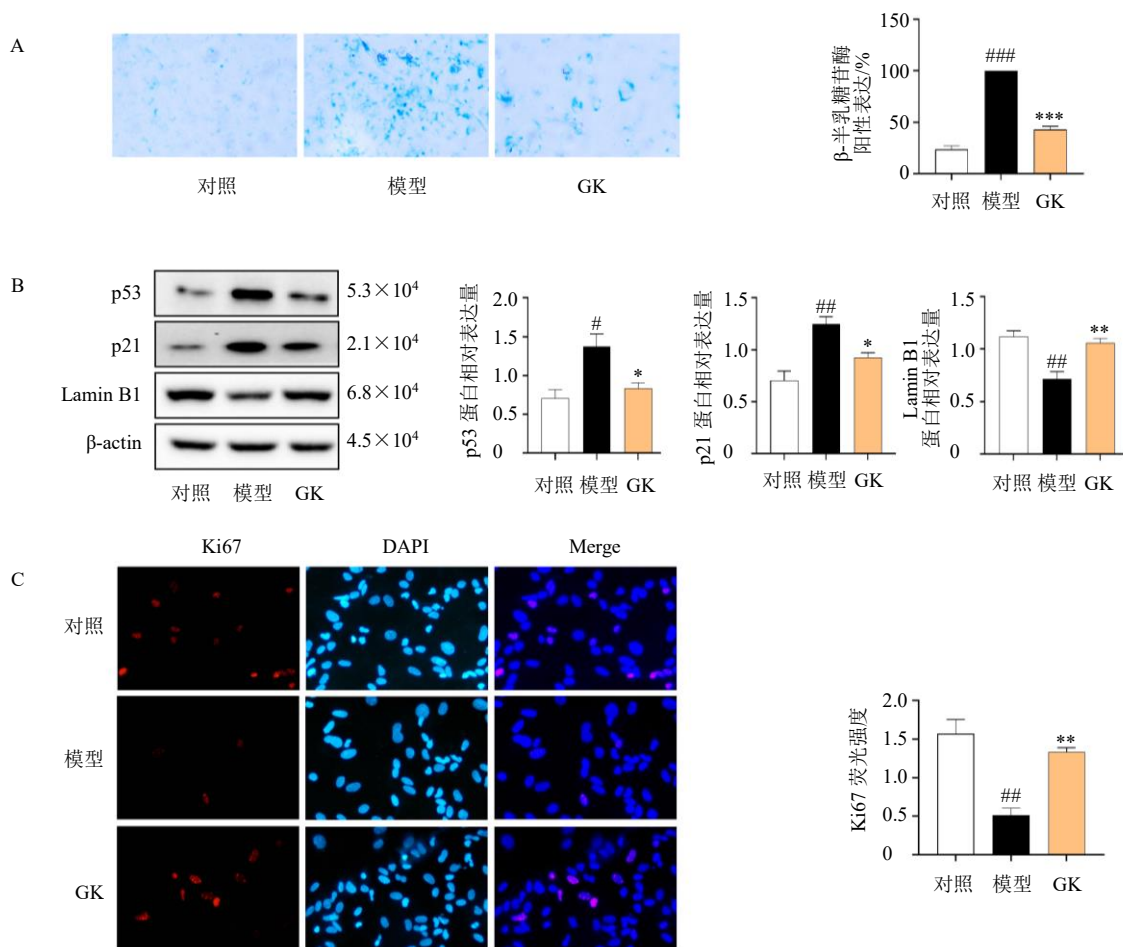
3.1 GK 抑制 D-半乳糖诱导的原代星形胶质细胞衰老

如图 1 所示, 与对照组比较, D-半乳糖诱导原

代星形胶质细胞中 β -半乳糖苷酶表达 ($P < 0.001$), 上调 p53 和 p21 表达 ($P < 0.05$ 、 0.01), 抑制 Lamin B1 和 Ki67 表达 ($P < 0.01$), 成功构建了星形胶质细胞的衰老模型。50 $\mu\text{g/mL}$ GK 干预 6 d 可显著抑制 β -半乳糖苷酶阳性表达 ($P < 0.001$), 下调 p53 和 p21 蛋白表达 ($P < 0.05$), 上调 Lamin B1 和 Ki67 的表达 ($P < 0.01$)。表明 GK 具有抑制 D-半乳糖诱导的原代星形胶质细胞衰老的作用。

3.2 GK 抑制 D-半乳糖诱导的原代星形胶质细胞衰老相关分泌表型

衰老相关分泌表型是衰老细胞分泌的一系列促炎因子、趋化因子或生长因子等现象, 可对细胞的微环境和邻近细胞产生影响。如图 2 所示, 在原代

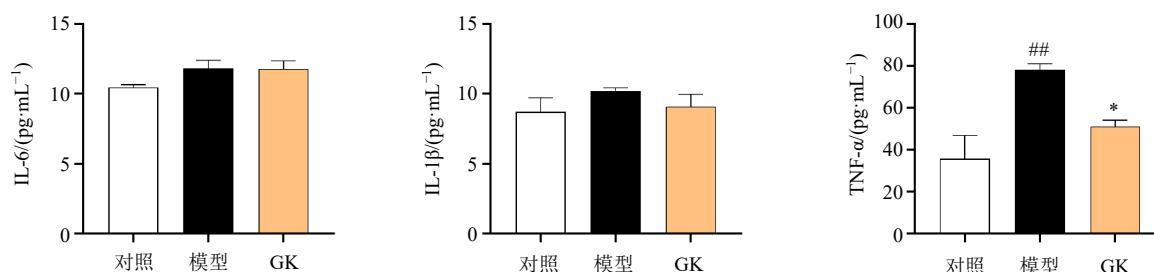


A-GK 对 D-半乳糖诱导的原代星形胶质细胞 β -半乳糖苷酶染色的影响 ($n=3$, $\times 200$) B-GK 对 D-半乳糖诱导的原代星形胶质细胞 p53、p21 和 Lamin B1 蛋白表达的影响 ($n=3$) C-GK 对 D-半乳糖诱导的原代星形胶质细胞 Ki67 表达的影响 ($n=3$, $\times 200$) 与对照组比较: # $P < 0.05$ ### $P < 0.01$ ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下图同

A-effect of GK on β -galactosidase staining in D-galactose induced primary astrocytes ($n = 3$, $\times 200$) B-effect of GK on p53, p21 and Lamin B1 protein expressions in D-galactose induced primary astrocytes ($n = 3$) C-effect of GK on Ki67 expression in D-galactose induced primary astrocytes ($n = 3$, $\times 200$) # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group, same as below figures

图 1 GK 抑制 D-半乳糖诱导的原代星形胶质细胞衰老

Fig. 1 GK inhibits D-galactose induced senescence in primary astrocytes

图2 GK抑制D-半乳糖诱导的衰老相关分泌表型 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 2 GK inhibits *D*-galactose induced secretory-associated senescence phenotype ($\bar{x} \pm s, n=3$)

星形胶质细胞分泌的一系列细胞因子中, *D*-半乳糖诱导的衰老模型中 IL-6 和 IL-1 β 水平无明显增加, GK 也无明显抑制作用; 但衰老的原代星形胶质细胞中 TNF- α 的分泌显著升高 ($P<0.01$), 而 GK 干预后显著抑制 TNF- α 的分泌 ($P<0.05$), 提示 GK 可抑制衰老相关分泌表型中 TNF- α 的分泌。

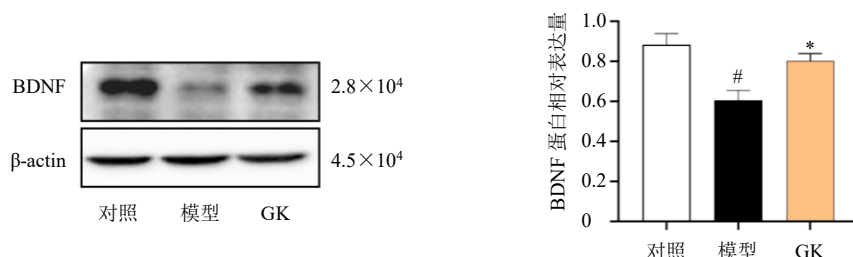
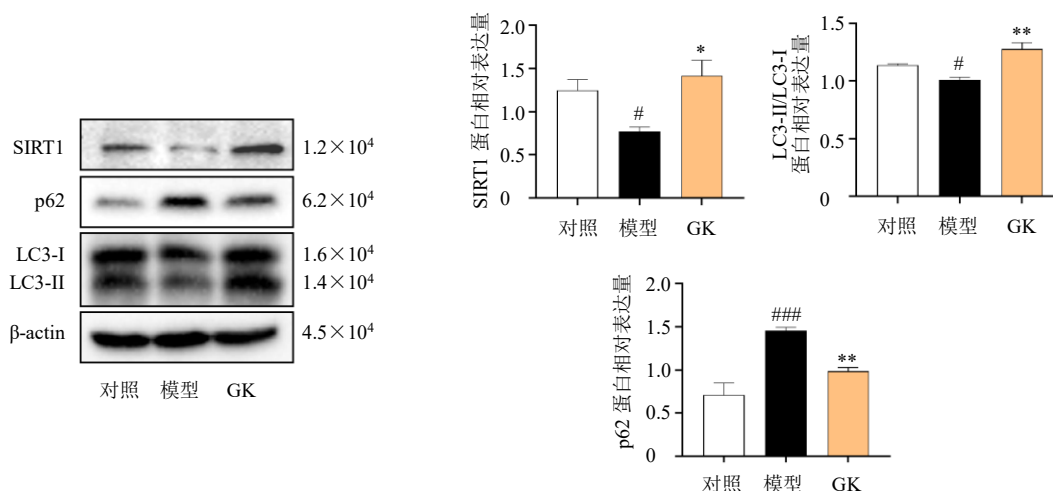
3.3 GK 促进原代星形胶质细胞营养因子释放

分泌神经营养因子是星形胶质细胞的功能之一, 可以对神经元的生长发育和功能维持起到营养作用。如图 3 所示, 与对照组比较, 模型组 BDNF 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$), 表明衰老的星

形胶质细胞分泌营养因子的功能下降; 与模型组比较, GK 显著上调 BDNF 蛋白表达 ($P<0.05$)。

3.4 GK 促进 SIRT1 表达和自噬功能

SIRT1 被称为“长寿”蛋白, 也被称为细胞年轻化标志分子, 与多种生物的衰老过程密切相关, 据报道 SIRT1 可通过去乙酰化抑制 p53 的表达^[9], 从而抑制 p21 的表达^[10]。自噬与衰老之间存在联系, 细胞在响应衰老信号的诱导时, 自噬被抑制, 受损的蛋白和细胞器无法及时降解, 将进一步促进衰老通路的激活, 导致细胞衰老标志物的累积和生长停滞^[11]。如图 4 所示, 衰老的星形胶质细胞 SIRT1 蛋

图3 GK促进D-半乳糖诱导的原代星形胶质细胞BDNF蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 3 GK promotes BDNF protein expression in *D*-galactose induced primary astrocytes ($\bar{x} \pm s, n=3$)图4 GK促进星形胶质细胞SIRT1表达和自噬功能 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 4 GK promotes SIRT1 expression and autophagy functions in astrocytes ($\bar{x} \pm s, n=3$)

白表达降低 ($P < 0.05$), 而 GK 可以上调 SIRT1 蛋白表达 ($P < 0.05$)。同时 *D*-半乳糖诱导的衰老星形胶质细胞 LC3-II/I 蛋白表达降低 ($P < 0.05$), 自噬底物标志 p62 蛋白表达升高 ($P < 0.001$), 表明细胞此时的自噬活动减少, 导致 p62 标记的降解物积聚。GK 干预则增加 LC3-II/I 蛋白表达 ($P < 0.01$), 降低泛素化蛋白 p62 蛋白表达 ($P < 0.01$), 增加细胞此时的自噬活动, 减少 p62 标记的降解物积聚。以上结果提示 GK 可能通过上调 SIRT1 表达, 同时促进 BDNF 产生和细胞自噬, 多维度协同达到抗细胞衰老的效应。

4 讨论

衰老细胞不同于凋亡细胞, 具有广泛的代谢活性, 但无增殖能力。自首次从体外培养非永生化成纤维细胞观察到“细胞复制性衰老”现象以来, 至今对衰老大脑的广泛研究已经确定脑细胞的衰老是神经变性和认知能力下降的关键因素。研究证明, 细胞衰老与阿尔茨海默病、帕金森病以及多发性硬化等多种神经退行性疾病的发生和发展有关^[12-13], 研究报道, 在阿尔茨海默病患者的额叶皮质中, 衰老标志蛋白 p16^{ink4a} 阳性的星形胶质细胞显著高于非阿尔茨海默病的同龄人^[14]。另有研究报道, 黄芪甲苷可通过促进有丝分裂自噬来抑制星形胶质细胞的衰老, 从而改善帕金森病模型中的多巴胺能神经变性^[15], 这些报道表明靶向星形胶质细胞的衰老可能是治疗或改善与年龄相关的神经退行性疾病的一种潜在的治疗方式。

β -半乳糖苷酶来源于 *GLB1* 基因编码的 β -*D*-半乳糖苷酶, 随着细胞的衰老, 增殖能力下降, 其数量和大小不断累积, 其活性与衰老程度高度相关, 在具有分化能力的细胞中无法检测到, 因此 β -半乳糖苷酶一直是体内外鉴定衰老细胞最广泛使用的生物标志物^[16]。p53 蛋白是一种转录因子, 在细胞应激反应中起着关键作用, 在 DNA 损伤时激活导致细胞生长停滞, 指导细胞和机体的衰老。p21 是 p53 的下游基因, 其表达受 p53 调控, p21 可抑制细胞周期蛋白依赖激酶 (cyclin-dependent kinase, CDK) 的活性, 具有和细胞周期蛋白 N 端和 C 端结合位点以及增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 的 C 端结合位点, 可与 CDK 复合物结合并抑制其活性, 进而阻滞细胞周期^[17]。Lamin B1 是一种核中间丝蛋白, 在 DNA 复制、有丝分裂纺锤体的形成、基因转录和细胞增殖的维持中起着

至关重要的作用。Lamin B1 的下调是衰老后的关键介质, 是局部染色质变化的触发因素, 从而影响整体的基因表达^[18]。*D*-半乳糖广泛用于体内外建立衰老模型, 在本研究中, 使用 *D*-半乳糖诱导原代星形胶质细胞衰老, 150 mmol/L *D*-半乳糖处理 6 d 可成功构建细胞衰老模型, 表现为 β -半乳糖苷酶染色和衰老标志物 p53、p21 蛋白表达增加, Lamin B1 蛋白表达下降, 这些结果表明该条件可以成功诱导星形胶质细胞的衰老模型。GK 的干预可以抑制 β -半乳糖苷酶染色和衰老标志物 p53、p21 蛋白表达增加, 促进 Lamin B1 蛋白表达增加。Ki67 染色在临床上被广泛用作增殖指标, 其在细胞分裂 S 期、G₂ 期和 M 期积累, G₁ 期和 G₀ 期即降解, 因此 Ki67 是细胞周期进行和静止期的分级标志物^[19]。本研究结果显示, 对照组和 GK 组 Ki67 表达显著多于模型组, 表明正在进行分裂增殖的细胞明显多于模型组, GK 可促进细胞增殖。这些研究数据表明 GK 可以在体外抑制由 *D*-半乳糖诱导的原代星形胶质细胞的衰老, 促进细胞增殖。

衰老相关分泌表型是衰老的细胞分泌细胞因子、趋化因子、细胞外基质蛋白酶等信号分子的总称。衰老的细胞分泌这些因子会改变局部组织微环境导致长期慢性炎症。这些因子不仅以自分泌的方式促进细胞自身的衰老, 还以旁分泌的方式影响周围细胞的衰老^[20]。衰老相关分泌表型可导致衰老相关炎症、代谢失调、慢性疾病、老年综合征和恢复力丧失等, 减少衰老相关分泌表型的相关分泌也是临床的一种干预方式^[21]。本研究发现, 衰老的星形胶质细胞会增加 TNF- α 的分泌, 而 GK 可以减少 TNF- α 的分泌。其他细胞因子 IL-6 和 IL-1 β 可能受限於体外培养, 细胞含量少, 细胞因子水平处于试剂盒检测下限, 所以 GK 也没能显示明显抑制作用。

BDNF 可以促进神经保护和神经再生, 对神经元的营养支持作用是星形胶质细胞的功能之一。衰老的星胶分泌营养因子功能下降, 而 GK 可以促进 BDNF 的分泌, 恢复其部分功能。在帕金森病患者和动物模型中也发现其黑质纹状体通路中 BDNF 水平下降, 因此 BDNF 可能可以作为一种治疗分子。但相关研究却表明外源性 BDNF 直接送入大脑并不能缓解症状, 且神经营养因子血脑通透性差、半衰期短、生物利用度差^[22], 或许促进脑内星形胶质细胞分泌营养因子是一种更加行之有效的方法。

SIRT1 是一种 NAD⁺依赖的去乙酰化酶, 主要

位于细胞核内,可以去乙酰化某些关键蛋白,从而调控衰老信号通路。据报道,SIRT1 可以去乙酰化非组蛋白底物 p53,改变其转录活性,从而参与细胞衰老和生物体寿命的调节^[23]。SIRT1 也被称为长寿调节因子,增加 SIRT1 的表达可以延长多种生物的使用寿命,包括酵母、苍蝇、蠕虫和哺乳动物等^[24],而 SIRT1 在体内的蛋白和转录水平会随着年龄的增加而下降^[25],同样,过表达小鼠大脑中 SIRT1 水平可以显著延长小鼠的寿命^[26]。进一步研究表明 SIRT1 具有抗衰老的作用,可以促进机体或细胞年轻化,近年来,靶向 SIRT1 来预防和治疗衰老相关疾病已经引起人们的注意。本研究发现 GK 可以显著激活 SIRT1 的表达,表明 GK 的抗衰老作用可能与 SIRT1 有关。

自噬是一种分解细胞内成分的过程,可降解和回收细胞中一些受损或不需要的成分,以维持能量稳态和保护细胞免受应激,自噬在发育和疾病的过程中起着至关重要的作用。近年来研究表明自噬激活与延长寿命之间存在正相关,在调节衰老中发挥着重要作用。卫星细胞随着年龄的增长,自噬现象消失,导致受损蛋白和细胞器累积,继而引发衰老和干细胞耗竭^[27-28]。本研究发现衰老的星形胶质细胞 LC3-II/I 的表达减少,p62 表达增加。而 GK 干预则可促进 LC3-II/I 的表达上升,p62 表达减少,LC3II 是自噬形成的前体物质,在衰老的星形胶质细胞中自噬被抑制,从而导致自噬底物标志物 p62 不能及时被降解而增多,而 GK 可以促进星形胶质细胞的自噬现象,提示 GK 可能通过促进自噬来抑制星形胶质细胞的衰老,但分子机制仍有待进一步深入研究加以阐明。另有相关研究报道,在衰老的细胞中,自噬系统被激活^[29],与本研究结果相反,这可能与细胞种类不同或不同的衰老模型有关。

综上,本研究发现 GK 具有显著的抗衰老作用,能够促进星形胶质细胞的增殖和营养因子分泌,减少炎症因子 TNF- α 的分泌,同时促进自噬和 SIRT1 表达。大量研究显示细胞的衰老是一个非常复杂的过程,是由诸多因素动态平衡紊乱导致的结局。GK 介导的星形胶质细胞抗衰老作用可能通过上调 SIRT1 表达,同时促进 BDNF 产生和细胞自噬,多维度协同达到抗细胞衰老的效应。至于 SIRT1 上调、BDNF 产生和细胞自噬相互间的关系,以及在 GK 抗衰老作用中的权重值得进一步利用现代细胞-分子生物学技术进行探索和验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Kritsilis M, Rizou S V, Koutsoudaki P N, *et al.* Ageing, cellular senescence and neurodegenerative disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(10): 2937.
- [2] Guillamón-Vivancos T, Gómez-Pinedo U, Matías-Guiu J. Astrocytes in neurodegenerative diseases (I): Function and molecular description [J]. *Neurologia*, 2015, 30(2): 119-129.
- [3] Gao L, Zheng W G, Wu X K, *et al.* Baicalein delays H₂O₂-induced astrocytic senescence through inhibition of senescence-associated secretory phenotype (SASP), suppression of JAK2/STAT1/NF- κ B pathway, and regulation of leucine metabolism [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2021, 12(13): 2320-2335.
- [4] Chen M, Zou W Y, Chen M M, *et al.* Ginkgolide K promotes angiogenesis in a middle cerebral artery occlusion mouse model via activating JAK2/STAT3 pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 833: 221-229.
- [5] 杜晓, 韩舟, 何斌, 等. 银杏二萜内酯葡胺注射液对急性缺血性脑卒中再通成功患者预后的影响 [J]. *药物评价研究*, 2023, 46(3): 607-613.
- [6] 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.
- [7] 杜雨芯, 操娇娇, 张倩霞, 等. 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 [J]. *中草药*, 2023, 54(9): 2793-2801.
- [8] Miao Q, Chai Z, Song L J, *et al.* The neuroprotective effects and transdifferentiation of astrocytes into dopaminergic neurons of ginkgolide K on Parkinson' disease mice [J]. *J Neuroimmunol*, 2022, 364: 577806.
- [9] Orimo M, Minamino T, Miyauchi H, *et al.* Protective role of SIRT1 in diabetic vascular dysfunction [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(6): 889-894.
- [10] Lamichane S, Baek S H, Kim Y J, *et al.* MHY2233 attenuates replicative cellular senescence in human endothelial progenitor cells via SIRT1 signaling [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 6492029.
- [11] Kang C, Xu Q K, Martin T D, *et al.* The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4 [J]. *Science*, 2015, 349(6255): aaa5612.
- [12] Sahu M R, Rani L, Subba R, *et al.* Cellular senescence in the aging brain: A promising target for neurodegenerative diseases [J]. *Mech Ageing Dev*, 2022, 204: 111675.
- [13] Killilea D W, Atamna H, Liao C, *et al.* Iron accumulation during cellular senescence in human fibroblasts *in vitro* [J].

- Antioxid Redox Signal*, 2003, 5(5): 507-516.
- [14] Bhat R, Crowe E P, Bitto A, *et al.* Astrocyte senescence as a component of Alzheimer's disease [J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e45069.
- [15] Xia M L, Xie X H, Ding J H, *et al.* Astragaloside IV inhibits astrocyte senescence: Implication in Parkinson's disease [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 105.
- [16] Mohamad Kamal N S, Safuan S, Shamsuddin S, *et al.* Aging of the cells: Insight into cellular senescence and detection Methods [J]. *Eur J Cell Biol*, 2020, 99(6): 151108.
- [17] Chen Q Z, Sun X L, Luo X L, *et al.* PIK3R3 inhibits cell senescence through p53/p21 signaling [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(9): 798.
- [18] Radspieler M M, Schindeldecker M, Stenzel P, *et al.* Lamin-B1 is a senescence-associated biomarker in clear-cell renal cell carcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2019, 18(3): 2654-2660.
- [19] Miller I, Min M W, Yang C, *et al.* Ki67 is a graded rather than a binary marker of proliferation versus quiescence [J]. *Cell Rep*, 2018, 24(5): 1105-1112.
- [20] Ohtani N. The roles and mechanisms of senescence-associated secretory phenotype (SASP): Can it be controlled by senolysis? [J]. *Inflamm Regen*, 2022, 42(1): 11.
- [21] Kirkland J L, Tchkonja T. Cellular senescence: A translational perspective [J]. *EBioMedicine*, 2017, 21: 21-28.
- [22] Palasz E, Wysocka A, Gasiorowska A, *et al.* BDNF as a promising therapeutic agent in Parkinson's disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3): 1170.
- [23] Nakagawa T, Guarente L. SnapShot: Sirtuins, NAD, and aging [J]. *Cell Metab*, 2014, 20(1): 192-192.
- [24] Chen C, Zhou M, Ge Y C, *et al.* SIRT1 and aging related signaling pathways [J]. *Mech Ageing Dev*, 2020, 187: 111215.
- [25] D'Onofrio N, Vitiello M, Casale R, *et al.* Sirtuins in vascular diseases: Emerging roles and therapeutic potential [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852(7): 1311-1322.
- [26] Satoh A, Brace C S, Rensing N, *et al.* Sirt1 extends life span and delays aging in mice through the regulation of Nk2 homeobox 1 in the DMH and LH [J]. *Cell Metab*, 2013, 18(3): 416-430.
- [27] García-Prat L, Martínez-Vicente M, Perdiguer E, *et al.* Autophagy maintains stemness by preventing senescence [J]. *Nature*, 2016, 529(7584): 37-42.
- [28] Hansen M, Rubinsztein D C, Walker D W. Autophagy as a promoter of longevity: Insights from model organisms [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(9): 579-593.
- [29] Xu C, Wang L, Fozouni P, *et al.* SIRT1 is downregulated by autophagy in senescence and ageing [J]. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(10): 1170-1179.

[责任编辑 李亚楠]