

人参皂苷 Rg1 抗衰老作用可能与改变 p16、cyclin D、CDK4 的表达有关

金建生, 赵朝晖, 陈晓春, 朱元贵, 曾育琦, 李永坤, 彭小松, 师广斌

福建医科大学附属协和医院、福建省老年医学研究所, 福州 350001, 福建

摘要 目的: 探讨人参皂苷 Rg1 对抗三 基过氧化氢 (*t*-BHP) 诱导的 WI-38 细胞衰老作用及其可能细胞周期调控机制。方法: 将 WI-38 细胞随机分为 4 组, 用不同剂量 Rg1 预处理。从 30 代开始, 隔代用 *t*-BHP 作用, 每次 1 h, 共 4 次, 诱导细胞衰老。从光镜、透射电镜观察细胞形态及超微结构; 流式细胞术分析 G₁ 期细胞比例; 以及 SA-β-半乳糖苷酶的细胞化学染色, 确定 Rg1 的抗衰老作用。并采用免疫印迹技术对 CDK4、cyclin D1 和 p16 等表达情况进行检测。结果: Rg1 预处理组与单纯 *t*-BHP 处理组相比, 细胞形态体积小、胞体不如后者扁平, 次级溶酶体减少, G₁ 期细胞比例下降, SA-β-半乳糖苷酶染色阳性细胞百分比下降, 说明 Rg1 在 *t*-BHP 诱导细胞衰老模型中有抗衰老作用。进一步发现用 Rg1 预处理后, p16、cyclin D1 表达水平降低、CDK4 表达水平增加。结论: 提示 Rg1 可能通过改变细胞周期调控因子的表达而发挥其抗 *t*-BHP 诱导的 WI-38 细胞衰老作用。

关键词 人参皂苷 Rg1; p16; cyclin D; CDK4; 衰老; 三 基过氧化氢

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1009-2501(2004)01-0029-06

许多研究表明细胞衰老是细胞周期调控下多基因参与的复杂的病理生理过程, 具有一定的可控性。

2003-06-26 收稿 2003-07-18 修回

福建省自然科学基金项目 (No0210017)

陈晓春, 通讯作者, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 神经系统变性疾病和衰老的分子机制。

Tel: 0591-3377664 E-mail: xc-chen329@sohu.com

金建生, 女, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 老年肾脏病和衰老的分子机制。

参与细胞周期调控的主要分子有: 细胞周期蛋白 (cyclin)、细胞周期蛋白依赖激酶 (CDK)、磷酸化酶和细胞周期蛋白依赖激酶抑制蛋白 (CDI) 等, 其中 p16 与 cyclin D-CDK 复合物的相互作用, 可使细胞阻滞在 G₁ 期^[1], 是细胞衰老周期调控的一个重要环节。

现代药理研究认为人参具有抗衰老、抗氧化、提高免疫力和增强记忆力等作用^[2]。本实验以 *t*-BHP (三丁基过氧化氢, *tert*-butyl hydroperoxide) 诱导 WI-38 细胞衰老为模型^[3], 用人参皂苷 Rg1 预处理 WI-38 细胞, 观察人参皂苷 Rg1 是否具有抗衰老作用。同时应用免疫印迹技术, 探讨人参皂苷 Rg1 的抗衰老作用是否与 p16、CDK4 和 cyclin D1 等细胞周期调控分子有关。

1 材料和方法

1.1 药物与试剂 WI-38 细胞是人胚肺成纤维细胞, 由美国 ATCC 细胞库提供 (ATCC 号: CCL-75)。培养基: 在含 10% 的胎牛血清 (美国 Gibco 公司产品) 的 MEM (Gibco) 中加入 2 mmol·L⁻¹ 谷氨酰胺, 1.0 mmol·L⁻¹ 丙酮酸钠, 0.1 mmol·L⁻¹ 非必需氨基酸和 1.5 g·L⁻¹ 碳酸氢钠。 *t*-BHP 购自 Sigma 公司。碘化丙啶购自 BD 公司。核糖核酸酶、鼠抗人 p16 单克隆抗体购自 BD Pharmingen 公司。鼠抗人 cyclin D1 单克隆抗体购自 NeoMarkers 公司。兔抗鼠 CDK4 多克隆抗体购自 Chemicon 公司。β-半乳糖苷酶细胞化学染色试剂盒。Western Blot 化学发光检测试剂盒购自美国 KPL 公司。

1.2 仪器 CO₂ 培养箱为美国 Forma Scientific 公司产品; 低温离心机和 DU640 型紫外分光光度计为美国 Beckman 公司产品; Alpha Emager 2200 型图像分析仪购自美国安莱公司。倒置显微镜为日本 Olympus CK40。流式细胞仪购自 BD 公司。

1.3 实验分组和处理 WI-38 细胞从第 24 代开始

与人参皂苷 Rg1 共同培养, 按人参皂苷 Rg1 不同的终作用浓度将细胞分为 4 组。单纯 *t*-BHP 处理组: 仅用 MEM 培养液, 不加入人参皂苷 Rg1; $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rg1 预处理组: MEM 培养液 + $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rg1 共培养细胞; $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rg1 预处理组: MEM 培养液 + $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rg1 共培养细胞; $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rg1 预处理组: MEM 培养液 + $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rg1 共培养细胞。所有的细胞从第 30 代开始, 每 2 代用 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ *t*-BHP 诱导作用 1 h, 用 MEM 培养液冲洗 2 遍后放入 CO_2 培养箱修复 2 d 再 1:4 传代。*t*-BHP 共作用 4 次。然后按不同的实验要求处理细胞。各组设 5 个平行对照。

1.4 倒置显微镜下观察 WI-38 细胞的形态 在 6 孔板中预先置入已铺过多聚赖氨酸的玻璃盖片, 接种分组处理的细胞悬液, 培养 24 h, 第 2 天取出盖片, 用 4°C 预冷的 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 冲洗细胞 2 次, 置倒置显微镜下观察拍照。

1.5 透射电镜观察 WI-38 细胞的超微结构 用 0.25% 胰酶消化后收集细胞, 用 4°C 预冷的 PBS ($\text{pH} 7.4$) 离心洗细胞 2 次, 弃去上清液, 加入 4°C 预冷的 3% 戊二醛-1% 多聚甲醛固定 4 h 以上, PBS 漂洗 3 次, 每次 10 min, 在 1% 锇酸 4°C 下后固定 2 h, 漂洗 3 次。室温下用乙醇、丙酮逐级脱水, 环氧树脂 618 浸透、包埋。超薄切片用醋酸铀、枸橼酸铅双染色各 10 min, HU-12A 型透射电镜观察拍照。

1.6 流式细胞术对 WI-38 细胞进行周期分析 常规分组培养细胞, 用 0.25% 的胰酶消化, 然后 PBS 反复吹打成单细胞悬液, 离心, 弃上清。将细胞密度调整为 $1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ 。在 $100 \mu\text{l}$ 样本液中加入含 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 碘化丙啶和 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 核糖核酸酶的染液 $500 \mu\text{l}$, 避光 37°C 孵育 30 min, 用流式细胞仪采集数据进行细胞周期分析, 计算 G_1 期细胞比例。

1.7 SA- β -半乳糖苷酶细胞化学染色 在 6 孔板中预先置入已铺过多聚赖氨酸的玻璃盖片, 按 700 个 cm^2 细胞密度接种分组处理的细胞悬液, 培养 24 h, 第 2 天取出盖片, 用 4°C 预冷的 PBS 冲洗细胞 2 次, 然后用 4°C 预冷的 2% 甲醛/0.2% 戊二醛固定 5 min, PBS 冲洗细胞 2 次, 用 SA- β -半乳糖苷酶反应液 37°C 孵育 3 ~ 4 h, 其后用双蒸水冲洗 2 次后固定 4 min (后固定液: 70% 乙醇、福尔马林、冰醋酸按 20:2:1 比例混合), 流水轻轻冲洗, 然后用核快红复染细胞核, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 阿拉伯树胶封固。每张片子计数 400 个细胞, 确定 SA- β -半乳糖苷酶染色阳性细胞数的百分比。

1.8 Western Blot 测定蛋白表达水平 将要收集的 WI-38 细胞提前 2 代, 1:4 接种于 6 孔板上。待细胞数增长至接种前 4 倍时, 用 4°C 预冷的 PBS 轻洗 2 次, 加入预冷的细胞裂解液 (1% NP40, $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris $\text{pH} 7.5$, $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PMSF, $0.02 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ aprotinin, leupeptin and pepstatin) $30 \mu\text{l}$, 冰浴 5 min, 用细胞刮将细胞从培养板上刮下, 4°C 离心 10 min, 吸上清液 -80°C 保存。蛋白质定量后加等量 $2\times$ 样品缓冲液, 100°C 水浴 5 min, $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 s, 取上清液上样。取样品 $100 \mu\text{g}$ /孔, 用 12% (w/v) SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离; 分离的蛋白转膜至硝酸纤维素膜后, 室温封闭液封闭 1 h; 与一抗 (浓度 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 4°C 过夜; 洗膜 4 次后, 与二抗 ($1:1000$) 室温下摇育 2 h; 洗膜 4 次后, 用化学发光显色系统显示蛋白条带, 曝光在柯达胶片上。每次实验重复 5 次。曝光在柯达胶片上条带, 用图像分析仪扫描, 并计算点密度, 与 β -actin 内参照 (一抗浓度为 $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) 相比。

1.9 统计学处理 实验结果以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 8.0 软件包分析, 多组间比较用单因素方差分析。

2 结果

2.1 倒置显微镜下 WI-38 细胞的形态 单纯 *t*-BHP 处理组 WI-38 细胞体呈梭形或不规则三角形, 中央有卵圆形核, 胞质向外伸出多个长短不同的突起, 体积增大、胞体变平。而用人参皂苷 Rg1 预处理的细胞体积比单纯 *t*-BHP 处理组小, 胞体不如单纯 *t*-BHP 处理组扁平。这种变化 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rg1 预处理组要比 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rg1 预处理组来得明显, 而 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rg1 预处理组与 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rg1 预处理组相比没有明显差别。

2.2 透射电镜下 WI-38 细胞的超微结构 单纯 *t*-BHP 处理组 WI-38 细胞体积较大, 核呈梭形或椭圆形, 核仁可见, 胞浆内见较多粗面内质网、线粒体, 多数细胞浆内次级溶酶体 (包括脂褐素) 明增多 (图 1A)。用人参皂苷 Rg1 预处理与单纯 *t*-BHP 处理组相比, 细胞浆内次级溶酶体 (包括脂褐素) 明显减少, 其中 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rg1 预处理组 (图 1C) 比 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rg1 预处理组 (图 1B) 明显, 而 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rg1 预处理组 (图 1D) 与 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rg1 预处理组相比没有明显变化。但 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rg1 预处理组出现细胞浆内线粒体有不同程度肿胀, 线粒体有减少或消失成空泡状, 部分细胞浆内脂肪滴增多。

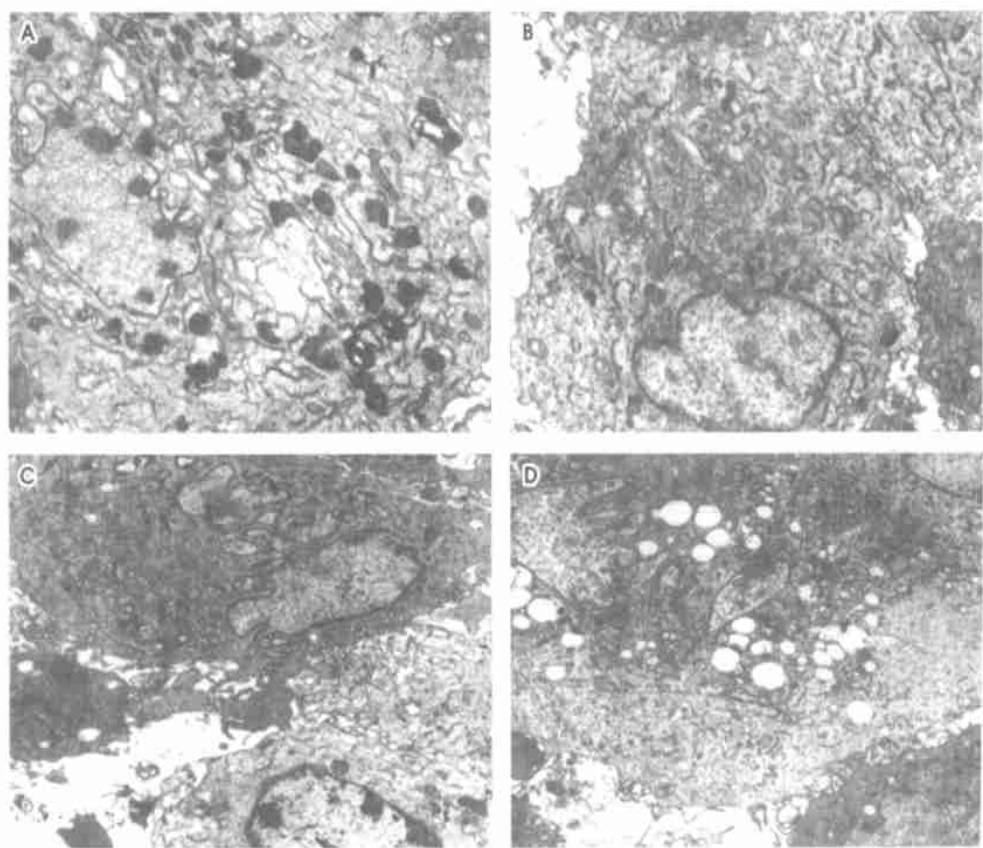


图1 单纯三丁基过氧化氢(*t*-BHP)处理组和不同浓度人参皂苷 Rg1 预处理组电镜图

A: 单纯 *t*-BHP 处理组($\times 600$); B: Rg1 $5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 预处理组($\times 3\ 600$); C: Rg1 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 预处理组($\times 3\ 600$); D: Rg1 $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 预处理组($\times 2\ 400$)

2.3 WI-38 细胞的周期分析结果 如图 2 所示, 单纯 *t*-BHP 处理组 G_1 期细胞百分比为 $(86.3 \pm 3.2)\%$, 5、10 和 $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Rg1 预处理组 G_1 期细胞百分比分别为 $(79.9 \pm 1.8)\%$ 、 $(69.6 \pm 2.4)\%$ 和 $(74.6 \pm 1.6)\%$ 。各 Rg1 预处理组的 G_1 期细胞百分比均比单纯 *t*-BHP 处理组降低, 差别有显著性意义 ($P < 0.05$), 其中尤以 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Rg1 预处理组的降低最为明显。

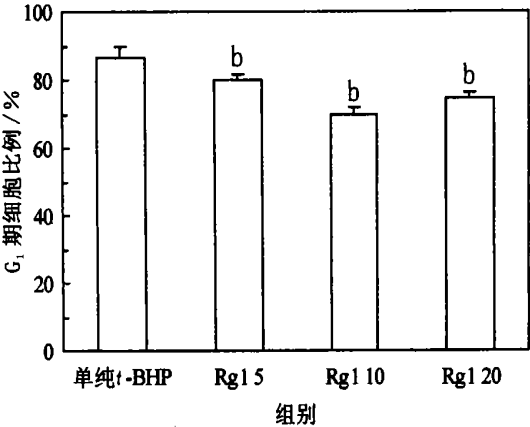


图2 各组 G_1 期细胞百分比

与单纯三 基过氧化氢(*t*-BHP)组比较^a $P < 0.05$; Rg1 浓度单位为 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

2.4 WI-38 细胞的 SA- β -半乳糖苷酶细胞化学染色 如图 3 所示, 单纯 *t*-BHP 处理组 SA- β -半乳糖苷酶染

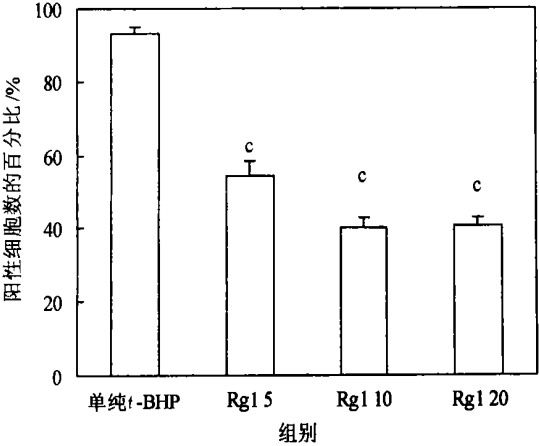


图3 各组 SA- β -半乳糖苷酶染色阳性细胞数的百分比

与单纯三 基过氧化氢(*t*-BHP)组比较^a $P < 0.01$; Rg1 浓度单位为 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

色阳性细胞数的百分比为 $(93.1 \pm 2.0)\%$, 5、10 和 $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Rg1 预处理组 SA- β -半乳糖苷酶染色阳性细胞数的百分比分别为 $(54.3 \pm 4.2)\%$ 、 $(40.2 \pm 2.8)\%$ 和 $(40.5 \pm 2.4)\%$ 。各 Rg1 预处理组的 SA- β -半乳糖苷酶染色阳性细胞数均比单纯 *t*-BHP 处理组

明显减低, 差别有极显著性意义 ($P < 0.01$), 图 4 为 SA- β -半乳糖苷酶染色阴性细胞。图 5 为 SA- β -半乳糖苷酶染色阳性细胞。

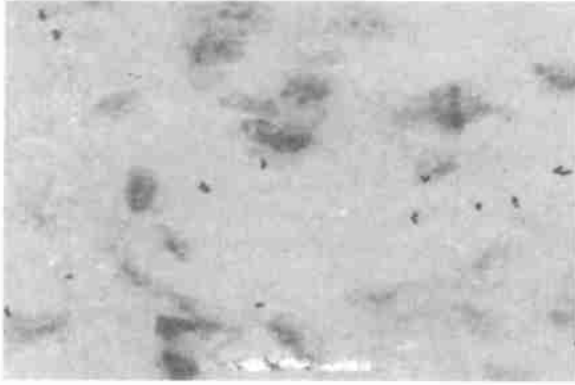


图 4 SA- β -半乳糖苷酶染色阴性的细胞($\times 400$)

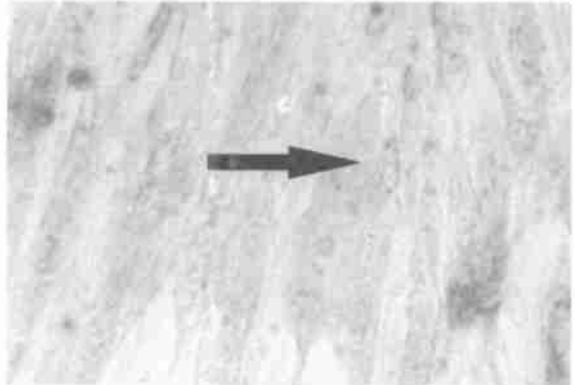


图 5 SA- β -半乳糖苷酶染色阳性的细胞数($\times 400$)
 β -半乳糖苷酶染色阳性细胞浆呈青绿色(如箭头所示)

2.5 p16 与 cyclin D1 蛋白表达水平的变化 从图 6—7 可以看出单纯 t -BHP 处理组 p16 蛋白与 cyclin D1 蛋白表达水平最高。用人参皂苷 Rg1 预处理后, p16 与 cyclin D1 蛋白表达水平明显下降, 下降程度与 人参皂苷 Rg1 的预处理浓度的增高呈剂量依赖性关系。其中以 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rg1 预处理组 p16 与 cyclin D1 蛋白表达水平下降最明显。

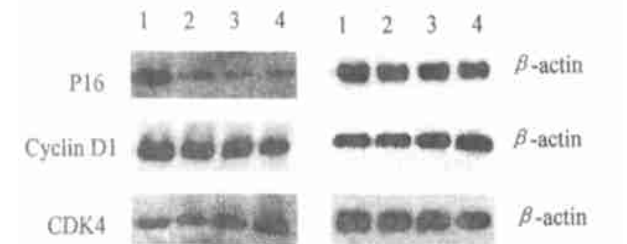


图 6 Western Blot 测定 p16、cyclin D1、CDK4 蛋白表达水平

2.6 CDK4 蛋白表达水平的变化 从图 6—7 可以看出单纯 t -BHP 处理组 CDK4 蛋白表达水平最低。用人参皂苷 Rg1 预处理后, CDK4 表达水平上升, 随 人参皂苷 Rg1 的预处理浓度呈剂量依赖性变化。以

$20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rg1 预处理组 CDK4 表达水平上升最为明显。

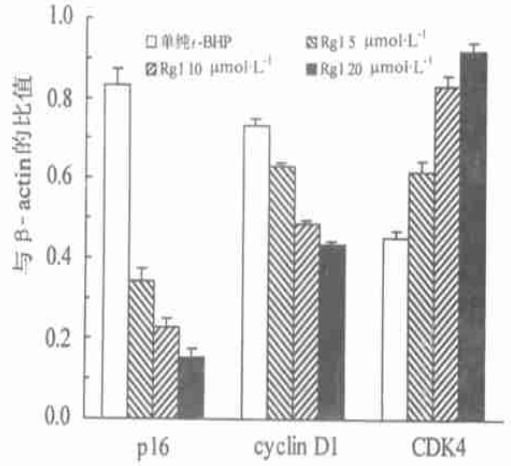


图 7 各蛋白与 β -actin 的比值

3 讨论

WI-38 细胞是人胚肺成纤维细胞, 在体外培养时经历一定次数的群体倍增后, 日趋成为对生长因子没有反应能力的衰老的细胞群, 具有胞体增大变平、次级溶酶体(包括脂褐素)明显增多、细胞生长阻滞于 G_1 期、SA- β -半乳糖苷酶表达增加等衰老细胞的特征性改变。本研究采用 t -BHP 通过氧化应激的方式已成功地诱导细胞衰老的模型^[3]。

本实验应用 t -BHP 诱导的细胞衰老模型来研究人参皂苷 Rg1 的体外抗衰老作用, 结果显示与单纯 t -BHP 处理组相比, Rg1 预处理组细胞的形态体积小、胞体不如其扁平, 细胞次级溶酶体(包括脂褐素)减少, G_1 期细胞比例下降, SA- β -半乳糖苷酶染色阳性细胞百分比下降, 提示人参皂苷 Rg1 在体外有很好的抗衰老作用。

此外, 本实验 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 人参皂苷 Rg1 预处理组出现细胞浆内线粒体有不同程度肿胀, 线粒体有减少或消失成空泡状, 部分细胞浆内脂肪滴增多, 而细胞浆内次级溶酶体(包括脂褐素)、 G_1 期细胞比例、SA- β -半乳糖苷酶染色等方面与 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rg1 预处理组相比没有明显减少。说明在细胞培养水平上, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 人参皂苷 Rg1 已有很好的抗衰老效果, 加大剂量并不能增强抗衰老的作用, 却会产生一定的毒性作用。这与陈晓春等报道人参皂苷 Rg1 对 PC12 细胞的凋亡保护作用的最佳作用剂量相一致^[5]。

p16、cyclin D1 和 CDK4 是细胞周期调控的重要分子。cyclin D1 与 CDK4 结合, 使 CDK4 激活, 活化

的CDK4可使Rb磷酸化;磷酸化Rb与E2F-DP1杂二聚体分离,失去了抑制E2F启动DNA合成的作用,从而使细胞由G₁期进入S期^[9]。cyclin D1合成和激活所导致的Rb蛋白磷酸化,将在G₁期末期形成一个负反馈,关闭cyclin D1的表达。Cyclin激活CDK4的过程可通过p16与CDK竞争性结合而受到抑制,即p16-CDK4复合物不能使Rb磷酸化,使Rb正常地行使G₁期阻滞功能,从而抑制细胞的增殖^[7,8]。

本研究结果证实在*t*-BHP诱导的WI-38细胞衰老模型中,存在p16和cyclin D1表达水平的增加、CDK4表达水平的减少(待发表),这些改变与成纤维细胞正常衰老时所表现的情形相一致^[1,9,10]。p16量的积累是作为生命末期引发的终点程序的一部分,维持衰老阻滞^[11,12]。它能特异地与CDK4结合,阻止CDK4与cyclin D形成复合物,抑制cyclin D-CDK复合物酶的活性,使细胞阻滞在G₁期,使cyclin D1合成没有受到负反馈调节而表达增加。同时,一方面,CDK4水平下降;另一方面,p16抑制CDK4的活性,阻断转录抑制因子Rb的磷酸化,导致与Rb蛋白结合的转录活化因子E2F1不能释放,使细胞循环至S期所必需的许多重要基因不能激活,引起细胞生长阻滞于G₁期,从而诱发细胞衰老的特征性改变^[13-15]。

而用人参皂苷Rg1预处理后,p16和cyclin D1表达水平下降、CDK4表达水平上升,这种改变随人参皂苷Rg1预处理浓度增高而呈剂量依赖性变化,一方面,提示人参皂苷Rg1抗衰老作用与p16表达水平下降、CDK4表达水平上升有关。而cyclin D1表达水平下降的原因可能是由于p16表达水平的降低,减少对cyclin D-CDK复合物酶活性的抑制,减少细胞在G₁期的阻滞,使cyclin D1合成受到负反馈调节从而表达水平下降;另一方面,除细胞周期调控机制外,还有其它调控机制发挥作用。而本实验为进一步证实中药人参的抗衰老作用提供必要的实验依据,并从细胞周期调控方面探讨人参皂苷Rg1抗衰老的可能机制。

参考文献

1 Ohtani N, Zebedee Z, Huot TJ, *et al.* Opposing effects of Ets

- and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence[J]. *Nature*, 2001; 409: 1067—70
- 2 Zhang JT. AF150(S) and AF267B: M1 muscarinic agonists as innovative therapies for Alzheimer's disease[J]. *J Mol Neurosci*, 2002; 19: 145—53
- 3 Cockcroft VG, Ross G JB, Peddemors VM. Distribution and status of bottle-nosed-dolphin tursiops truncatus on the south coast of Natal, South Africa[J]. *South Afri J Marine*, 1991; 11: 203—9
- 4 Dimri GP, Lee X, Basile G, *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995; 92: 9363—7
- 5 Chen XC, Zhu YG, Wang XC. Protective effect of ginsenoside Rg1 on dopamine-induced apoptosis in PC12 cells[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2001; 22: 673—8
- 6 Sherr CJ. G₁ phase progression: cycling on cue[J]. *Cell*, 1994; 79: 551—5
- 7 Lee JY, Bielawska AE, Obeid LM. Regulation of cyclin-dependent kinase 2 activity by ceramide[J]. *Exp Cell Res*, 2000; 261: 303—11
- 8 Sandhu C, Peehl DM, Slingerland J. p16INK4A mediates cyclin dependent kinase 4 and 6 inhibition in senescent prostatic epithelial cells [J]. *Cancer Res*, 2000; 60: 2616—22
- 9 Sandhu C, Donovan J, Bhattacharya N, *et al.* Reduction of Cdc25A contributes to cyclin E1-Cdk2 inhibition at senescence in human mammary epithelial cells[J]. *Oncogene*, 2000; 19: 5314—23
- 10 Lucibello FC, Sewing A, Brusselbach S, *et al.* Deregulation of cyclins D1 and E and suppression of cdk2 and cdk4 in senescent human fibroblasts [J]. *J Cell Sci*, 1993; 105 (Pt 1): 123—3
- 11 Brown JP, Wei W, Sedivy JM. Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts [J]. *Science*, 1997; 277: 831—4
- 12 Dulic V, Beney GE, Frebourg G, *et al.* Uncoupling between phenotypic senescence and cell cycle arrest in aging p21-deficient fibroblasts[J]. *Mol Cell Biol*, 2000; 20: 6741—54
- 13 Sandhu C, Donovan J, Bhattacharya N, *et al.* Reduction of Cdc25A contributes to cyclin E1-Cdk2 inhibition at senescence in human mammary epithelial cells[J]. *Oncogene*, 2000; 19: 5314—23
- 14 Lucibello FC, Sewing A, Brusselbach S, *et al.* Deregulation of cyclins D1 and E and suppression of cdk2 and cdk4 in senescent human fibroblasts[J]. *J Cell Sci*, 1993; 105 (Pt 1): 123—33
- 15 Sandhu C, Peehl DM, Slingerland J. p16INK4A mediates cyclin dependent kinase 4 and 6 inhibition in senescent prostatic epithelial cells[J]. *Cancer Res*, 2000; 60: 2616—22

Antiaging effect of ginsenoside Rg1 is related with the expression of p16, cyclin D1 and CDK4

JIN Jian-Sheng, ZHAO Chao-Hui, CHEN Xiao-Chun, ZHU Yuan-Gui, ZHENG Yu-Qi, LI Yong-Kun, PENG Xiao-Song, SHI Guang-Bin

The Affiliated Union Hospital, Fujian Medical University & Fujian Institute of Geriatric Medicine, Fuzhou 350001, Fujian, China

ABSTRACT **AIM:** To investigate the antiaging effects of ginsenoside Rg1 and the possible mechanism of cell cycle in senescence model induced by tert-butylhydroperoxide (*t*-BHP). **METHODS:** WI-38 cells were divided into 4 groups and randomly added with different concentrations of Rg1. From 30 population doubling (PD), WI-38 cells were exposed to *t*-BHP for 1 h at every two PDs. Four stresses were induced to reach premature senescence. The changes of cells of were observed by microscope and flow cytometric assay, and the SA- β -galactosidase staining was used to investigate the antiaging effect of ginsenoside Rg1. The expression of CDK4, cyclin D1 and

p16 was detected by Western blot. **RESULTS:** Cells of Rg1 groups were smaller and less flat than those in the group only treated with *t*-BHP. In addition, the number of secondary lysosome, cells in G₁ phase, and activity of β -galactosidase decreased. Furthermore it showed higher expression of CDK4 and lower expression of cyclin D1 and p16 in comparison with cells only treated with *t*-BHP. **CONCLUSION:** The possible mechanism of antiaging effect of Rg1 is to regulate the expression of p16, cyclin D1 and CDK4 In senescence model induced by *t*-BHP. **KEY WORDS** ginsenoside Rg1; p16; cyclin D; CDK4; senescence; tert-butylhydroperoxide