

人参皂苷Rg1调控神经干细胞衰老作用及机制探讨

彭彬^{1,2} 王朝丽² 冯丽² 王亚平^{1*}¹重庆医科大学干细胞与组织工程研究室, 重庆 400016; ²川北医学院组织学与胚胎学教研室, 南充 637007)

摘要 用三丁基过氧化氢(t-BHP)构建神经干细胞(NSC)体外衰老模型, 探讨人参皂苷Rg1延缓NSC衰老的作用及机制, 为寻找延缓NSC衰老新途径提供理论和实验依据。将从新生SD大鼠海马组织中分离纯化的第三代NSC随机分为五组。对照组: 在NSC完全培养基中培养2 h; 衰老模型组: 在对照组基础上加入终浓度为100 $\mu\text{mol/L}$ 的t-BHP培养2 h; Rg1组: 在对照组基础上加入终浓度为10 $\mu\text{g/mL}$ 的Rg1培养2 h; Rg1抗衰老组: 在衰老造模同时加入终浓度为10 $\mu\text{g/mL}$ 的Rg1培养2 h; Rg1治疗衰老组: 终浓度为100 $\mu\text{mol/L}$ 的t-BHP培养2 h后再加入终浓度为10 $\mu\text{g/mL}$ 的Rg1继续培养2 h。MTT法、神经球计数、分化细胞计数以及衰老相关 β -半乳糖苷酶(SA- β -Gal)染色阳性神经球计数分析Rg1调控NSC衰老的生物学作用, RT-PCR检测衰老相关基因*p16^{INK4a}*、*p21^{Cip1/Waf1}* mRNA的表达。结果显示, 与衰老组比较, Rg1抗衰老组和治疗衰老组NSC的增殖能力和多向分化能力显著增强; 衰老特异性SA- β -Gal染色阳性神经球百分比显著降低, *p16^{INK4a}*、*p21^{Cip1/Waf1}* mRNA的表达显著下降。提示Rg1具有延缓t-BHP诱导NSC衰老的作用, 其机制可能与下调*p16^{INK4a}*、*p21^{Cip1/Waf1}*的表达有关。

关键词 人参皂苷Rg1; 神经干细胞; 衰老; 调控机理

干细胞衰老学说是现今解释机体衰老机制的最新学说^[1-3]。随着对干细胞研究的深入, 人们认识到干细胞并非是“长生不老”的细胞, 所有衰老现象如组织器官退变、功能丧失、肿瘤发生和反复感染等老年性疾病都反映出成体干细胞衰老的水平。研究显示, 随着年龄的增长, 人或动物大脑内的神经发生率呈指数下降^[4-5], 推测其原因可能与NSC衰老导致其自我更新和多向分化功能衰退有关。因此, 将NSC、NSC衰老与人体衰老密切结合, 深入研究NSC衰老和延缓NSC衰老的现代生物学机理, 寻找重新激活干细胞的方法和调控其靶向分化, 对推动人体衰老问题的研究、预防老年疾病和治疗退行性疾病有不可估量的社会价值。

人参作为中医临床“补气”补药已有2 000余年的应用历史, 现代药理学研究发现人参皂苷Rg1对中枢神经系统有明确的调节作用, 具促智益智功效。Shen等^[6-7]研究表明人参皂苷Rg1能提高体内外神经前体细胞的增殖能力, 但其作用机制尚不清楚。迄今未见从延缓NSC衰老角度探讨人参皂苷Rg1抗衰老的报道。本研究采用三丁基过氧化氢(t-BHP)构建NSC体外衰老模型, 探讨人参皂苷Rg1延缓和治疗NSC衰老的作用与机理, 旨在为研究延缓NSC衰老以及重新激活衰老NSC的途径提供理论及实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级新生SD大鼠, 雌雄均有, 由川北医学院实验动物中心提供。

1.2 试剂

人参皂苷单体Rg1 (吉林宏久生物有限公司, 纯度>98%), DMEM/F12、D-Hank's液(Hyclone公司), b-FGF、EGF (Peprotech公司), B27、Trizol试剂、Stem Pro Accutase (Invitrogen公司), 胎牛血清(Gibco公司), RT-PCR试剂盒(TaKaRa公司), Gal-C一抗(Millipore公司), 细胞衰老特异性 β -半乳糖苷酶染色试剂盒(Genmed公司), 三丁基过氧化氢、BrdU (Sigma公司), SP试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.3 NSC分离培养及传代

将新生24 h内的SD大鼠断颈处死, 在解剖显微镜下仔细剥离脑膜并夹取海马组织放入装满预冷的DMEM/F12培养基的离心管内。待组织块沉淀后小心吸走上清, 加入1 mL StemPro Accutase, 入37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱消化10 min后, 移液枪适当吹打, 可见组织块消失,

收稿日期: 2011-03-22 接受日期: 2011-07-04

国家自然科学基金(No.30973818)资助项目

*通讯作者。Tel: 023-68485968, E-mail: ypwangcq@yahoo.cn

形成稍浑浊的细胞悬液。静置数分钟,待未解离的组织沉到底部,小心吸取上清,1 000 r/min离心5 min,弃上清,用新鲜配制的NSC完全培养基(含20 ng/mL EGF、b-FGF和2% B27的DMEM/F12)重悬细胞,以 5×10^5 /mL密度接种于培养瓶中,置37 °C、5% CO₂孵箱中培养,每3 d半量换液、7 d传代。

1.4 实验分组

将第3代NSC按 5×10^5 /mL密度接种到培养瓶中,随机分为以下5组:对照组(在NSC完全培养基中培养2 h)、衰老模型组(对照组基础上加入终浓度为100 μmol/L的t-BHP培养2 h)、Rg1组(对照组基础上加入终浓度为10 μg/mL的Rg1培养2 h)、Rg1抗衰老组(对照组基础上同时加入终浓度为100 μmol/L的t-BHP和终浓度为10 μg/mL的Rg1培养2 h)和Rg1治疗衰老组(终浓度为100 μmol/L的t-BHP培养2 h后再加入终浓度为10 μg/mL的Rg1继续培养2 h)。各组作用结束后离心、洗涤细胞,进行以下NSC衰老相关指标检测。

1.5 NSC体外衰老相关指标检测

1.5.1 MTT法检测Rg1对衰老NSC增殖的影响 各组NSC按 5×10^5 /mL密度接种到96孔培养板,每孔200 μL,每组重复3孔。在96孔板内继续培养72 h,1 000 r/min离心5 min后弃上清,每孔加入180 μL NSC完全培养基以及20 μL 5 mg/mL MTT,37 °C,5% CO₂孵箱中培养4 h后,吸去培养液,每孔加入150 μL DMSO于振荡器上振摇10 min,待蓝色晶体完全溶解后,在酶标仪上测定570 nm处的吸光度值(D_{570})。

1.5.2 神经球计数检测Rg1对衰老NSC克隆球形成数量的影响 各组NSC按3 000/mL的密度接种到24孔培养板中,每孔1 mL,每组重复3孔。各组NSC在新鲜无血清培养基中继续培养到第7 d形成第三代神经球,在100×显微镜下每孔随机抽选20个视野进行神经球(由6个以上NSC组成)计数,以3个复孔的平均值作为该组NSC克隆形成的神经球数量估计。

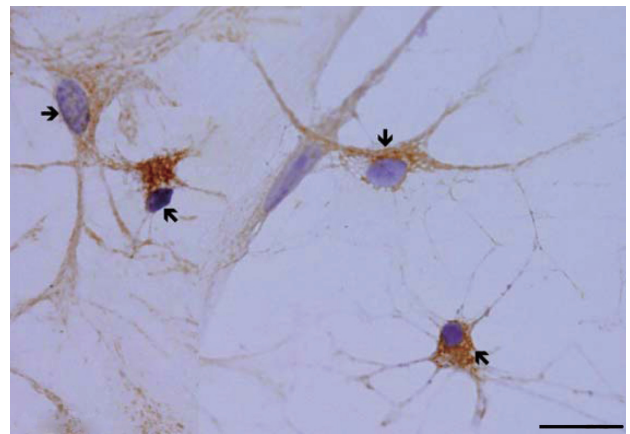
1.5.3 体视学方法检测Rg1对衰老NSC分化形成的三种细胞数密度的影响 各组NSC离心洗涤后用含10%小牛血清的DMEM/F12培养基重悬,按3 000/mL的密度接种到预先铺有多聚赖氨酸包被的盖玻片的6孔板中,每孔2 mL,每组重复3孔,继续培养到第7天。取出6孔板中的盖玻片,用0.01 mol/L PBS洗涤2次,4%多聚甲醛固定30 min后,行小胶质细胞标记物Gal-C免疫组化染色。具体染色步骤按二抗试剂盒(SP

试剂盒)说明书进行,苏木精复染后中性树胶封片。

神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞计数:采用Visopharm(丹麦)的NewCAST体视学系统及Olympus DP71型光学显微镜用60×物镜(数值孔径1.42)观察切片,根据Gal-C阳性染色以及细胞、细胞核的形状仔细分辨神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞(图1)。从切片的左上角随机选取第一个测试视野,然后用电脑控制的电动载物台依次沿X轴和Y轴等距随机抽选视野进行观察和测量(步进参数为300 μm×200 μm)。利用测试系统软件在图像上叠加4个面积为5 774 μm²的长方形测试框,根据禁线法则计数神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞的数量。用电动载物台按300 μm×200 μm的步进走完每张切片,得到的各种细胞的总数除以所用测试框的总面积,即得神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞的数密度。

1.5.4 体视学方法检测Rg1对SA-β-Gal阳性神经球百分比的影响 各组NSC用0.01 mol/L PBS离心洗涤后按3 000/mL的密度接种到24孔板中,每孔1 mL,每组重复3孔。各组NSC在新鲜无血清培养基中继续培养到第7 d形成第三代神经球,按照细胞衰老特异性β-半乳糖苷酶原位染色试剂盒说明书进行β-半乳糖苷酶(SA-β-Gal)染色(具体步骤略)。染色结束后,0.01 mol/L PBS离心洗涤2次,调节神经球浓度,滴加到多聚赖氨酸处理的载玻片上,10 μL/张。

SA-β-Gal染色阳性神经球百分比估计:分别计数



→: 神经元; ←: 少突胶质细胞; ↓: 星形胶质细胞。标尺=10 μm。
→: neuron; ←: oligodendrocyte; ↓: astrocyte. Scale bar=10 μm.

图1 Gal-C免疫细胞化学染色示意三种分化细胞
Fig.1 Three types of differentiated cells with Gal-C immunocytochemical staining

视野内SA- β -Gal阳性神经球和阴性神经球的数量,具体步骤同分化细胞计数,只是采用 $\times 10$ 物镜(数值孔径0.40)观察,每个视野只测量了1个面积为 0.58 mm^2 的测试框,步进参数为 $900 \mu\text{m} \times 700 \mu\text{m}$,得到的阳性神经球的数量与阳性、阴性神经球数量之和的比值即为SA- β -Gal阳性神经球百分比。

1.5.5 RT-PCR检测Rg1对衰老NSC $p16^{\text{INK4a}}$ 、 $p21^{\text{Cip1/Waf1}}$ mRNA表达的影响 各组NSC按 $5 \times 10^6/\text{mL}$ 的密度接种到6孔板中,用 0.01 mol/L PBS离心洗涤2次,每孔加入 1 mL Trizol,分别提取各组NSC总RNA。紫外分光光度计测定总RNA的 D_{260}/D_{280} 值,取适量RNA用1%琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性。按RT-PCR试剂盒操作步骤将总RNA反转录为相应的cDNA,逆转录反应条件为: $42 \text{ }^\circ\text{C}$, 30 min ; $99 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 min ; $5 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 min 。以RNA反转录得到的cDNA为模板,扩增 $p16^{\text{INK4a}}$ 、 $p21^{\text{Cip1/Waf1}}$,以 β -actin为内参照。 $p16^{\text{INK4a}}$ 上游引物为:5'-GGG AGG GCT TCC TAG ACA C-3',下游引物为:5'-GCG CAG AGT TAT GCC TGT C-3',扩增片段长度:193 bp; $p21^{\text{Cip1/Waf1}}$ 上游引物为:5'-GTG ATG TCC GAC CTG TTC C-3',下游引物为:5'-GCA AAG TTC CAC CGT TCT C-3',扩增片段长度:139 bp; β -actin上游引物为:5'-GAG GGA AAT CGT GCG TGA C-3',下游引物为:5'-CGT TGC CGA TAG TGA TGA CC-3',扩增片段长度:264 bp。PCR反应条件: $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性3 min; $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性30 s, $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火30 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸1 min, 35个循环; $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火5 min。PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像分析系统对基因条带进行扫描成像,Quantity One软件(Bio-Rad)分析电泳图上每条基因条带光密度值。计算各个样本的强度与内参的比值。

1.6 统计学分析

文中数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,用SPSS11.0统计软件,组间的比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用SNK检验。 $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT检测Rg1对衰老NSC增殖能力的影响

与对照组相比,衰老组NSC的吸光度值降低了47%; Rg1组略高于对照组,两组间的差异无统计学意义($P > 0.05$);与衰老组比较, Rg1抗衰老组和Rg1治疗衰老组NSC的吸光度值分别升高了35%和78%,且Rg1治疗衰老组的 D 值高于Rg1抗衰老组(表1)。

表1 MTT检测Rg1对衰老NSC增殖能力的影响($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Effects of Rg1 on proliferation of aged NSC with MTT assay ($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	吸光度值 Absorbance
Control group	0.72 \pm 0.16
Aging group	0.37 \pm 0.05*
Rg1 group	0.82 \pm 0.07 [#]
Rg1 anti-aging group	0.50 \pm 0.03* [#]
Rg1 treated-aging group	0.66 \pm 0.02* [#]

与对照组相比, * $P < 0.05$; 与衰老组相比, [#] $P < 0.05$; 与Rg1抗衰老组相比, * $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$, compared with control group; [#] $P < 0.05$, compared with aging group; * $P < 0.05$, compared with anti-aging group.

2.2 Rg1对衰老NSC形成神经球数量的影响

与对照组比较,衰老组NSC克隆形成的神经球的数量降低了46%; Rg1组神经球数略高于对照组,但两组之间的差异无统计学意义。与衰老组比较, Rg1抗衰老组和治疗衰老组NSC克隆数分别增加了29%和35% (表2)。

表2 Rg1对衰老NSC形成神经球数量的影响($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Effects of Rg1 on the number of neurospheres cloned from aged NSC ($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	神经球数 No. of neurospheres
Control group	57.1 \pm 4.0
Aging group	31.6 \pm 4.1*
Rg1 group	59.2 \pm 4.9 [#]
Rg1 anti-aging group	40.5 \pm 2.5* [#]
Rg1 treated-aging group	42.1 \pm 2.8* [#]

与对照组相比, * $P < 0.05$; 与衰老组相比, [#] $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$, compared with control group; [#] $P < 0.05$, compared with aging group.

2.3 Rg1对衰老NSC多向分化能力的影响

与对照组比较,衰老组NSC分化形成的神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞的数量分别显著降低了68%、89%和69%; Rg1组与对照组间的差异无统计学意义。与衰老组比较, Rg1抗衰老组神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞的数量显著增加,分别是衰老组的2.2倍、1.9倍和1.7倍; Rg1治疗衰老组三种细胞的数量则分别显著增加到衰老组的2.7倍、6.3倍和2.7倍。Rg1治疗衰老组三种分化细胞的数量显著高于抗衰老组(表3)。

表3 Rg1对衰老NSC分化形成的三种细胞数密度的影响($\bar{x}\pm s$)Table 3 Effects of Rg1 on the numerical density (ND) of cells defifferentiated from aged NSC ($\bar{x}\pm s$)

组别 Groups	神经元数密度/mm ² ND of neurons/mm ²	星形胶质细胞数密度/mm ² ND of astrocytes/mm ²	少突胶质细胞数密度/mm ² ND of oligodendrocytes/mm ²
Control group	197.7±18.3	31.9±2.1	58.0±4.3
Aging group	63.4±3.9*	3.5±0.2*	18.6±1.1*
Rg1 group	201.4±13.5 [#]	33.9±2.6 [#]	64.0±4.1 [#]
Rg1 anti-aging group	139.5±11.1* [#]	6.8±0.4* [#]	32.3±2.1* [#]
Rg1 treated-aging group	173.5±12.2 [#] *	22.1±2.0 [#] *	51.1±3.3* [#]

与对照组相比, * $P<0.05$; 与衰老组相比, [#] $P<0.05$; 与Rg1抗衰老组相比, * $P<0.05$ 。

* $P<0.05$, compared with control group; [#] $P<0.05$, compared with aging group; * $P<0.05$, compared with anti-aging group.

2.4 Rg1对SA-β-Gal染色阳性神经球百分比的影响

SA-β-Gal染色显示阳性神经球着蓝色(图2)。与对照组比较, 衰老组SA-β-Gal染色阳性神经球百分比显著高于对照组; Rg1组阳性神经球百分比低于对照组, 但差异无统计学意义; Rg1抗衰老组及治疗衰老组阳性神经球百分比显著低于衰老组, 且Rg1治疗衰老组阳性神经球百分比比较Rg1抗衰老组显著降低(表4)。

2.5 Rg1对衰老NSC *p16^{INK4a}*、*p21^{Cip1/Waf1}* mRNA表达水平的影响

提取的各组细胞总RNA经1%琼脂糖凝胶电泳可见清晰的28S、18S、5S三条带, 说明提取的RNA有较好的完整性。RNA的 D_{260}/D_{280} 比值在1.8~2.0之间, 说明RNA的纯度较高, RNA含量足以进行RT-PCR反应。

RT-PCR结果显示*p16^{INK4a}*、*p21^{Cip1/Waf1}*基因在各组均有表达。对照组和Rg1组的表达明显很低, 而衰老组表达明显增高, Rg1抗衰老组和治疗衰老处理后, 表达有一定下降(图3A)。以实验组*p16^{INK4a}*、*p21^{Cip1/Waf1}*

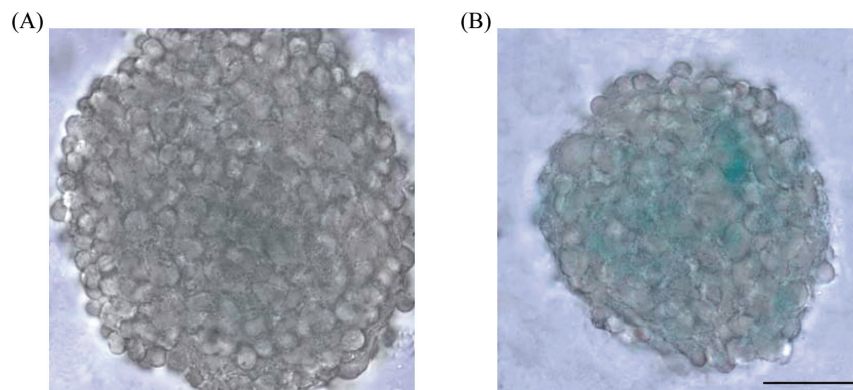
表4 Rg1对SA-β-Gal染色阳性神经球百分比的影响(%, $\bar{x}\pm s$)Table 4 Effects of Rg1 on the percentage of SA-β-Gal staining positive neurospheres (%, $\bar{x}\pm s$)

组别 Groups	SA-β-Gal阳性细胞百分比(%) Percentage of SA-β-Gal staining positive cell (%)
Control group	6.53±0.51
Aging group	52.1±4.2*
Rg1 group	6.12±0.41
Rg1 anti-aging group	31.62±1.87* [#]
Rg1 treated-aging group	22.23±3.10* [#] *

与对照组相比, * $P<0.05$; 与衰老组相比, [#] $P<0.05$; 与Rg1抗衰老组相比, * $P<0.05$ 。

* $P<0.05$, compared with control group; [#] $P<0.05$, compared with aging group; * $P<0.05$, compared with anti-aging group.

mRNA与β-actin灰度比值作为对照组与实验组相对表达水平估计, 衰老组*p16^{INK4a}*、*p21^{Cip1/Waf1}*mRNA表达水平显著高于对照组; 对照组与Rg1组间差异无统计学意义; Rg1抗衰老及治疗衰老组*p16^{INK4a}*、*p21^{Cip1/Waf1}*mRNA表达水平较衰老组显著降低, Rg1治疗衰老组表达低于Rg1抗衰老组(图3B)。

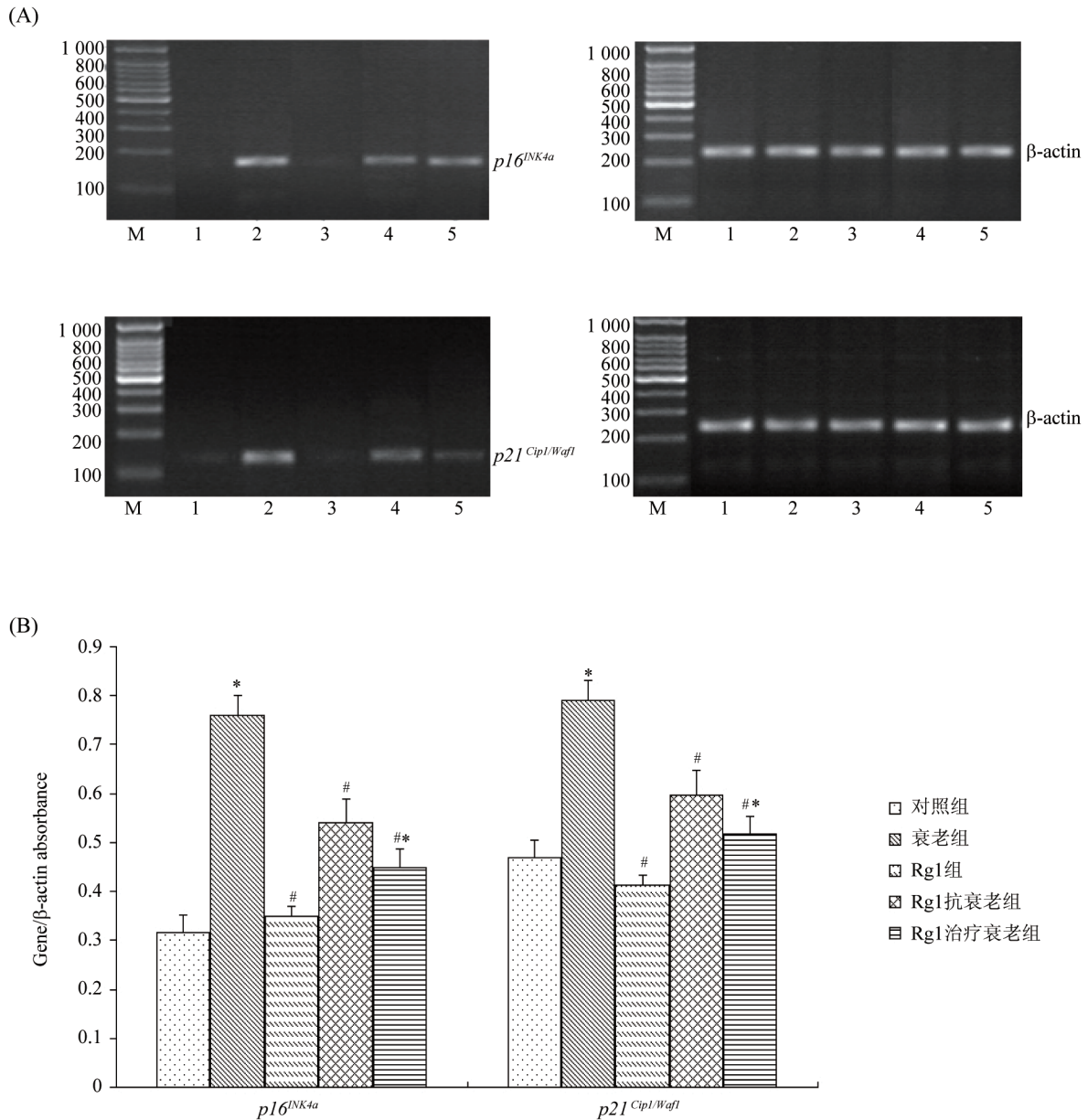


A: SA-β-半乳糖苷酶染色阴性神经球; B: SA-β-半乳糖苷酶染色阳性神经球。标尺=60 μm。

A: SA-β-Gal negative neurosphere; B: SA-β-Gal positive neurosphere. Scale bar=60 μm.

图2 衰老相关SA-β-半乳糖苷酶染色

Fig.2 Senescence-associated β-galactosidase staining



A: *p16^{INK4a}*、*p21^{Cip1/Waf1}* mRNA表达水平。M: DNA marker; 1~5: 对照组、衰老组、Rg1组、Rg1抗衰老组和Rg1治疗衰老组; B: *p16^{INK4a}*、*p21^{Cip1/Waf1}* mRNA相对表达水平分析。与对照组比较, * $P < 0.05$; 与衰老组比较, # $P < 0.05$; 与Rg1抗衰老组比较, * $P < 0.05$ 。

A: RT-PCR results of *p16^{INK4a}* and *p21^{Cip1/Waf1}* mRNA. M: DNA marker; 1: control group; 2: aging group; 3: Rg1 group; 4: Rg1 anti-aging group; 5: Rg1 treat-aging group; B: relative levels of *p16^{INK4a}* and *p21^{Cip1/Waf1}* mRNA expressions. * $P < 0.05$, compared with control group; # $P < 0.05$, compared with aging group; * $P < 0.05$, compared with anti-aging group.

图3 Rg1对衰老NSC *p16^{INK4a}*、*p21^{Cip1/Waf1}* mRNA表达的影响

Fig.3 Effects of Rg1 on the expressions of *p16^{INK4a}* and *p21^{Cip1/Waf1}* mRNA in aged NSC

3 讨论

干细胞衰老学说是机体衰老机制的最新学说, 干细胞衰老将导致其自我更新和多向分化能力逐渐衰退。同时, 衰老特异性SA- β -Gal活性增强、衰老相关基因表达水平改变以及端粒长度缩短和端粒酶活性增强等是细胞衰老的共同特征。*p16*和*p21*基因

分别是由*Rb*和*p53*依赖调控的两个衰老诱导途径中的关键调节因子。本研究从新生大鼠海马组织内提取NSC进行原代培养和传代, 用100 $\mu\text{mol/L}$ t-BHP诱导第3代NSC后, NSC出现下列衰老细胞特征: MTT及神经球计数显示衰老NSC增殖能力下降; 分化细胞计数显示衰老NSC多向分化能力下降; 衰老特异

性SA- β -Gal染色阳性神经球百分比增加; 衰老相关基因 $p16^{INK4a}$ 、 $p21^{Cip1/Waf1}$ mRNA表达水平升高。因此, 100 μ mol/L t-BHP能成功诱导并构建NSC体外衰老模型。

尽管衰老是不可抗拒的生命规律, 但干预衰老过程, 延缓衰老进程是可能的。人参应用于中医临床已有2 000多年的历史, 中国最早的药书《神农本草经》中就描述了人参的促智、抗衰老等药理功能^[8-9]。随着现代科技的发展, 人们已从人参植物中分离出了40多种人参皂苷单体, 人参皂苷单体Rg1是人参的标志性成分, 具有延缓细胞衰老的作用^[10]。但是, 人参皂苷真正用于制作抗衰老药物的还很少, 其作用机制尚不十分清楚。有研究显示细胞周期蛋白依赖激酶(CDK)抑制因子 $p16^{INK4a}$ 、 $p21^{Cip1/Waf1}$ 等是细胞衰老的主要效应物^[11]。

本研究运用100 μ mol/L t-BHP诱导的NSC衰老模型探讨人参皂苷Rg1体外抗衰老作用及机制, 结果显示: 与衰老组相比, Rg1抗衰老及治疗衰老组MTT及神经球计数结果提示NSC增殖能力显著增强; 分化细胞计数结果提示NSC多向分化能力显著增强; 衰老特异性SA- β -Gal染色阳性神经球比例降低。说明Rg1抗衰老及治疗衰老处理后衰老NSC的自我更新及多向分化能力显著增强。同时, 本研究结果显示单纯Rg1 10 μ g/mL作用于正常NSC 2 h对NSC的增殖、分化能力没有显著的促进作用。有研究表明, Rg1能提高体外正常NSC的增殖和分化能力^[12-13], 可能与Rg1的作用浓度更大或作用时间更长有关。Rg1治疗衰老组各指标恢复均优于Rg1抗衰老组, 我们推测可能与抗衰老处理时培养液中同时加入t-BHP和Rg1对实验结果产生了影响有关, 其原因有待进一步研究。

细胞衰老过程是借助于信号传导途径参与的。其中, 由视网膜母细胞瘤抑制蛋白(Rb)和p53控制的信号途径至关重要。当这些途径所涉及的关键调节因子(如Rb/ $p16^{INK4a}$ 、 $p19^{ARF}$ / $p53$ / $p21^{Cip1}$ 等)发生突变, 细胞将延缓衰老或绕过衰老程序继续增殖, 因此, 这些基因被称为抑癌基因^[11]。其中, $p16$ 和 $p21$ 基因分别是Rb和p53依赖调控的两个衰老诱导途径中的关键调节因子, 同时, $p21$ 还有由分裂原诱导的p53非依赖途径。大量研究表明, $p16$ 和 $p21$ 的高表达, 可以诱导细胞衰老, 又被称为衰老相关基因^[11, 14-16]。Molofsky等^[16]的研究表明, 随着小鼠年龄增加, 下脑

室区的祖细胞增殖和嗅球神经再生能力下降、专能干细胞数量和自我更新潜能都降低的同时, 伴随着 $p16^{INK4a}$ 的表达增加。通过基因剔除技术获得了 $p16^{INK4a}$ 缺陷小鼠, $p16^{INK4a}$ 基因缺陷虽然没有使老年小鼠大脑变年轻, 但显著增加了祖细胞的功能和神经再生能力, 延缓了大脑的衰老进程。

本研究结果显示, 衰老组NSC $p16^{INK4a}$ 、 $p21^{Cip1/Waf1}$ mRNA表达水平均显著高于对照组, 证明t-BHP可通过调控 $p16^{INK4a}$ 、 $p21^{Cip1/Waf1}$ 基因的表达诱导NSC衰老; Rg1抗衰老及治疗衰老处理后, $p16^{INK4a}$ 、 $p21^{Cip1/Waf1}$ mRNA表达水平均显著低于衰老组, 提示Rg1延缓NSC衰老的作用与调控 $p16^{INK4a}$ 、 $p21^{Cip1/Waf1}$ mRNA的表达水平有关。因此, 我们可以推测 $p16^{INK4a}$ 、 $p21^{Cip1/Waf1}$ 通过p16-RB和p19^{ARF}/p53/p21^{Cip1}通路在Rg1延缓NSC衰老过程中发挥着重要调控作用。从遗传因素看, 衰老并非由单一基因或单一作用所决定, 而是一连串基因激活和阻抑及其通过各自产物相互作用的结果, 是否还有其它机制参与衰老以及Rg1抗衰老作用还有待进一步研究。近年来, 老年病发病机理与衰老机理的汇合点的研究, 将为阐明衰老机理提供新的线索。

参考文献 (References)

- 1 王亚平. 干细胞衰老与疾病. 北京: 科学出版社, 2009: 1-22.
- 2 Rossi DJ, Bryder D, Weissman IL. Hematopoietic stem cell aging: Mechanism and consequence. *Exp Gerontol* 2007; 42(5): 385-90.
- 3 Gazit R, Weissman H, Rossi DJ. Hematopoietic stem cells and the aging hematopoietic system. *Semin Hematol* 2008; 45(4): 218-24.
- 4 Olariu A, Cleaver KM, Cameron HA. Decreased neurogenesis in aged rats results from loss of granule cell precursors without lengthening of the cell cycle. *J Comp Neurol* 2007; 501(4): 659-67.
- 5 Rao MS, Hattiangady B, Shetty AK. The window and mechanisms of major age-related decline in the production of new neurons within the dentate gyrus of the hippocampus. *Aging Cell* 2006; 5 (6): 545-58.
- 6 Shen LH, Zhang JT. Ginsenoside Rg1 promotes proliferation of hippocampal progenitor cells. *Neurol Res* 2004; 26(4): 422-8.
- 7 张均田. 人参皂苷Rg1促智作用及机制——对神经可塑性和神经发生的影响. *药理学报* 2005; 40(5): 385-8.
- 8 Dahlstrand J, Lardelli M, Lendhal U. Nestin mRNA expression correlates with the central nervous system progenitor cell state in many, but not all, regions of developing central nervous system. *Dev Brain Res* 1995; 84(1): 109-29.
- 9 童坦君. 衰老机制及其学说. *生命科学进展* 2007; 38(1): 14-8.

- 10 许士凯, 王晓东, 赵军宁, 李梅, 陆敏仪, 陈号宏. 天然药物抗衰老有效成分研究进展(之三). 现代中西医结合杂志 2005; 14(21): 2772-4.
- 11 郑文婕, 童坦君, 张宗玉. 细胞衰老的重要通路: p16^{INK4a}/Rb和p19^{ARF}/p53/p21^{Cip1}信号途径. 生命的化学 2002; 22(4): 314-6.
- 12 崔荣太, 蒲传强, 刘洁晓, 毛燕玲. 人参皂苷Rg1对大鼠脑源性神经干细胞分化作用的实验研究. 中国神经精神疾病杂志 2008; 34(2): 109-11.
- 13 崔荣太, 蒲传强, 刘洁晓, 毛燕玲. 人参皂苷Rg1对体外培养大鼠神经干细胞的增殖作用. 军医进修学院学报 2008; 29(1): 22.
- 14 Duan J, Zhang Z, Tong T. Senescence delay of human diploid fibroblast induced by antisense p16^{INK4a} expression. J Biol Chem 2001; 276(51): 48325-31.
- 15 Shilkaitis A, Green A, Punj V, Steele V, Lubet R, Christov K. Dehydroepiandrosterone inhibits the progression phase of mammary carcinogenesis by inducing cellular senescence via a p16-dependent but p53-independent. Breast Cancer Res 2005; 7(6): R1132-40.
- 16 Molofsky AV, Slutsky SG, Joseph NM, He S, Pardal R, Krishnamurthy J, et al. Increasing p16^{INK4a} expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. Nature 2006; 443(7110): 448-52.

The Effects and the Underlying Mechanisms of Ginsenoside Rg1 to Regulate Neural Stem Cell Senescence

Peng Bin^{1,2}, Wang Chaoli², Feng Li², Wang Yaping^{1*}

(¹Laboratory of Stem Cell and Tissue Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; ²Department of Histology and Embryology, North Sichuan Medical College, Nanchong 637007, China)

Abstract To provide the theory and experiment foundation for searching the methods of how to delay neural stem cell (NSC) senescence, this study explored the anti-aging effects and the underlying mechanisms of Ginsenoside Rg1 on aging model of NSC induced by 100 μmol/L tert-butylhydroperoxide (t-BHP). The third generation of NSCs isolated and purified from neonatal SD rats were divided into 5 groups: control group, aging group (treated with 100 μmol/L t-BHP for 2 h), Rg1 group (treated with 10 μg/mL Rg1 for 2 h), Rg1 anti-aging group (co-treated with 100 μmol/L t-BHP and 10 μg/mL Rg1 for 2 h) and Rg1 treated-aging group (treated with 10 μg/mL Rg1 for 2 h after treated with 100 μmol/L t-BHP for 2 h). The MTT assay, neurospheres counting, differentiated cells counting and senescence-associated β-Galactosidase (SA-β-Gal) staining were used to evaluate the effects of ginsenoside Rg1 to regulate NSC senescence. The expressions of senescence associated p16^{INK4a} and p21^{Cip1/Waf1} mRNA were examined by RT-PCR. Compared to aging group, the reproductive activity and the differentiated activity are significantly enhanced; the percentage of SA-β-Gal positive neurospheres and the expressions of p16^{INK4a} and p21^{Cip1/Waf1} mRNA were significantly reduced in Rg1 anti-aging group and Rg1 treated-aging group. These results suggested that Rg1 can regulate the aging process of NSC induced by t-BHP. The underlying mechanisms maybe relevant to the down-regulation of expressions of the p16^{INK4a} and p21^{Cip1/Waf1} mRNA.

Key words Ginsenoside Rg1; neural stem cell; aging; regulating mechanism

Received: March 22, 2011 Accepted: July 4, 2011

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30973818)

*Corresponding author. Tel: 86-23-68485968, E-mail: ypwangcq@yahoo.cn