·基础研究·

黄山药总皂苷对晚期糖基化终产物诱导心肌老化的保护作用及机制

徐婉莹[1],查志敏[1],冯楚炎[2],郭妍[1*]
([1]南京医科大学第一附属医院老年心血管内科,南京 210029, [2]苏北人民医院老年科,江苏 扬州 225001)

【摘 要】 **目的** 研究黄山药总皂苷(TSDP)对晚期糖基化终产物(AGEs)诱导的心肌老化产生的作用并初步探讨其机制。**方法** 用不同浓度TSDP干预原代心肌细胞,以CCK-8试剂盒(CCK-8)检测细胞活性。细胞预先TSDP干预2 h后加入AGEs,通过免疫印迹实验检测沉默信息调节因子(SIRT3)、超氧化物歧化酶-2(SOD2)、及衰老相关蛋白p53和p16水平的表达;2′,7′-二氯二氢荧光素二乙酸酯探针(DCFH-DA)检测细胞内活性氧(ROS)。**结果** 与对照组比较,AGEs干预组β半乳糖苷酶(SA-β-Gal)活性增加,p53和p16蛋白水平增加, SOD2和SIRT3蛋白表达下降,ROS产生增多,差异有统计学意义($P<0.05$)。与AGEs组相比,TSDP预干预组SA-β-Gal活性降低,SIRT3和SOD2蛋白水平增加,p53和p16下降,ROS增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** TSDP对AGEs诱导的心肌细胞老化起保护作用,其机制可能与升高SIRT3和调节氧化应激有关。

【关键词】 黄山药总皂苷;晚期糖基化终产物;心肌细胞老化;SIRT3;氧化应激
【中图分类号】 R541 【文献标志码】 A 【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2020.07.128

Protective effect of total saponins of dioscorea pathaica on cardiac senescence induced by advanced glycation end-products and its mechanism

XU Wan-Ying[1], ZHA Zhi-Min[1], FENG Chu-Yan[2], GUO Yan[1*]
([1]Department of Geriatric Cardiology, First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China; [2]Department of Geriatrics, Northern Jiangsu People's Hospital, Yangzhou 225001, Jiangsu Province, China)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the effect of total saponins of Dioscorea pathaica (TSDP) on cardiac senescence induced by advanced glycation end-products (AGEs) and its mechanism. **Methods** Neonatal rat cardiomyocytes were incubated with different concentrations of TSDP, and cell viability was measured by Cell Counting Kit-8 (CCK-8). AGEs were added 2 h after the cells were pre-treated with TSDP. Western blotting was used to detect levels of silent mating type information regulation 2 homolog-3 (SIRT3), superoxide dismutase-2 (SOD2), and aging-related p53 and p15. 2,7-Dichlorodi-hydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) was used to detect intracellular reactive oxygen species (ROS). **Results** Compared with the control group, the activity of SA-β-Gal and the level of p53 and p16 increased, the production of ROS increased, and the expression of SOD2 and SIRT3 decreased in the AGEs group, the differences being statistically significant ($P<0.05$). Compared with the AGEs group, the activity of SA-β-Gal decreased, ROS increased, SIRT3 and SOD2 protein levels increased, and p53 and p16 decreased in the TSDP pre-treatment group, differences being statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** TSDP has protective effects on AGEs-induced cardiomyocyte aging, and its mechanism may be related to the increase of SIRT3 and regulation of oxidative stress.

【**Key words**】 total saponins of dioscoreapathaica; advanced glycation end-products; cardiac senescnece; SIRT3; oxidative stress
This work was supported by Jiangsu Provincial Cadre Health Research Project (BJ18017).
Corresponding author: *GUO Yan*, *E-mail*:*guoyan51@hotmail.com*

晚期糖基化终产物(advanced glycation end products,AGEs)是脂质、核酸、蛋白质等生物大分子的氨基在非酶促条件下,与还原糖经过一系列复杂的反应后重排折叠最终形成的不可逆产物。随着年龄增长,AGEs在体内的积累也越来越多,影响身体重要器官心脑肾的功能[1]。去乙酰化酶家族中,沉默信息调节因子(silent mating type information regulation 2 homolog-3,SIRT3)被称为“长寿蛋白”,是

收稿日期:2019-08-05;**接受日期**:2020-01-16
基金项目:江苏省干部保健科研课题(BJ18017)
通信作者:郭妍, E-mail: guoyan51@hotmail.com

存在于线粒体内的一种依赖烟碱胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD)的组蛋白去乙酰化酶。它参与调节氧化应激、线粒体代谢、线粒体动力学及自噬等方面,参与介导衰老过程,对不同病态下的心肌有保护作用。黄山药总皂苷(total saponins of dioscorea pathaica, TSDP)是薯蓣科植物黄山药根茎中提取物,主要成分为甾体皂苷类,具有治疗心肌缺血、降血脂和抗肿瘤等作用,临床上对于心肌缺血的应用得到了广泛关注,而它对心肌衰老的影响尚无研究。本实验旨在研究 TSDP 对 AGEs 引起心肌细胞老化的影响,并探讨涉及的通路。

1 材料与方法

1.1 材料

每次实验需订购出生 1~3 d SD 乳大鼠 10 只(南京青龙山动物养殖场);共需 180 只乳大鼠。Ⅱ型胶原酶(Sigma 公司,美国);DMEM 培养基、胎牛血清(Gibco 公司,美国);AGEs(ab51995, abcam,美国);细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒(DCFH-DA)、SA-β-Gal 染色试剂盒(上海碧云天公司);p53, p16(Proteintech, 中国);SIRT3,超氧化物歧化酶-2(superoxide dismutase-2, SOD2)(CST,美国)。CCK-8 试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)(APExBIO,美国);黄山药总皂苷提取物原粉(成都地奥制药公司提供)。

1.2 方法

1.2.1 原代心肌细胞的分离与培养 无菌条件下取 SPF 级 SD 乳大鼠 10 只,剪开胸壁取出心脏,立即置于预冷的无菌 PBS 洗 3 次,剪碎成约 1 mm×1 mm×1 mm 大小,用 0.1% 的Ⅱ型胶原酶消化 6 min×7 次,每次将收集消化后液体滴入预冷的含有血清及完全培养基的终止液中。7 次消化完毕后,将收集的溶液于 4℃ 、1 000 转/min 离心 10 min,弃上清,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基重悬后,铺板于 10 cm 皿中放在 37℃温箱中,1.5 h 后,收集含有心肌细胞的上清,吹匀后铺板于 6 孔板中,用 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养 48 h。

1.2.2 实验分组与干预 不同浓度(0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0, 8.0, 10.0 μg/ml)的 TSDP 处理细胞 48 h,观察细胞活性,于时间梯度(0、6、12、24、36、48 h)干预细胞,检测细胞活性及蛋白水平。

实验分组:将培养 48 h 的原代心肌细胞分为以下 5 组(每组设 6 个复孔):不干预的对照组,AGEs 组(100 ng/ml),TSDP + AGEs 组(10 μg/ml TSDP 处理细胞 2 h 后,加入 100 ng/ml AGEs),TSDP 组(2 μg/ml),TSDP 组(10 μg/ml)。每组处理 48 h。

1.2.3 CCK-8 检测细胞活力 将原代心肌细胞铺于 96 孔板培养 48 h 后换液,加入不同浓度 TSDP(0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0, 8.0, 10.0 ng/ml)的培养基继续培养 48 h。每组设 6 个复孔。弃培养基,每孔加入含 10% WST-8 的培养基 100 μl,37℃孵箱避光孵育 4 h,用酶标仪测 450 nm 波长处的吸光度($A_{450\,nm}$),心肌细胞活力 = ($A_{450\,nm实验组} - A_{450\,nm空白组}$)/($A_{450\,nm对照组} - A_{450\,nm空白组}$)×100%。

1.2.4 测定 SA-β-Gal 活性 药物干预细胞 48 h 后,弃细胞培养基,加入 1 ml 染色固定液每孔,室温下 15 min。弃固定液,PBS 洗 3 次,吸除 PBS,每孔加入 1 ml 染色工作液,用保鲜膜包裹后放入无 CO_2 孵箱过夜。光学显微镜观察,计数。

1.2.5 细胞内活性氧测定 将孔板中的培养基吸除,避光加入稀释好的 DCFH-DA 1 ml(10 μmol/ml)。细胞培养箱中静置 20 min,用 DMEM 洗 3 次,于荧光显微镜下观察,用 Image J 测荧光强度。

1.2.6 Western-blotting 检测蛋白水平 用 RIPA 裂解液(含 1 mmol/L PMSF)提取心肌蛋白。用 BCA 法测蛋白浓度。配制 12% 的分离胶及 6% 的浓缩胶,80 V 电泳 30 min,120 V 继续电泳至溴酚蓝达到分离胶底部。100 V 1 h 转膜,4℃下牛奶封闭 2 h。加入一抗 β-actin、SOD、p53、p16、SIRT3(1∶1 000),4℃过夜。次日洗膜后加入二抗,4℃孵育 2 h,洗膜,用 ECL 试剂盒化学发光,显示目的蛋白条带。

1.3 统计学处理

所有数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 GraphPad Prism 软件(美国 GraphPad Software 公司)对数据进行统计分析。多组均数间的比较采用单因素方差分析,均数多重比较采用 SNK-q 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 TSDP 对心肌细胞活性的影响

48 h 内干预对心肌细胞活性影响差异无统计学意义(图 1A)。干预 48 h,TSDP 浓度<10 μg/ml 的药物剂量同未加药干预组的细胞活性差别无统计学意义(图 1B)。说明<10 μg/ml 以内可作为药物的安全剂量范围,最终选取 TSDP 浓度为 2 μg/ml 及 10 μg/ml 的药物干预细胞。

2.2 TSDP 时间梯度对衰老指标的影响

TSDP(10 μg/ml)干预细胞 24、36、48 h 后,p53 水平下降差异有统计学意义($P<0.05$,图 2B),干预

36、48 h 时，p16 减少显著，差异有统计学意义（$P<0.05$，图 2C）。

2.3 TSDP 时间梯度对 SOD2 和 SIRT3 蛋白水平的影响

干预 6、12、24、36、48 h 时，SIRT3 蛋白水平较未干预组增加，差异有统计学意义（$P<0.05$，图 3B）。干预 12、24、36、48 h 时，SOD2 蛋白水平较未干预组增加，差异有统计学意义（$P<0.05$，图 3C）。

2.4 TSDP 对心肌细胞老化的影响

与空白对照组比较，AGEs 组 SA-β-Gal 活性增加，p53 和 p16 蛋白水平增加。TSDP（10 μg/ml）预先加入 AGEs 干预的心肌细胞后，AGEs 引起的 SA-β-Gal 增强及 p53 和 p16 蛋白水平增加均得到了缓解（$P<0.05$，图 4）。

2.5 TSDP 对 SIRT3 蛋白水平的影响

与空白对照组比较，AGEs 组 SIRT3 蛋白水平下降。TSDP（10 μg/ml）干预心肌细胞后，SIRT3 增加。TSDP（10 μg/ml）预处理 AGEs 干预的心肌细胞后，SIRT3 蛋白水平较 AGEs 组升高（图 5，$P<0.05$）。

2.6 TSDP 对 AGEs 引起的 ROS 变化的影响

与对照组相比，AGEs 组 ROS 增加，SOD 蛋白水平下降，差异有统计学意义（$P<0.05$）。TSDP（10 μg/ml）预先加入 AGEs 干预的心肌细胞后，AGEs 引起的 ROS 增强及 SOD 蛋白水平的减少均得到了缓解（$P<0.05$，图 6）。

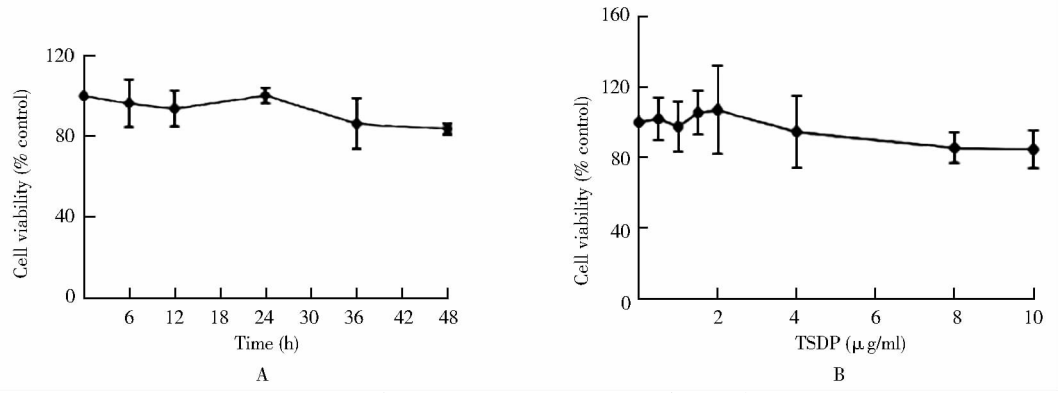


图 1 不同浓度及时间 TSDP 对心肌细胞活性的影响

Figure 1 Effect of TSDP on cardiomyocyte viability at different concentrations and different time length

A: at different time length; B: at different concentrations of TSDP ($n=6$). TSDP: total saponins of dioscorea pathaica.

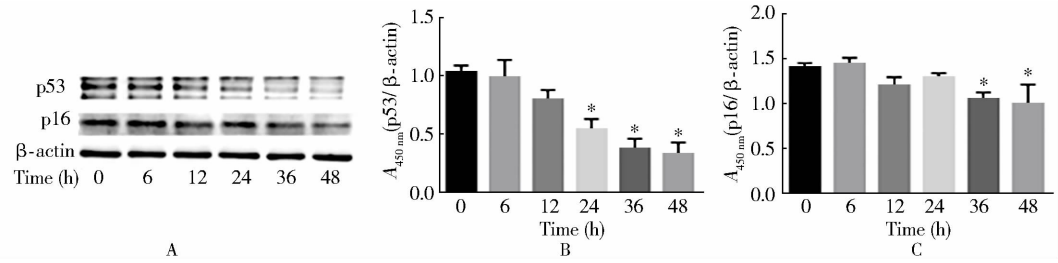


图 2 不同时间对衰老指标的影响

Figure 2 Effect of TSDP on aging indicators at different time length

A: Western blotting results; B, C: quantitative analysis results (compared with 0 h, $^*P<0.05$, $n=3$ in each group). TSDP: total saponins of dioscorea pathaica.

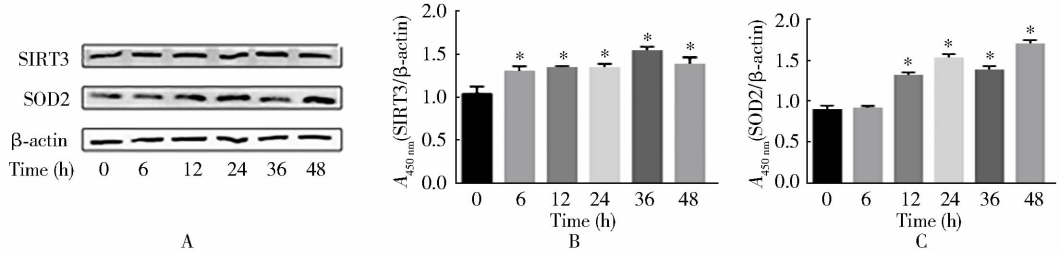


图 3 不同时间对 SIRT3 及 SOD2 蛋白水平的影响

Figure 3 Effect of TSDP on SIRT3 and SOD2 levels at different time length

A: Western blotting results; B, C: quantitative analysis results (compared with 0 h, $^*P<0.05$, $n=3$ in each group). SIRT3: silent mating type information regulation 2 homolog-3; SOD2: superoxide dismutase-2; TSDP: total saponins of dioscorea pathaica.

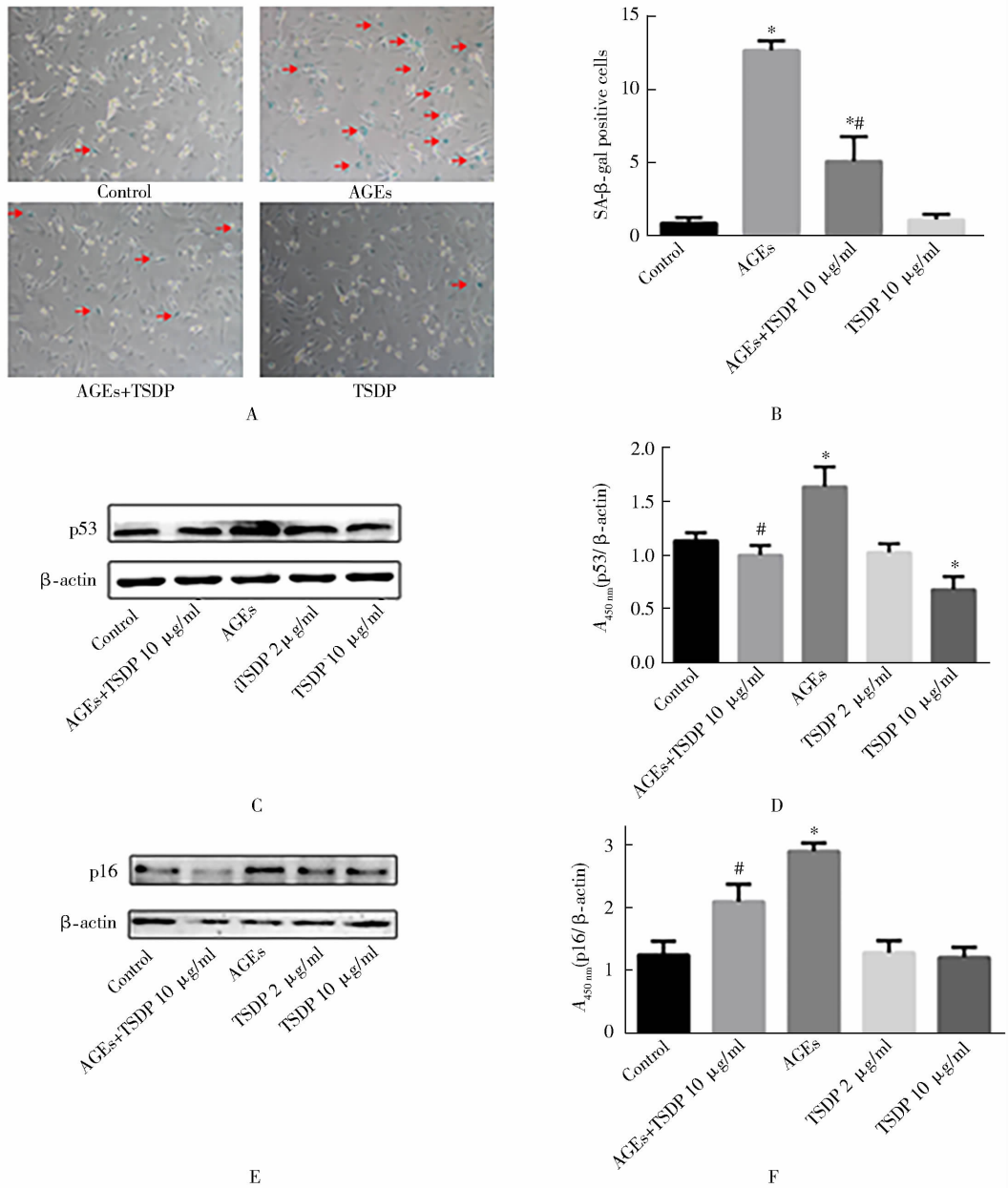


图 4 TSDP 对 AGEs 引起的心肌细胞老化的影响

Figure 4 Effect of TSDP on aging of cardiomyocytes by AGEs

A,B: SA-β-gal assay. SA-β-gal positive cells are stained in blue, as indicated by the red arrow (×100); C,E: Western blotting results; D,F: quantitative analysis results (compared with control group, $^{*}P<0.05$; compared with the corresponding AGEs treatment, $^{\#}P<0.05$; $n=3$ in each group). TSDP: total saponins of dioscorea pathaica; AGEs: advanced glycation end products.

3 讨 论

研究衰老机制,寻找抗衰老方法一直是人类想攻克的难题。在众多衰老学说中,糖基化致衰老学说引起越来越多研究者的重视。晚期糖基化终产物 AGEs 是还原糖的羧基与大分子物质如核酸、蛋白质等的氨基结合后经过重排脱水等反应形成的不可逆产物。AGEs 的积累激活炎症信号通路,引起活性氧产生,影响心脑肾功能,继而加速衰老[1,2]。体内实验也证明,人体内存在缓慢糖基化过程。随着年龄增长,血浆及各组织中的 AGEs 水平逐步增高。SA-β-Gal 是细胞老化过程中最常用的生物标志物,p53 增加与细胞增殖抑制密切相关,p16 通过抑制细胞分裂周期关键酶活性使 G1 细胞周期停滞,两者也被认为是老化的标志。我们的前期研究结果表明,AGEs 干预后 SA-β-Gal 活性明显增强, p16、p53 蛋白水平显著升高,活性氧 ROS 产生明显增加[3]。如何改善 AGEs 引起的老化引起越来越多研究者们的关注。

黄山药为我国特有的薯蓣科薯蓣属植物,有效成分为甾体总皂苷。以其为主要成分的国家级中药

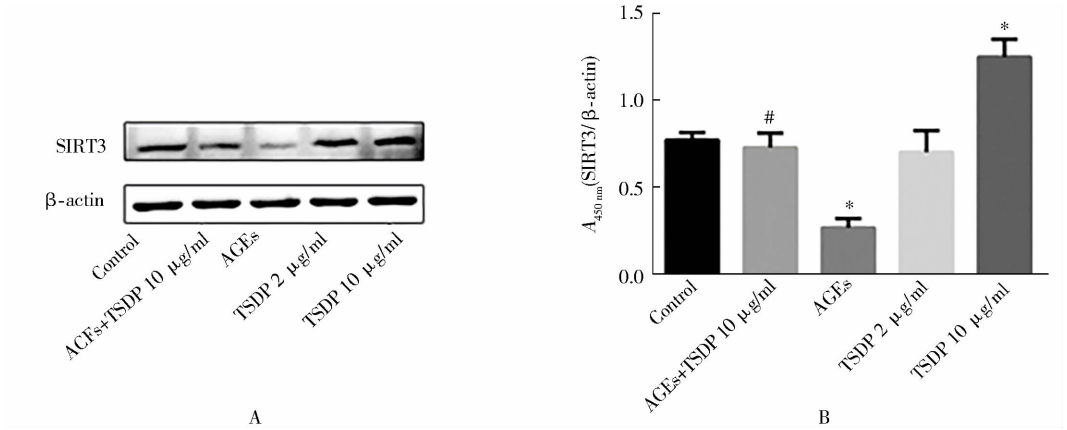


图5 TSDP对AGEs干预后的心肌细胞SIRT3蛋白水平的影响

Figure 5 Effect of TSDP on SIRT3 protein levels of AGEs-pretreated cardiomyocytes

A: Western blotting results; B: quantitative analysis results (compared with control group, $^{*}P<0.05$; compared with the corresponding AGEs treatment, $^{\#}P<0.05$; $n=3$ in each group). TSDP: total saponins of dioscorea pathaica; AGEs: advanced glycation end products; SIRT3: silent mating type information regulation 2 homolog-3.

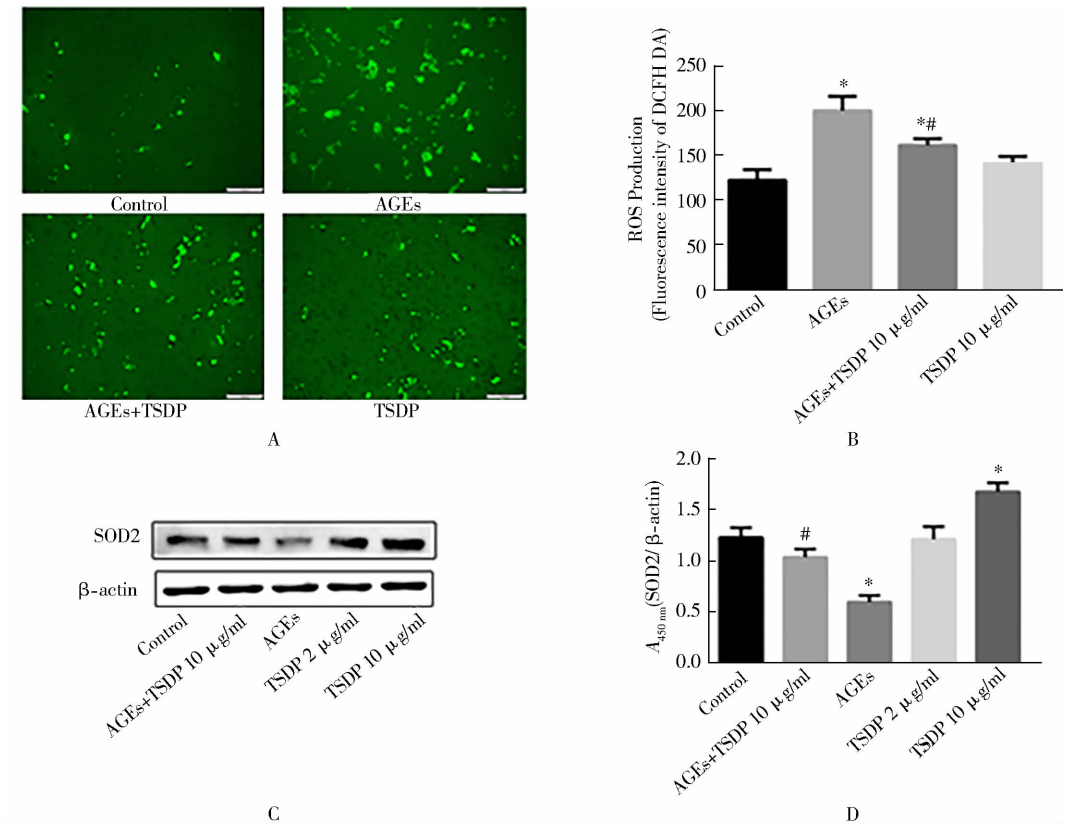


图6 不同处理组心肌细胞中ROS和SOD的水平

Figure 6 Level of ROS and SOD in cardiomyocytes in 5 groups

A: green fluorescence intensity represents ROS production (×100); C: expression level of SOD2 is determined by Western blotting; B,D: quantitative analysis (compared with control group, $^{*}P<0.05$; compared with the corresponding AGEs treatment, $^{\#}P<0.05$; $n=3$ in each group). ROS: reactive oxygen species; SOD2: superoxide dismutase-2.

地奥心血康具有明显活血化淤、改善机体微循环、扩张冠状动脉血管、改善心肌缺血、降低血脂的作用[4],在临床上广泛用于心肌缺血性疾病的治疗,它的抗损伤的分子机制主要涉及增加了SOD2的表达、降低氧化应激水平、降低心肌细胞的凋亡率、抑制炎症因子的生成、改善微循环等[5]。因而我们思考TSDP可能对AGEs通过氧化应激引起的心肌细胞老化有着保护作用。我们的研究结果发现,TSDP减少了AGEs干预后SA-β-Gal的活性增加及p53,p16蛋白水平的增加,由此推测TSDP对AGEs诱导的心肌细胞的衰老起保护作用。

我们的实验探讨了上述过程中可能涉及的机制。去乙酰化酶家族对维护心脏功能稳态、老化、疾病及代谢等多方面有重要的作用。而其中沉默信息调节

因子 SIRT3 在长寿人群中表达量高,又被称为长寿蛋白。它是一种存在于线粒体内 NAD 依赖的去乙酰化酶,通过参与能量代谢、清除活性氧、参与调节细胞凋亡与生长、细胞内自噬等对不同病态下的心肌细胞具有保护作用。随着年龄的增长,心肌细胞 SIRT3 水平逐渐降低。敲除 SIRT3 或表达下降与衰老导致代谢异常的心肌疾病如心脏疾病、糖尿病、高血压等的发生相关[6,7]。已有研究发现,AGEs 干预内皮祖细胞后降低了 SIRT3 表达,而过表达 SIRT3 保护了 AGEs 诱导的 EPCs 功能障碍和增强的抗氧化能力[8]。椎间盘退行性病变时,AGEs 在髓核细胞中积累,而过表达 SIRT3 减轻了髓核细胞的氧化应激和凋亡进而预防 AGEs 诱导的椎间盘退行性病变[9]。本次试验证实了 AGEs 干预原代心肌细胞后, SIRT3 的表达下降。我们推测心肌细胞中 AGEs 所致衰老可能与 SIRT3 的减少有关。以往研究发现富含 SIRT3 激活剂的食物可改善机体代谢,姜黄素具有心脏保护和抗衰老特性[10]。白藜芦醇通过激活 SIRT3 改善糖尿病性心肌病[11]。所以,增加 SIRT3 的活性可能是减轻心脏衰老影响的潜在策略。本实验中,TSDP 干预心肌细胞后增加了 SIRT3 及抗氧化酶 SOD2 的蛋白水平。同时 TSDP 增加了 AGEs 引起的 SIRT3 蛋白水平和 SOD2 蛋白水平的下降。

许多研究已证明,过表达 SIRT3 可以增加 SOD2 和过氧化氢酶 CAT 的表达,进而对抗由 ROS 诱导的细胞氧化损伤[12]。ROS 在冠心病的发生、发展中发挥重要的作用,是造成心肌细胞损伤加重和患者死亡的重要因素。它的产生和细胞对其解毒能力之间的不平衡扰乱了细胞还原环境,导致氧化应激。低 ROS 水平通过诱导适应性反应的防御机制,继而提高抗压能力,有助延长寿命。高 ROS 水平导致适应不良,导致衰老的发生和发展[13]。AGEs 被认为是一个重要的促进 ROS 产生和造成氧化应激、继而引发心肌损伤的因素[14]。我们前期研究也证明了 AGEs 增加了心肌 ROS 产生,促进心肌衰老。SOD2 活性的高低可间接反应细胞清除氧自由基的能力,及时清除 ROS 保护内环境至关重要。热量限制可通过激活 SIRT3,进而去乙酰化 SOD2,减少氧化应激[15]。在本次试验中,AGEs 减少了 SOD2 蛋白水平的表达,增加了 ROS 产生。预先干预 TSDP 后,AGEs 引起的 ROS 增强及 SOD2 蛋白水平减少均得到了缓解。因此,我们推测 TSDP 可能通过增加 SIRT3,进而增加 SOD2 的水平,对 AGEs 通过氧化应激引起的心肌细胞老化起到保护作用。

综上所述,本研究结果显示,TSDP 可改善 AGEs 引起的心肌细胞衰老现象,为祖国传统药物干预老化治疗提供了理论依据。其作用机制可能与升高 SIRT3、调节氧化应激有关。但其中具体作用机制及其他信号通路仍需进一步研究。

【参考文献】

[1] Frimat M, Daroux M, Litke R, *et al*. Kidney, heart and brain: three organs targeted by ageing and glycation[J]. Clin Sci (Lond), 2017, 131(11): 1069-1092. DOI: 10.1042/CS20160823.

[2] Van Puyvelde K, Mets T, Njemini R, *et al*. Effect of advanced glycation end product intake on inflammation and aging: a systematic review[J]. Nutr Rev, 2014, 72(10): 638-650. DOI: 10.1111/nure.12141.

[3] Zha ZM, Wang JH, Li SL, *et al*. Pitavastatin attenuates AGEs-induced mitophagy *via* inhibition of ROS generation in the mitochondria of cardiomyocytes[J]. J Biomed Res, 2018, 32(4): 281-287. DOI: 10.7555/JBR.31.20160116.

[4] Qu L, Li D, Gao X, *et al*. Di'ao Xinxuekang Capsule, a Chinese medicinal product, decreases serum lipids levels in high-fat diet-fed ApoE (-/-) mice by downregulating PCSK9 [J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 1170. DOI: 10.3389/fphar.2018.01170.

[5] Yu Y, Li X, Qu L, *et al*. DXXK exerts anti-inflammatory effects by inhibiting the lipopolysaccharide-induced NF-kappaB/COX-2 signalling pathway and the expression of inflammatory mediators[J]. J Ethnopharmacol, 2016, 178: 199-208. DOI: 10.1016/j.jep.2015.11.016.

[6] Yu W, Gao B, Li N, *et al*. Sirt3 deficiency exacerbates diabetic cardiac dysfunction: role of Foxo3A-Parkin-mediated mitophagy[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2017, 1863(8): 1973-1983. DOI: 10.1016/j.bbadis.2016.10.021.

[7] Koentges C, Pfeil K, Schnick T, *et al*. SIRT3 deficiency impairs mitochondrial and contractile function in the heart[J]. Basic Res Cardiol, 2015,110(4):36. DOI: 10.1007/s00395-015-0493-6.

[8] Chang M, Zhang B, Tian Y, *et al*. AGEs decreased SIRT3 expression and SIRT3 activation protected AGEs-induced EPCs' dysfunction and strengthened anti-oxidant capacity[J]. Inflammation, 2017,40(2):473-485. DOI:10.1007/s10753-016-0493-1.

[9] Song Y, Li S, Geng W, *et al*. Sirtuin 3-dependent mitochondrial redox homeostasis protects against AGEs-induced intervertebral disc degeneration[J]. Redox Biol, 2018, 19: 339-353. DOI: 10.1016/j.redox.2018.09.006.

[10] Trevino-Saldana N, Garcia-Rivas G. Regulation of sirtuin-mediated protein deacetylation by cardioprotective phytochemicals[J]. Oxid Med Cell Longev, 2017, 2017: 1750306. DOI: 10.1155/2017/1750306.

[11] Zhang M, Wang S, Cheng Z, *et al*. Polydatin ameliorates diabetic cardiomyopathy *via* Sirt3 activation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 493(3): 1280-1287. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.09.151.

[12] Zhang DY, Zhang CF, Fu BC, *et al*. Sirtuin 3 protects aged human mesenchymal stem cells against oxidative stress and enhances efficacy of cell therapy for ischaemic heart diseases[J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(11): 5504-5517. DOI: 10.1111/jcmm.13821.

[13] Yan LJ. Positive oxidative stress in aging and aging-related disease tolerance[J]. Redox Biol, 2014, 2: 165-169. DOI: 10.1016/j.redox.2014.01.002.

[14] Deluyker D, Evens L, Bito V. Advanced glycation end products (AGEs) and cardiovascular dysfunction: focus on high molecular weight AGEs[J]. Amino Acids, 2017, 49(9): 1535-1541. DOI: 10.1007/s00726-017-2464-8.

[15] Qiu X, Brown K, Hirschey MD, *et al*. Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation [J]. Cell Metab, 2010, 12(6): 662-667. DOI: 10.1016/j.cmet.2010.11.015.

(编辑:门可)