

· 论 著 ·

6-姜酚降低血管紧张素 II 诱导的血管平滑肌细胞衰老的机制研究

周艳芳, 张国辉, 王 好

(江苏大学附属人民医院心研所, 江苏镇江 212002)

摘要:目的 探讨 6-姜酚对血管平滑肌细胞(VSMCs)病理衰老的影响及机制。方法 培养的 VSMCs 细胞, 给予血管紧张素 II (Ang II) 刺激及 6-姜酚干预, 采用 β -半乳糖苷酶染色检测细胞衰老变化, 流式细胞术检测细胞周期分布, 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 mTOR 蛋白表达及其底物 P70-S6K 磷酸化水平。结果 Ang II 显著增加 VSMCs 的 β -半乳糖苷酶染色率、 G_0/G_1 期停滞、mTOR 蛋白表达及 P70-S6K 磷酸化, 而 6-姜酚能显著干预上述 Ang II 诱导的细胞衰老表型及相关信号分子变化。结论 6-姜酚可能通过抑制 mTOR/P70-S6K 降低 Ang II 诱导的 VSMCs 衰老。

关键词:肌, 平滑, 血管; 血管紧张素 II; 6-姜酚; mTOR; 细胞衰老

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2014.14.003

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)14-1687-03

A study on 6-gingerol attenuate vascular smooth muscle cells senescence through inhibition of mTOR pathway molecular

Zhou Yanfang, Zhang Guohui, Wang Hao

(Cardiovascular Disease Institute, the Affiliated People's Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212002, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of 6-gingerol on the rat aortic vascular smooth muscle cells(VSMCs) senescence induced by angiotensin II (Ang II). **Methods** Culturing rat VSMCs were stimulated with Ang II with or without pretreating with 6-gingerol. The senescent status of cells was verified by in situ staining for senescence-associated β -galactosidase(SA- β -gal). The cell cycle distribution was analyzed by FACS. The protein expression of mTOR and phosphorylated P70-S6K were detected by Western blot. **Results** When VSMCs were exposed to Ang II, the senescence marker such as SA- β -gal staining and cell cycle arresting in G_0/G_1 phase were significantly increased. Furthermore, the protein level of mTOR, phosphorylated P70-S6K were also enhanced significantly. However, 6-gingerol was found to markedly inhibit the senescence-like phenotype and related signal molecular induced by Ang II as mentioned above. **Conclusion** 6-gingerol attenuate VSMCs senescence through inhibition of mTOR/P70S6K pathway molecular.

Key words: muscle, smooth, vascular; Angiotensin II; 6-gingerol; mTOR; senescence

细胞衰老是不可逆的细胞周期停滞伴随表型的改变, 呈现特征性的衰老表型, 包括细胞增大、扁平等细胞形态改变、衰老相关的 β -半乳糖苷酶活性增加^[1]等。细胞衰老不仅仅是生理上促进组织、器官及机体的衰老, 还具有促进衰老相关疾病的发生发展。因此, 靶向抑制细胞衰老可能是衰老相关疾病防治的有效新策略^[2-3]。细胞衰老与坏死一样是不可逆过程, 有效降低其衰老是关键。目前, 认为一些酚类物质治疗可能有效, 6-姜酚是一种生姜中的多酚复合物, 具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤的多重保护效应^[4-5], 且中国有饮生姜水祛老年斑(皮肤衰老表现)的民间验方。血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 是高血压、冠心病等衰老相关性血管疾病发生发展的重要病理因素, 有研究显示 Ang II 能通过 AT1 受体介导血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMCs) 衰老^[6], 作者实验证明 mTOR 参与 Ang II 诱导的 VSMCs 衰老。在本试验中, 作者以 Ang II 作为 VSMCs 衰老诱导剂, 探讨 6-姜酚对 Ang II 介导 VSMCs 衰老的干预作用及其机制。

1 材料与方

1.1 实验动物 体质量 120~150 g 的雄性 SD 大鼠, 由江苏大学动物实验中心提供。

1.2 药物与试剂 DMEM 培养基及胰蛋白酶(Gibco, 美国), 南美胎牛血清(HyClone, 美国), Ang II (Tocris, 美国), 6-姜酚(Merck, 德国), 细胞衰老相关的 β -半乳糖苷酶检测试剂盒(碧云天, 中国), RNaseA、碘化丙啶(Amresco, 美国), 兔单克隆

mTOR 抗体、磷酸化 P70-S6K 抗体(Cell Signal Technique, 美国)及辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(Cell Signal Technique, 美国), 山羊多克隆 AT1 抗体及辣根过氧化物酶标记驴抗山羊 IgG (Santa Cruz, 美国), 超敏 ECL 显色试剂盒(Pierce, 美国)。

1.3 方法

1.3.1 大鼠主动脉 VSMCs 的分离培养及处理 取体质量 120~150 g 的雄性 SD 大鼠, 断头处死, 无菌条件下取胸主动脉, 纵向剪开, 剥离血管外膜及内膜, 中膜剪成 1~3 mm 大小组织块, 采用组织块贴壁法培养 VSMCs, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 37 °C、5% CO₂、100% 湿度的标准条件下培养细胞, 获得纯度 90% 以上的 VSMCs (免疫细胞化学抗 α -SMA 染色)。第 3~8 代的细胞用于实验, 给予 Ang II 处理细胞 (Ang II 组), 或以 6-姜酚预处理细胞 1 h, 再给予 Ang II 处理 (6-姜酚组)。然后进行细胞衰老相关的 β -半乳糖苷酶染色检测细胞衰老, 流式细胞术分析细胞周期, 或提取蛋白进行蛋白免疫印迹法 (Western blot) 分析蛋白表达。

1.3.2 β -半乳糖苷酶染色 按试剂说明书的步骤进行, 经处理 48 h 的 6 孔板中培养的细胞, 吸除细胞培养液, PBS 洗 1 次, 加 1 mL β -半乳糖苷酶染色固定液, 室温固定 15 min, PBS 洗 3 次。每孔加 1 mL 染色工作液, 37 °C 孵育过夜, 相差显微镜下 ($\times 400$) 观察并摄片。分别选择 8~10 个视野, 计数衰老和正常细胞数 (共计数 100 个), 计算衰老阳性率 [衰老细胞阳性率 (%) = 衰老阳性细胞数 / 100 个细胞 $\times 100\%$]。

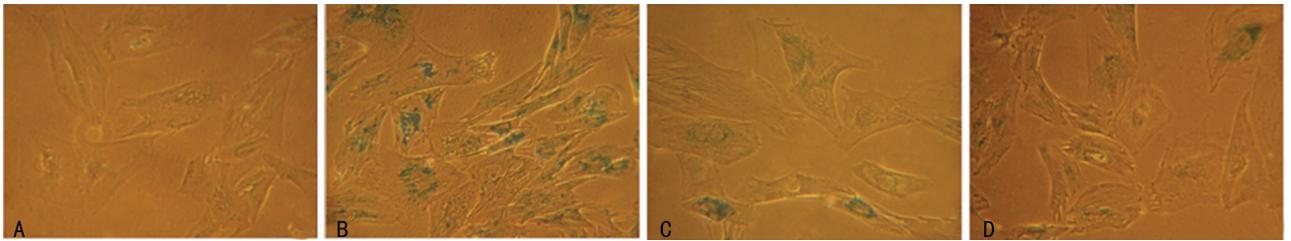
1.3.3 流式细胞术检测细胞周期变化 细胞以 2×10^4 个密度接种于 6 孔板, 培养 24 h, 用药物处理到设定的时间, 以 0.25% 胰蛋白酶消化收集细胞, $1\,000 \times g$ 离心 5 min, PBS 洗涤 3 次, $500 \mu\text{L}$ 预冷的 70% 乙醇 4°C 过夜固定。PBS 洗涤 2 次, $100 \mu\text{L}$ 的 PBS 重悬细胞, 加入 RNaseA (终浓度 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$), 37°C 孵育 30 min, 加入碘化丙啶染色液 (终浓度 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$), 常温避光染色 1 h, 200 目滤网过滤, 流式细胞仪 (美国 BD 公司 FACS Calibur) 检测分析细胞周期变化。

1.3.4 Western blot 检测 收集各组细胞, 加入冰冷细胞裂解液 $100 \mu\text{L}$ (5 倍细胞球体积), 静置 30 min, 超声粉碎 4 次, $13\,000 \text{ r}/\text{min}$ 离心 30 min, 提取总蛋白并用 Bradford 法测蛋白浓度, $40 \mu\text{g}$ 蛋白上样行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 再将蛋白质转移到硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 加一抗 4°C 过夜。二抗室温孵育 1 h, ECL 化学发光显色后凝胶成像仪 (Bio-Rad 公司, 美国) 捕获图像。

1.4 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件进行统计分析, 计数资料以率 (%) 表示, 组间率的比较采用 χ^2 检验; 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间均数的比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 方法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 6-姜酚降低 Ang II 诱导的 VSMCs 衰老 β -半乳糖苷酶活性被证明是衰老细胞的一个特征性的生物标志物^[7]。作者以 $1 \times 10^{-6} \text{ mol}/\text{L}$ Ang II 处理细胞 48 h, β -半乳糖苷酶染色结果显示: 未经刺激的细胞偶见染色阳性细胞, Ang II 刺激后染色阳性细胞数量及染色程度显著增加, 与 Ang II 刺激的细胞相比较, 6-姜酚预处理的细胞 β -半乳糖苷酶染色阳性细胞数量及染色程度均随 6-姜酚浓度升高而显著降低, 见图 1, 表 1。表明 6-姜酚可以保护 VSMCs 抵抗 Ang II 诱导的细胞衰老。以下的机制探讨中均以终浓度 $1 \times 10^{-5} \text{ mol}/\text{L}$ 的 6-姜酚作为干预条件。



A: 对照组 (不作任何处理); B: Ang II ($1 \times 10^{-6} \text{ mol}/\text{L}$) 组; C: 6-姜酚 ($1 \times 10^{-6} \text{ mol}/\text{L}$) 组; D: 6-姜酚 ($1 \times 10^{-5} \text{ mol}/\text{L}$) 组, 衰老细胞染色阳性呈蓝色。

图 1 β -半乳糖苷酶染色结果 (X-Gal 法, $\times 400$)

表 1 不同浓度 Ang II 对 VSMCs 衰老的影响 ($n=3$)

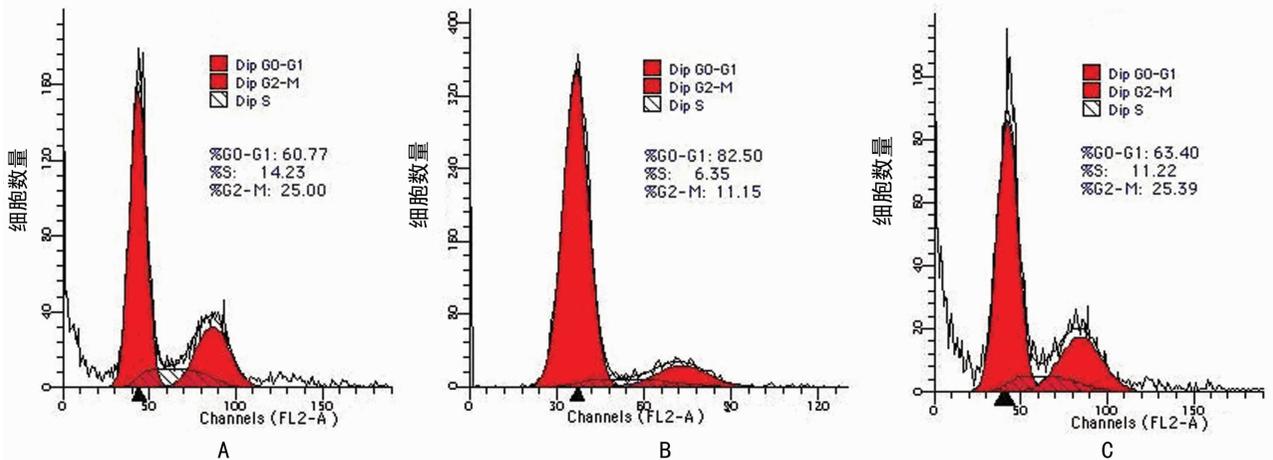
组别	药物浓度 (mol/L)		细胞衰老率 (%)
	Ang II	6-姜酚	
对照组	—	—	0
Ang II 组	10^{-6}	—	64.0 ^a
6-姜酚组			
浓度 1 组	10^{-6}	10^{-6}	39.0 ^b
浓度 2 组	10^{-6}	10^{-5}	10.0 ^b

^a: $P < 0.01$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.01$, 与 Ang II 组比较; —: 此项无数据。

2.2 6-姜酚对 Ang II 处理的 VSMCs 细胞周期的影响 细胞

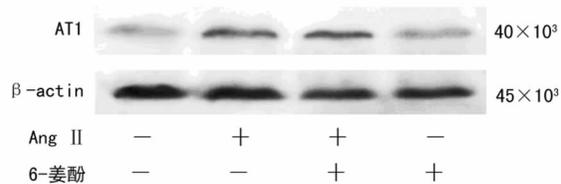
周期停滞是衰老细胞的一个显著特征, VSMCs 经 Ang II ($10^{-6} \text{ mol}/\text{L}$) 处理 48 h 后 G_0/G_1 期停滞的细胞由对照的 60.77% 上调至 82.50%, 而 S 期则由 14.23% 降至 6.35%, 显著低于对照组 ($P < 0.05$); 6-姜酚 ($10^{-5} \text{ mol}/\text{L}$) 干预后则 G_0/G_1 期细胞下调至 63.40%, S 期上调至 11.22%, 见图 2。

2.3 6-姜酚对 AT1 受体表达的影响 有研究证明 Ang II 通过其 AT1 受体介导细胞衰老, 本实验显示 Ang II ($10^{-6} \text{ mol}/\text{L}$) 刺激的细胞 AT1 表达上调, 6-姜酚 ($10^{-5} \text{ mol}/\text{L}$) 预处理未影响 Ang II 诱导的 AT1 蛋白表达。6-姜酚处理对正常培养的细胞 AT1 表达水平亦无显著影响, 见图 3。



A: 对照组; B: Ang II 组; C: 6-姜酚组。

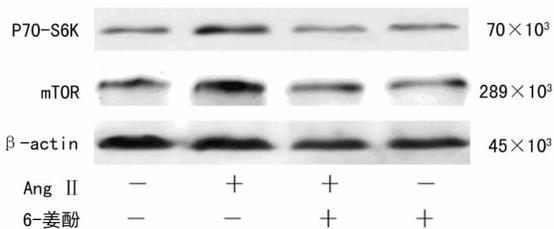
图 2 6-姜酚对 Ang II 处理的 VSMCs 细胞周期的影响



+: Ang II 诱导或 6-姜酚干预; -: 无 Ang II 诱导或无 6-姜酚干预。

图 3 6-姜酚对 Ang II 诱导的 AT1 受体蛋白表达的影响

2.4 6-姜酚对 mTOR 蛋白表达及底物 P70-S6K 磷酸化水平的影响 单独 6-姜酚处理的细胞与对照细胞比较, mTOR 表达及 P70-S6K 磷酸化水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 但与单独 Ang II (10^{-6} mol/L) 刺激的细胞比较, 6-姜酚 (10^{-5} mol/L) 预处理的细胞 mTOR 表达水平则显著降低 ($P < 0.05$); Ang II 刺激而升高的 P70-S6K 磷酸化水平显著回落, 见图 4。



+: Ang II 诱导或 6-姜酚干预; -: 无 Ang II 诱导或无 6-姜酚干预。

图 4 6-姜酚预处理对 Ang II 诱导的 mTOR 蛋白表达及 P70-S6K 蛋白磷酸化水平的影响

3 讨 论

生姜具有抗炎、抗氧化及抗肿瘤作用, 6-姜酚是生姜的主要活性成分之一, 是一种多酚复合物; 体外细胞及动物实验显示 6-姜酚除有抗炎、抗氧化效应, 还具有抗血小板、降脂、降压等多重心血管损伤保护作用^[8]。本研究利用 Ang II 诱导的 VSMCs 衰老模型显示 6-姜酚能显著抑制模型细胞的衰老样表型改变(图 1), 表明 6-姜酚可保护 VSMCs 抵抗 Ang II 诱导的细胞衰老, 这利于 VSMCs 保持正常的细胞功能进而维持血管稳态。Ang II 通过 AT1 受体介导 VSMCs 衰老^[6], 而本研究 6-姜酚处理对 Ang II 诱导的 AT1 受体表达并无显著影响(图 3), 提示 6-姜酚降低 Ang II 诱导的 VSMCs 衰老可能不依赖于 AT1 受体, 而是作用于受体后信号分子。mTOR 作为细胞生长代谢中的一个中心控制者^[9], 除可通过磷酸化使其下游底物活化而调节细胞代谢、生长及存活等, 还可调节一些细胞型的衰老过程^[10-11], 是衰老相关疾病治疗的潜在靶点^[12]。本研究结果显示 6-姜酚可以显著抑制 Ang II 诱导的 mTOR 升高(图 4)及底物 P70-S6K 磷酸化, 提示抑制 mTOR/P70-S6K 途径可能是 6-姜酚保护 VSMCs 抵抗 Ang II 诱导的细胞衰老的机制之一。该结果与最近报道的 mTOR 抑制剂雷帕霉素抵抗某些细胞或动物衰老的结果一致^[13-15], 提示 6-姜酚可能有一定的类雷帕霉素的抗衰老作用。生姜是中国人民普遍使用的调味食物, 价廉而又不良反应少, 易于推广使用, 这为衰老相关心血管疾病的防治提供了一个非常有益的提示。当然本实验探讨了生姜主要活性成分之一的 6-姜酚对体外 VSMCs 衰老的影响, 进一步深入研究生姜及其主要成分对血管细胞衰老的影响及在体内效果可能会发掘出生姜这一食用植物对血管衰老的确切防治作用, 并产生意想不到的现实意义。

总之, 本研究就 6-姜酚在 VSMCs 衰老的作用进行了初步研究, 结果显示 6-姜酚可降低 Ang II 诱导的 VSMCs 衰老, 该作用可能部分是通过抑制 mTOR/P70-S6K 而实现, 6-姜酚的这一作用为衰老相关的心血管疾病的防治提供了新的思路。

参考文献:

- [1] Campisi J. The biology of replicative senescence[J]. *Eur J Cancer*, 1997, 33(5): 703-709.
- [2] Minamino T, Komuro I. Antisenescence as a novel therapeutic strategy for vascular aging[J]. *Nippon Ronen Igakkai Zasshi*, 2006, 43(3): 347-350.
- [3] Costopoulos C, Liew TV, Bennett M. Ageing and atherosclerosis: Mechanisms and therapeutic options[J]. *Biochem Pharmacol*, 2008, 75(6): 1251-1261.
- [4] Masuda Y, Kikuzaki H, Hisamoto M, et al. Antioxidant properties of gingerol related compounds from ginger[J]. *Biofactors*, 2004, 21(1/4): 293-296.
- [5] Shimoda H, Shan SJ, Tanaka J, et al. Anti-inflammatory properties of red ginger (*Zingiber officinale* var. *Rubra*) extract and suppression of nitric oxide production by its constituents[J]. *J Med Food*, 2010, 13(1): 156-162.
- [6] Basso N, Paglia N, Stella I, et al. Protective effect of the inhibition of the renin-angiotensin system on aging[J]. *Regul Pept*, 2005, 128(3): 247-252.
- [7] 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 U S A*, 1995, 92(20): 9363-9367.
- [8] Nicoll R, Henein MY. Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): A hot remedy for cardiovascular disease[J]. *Int J Cardiol*, 2009, 131(3): 408-409.
- [9] Dazert E, Hall MN. mTOR signaling in disease[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2011, 23(6): 744-755.
- [10] Brian M, Bilgen E, Diane CF. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signaling networks[J]. *Biochemical Journal*, 2012, 441(1): 1-21.
- [11] Chao SK, Lin J, Brouwer-Visser J, et al. Resistance to discodermolide, a microtubule-stabilizing agent and senescence inducer, is 4E-BP1-dependent[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(1): 391-396.
- [12] Blagosklonny MV. Aging: ROS or TOR[J]. *Cell Cycle*, 2008, 7(21): 3344-3354.
- [13] Powers RW, Kaerberlein M, Caldwell SD, et al. Extension of chronological Life span in yeast by decreased TOR pathway signaling[J]. *Genes Dev*, 2006, 20(2): 174-184.
- [14] Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice[J]. *Nature*, 2009, 460(7253): 392-395.
- [15] Wilkinson JE, Burmeister L, Brooks SV, et al. Rapamycin slows aging in mice[J]. *Aging Cell*, 2012, 11(4): 675-682.