

网络出版时间:2022-06-13 9:07 网络出版地址:<https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1086.R.20220610.1011.014.html>

◇神经药理学◇

# 人参皂苷 Rg1 通过 AMPK/mTOR 信号通路调控自噬延缓小鼠脑衰老的研究

张进<sup>1,2</sup>,王顺和<sup>1,2</sup>,汪兰<sup>1,2</sup>,胡玲<sup>1,3</sup>,汪子铃<sup>1,3</sup>,曾娣<sup>1,3</sup>,侯吉颖<sup>1,3</sup>,  
黄彩虹<sup>1,3</sup>,杜坤航<sup>1,3</sup>,王璐<sup>1,3</sup>,王亚平<sup>1,3</sup>

(重庆医科大学 1. 干细胞与组织工程研究室、2. 病理学教研室、3. 组织胚胎学教研室,重庆 400016)

doi:10.12360/CPB202110092

文献标志码:A 文章编号:1001-1978(2022)07-0987-07

中国图书分类号:R-322; R284.1; R322.81; R339.38;  
R741.02

**摘要:**目的 探讨人参皂苷 Rg1 通过 AMPK/mTOR 信号通路调控自噬延缓小鼠脑衰老的机制。方法 C57BL/6J ♂ 小鼠随机分为 4 组:脑衰老模型组、对照组、Rg1 抗衰老组、自噬激活剂雷帕霉素(rapamycin, Rap)抗衰老组。建模完成后于次日进行各实验指标的检测。水迷宫实验检测小鼠学习与记忆能力;制备脑海马区石蜡切片,进行 HE、Nissl 染色与免疫组化染色,分别观察海马区神经元形态并计数神经元和 Nissl 小体数量与检测海马区神经元自噬相关蛋白 p62、ATG5、ULK1;制备脑组织匀浆,检测脑组织乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)的活性;Western blot 检测脑组织自噬相关蛋白 LC3-II、p62、Beclin1、p-AMPK/AMPK、p-mTOR/mTOR 与凋亡蛋白 p53。结果 水迷宫实验表明 Rg1 与 Rap 使脑衰老小鼠的学习与记忆能力明显提升;HE、Nissl 染色表明 Rg1 与 Rap 使脑衰老小鼠海马区神经元变性、坏死细胞减少,Nissl 小体数量增多;免疫组化显示 Rg1 与 Rap 使海马区神经元自噬蛋白 p62 表达下降、ATG5 与 ULK1 表达上升;Rg1 与 Rap 使脑衰老小鼠 AChE 活性下降;Western blot 表明 Rg1 与 Rap 使脑衰老小鼠的自噬相关蛋白 LC3-II、Beclin1、p-AMPK/AMPK 表达增加、p-mTOR/mTOR、p62、p53 表达减少。**结论** 人参皂苷 Rg1 能有效拮抗 D-gal 对小鼠脑的致衰老作用,其机制与 Rg1 通过 AMPK/mTOR 信号通路调控自噬途径有关。

**关键词:**人参皂苷 Rg1;D-半乳糖;脑;神经元;衰老;AMPK/mTOR 信号通路;自噬

收稿日期:2022-02-27,修回日期:2022-04-02

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No 81873103)

作者简介:张进(1995-),男,硕士生,研究方向:神经干细胞衰老机制,E-mail:1192964732@qq.com;

王顺和(1964-),男,教授,硕士生导师,研究方向:神经病理性,通信作者,E-mail:wangshunhe120@gmail.com;

王亚平(1956-),男,教授,博士生导师,研究方向:干细胞衰老生物学,通信作者,E-mail:ypwangeq@aliyun.com

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



目前,人口老年化趋势日渐严峻,对于加快推动衰老生物学研究和寻找防治老年性疾病途径已迫在眉睫。随着年龄增加神经退行性疾病的发病率不断攀升,已经严重危及老年人群的健康,目前还没有延缓脑衰老的有效途径。人参是中医临床“补气”药,我们既往研究证明<sup>[1-2]</sup>,人参皂苷 Rg1 是人参重要的抗衰老成分之一,它能有效延缓脑衰老,并证明可能与减轻神经干细胞(NSCs)的氧化损伤密切相关,但其具体机制尚不清楚。最新研究表明<sup>[3-4]</sup>,自噬在调控细胞衰老过程发挥着极为重要的作用,而 AMPK/mTOR 信号通路在自噬相关的代谢中扮演着重要角色,因此,对于人参皂苷 Rg1 是否能通过调控该信号通路延缓脑衰老值得研究。本文采用 D-半乳糖(D-gal)构建小鼠脑衰老模型,探讨了人参皂苷 Rg1 延缓脑衰老与其调控自噬相关信号通路的机制,旨在为 Rg1 延缓脑衰老的临床应用提供理论与实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 6~8 周龄 ♂ C57BL/6J 小鼠,体质量(16~18)g,由重庆医科大学实验动物中心提供,合格证号:SYXK(渝)2018-0003。

**1.2 主要药品与试剂** 人参皂苷 Rg1(成都曼思特生物科技有限公司,纯度>99%);D-半乳糖(D-gal,上海麦克林生化科技有限公司,纯度>99%);BCA 蛋白浓度测定试剂盒、RAPA 裂解液(上海碧云天生物技术研究所);兔单克隆抗体 LC3-II、p62、Beclin1、AMPK、p-AMPK、mTOR、p-mTOR,鼠单克隆抗体 p53(Affinity 公司),鼠单克隆抗体 β-actin( Signaling 公司);乙酰胆碱酯酶试剂盒、雷帕霉素(Rapamycin)(索莱宝生物科技有限公司)。

## 1.3 方法

### 1.3.1 脑衰老模型建立与分组处理 C57BL/6J

雄性小鼠随机分为 4 组 (10 只/组)。脑衰老模型组:腹腔连续注射 D-半乳糖 (D-galactose, D-gal) ( $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \times 42 \text{ d}$ ); 对照组:腹腔注射等量生理盐水  $\times 42 \text{ d}$ ; Rg1 抗脑衰老模型组:腹腔注射等量 D-gal  $\times 42 \text{ d}$ , 从 d 16 起, 同时注射 Rg1 ( $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \times 27 \text{ d}$ ); 自噬激活剂雷帕霉素抗衰老组:腹腔注射等量 D-gal  $\times 42 \text{ d}$ , 从 16 d 起, 同时注射 Rap ( $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \times 27 \text{ d}$ ), 建模完成后于次日进行各实验指标的检测。

### 1.3.2 小鼠衰老生物学表现观察 在构建模型期间对各组小鼠进行衰老生物学动态观察, 包括体质量、饮食、饮水情况、精神状态、活动状态、毛色与大小便等状况。

**1.3.3 行为学测试** 让小鼠背对逃生平台, 将其分别从水迷宫的 4 个象限轻轻放入水槽之中, 记录小鼠在 60 s 内找到逃生平台的时间, 并让小鼠在逃生平台上停留 5 s, 如果超过 60 s 仍未找到, 则引导小鼠回到平台并使其停留 20 s。d 7, 撤去逃生平台, 随机将小鼠在任一象限的同一位置放入水槽之中, 并记录 60 s 内小鼠在目标象限游泳的时间百分比与穿越原逃生平台的次数。

**1.3.4 海马组织形态学观察** 水迷宫测试完成后 d 2, 处死小鼠取脑组织, 4% 多聚甲醛固定 2 d, 选取脑海马区制作石蜡切片, 进行 HE 染色、Nissl 染色, 观察各组海马区神经元损伤形态和神经元内尼氏小体的数量, 并用 ImageJ 软件对海马区神经元进行计数分析。

**1.3.5 脑组织乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AChE) 活性测定** 制备脑组织匀浆,  $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 收集上清液。BCA 蛋白测定试剂盒检测各组上清液的蛋白浓度, 按照 AChE 检测试剂盒说明书相关检测 AChE 活性并分析数据。

**1.3.6 脑组织自噬相关蛋白检测** RAPA 裂解液提取脑组织蛋白, BCA 蛋白试剂盒进行蛋白浓度测定。SDS-PAGE 凝胶电泳, PVDF 膜进行蛋白转膜, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h。兔抗 LC3-II (1 : 1 000)、p62 (1 : 1 000)、Beclin1 (1 : 1 000)、鼠抗  $\beta$ -actin (1 : 10 000), 4 °C 分别孵育过夜。次日, 抗鼠二抗 (1 : 10 000)、抗兔二抗 (1 : 10 000) 室温孵育 2 h, TBST 洗膜, ECL 发光法显影。用 ImageJ 软件对各条带进行其灰度值分析, 并计算各目的蛋白与内参蛋白  $\beta$ -actin 的比值并作图。同时用石蜡切片进行

免疫组化染色, 检测海马区神经元内自噬蛋白 p62、ATG5、ULK1 的表达, 并用 ImageJ 软件对各组切片进行免疫组化定量分析并作图。

### 1.3.7 自噬通路 AMPK/mTOR 信号通路的检测

对 AMPK/mTOR 信号通路的两个主要蛋白进行 Western blot 蛋白检测, 包括 p-AMPK/AMPK 与 p-mTOR/mTOR 的比值。同时检测脑组织中凋亡蛋白 p53 的表达, 并用 ImageJ 软件对各条带进行灰度值分析并作图。

**1.3.8 统计学分析** 所有实验数据均用 GraphPad Prism8.0 统计分析软件进行分析和作图, 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组比较宜先用方差分析, 再作两两比较。

## 2 结果

**2.1 衰老模型小鼠逐渐表现出自然衰老的生物学特点** 随着注射 D-gal 剂量累积和时间延长, D-gal 组小鼠逐渐表现出衰老生物学特征, 表现为体质量减轻, 活动减少, 精神倦怠, 毛发灰暗, 进食量减少, 大便稀溏, 符合自然衰老的生物学表现。而对照组和 Rg1 或 Rap 抗衰老组无明显衰老的生物学表现。

**2.2 Rg1 能显著改善脑衰老小鼠的空间探索与学习记忆能力** 水迷宫实验结果表明, D-gal 组小鼠在探索期的游泳轨迹杂乱无章, 逃避潜伏期较长, 并且在目标象限停留时间的百分比与穿越逃生平台的次数均明显低于对照组 ( $P < 0.05$ ), 提示小鼠空间探索能力与学习记忆能力明显降低, 而用 Rg1 或 Rap 干预致衰过程, 小鼠空间探索能力与学习记忆能力明显改善 (Fig 1)。

**2.3 Rg1 对脑衰老小鼠海马区神经元形态与 Nissl 小体数量的影响** HE 染色结果表明, 对照组小鼠海马区神经元排列整齐, 形态结构正常, 而 D-gal 组小鼠海马区神经元数量明显减少, 排列紊乱, 分布稀疏, 且退变与坏死细胞数增多, Nissl 染色显示神经元内 Nissl 小体数量明显减少。采用 Rg1 或 Rap 干预致衰过程, 海马区神经元数量无明显减少, 没有明显的形态学损伤, 且神经元内 Nissl 数量无明显减少 (Fig 2, 3)。

**2.4 Rg1 对脑衰老小鼠脑组织内乙酰胆碱酯酶 (AChE) 活性的影响** 结果表明, D-gal 组小鼠脑组织匀浆中乙酰胆碱酯酶的活性明显上升 ( $P < 0.05$ ), 采用 Rg1 或 Rap 干预致衰过程, 脑组织匀浆中乙酰胆碱酯酶的活性明显降低 ( $P < 0.05$ ) (Fig 4)。

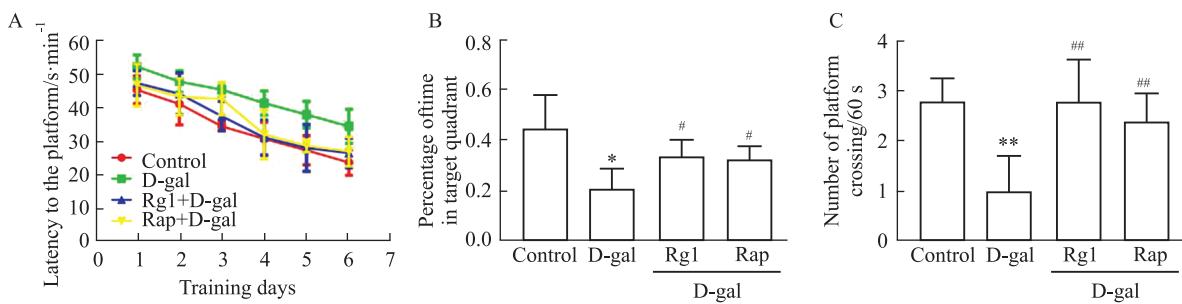


Fig 1 Effect of ginsenoside Rg1 on learning and memory abilities of brain aging mice ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

A: The effect of Rg1 on the escape latency of brain aging mice; B: The effect of Rg1 on the percentage of time that brain aging mice stayed in the target quadrant. \* $P < 0.05$  vs control; # $P < 0.05$  vs D-gal. C: The effect of Rg1 on the number of times that brain aging mice crossed the platform. \*\* $P < 0.01$  vs control; ## $P < 0.01$  vs D-gal

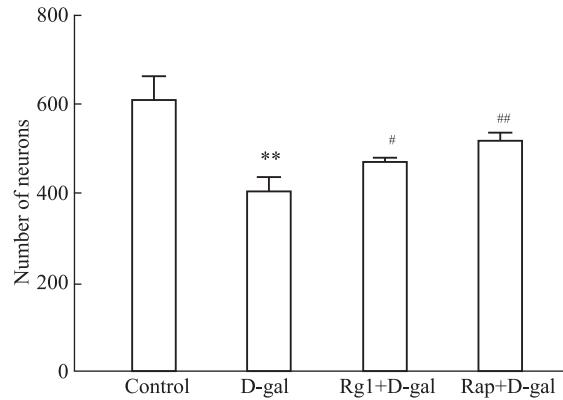
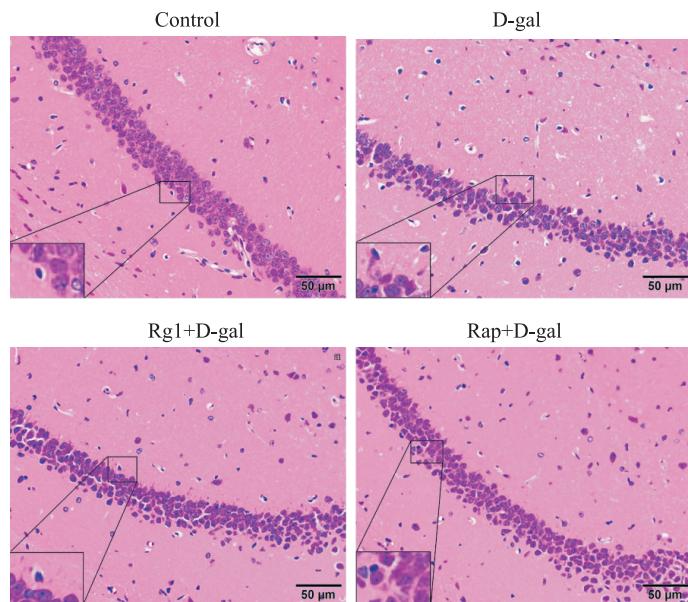


Fig 2 Effect of ginsenoside Rg1 on morphology and number of neurons in hippocampus of brain aging mice (HE staining  $\times 400$ ) ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

\*\* $P < 0.01$  vs control; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs D-gal

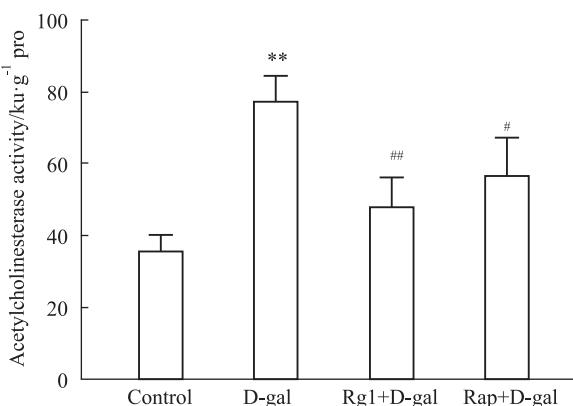
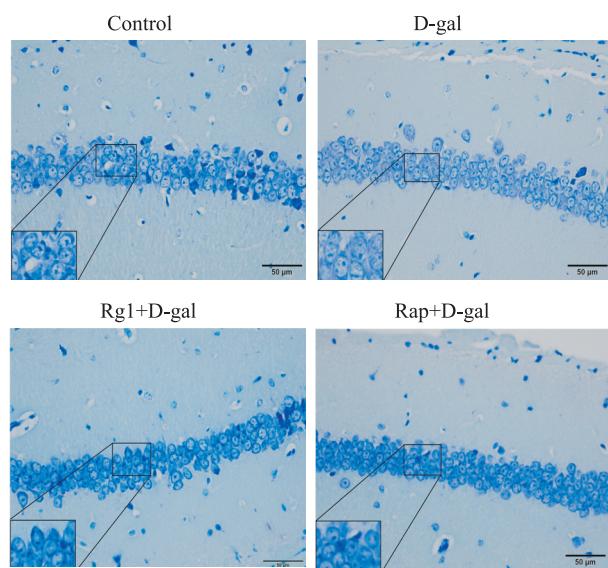


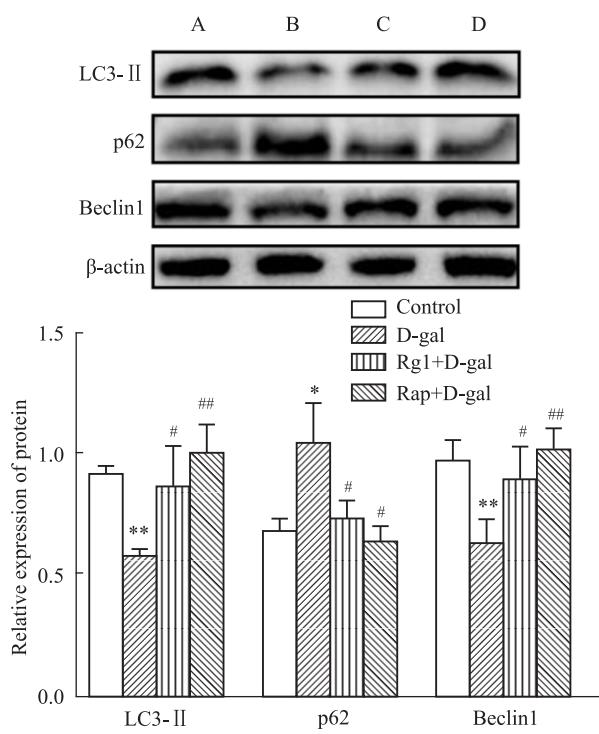
Fig 4 Effect of ginsenoside Rg1 on acetylcholinesterase in brain tissues of brain aging mice ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

\*\* $P < 0.01$  vs control; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs D-gal

## 2.5 Rg1 对脑衰老小鼠脑组织中自噬相关蛋白的影响

Western blot 结果表明,与对照组相比,D-gal

组小鼠脑组织中自噬相关蛋白 LC3-II、Beclin1 表达下调,p62 表达上调( $P < 0.05$ ),提示小鼠脑自噬活动的下降。采用 Rg1 或 Rap 干预致衰过程,LC3-II、Beclin1 表达上调, p62 表达下调 ( $P < 0.05$ ),说明 Rg1 与 Rap 可以上调小鼠脑的自噬功能(Fig 5)。



**Fig 5 Effect of ginsenoside Rg1 on expression of autophagy protein in brain tissues of brain aging mice ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )**

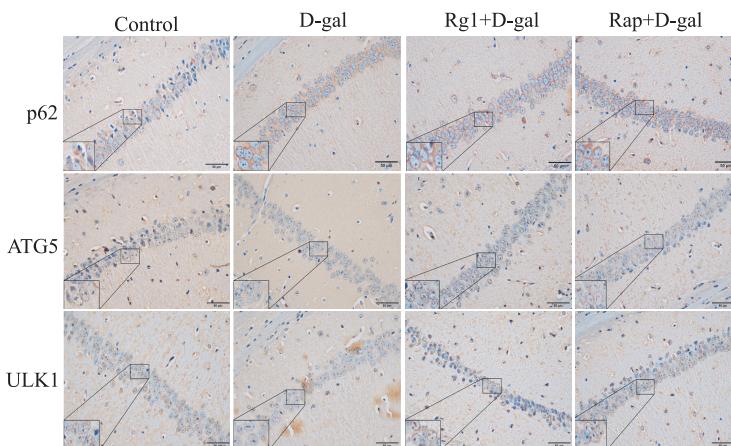
A: Control B: D-gal C: Rg1 + D-gal D: Rap + D-gal. \*  $P < 0.05$ ,

\*\*  $P < 0.01$  vs control; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs D-gal

同时免疫组织化学染色结果表明,与对照组相比,D-gal 组小鼠海马区神经元内自噬相关蛋白 p62 表达上升,ATG5、ULK1 蛋白表达下降( $P < 0.05$ )。采用 Rg1 或 Rap 干预致衰过程,p62 表达下降,ATG5、ULK1 蛋白表达明显上升( $P < 0.05$ ),提示了 Rg1 与 Rap 可以上调海马区神经元的自噬功能(Fig 6)。

## 2.6 Rg1 对脑衰老小鼠脑组织 AMPK/mTOR 信号通路以及 p53 蛋白的影响

Western blot 结果表



**Fig 6 Effect of ginsenoside Rg1 on expression of neuronal autophagy protein in hippocampus of brain aging mice (Immunohistochemistry  $\times 400$ ) ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )**

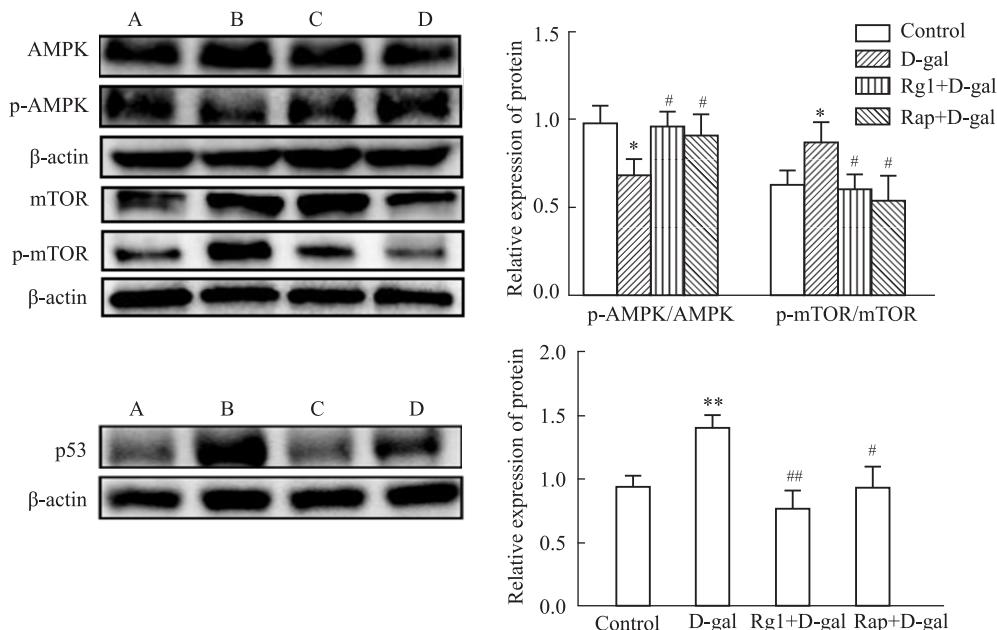
\*  $P < 0.05$  vs control, \*\*  $P < 0.01$  vs D-gal ; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs D-gal

明,D-gal 组小鼠脑组织蛋白的 p-AMPK/AMPK 比值下降,p-mTOR/mTOR 的比值上升,提示脑内细胞自噬活动的下降。当采用 Rg1 或 Rap 干预致衰过程,脑组织蛋白的 p-AMPK/AMPK 比值上升,p-mTOR/mTOR 的比值下降,说明 Rg1 可以通过上调 p-AMPK 或下调 p-mTOR 含量促进小鼠脑的自噬功能。同时,与对照组相比,D-gal 组 p53 蛋白明显上调( $P < 0.05$ ),提示小鼠脑中存在细胞凋亡现象,而采用 Rg1 或 Rap 干预致衰过程,p53 表达明显下降( $P < 0.05$ ),提示 Rg1 可以显著拮抗 D-gal 所致的脑衰老(Fig 7)。

## 3 讨论

随着年龄的增长,大脑逐渐出现器官与细胞水平上的退行性变,因此,阿尔茨海默病、帕金森病(PD)等神经退行性疾病的发病率逐渐上升<sup>[5]</sup>。人参是中医临床“补气”药,而人参皂苷 Rg1 是人参中最重要的抗氧化、抗衰老成分,它能够有效延缓机体脑器官的衰老<sup>[6]</sup>,本文采用 D-gal 构建脑衰老模型,旨在探讨人参皂苷 Rg1 延缓 D-gal 所致的脑衰老与激活 AMPK/mTOR 信号通路调控自噬的初步机制。

D-gal 是一种公认的致衰剂,所致衰老与自然衰老相似,它可以有效导致机体脑,心脏,脾等多个器官的氧化损伤与衰老,现被广泛用于机体抗衰老机制的相关研究<sup>[7-8]</sup>。课题组前期研究发现,D-gal 对脑确有明显损伤,并与其下调自噬活动有关<sup>[9]</sup>,而 Rap 是一种典型的自噬激活剂,它可以显著提升机体的自噬功能<sup>[10]</sup>。本实验结果证明,随着注射 D-gal 剂量的累积和时间的延长,小鼠逐渐出现精神萎靡,毛色灰暗等与自然衰老相似的生物学特征。经过水迷宫实验测试小鼠的学习与记忆能力,D-gal 组



**Fig 7 Effect of ginsenoside Rg1 on AMPK/mTOR signaling pathway and p53 protein in brain tissues of brain aging mice ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )**  
 A: Control B: D-gal C: Rg1 + D-gal D: Rap + D-gal. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs D-gal

小鼠的空间学习与记忆能力明显下降。在 Rg1 与 Rap 干预衰老模型之后, 小鼠的学习与记忆能力显著提高, 并明显提高了小鼠的认知功能, 水迷宫实验证明了 Rg1 与 Rap 确实可以改善 D-gal 对小鼠大脑所致的学习记忆能力的损伤。

自噬是一种调节机体吞噬自身衰老细胞与细胞器的活动, 在一定程度上, 上调自噬功能可以对机体起着抗衰老的作用<sup>[11]</sup>。Beclin1 是自噬过程启动的关键因子<sup>[12]</sup>, 当机体自噬启动时, 胞质型 LC3 (LC3-I) 会酶解掉一小段多肽, 转变为自噬体(膜型), 即 LC3-II。p62 蛋白是自噬过程的一种降解产物, 具有底物特异性, 在自噬的中晚期被降解, 因此组织整体的 p62 水平与自噬活动存负相关<sup>[13]</sup>。因此, LC3-II、p62、Beclin1 均可作为自噬水平检测的主要标志物。本实验研究结果表明, D-gal 所致脑衰老小鼠 LC3-II、Beclin1 蛋白含量降低, p62 蛋白含量升高。用 Rg1 与 Rap 干预其衰老进程之后, 小鼠 LC3-II、Beclin1 蛋白含量升高, p62 蛋白含量显著降低, 提示 Rg1 明显改善了小鼠脑的自噬功能。AMPK/mTOR 信号通路是细胞自噬的重要调控通路。腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK) 和雷帕霉素靶蛋白(mTOR) 是调控自噬的重要信号分子<sup>[14]</sup>, 自噬可在不同应激刺激下发生, 如饥饿、缺氧和氧化应激<sup>[15]</sup>。在 AMPK/mTOR 信号通路中, AMPK 通过磷酸化被激活, 并降低了 mTOR 的磷酸化水平, 最终激活自噬。Rg1 与 Rap 通过促进 AMPK 或抑制 mTOR 的磷酸化和调节

各自噬相关蛋白的表达来调控自噬功能。据报道, 有许多信号通路都参与了自噬的调控, 包括 AMPK、mTOR、PI3K 与 MAPK 等信号通路, 人参皂苷 Rg1 被认为通过 AMPK/mTOR 信号通路诱导自噬, 自噬功能的下降则会导致衰老的发生<sup>[16]</sup>。本研究结果表明, D-gal 组 p-AMPK/AMPK 明显下降, p-mTOR/mTOR 上升, 通过 Rg1 与 Rap 干预之后, 自噬活动明显提升, 此研究证明了 Rg1 可以通过 AMPK/mTOR 信号通路提升小鼠脑的自噬功能。乙酰胆碱是一种神经递质, 能特异地作用于各类胆碱受体, 在脑组织内迅速被乙酰胆碱酯酶所分解<sup>[17]</sup>, 因此, 同时通过测定脑组织内的乙酰胆碱酯酶活性可以反映神经递质乙酰胆碱的含量, 以助于诊断小鼠大脑的神经功能状态。本研究结果表明, D-gal 所致脑衰老小鼠的乙酰胆碱酯酶活性明显升高, 而 Rg1 与 Rap 干预之后可以显著降低乙酰胆碱酯酶的活性, 证明了 Rg1 可以改善 D-gal 所致小鼠脑衰老的神经功能障碍。

综上所述, 本文通过腹腔注射 D-gal 成功构建小鼠脑衰老模型, 同时用人参皂苷 Rg1 与自噬激活剂 Rap 干预其衰老机制, 结果表明了 Rg1 确实可以延缓 D-gal 所致的脑衰老, 与其自噬活动密切相关, 并可能是因为上调了 AMPK/mTOR 信号通路, 从而起着抗衰老的作用, 这为今后进一步研究人参皂苷 Rg1 延缓机体衰老的具体机制提供了一定的理论基础。

## 参考文献:

- [1] Zhong S J, Wang L, Gu R Z, et al. Ginsenoside Rg1 ameliorates the cognitive deficits in D-galactose and AlCl-induced aging mice by restoring FGF2-Akt and BDNF-TrkB signaling axis to inhibit apoptosis [J]. *Int J Med Sci*, 2020, **17**(8): 1048–55.
- [2] 向 玥, 陈粼波, 姚 辉, 等. 人参皂苷 Rg1 对 D-半乳糖所致衰老小鼠海马的保护机制 [J]. 中草药, 2017, **48**(18): 3789–95.
- [2] Xiang Y, Chen L B, Yao H, et al. The protective mechanism of ginsenoside Rg1 on the hippocampus of aging mice induced by D-galactose [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2017, **48**(18): 3789–95.
- [3] Zheng J, Hu S S, Wang J X, et al. Icarin improves brain function decline in aging rats by enhancing neuronal autophagy through the AMPK/mTOR/ULK1 pathway [J]. *Pharm Biol*, 2021, **59**(1): 183–91.
- [4] Han X J, Tai H R, Wang X B, et al. AMPK activation protects cells from oxidative stress-induced senescence via autophagic flux restoration and intracellular NAD(+) elevation [J]. *Aging Cell*, 2016, **15**(3): 416–27.
- [5] Aseyf Z, Hoseinnezhad S, Ceferov Z. Nanoparticles approaches in neurodegenerative diseases diagnosis and treatment [J]. *Neurol Sci*, 2021, **42**(7): 2653–60.
- [6] Liang H Y, Zhang P P, Zhang X L, et al. Preclinical systematic review of ginsenoside Rg1 for cognitive impairment in Alzheimer's disease [J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, **13**(5): 7549–69.
- [7] Liu X H, Zhao Z H, Zhou Y, et al. Effect of ginsenoside Rg1 in delaying premature ovarian failure induced by D-gal in mice through PI3K/Akt/mTOR autophagy pathway [J]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2020, **45**(24): 6036–42.
- [8] 李 庚, 汪子铃, 候吉颖, 等. 人参皂苷 Rg1 对 D-半乳糖所致小鼠心肌损伤的保护作用 [J]. 第三军医大学学报, 2021, **43**(11): 1074–9.
- [8] Li G, Wang Z L, Hou J Y, et al. Protective effect of ginsenoside Rg1 on myocardial injury induced by D-galactose in mice [J]. *J Third Mil Med Univ Journal of the Third*, 2021, **43**(11): 1074–9.
- [9] Chen L B, Yao H, Chen X B, et al. Ginsenoside Rg1 decreases oxidative stress and down-regulates Akt/mTOR signalling to attenuate cognitive impairment in mice and senescence of neural stem cells induced by D-Galactose [J]. *Neurochem Res*, 2018, **43**(2): 430–40.
- [10] Zhou W, Ye S D. Rapamycin improves insulin resistance and hepatic steatosis in type 2 diabetes rats through activation of autophagy [J]. *Cell Biol Int*, 2018, **42**(10): 1282–91.
- [11] Benedetto A, Gems D. Autophagy promotes visceral aging in wild-type *C. elegans* [J]. *Autophagy*, 2019, **15**(4): 731–2.
- [12] 潘 慧, 郑晓月, 王 珊, 等. 褐藻胶寡糖对 D-半乳糖诱导的小鼠肾脏衰老的保护作用及机制 [J]. 中国药理学通报, 2021, **37**(10): 1390–5.
- [12] Pan H, Zhen X Y, Wang S, et al. Protective effect and mechanism of algin oligosaccharides on D-galactose-induced renal senescence in mice [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2021, **37**(10): 1390–5.
- [13] Jeong S J, Zhang X, Rodriguez-Velez A, et al. SQSTM1/p62 and selective autophagy in cardiometabolic diseases [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2019, **31**(6): 458–71.
- [14] Meng H Y, Shao D C, Li H, et al. Resveratrol improves neurological outcome and neuroinflammation following spinal cord injury through enhancing autophagy involving the AMPK/mTOR pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2018, **18**(2): 2237–44.
- [15] Kulkarni A, Dong A, Kulkarni V V, et al. Differential regulation of autophagy during metabolic stress in astrocytes and neurons [J]. *Autophagy*, 2020, **16**(9): 1651–67.
- [16] Yang P, Ling L, Sun W J, et al. Ginsenoside Rg1 inhibits apoptosis by increasing autophagy via the AMPK/mTOR signaling in serum deprivation macrophages [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2018, **50**(2): 144–55.
- [17] Janecek M, Gefen T, Samimi M, et al. Variations in acetylcholinesterase activity within human cortical pyramidal neurons across age and cognitive trajectories [J]. *Cereb Cortex*, 2018, **28**(4): 1329–37.

## Ginsenoside Rg1 regulates autophagy through AMPK/mTOR signaling pathway and delays brain aging in mice

ZHANG Jin<sup>1,2</sup>, WANG Shun-he<sup>1,2</sup>, WANG Lan<sup>1,2</sup>, HU Ling<sup>1,3</sup>, WANG Zi-ling<sup>1,3</sup>,

ZENG Di<sup>1,3</sup>, HOU Ji-ying<sup>1,3</sup>, HUANG Cai-hong<sup>1,3</sup>, DU Kun-hang<sup>1,3</sup>, WANG Lu<sup>1,3</sup>, WANG Ya-ping<sup>1,3</sup>

(1. Dept of Stem Cell and Tissue Engineering; 2. Dept of Pathology, 3. Dept of Histology and Embryology,

Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract: Aim** To investigate the mechanism by which ginsenoside Rg1 regulates autophagy and delays brain aging in mice through AMPK/mTOR signaling pathway. **Methods** C57BL/6J male mice were randomly divided into four groups, namely brain aging model group, control group, Rg1 anti-aging group, autophagy activator Rapamycin anti-aging group. After the modeling was completed, the test of each experimental

index would be carried out on the next day. Morris water maze experiment was used to detect the learning and memory ability of mice. Paraffin sections of the hippocampus were prepared, HE, Nissl and immunohistochemical staining were used to observe the morphology of hippocampal neurons, the number of neurons and Nissl bodies was counted, and autophagy-related proteins p62, ATG5, ULK1 were detected. Brain tissue

网络出版时间:2022-06-16 15:00 网络出版地址:<https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1086.R.20220615.0945.002.html>

# 槲皮素对 A<sub>β</sub><sub>25-35</sub> 诱导的 PC12 细胞线粒体途径凋亡的雌激素样神经保护作用

赵雨薇,戴月英,甄艳杰,李 炜,沈丽霞

(河北北方学院药学系,河北省神经药理学重点实验室,河北张家口 075000)

doi:10.12360/CPB202109035

文献标志码:A 文章编号:1001-1978(2022)07-0993-07

中国图书分类号:R329.24;R347.913;R977.12

**摘要:**目的 考察槲皮素(quercetin, Que)通过雌激素受体α( estrogen receptorα, ERα)对 A<sub>β</sub><sub>25-35</sub>致 PC12 细胞线粒体损伤的保护作用。**方法** 选用 PC12 细胞作为 AD 细胞毒性损伤模型的对象,采用 A<sub>β</sub><sub>25-35</sub> (20 μmol·L<sup>-1</sup>) 毒性损伤的同时加入 Que(40、60、80 μmol·L<sup>-1</sup>),同时选取 0.1 μmol·L<sup>-1</sup> 的 17β-雌二醇(17β-estradiol, 17β-E<sub>2</sub>)与 50 μmol·L<sup>-1</sup> 金雀异黄素(genistein, Gen)作为阳性对照,并设 ICI182,780 (雌激素受体抑制剂)预处理组(A<sub>β</sub><sub>25-35</sub> + 1 μmol·L<sup>-1</sup> ICI182,780, A<sub>β</sub><sub>25-35</sub> + 1 μmol·L<sup>-1</sup> ICI182,780 + 60 μmol·L<sup>-1</sup> Que)。Rhodamine 123 检测线粒体膜电位;6-二氯苯酚酚钠(2,6-DPIP)还原法和分光光度法分别测定琥珀酸脱

氢酶(SDH) 和 Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATP 酶活力;Western blot 法测定 ERα,ERβ,Bcl-2、Bax,caspase-3,Cytochrome C 蛋白的表达。

**结果** 与毒性损伤组相比,A<sub>β</sub><sub>25-35</sub> + Que 组能明显增强线粒体 SDH 和 Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATP 酶活性,提高线粒体膜电位( $P < 0.01$ )。Western blot 显示,与毒性损伤组相比,Que 提高 ERα 蛋白表达量( $P < 0.01$ ),对于 ERβ 蛋白表达无明显差异( $P > 0.05$ ),上调 Bcl-2 蛋白表达及下调 Bax,caspase-3,Cytochrome C 蛋白的表达( $P < 0.05$ )。当细胞内雌激素受体受到 ICI182,780 抑制后,Que 对上述指标的作用可被逆转。**结论** Que 通过介导 ERα 抑制 A<sub>β</sub><sub>25-35</sub> 毒性损伤造成的 PC12 细胞线粒体途径凋亡,从而发挥神经保护效应。

**关键词:**槲皮素;植物雌激素;线粒体;雌激素受体;雌激素;神经保护作用

收稿日期:2022-01-12,修回日期:2022-03-10

基金项目:河北省自然科学基金资助项目(No H2019405057, H2020405298);河北省高等学校科学技术研究项目(No ZD2020136);河北省研究生创新项目(No CXZZSS2019147)

作者简介:赵雨薇(1996-),女,硕士生,研究方向:神经药理学,E-mail: zhaoyuwei961229@163.com;  
沈丽霞(1970-),女,博士,教授,硕士生导师,研究方向:神经药理学,通信作者,E-mail: shenliaxian@163.com;  
李 炜(1977-),女,硕士,副教授,硕士生导师,研究方向:神经药理学,通信作者,E-mail: leewei318@126.com

homogenates were prepared to detect the activity of brain tissue acetylcholinesterase (AChE). Western blot was used to detect brain tissue autophagy-related proteins LC3II, P62, beclin1, P-AMPK/AMPK, P-mTOR/mTOR and apoptosis protein P53. **Results** Water maze test showed that Rg1 and Rap significantly improved the learning and memory abilities of brain-aging mice. HE and Nissl staining showed that Rg1 and Rap decreased necrotic cells and increased the number of Nissl bodies in the hippocampus of brain-aging mice. Immunohistochemistry staining showed that Rg1 and Rap decreased the expression of neuronal autophagy protein P62 in hippocampus and increased the ex-

pression of ATG5 and ULK1. Rg1 and Rap decreased the activity of AChE in brain-aging mice. Western blot showed that Rg1 and Rap increased autophagy-related proteins LC3II, Beclin1, P-AMPK/AMPK, but decreased the expression of P-mTOR/mTOR, P62, P53. **Conclusions** Ginsenoside Rg1 can effectively antagonize the aging effect of D-gal on mouse brain. The possible mechanism is related to the regulation of autophagy by Rg1 through AMPK/mTOR signaling pathway.

**Key words:** ginsenoside Rg1; D-galactose; brain; neurons; aging; AMPK/mTOR signaling pathway; autophagy

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

