

鼠尾草酸对H₂O₂诱导的早熟性细胞衰老和D-半乳糖诱导的衰老模型小鼠的保护作用

苏慧丽¹, 暴一众¹, 张 婧¹, 徐小刚¹, 张忠山², 万晓青^{1*}, 毛根祥^{1*}

(1. 浙江医院, 浙江 杭州 310013; 2. 湖州师范学院生命科学院, 浙江 湖州 313000)

摘要: 研究鼠尾草酸 (carnosic acid, CA) 延缓早熟性细胞衰老和对D-半乳糖 (D-gal) 诱导小鼠衰老的保护作用和相关机制。采用人胚肺二倍体成纤维2BS细胞系, 应用200 μmol·L⁻¹ H₂O₂建立早熟性细胞衰老模型, 观察CA对衰老相关β-半乳糖苷酶(SA-β-Gal)活性和衰老相关蛋白p53、p21和p16的影响。动物实验获得浙江医院伦理委员会批准。采用雄性C57 BL/6J小鼠连续8周皮下注射D-gal (100 mg·kg⁻¹·d⁻¹) 构建小鼠衰老模型, 给予5和10 mg·kg⁻¹·d⁻¹ CA进行干预, Morris水迷宫实验观察小鼠空间记忆能力变化、测定小鼠血清及海马组织中脂质过氧化产物丙二醛(MDA)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)水平、晚期糖基化终末产物(AGEs)、炎症因子白介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子α(TNFα)水平, 并检测海马内衰老相关分子的蛋白表达变化。结果显示, H₂O₂处理的2BS细胞SA-β-Gal染色阳性率接近95%, 而CA干预组为35%左右, 并显著降低H₂O₂诱导的衰老相关分子p53、p21和p16蛋白水平。在D-gal小鼠模型中, CA干预明显改善了小鼠空间记忆能力, 并显著抑制AGEs生成、氧化应激和炎症因子水平, 同时减少小鼠海马中衰老相关p53、p21和p16蛋白表达。研究表明, CA可改善氧化应激诱导的2BS细胞早熟型衰老, 并可以明显改善小鼠空间记忆能力, 该作用与其抗氧化、抗炎及抑制非酶糖基化作用相关。

关键词: 鼠尾草酸; 衰老; D-半乳糖; 非酶糖基化; 氧化应激

中图分类号: R965 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)05-0915-07

Protective effects of carnosic acid against aging in a premature cellular senescence model and in a D-galactose induced mouse model

SU Hui-li¹, BAO Yi-zhong¹, ZHANG Jing¹, XU Xiao-gang¹, ZHANG Zhong-shan²,
WAN Xiao-qing^{1*}, MAO Gen-xiang^{1*}

(1. Zhejiang Hospital, Hangzhou 310013, China; 2. School of Life Sciences, Huzhou University, Huzhou 313000, China)

Abstract: This study aimed to investigate the effect and possible mechanism of carnosic acid (CA) on delaying aging. The effects of CA on senescence-related β-galactosidase (SA-β-Gal) activity and expressions of p53, p21 and p16 were evaluated by an oxidative challenge induced premature 2BS cell senescence model. Meanwhile, the animal experiment was approved by the Ethics Committee of Zhejiang Hospital. Male C57 BL/6J mice were injected with 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹ D-galactose (D-gal) for 8 weeks to establish an aging model *in vivo*, and CA at 5 and 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹ were given *ig* administration at the same time. Morris water maze test was used to test the spatial memory ability. Then the serum and tissue samples were collected for the detections of malondialdehyde (MDA), total superoxide dismutase (T-SOD), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor α (TNFα) and advanced glycation end products (AGEs) as well as the protein expression of p53, p21 and p16 in hippocampus of brain. The results

收稿日期: 2019-10-22; 修回日期: 2019-11-18.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81771520, 31700307); 浙江省医药卫生平台计划 (学科带头人) (2015DTA001); 浙江省中医药科学研究基金项目 (2015ZA002); 浙江省中医药优秀青年人才基金项目 (2020ZQ002).

*通讯作者 Tel: 86-571-87377772, E-mail: maogenxiang@163.com; zjywxq@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0826

showed that H₂O₂ induced increment of SA- β -Gal activity (95%) was prevented by CA treatment (35%) and the enhanced protein expressions of p53, p21 and p16 in H₂O₂ exposed 2BS cells were alleviated by CA treatment, suggesting a potent protective role of CA against premature senescence induced by oxidative challenge. For *in vivo* study, D-gal induced declined spatial memory ability was partly reversed by CA administration. Besides, the serum and cerebral levels of MDA, IL-6, TNF α and AGEs were attenuated by CA treatment when compared to those in model mice. And the protein expressions of p53, p21 and p16 in mice hippocampus were suppressed by CA in D-gal treated mice. Taken together, our results showed that CA protects premature senescence induced by oxidative stress and D-gal, which is related to its antioxidative, antiinflammatory roles and inhibition on non-enzymatic glycosylation.

Key words: carnosic acid; aging; D-galactose; non-enzymatic glycosylation; oxidative stress

迷迭香, 拉丁学名 *Rosmarinus officinalis* L, 系唇形科迷迭香属植物, 多年生常绿亚灌木, 气味芳香、浓郁, 原产于地中海沿岸, 近年来作为经济作物在我国也大范围栽培。迷迭香及其提取物被广泛应用于食品、化妆品和饲料产业^[1]。研究发现, 迷迭香具有良好的抗癌、抗炎、抑菌及调节代谢等作用, 体外研究发现迷迭香对于乳腺癌细胞具有显著的抑制作用, 体内实验证实迷迭香具有良好的降血脂和降血糖作用, 并具有抗抑郁和神经保护等效果^[2-7]。迷迭香提取物成分复杂, 含鼠尾草酸 (carnosic acid, CA)、鼠尾草酚、迷迭香酚、熊果酸和迷迭香酸等, 其中 CA 推测是迷迭香抗衰老作用的重要组成部分之一^[8,9]。CA 分子式为 C₂₀H₂₅O₄, 相对分子质量为 332.43。作者前期研究发现 CA 具有延缓复制性细胞衰老的功效^[10], 但是其延缓衰老的体内作用和具体机制尚不明确。衰老动物模型是研究人类衰老机制和研发抗衰老药物的重要手段。目前, 衰老模型涵盖了从果蝇、线虫等无脊椎动物到小型鱼类 (如非洲青鳉鱼和斑马鱼)、啮齿动物和非人灵长类动物等, 且近年来各种基因修饰小鼠在研究衰老发生、发展及干预评价中亦起到重要作用。但是由于不同的模型都有其自身的局限性, 因此各模型都有不同程度的应用^[11]。D-半乳糖 (D-gal) 诱导的啮齿类动物亚急性衰老模型, 在评价药物抗衰老活性及相关机制的研究中得到了广泛应用, 具有氧化应激水平和炎症水平增加、学习记忆障碍和免疫力降低等多种衰老特征, 机制上与 D-gal 诱导的非酶糖基化相关^[12]。本实验利用过氧化氢诱导的早熟性人胚肺二倍体成纤维 2BS 细胞衰老模型和 D-gal 诱导的小鼠衰老模型, 进一步验证 CA 干预衰老的体内外效应, 并研究其相关机制, 为迷迭香抗衰老作用的进一步开发利用提供实验依据。

材料与方法

主要试剂和药品 CA (纯度 98%, 上海诗丹德生物技术有限公司); 脂质过氧化产物丙二醛 (MDA) 检

测试剂盒、总超氧化物歧化酶 (T-SOD) 检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 衰老相关 β -半乳糖苷酶 (SA- β -Gal) 染色试剂盒 (碧云天生物技术研究所); Bradford 法蛋白质定量试剂盒 (北京普利莱基因技术公司); 鼠抗 p53 抗体、鼠抗 p21 抗体和鼠抗 β -actin 抗体 (美国 Santa Cruz Biotechnology 公司); 兔单抗 p16^{INK4a} (Cell Signaling Technology 公司); 小鼠晚期糖基化终末产物 (AGEs)、白介素-6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子 α (TNF α) ELISA 检测试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司)。

实验动物 雄性 C57 BL/6J 小鼠 2 月龄, 合格证号: SCXK (沪) 2013-0016, 购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司, 动物实验获得浙江医院伦理委员会批准。

细胞培养 2BS 细胞由北京天坛生物制品有限公司建株, 广泛用于衰老相关的体外研究^[13], 一般认为代龄在 30PD (population doubling, 倍增次数, 亦称作“代”) 以下为年轻细胞, 55PD 以上为复制性衰老细胞。使用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 在 95% 相对饱和湿度、37 °C、5% CO₂ 通用培养条件下培养 2BS 细胞。当细胞生长到约 80% 汇合时, 将细胞进行 1:2 或 1:4 传代。

衰老相关 SA- β -Gal 染色 SA- β -Gal 染色按照试剂盒说明书进行, 主要步骤: 32PD 2BS 细胞按 1 \times 10⁵/孔接种于 6 孔板中, 每组 3 个平行孔, 培养 24 h 待细胞完全贴壁后, 采用 200 μ mol·L⁻¹ H₂O₂ 处理 2 h, 之后更换新鲜培养基继续培养 5 天; 药物处理组提前 2 h 加入 1 和 5 μ mol·L⁻¹ CA, 换液后继续加入同样浓度的药物。采用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 2 遍后, 再用 4 °C 预冷的 2% 甲醛/0.2% 戊二醛固定 10 min, 以 PBS 洗 3 遍, 细胞和新配制的 SA- β -Gal 染液于 37 °C (无 CO₂) 温育 3~16 h, 于显微镜下 (100 \times) 拍照并计算阳性 (蓝绿色) 细胞所占百分比。

Western blot 接种 5 \times 10⁵ 32PD 2BS 细胞至 60 mm 培养皿, 细胞完全贴壁后, 用 200 μ mol·L⁻¹ H₂O₂ 处理, 药物处理组提前 2 h 加入不同浓度的 CA (0.2、1、5 μ mol·L⁻¹), 换液后继续加入同样浓度的药物, 作用

2天。采用2 mmol·L⁻¹ N-乙酰半胱氨酸(NAC)作为抗氧化剂阳性对照,加药时间同CA。收集细胞时,弃掉培养基,用冰冷的PBS清洗细胞2遍后,加入RIPA裂解液(含蛋白酶抑制剂Cocktail),用细胞刮刀收集细胞,4 °C、12 000 r·min⁻¹离心15 min,吸取上清,采用Bradford蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,并制作蛋白上样缓冲液。组织样本采用液氮研磨后加入RIPA裂解液进行裂解,余下同细胞样品处理。每个样本取20 μg总蛋白,常规方法电泳、转膜,采用5%脱脂牛奶室温封闭1 h,再应用抗p53、抗p21、抗p16和抗β-actin抗体4 °C孵育过夜(p16抗体稀释比例1:500,其余为1:1 000),HRP标记的二抗室温孵育1 h(抗体稀释比例1:5 000),进而应用ECL化学发光试剂盒显色,ChemiDoc MP多功能成像系统拍照保存显色图片,Image J软件分析光密度值并计算相对蛋白表达水平。

D-半乳糖衰老动物模型构建及CA干预 将40只小鼠适应培养1周后,随机分为4组,即对照组、模型组、CA低剂量给药组(5 mg·kg⁻¹·d⁻¹)和高剂量给药组(10 mg·kg⁻¹·d⁻¹),每组10只。小鼠连续8周皮下注射D-gal(100 mg·kg⁻¹·d⁻¹)构建小鼠衰老模型,同时灌胃给予低、高剂量CA。测定小鼠认知功能变化并获取组织和血液样本,进行相关指标的测定。

水迷宫实验 采用Morris水迷宫法对小鼠认知功能进行评估^[14]。定位航行实验:将受试小鼠按顺时针方向依次由第1、2、3、4象限入水点顺序放入水中,记录2 min内寻找平台的时间(逃避潜伏期)。空间探索实验:定位航行实验全部结束后,次日进行空间探索实验。撤去平台,然后选第1象限相同的入水点将小鼠面向池壁放入水中,测其2 min内跨越原平台位置(目标区域)的次数,以判断小鼠记忆储存及提取再现能力。如此连续训练4天,取第5天测试数据用于评价各组小鼠的学习记忆能力。

MDA和T-SOD测定 脂质过氧化产物MDA和T-SOD的测定按照试剂盒说明书进行。

其他因子测定 AGEs、IL-6和TNFα采用对应的ELISA试剂盒进行测定。

数据处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间样本间比较用SPSS 17.0统计软件包进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结果

1 CA对H₂O₂诱导的2BS细胞SA-β-Gal活性的影响

2BS细胞(32PD)用亚致死量(200 μmol·L⁻¹)H₂O₂处理2 h后,继续培养5天,其SA-β-Gal染色阳性率高达95%左右,继续传代培养后细胞几乎不增殖,呈现

显著的细胞衰老表型,同时发现32PD的2BS细胞SA-β-Gal染色阳性率不足5%,说明其仍可能是年轻细胞;H₂O₂处理前,加入1和5 μmol·L⁻¹CA,处理细胞至5天,均能显著降低SA-β-Gal染色阳性率($P < 0.01$),且两种浓度CA的效果相近。结果表明(图1),CA能显著改善亚致死量H₂O₂诱导的早熟型细胞衰老。

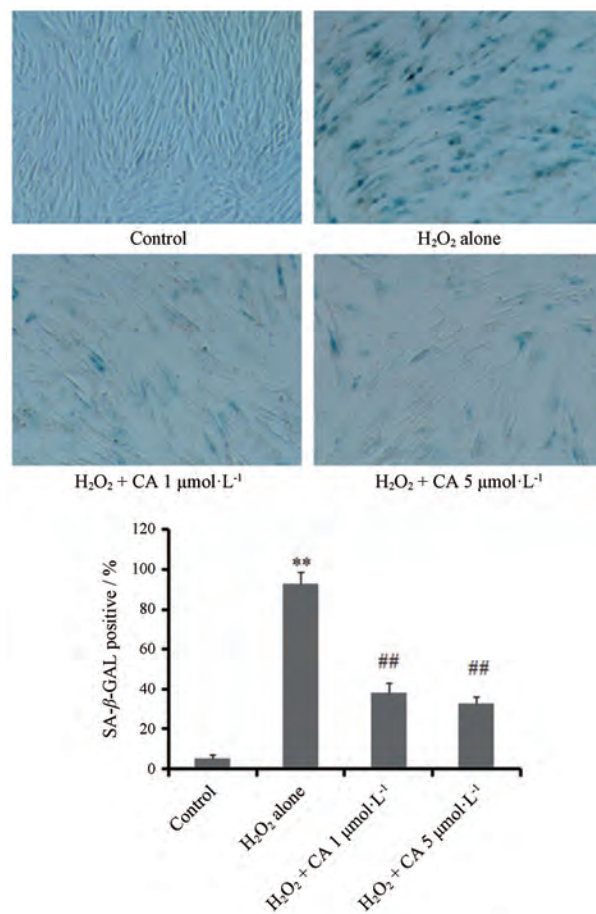


Figure 1 Effect of carnosic acid (CA) on H₂O₂ (200 μmol·L⁻¹) induced senescence-related β-galactosidase (SA-β-Gal) activity in 32 PD (population doubling) 2BS fibroblasts. 2BS cells were pre-treated by CA at indicated concentrations 2 h before exposure to H₂O₂ challenge (200 μmol·L⁻¹ for 2 h) and with its presence for SA-β-Gal staining test at 5th day (100×). $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs H₂O₂ alone group

2 CA对H₂O₂诱导的2BS细胞衰老相关分子p53、p21和p16蛋白表达水平的影响

通过Western blot检测发现,H₂O₂处理的32 PD 2BS细胞中衰老相关蛋白p53、p21和p16表达水平显著高于对照组;给予0.2、1、5 μmol·L⁻¹ CA处理后,这些分子的蛋白表达均有一定程度的下降,其效果与抗氧化阳性药物2 mmol·L⁻¹ NAC接近。图2结果表明,CA可在细胞水平改善衰老相关分子p53、p21和p16的表达。

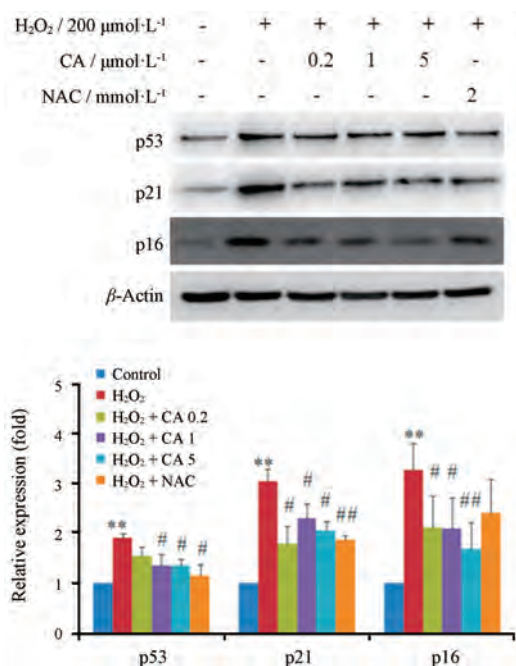


Figure 2 Inhibitive role of CA on H₂O₂ (200 μmol·L⁻¹) induced increment of protein expression of senescence associated molecules p53, p21 and p16 in 32 PD 2BS cells. N-acetyl-L-cysteine (NAC) was used as a positive control for antioxidant. 2BS cells were pre-treated by CA or NAC at indicated concentrations 2 h before exposure to H₂O₂ challenge (200 μmol·L⁻¹ for 2 h) and with its presence until cells were harvested at 2 days after H₂O₂ challenge. Relative protein expression levels were analyzed according to the optical density for each ladder which was calculated by the Image J software. *n* = 10, $\bar{x} \pm s$. ***P*<0.01 vs control group; #*P*<0.05, ##*P*<0.01 vs H₂O₂ group

3 CA 对 D-gal 诱导的衰老模型小鼠体重及 AGEs 的影响

给药前, 各组小鼠间的体重没有明显差异 (*P*>0.05); 实验过程中未见小鼠死亡, 给药结束后各组小鼠体重均有增长, 但组间没有统计学差异 (*P*>0.05)。通过检测小鼠体内 AGEs 含量发现, 模型组 (D-gal) 小鼠的血清 AGEs 和脑 AGEs 均有显著性上升, 而不同剂量的 CA 均有效下调模型组的 AGEs 水平, 5 和 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 剂量之间无显著差别 (表 1), 说明 CA 对 D-gal 诱导的衰

Table 1 Effect of CA on the body weight and AGEs levels in D-galactose (D-gal, s.c.)-induced aging model mice. D-gal mice were treated with saline or CA (ig) at doses of 5 and 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹ once a day for 8 weeks. The body weight of each mouse was observed before and after experiment. At the end of experiment, serum and brain tissues were collected for the detection of AGEs levels. AGEs: Advanced glycation end products. *n* = 10, $\bar{x} \pm s$. **P*<0.05, ***P*<0.01 vs group I; #*P*<0.05 vs group II

Group	Treatment/mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	Body weight/g		Serum AGEs/ng·mL ⁻¹	Cerebral AGEs/ng·mg ⁻¹
		Pre-treatment	Post-treatment		
I	Control	21.71 ± 0.32	23.90 ± 0.94	128.01 ± 14.59	18.60 ± 16.79
II	D-gal 100	21.89 ± 0.22	24.16 ± 1.03	265.57 ± 84.16**	49.62 ± 20.7*
III	D-gal + CA 5	21.99 ± 0.27	24.99 ± 1.13	171.23 ± 56.02#	29.81 ± 12.45#
IV	D-gal + CA 10	21.84 ± 0.17	24.86 ± 0.77	145.49 ± 88.71#	24.75 ± 17.07#

老小鼠的保护作用与其抑制非酶糖基化作用有关。

3 CA 对学习记忆的改善作用

Morris 水迷宫实验结果见图 3, 与对照组小鼠相比, 模型组平均潜伏期显著延长 (*P*<0.05), 2 min 内穿过目标区域次数明显减少, 表明模型组小鼠空间搜索和辨别学习能力明显减弱, 而 5 和 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹ CA 给药能部分改善这一状况, 其平均潜伏期较模型组显著缩短 (*P*<0.05), 穿过目标区域次数也明显增加, 表明 CA 对 D-gal 诱导的衰老小鼠的学习记忆有较好的改善作用。

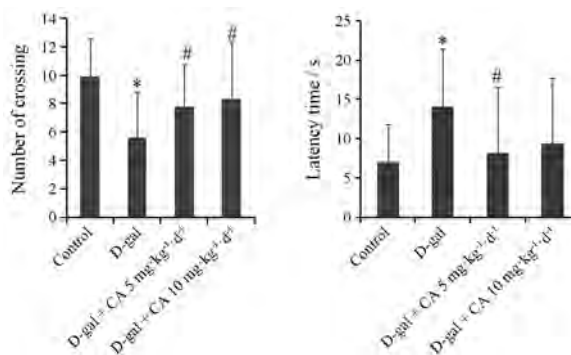


Figure 3 Effects of CA on the spatial memory in Morris water maze of the D-galactose (D-gal)-induced aging model mice. D-gal mice were treated with CA (ig) at doses of 5 and 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹ for 8 weeks. To all mice, the latency and numbers of crossing target area within 2 minutes were measured at eighth week before mice sacrificed. *n* = 10, $\bar{x} \pm s$. **P*<0.05 vs control group; #*P*<0.05 vs D-gal group

4 CA 对 D-gal 小鼠氧化应激的影响

采用小鼠血清和脑组织中 MDA 水平和总 SOD 活力反映氧化应激水平。与正常组比较, 衰老模型小鼠 MDA 含量增加, 而 CA 可显著抑制 MDA 含量的增加; 与对照组比较, 衰老模型小鼠 SOD 活力有所下降, CA 作用后则表现出升高趋势。图 4 结果表明, CA 对衰老模型小鼠的保护作用与其抑制小鼠体内的脂质过氧化水平有关。

5 CA 对炎症因子的影响

与正常组比较, 衰老模型小鼠血清和脑组织中的

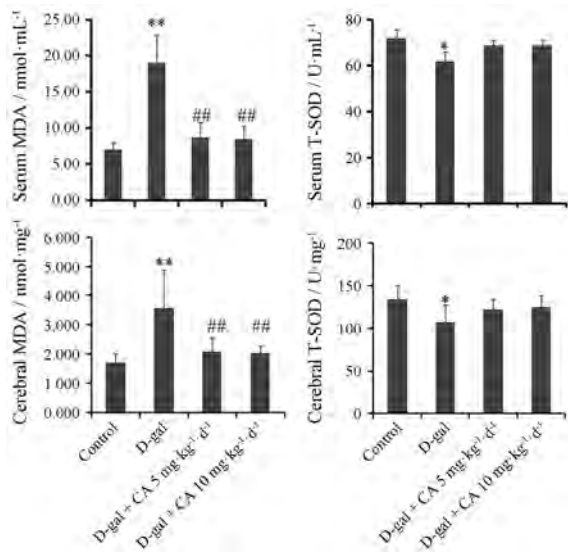


Figure 4 Effects of CA on T-SOD activity and MDA levels in mouse serum and cerebral samples. D-gal mice were treated with saline or CA (ig) at doses of 5 and 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹ for 8 weeks. At the end of experiment, serum and brain tissues were collected for the indicated detections. T-SOD: Total superoxide dismutase; MDA: Malondialdehyde. *n* = 10, $\bar{x} \pm s$. **P*<0.05, ***P*<0.01 vs control group; ##*P*<0.01 vs D-gal group

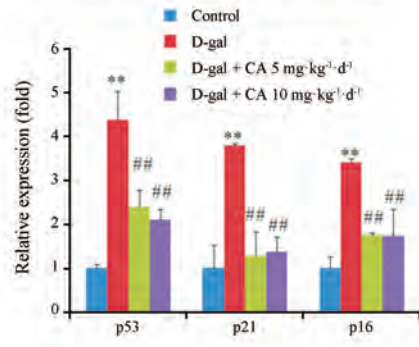
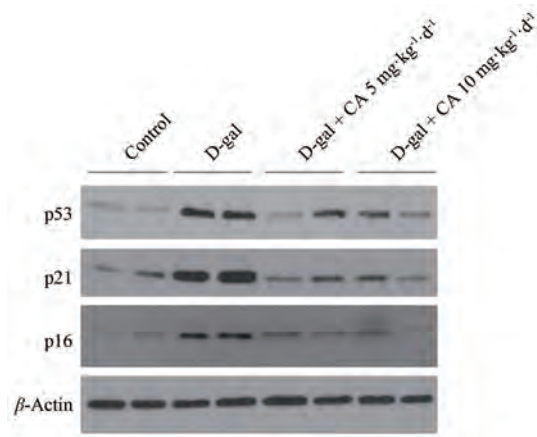


Figure 5 Effects CA on protein expression of p53, p21 and p16 in mouse hippocampus samples. D-gal mice were treated with saline or CA (ig) at doses of 5 and 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹ for 8 weeks. At the end of experiment, mouse hippocampus tissues were collected, homogenized with liquid nitrogen and prepared for the Western blot analysis. Representative images were acquired from three repeated experiments. Relative protein expression levels were analyzed according to the optical density for each ladder which was calculated by the Image J software. *n* = 10, $\bar{x} \pm s$. ***P*<0.01 vs control group; ##*P*<0.01 vs D-gal group

IL-6 和 TNFα 含量显著升高, 表明 D-gal 促进了小鼠的炎症水平。CA 具有一定的抗炎作用, 表现为不同剂量的 CA 均能显著降低血清中的 IL-6 含量 (*P*<0.01)。在脑组织中, 高剂量 (10 mg·kg⁻¹·d⁻¹) CA 下调脑组织 IL-6 水平具有统计学意义 (*P*<0.05); 与模型组比较, 各给药组对血清 TNFα 下调作用未见统计学差异, 而对脑组织中的 TNFα 增高具有明显的抑制作用 (*P*<0.05)。以上结果表明 (表 2), CA 对 D-gal 诱导的衰老小鼠的保护作用与其抑制衰老小鼠中的炎症水平有关。

6 CA 对模型鼠脑组织衰老相关分子的影响

采用 Western blot 检测小鼠海马中衰老相关分子 p53、p21 和 p16 的蛋白表达, 结果如图 5 所示, 与对照组相比, D-gal 组小鼠海马的 p53、p21 和 p16 的蛋白表达水平显著增加, 分别上调了约 4.4、3.8 和 3.6 倍, 而同时给予 5 和 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹CA 后, 这些分子的蛋白表达被显著逆转, CA 下调这些分子的作用在两个剂量之间

无显著差别。

讨论

已有研究表明, 迷迭香提取物具有多种药理活性, 如抗肿瘤、抗菌、抗氧化、消炎、抗抑郁症等作用, 但其成分复杂, 包括酚类和挥发油类化合物, 如 CA、鼠尾草酚、迷迭香酸和熊果酸等, 精油中 α-蒎烯、樟脑、桉叶

Table 2 Effects of CA on inflammatory cytokines in D-gal treated mice. D-gal mice were treated with saline or CA (ig) at doses of 5 and 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹ for 8 weeks. At the end of experiment, serum and brain tissues were collected for the detection of IL-6 and TNFα levels. IL-6: Interleukin 6; TNFα: Tumor necrosis factor α. *n* = 10, $\bar{x} \pm s$. **P*<0.05, ***P*<0.01 vs group I; #*P*<0.05, ##*P*<0.01 vs group II

Group	Treatment/mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	Serum IL-6/pg·mL ⁻¹	Cerebral IL-6/pg·mg ⁻¹	Serum TNFα/pg·mL ⁻¹	Cerebral TNFα/pg·mg ⁻¹
I	Control	103.90 ± 18.65	20.29 ± 10.72	137.08 ± 27.31	25.00 ± 10.53
II	D-gal 100	158.11 ± 21.33**	47.04 ± 13.88**	240.74 ± 78.32*	83.87 ± 24.37**
III	D-gal + CA 5	119.30 ± 23.09##	30.86 ± 17.79	175.22 ± 58.93	45.27 ± 23.69#
IV	D-gal + CA 10	111.13 ± 23.12##	25.94 ± 12.81#	173.20 ± 32.19	44.05 ± 22.03#

素、蒎烯和龙脑等, CA 作为其一种重要的单体成分, 文献^[7]报道具有良好的抗氧化和抗炎活性, 尽管推测其具有良好的延缓衰老的效应, 但缺乏具体的实验证据。本研究在前期证明 CA 具有良好的延缓 2BS 细胞复制性衰老的基础上, 进一步证实了 CA 具有改善氧化应激诱导的早熟型细胞衰老, 利用 D-gal 小鼠加速衰老模型证实了 CA 具有一定的体内延缓衰老的效果, 表现为改善小鼠的学习记忆能力, 抑制血清及脑组织中的脂质过氧化及炎症因子水平, 并通过抑制非酶糖基化减少 AGEs 的生成。在分子水平上, 证实 CA 可显著抑制体外早熟型衰老模型及 D-gal 小鼠海马中衰老相关分子 p53、p21 和 p16 的蛋白表达。

D-gal 小鼠作为一种衰老加速模型, 其机制之一是通过 D-gal 促进非酶糖基化, 促进 AGEs 的生成, 进而上调机体的氧化应激和炎症水平, 在一定程度上模拟生理性衰老^[15]。炎性衰老是一种衰老进程中机体内存在的增龄性慢性低度促炎性反应状态^[16], 它被视为机体衰老进程速率和寿命的一个决定因素。同时, 促炎因子是衰老相关分泌表型 (senescence-associated secretory phenotype, SASP) 的一个重要组成部分, 是衰老细胞的关键特征。衰老细胞通过大量分泌 SASP, 在诱发机体炎症的同时, 加速机体衰老, 导致多种衰老相关疾病的产生, 是目前衰老研究的热点之一^[17]。作者研究发现, CA 显著下调模型小鼠的外周血和大脑皮层组织中脂质过氧化和炎症因子水平, CA 可能是活性氧自由基的直接清除剂, 进而通过抑制活性氧自由基介导的 p38/NF- κ B 信号通路抑制炎症因子的生成^[18]。此外, AGEs 在脑组织的蓄积与脑衰老及衰老相关神经退行性疾病如阿尔茨海默病、帕金森氏病具有重要的联系, D-Gal 诱导小鼠衰老模型同时作为一种脑老化模型也日益被认可^[19]。作者研究发现, CA 在降低血清 AGEs 水平的同时, 有效减少模型小鼠大脑皮层组织的 AGEs 生成, 这可能与透过血脑屏障直接抑制非酶糖基化的作用相关, 也可能是通过抗氧化而间接减少 AGEs 的生成, 因为 AGEs 可诱导细胞内氧应激水平增加, 而活性氧自由基的增加反过来也可以促进非酶糖基化^[20]。减少 AGEs 的生成和降低氧化应激水平可以直接保护神经元, 这可能是 CA 发挥改善学习记忆能力的可能作用机制。

总之, 本实验建立的人胚肺二倍体成纤维细胞早熟型细胞衰老模型和 D-gal 诱导的小鼠加速衰老模型, 为 CA 延缓衰老的作用提供了更为系统的实验证据, 并进一步丰富了该化合物延缓衰老的作用机制, 为 CA 在衰老相关领域的应用开发提供了理论依据。

References

- [1] Moran L, Giraldez FJ, Panseri S, et al. Effect of dietary carnosic acid on the fatty acid profile and flavour stability of meat from fattening lambs [J]. *Food Chem*, 2013, 138: 2407-2414.
- [2] Moore J, Yousef M, Tsiani E. Anticancer effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract and rosemary extract polyphenols [J]. *Nutrients*, 2016, 8: pii: E731.
- [3] Naimi M, Vlavcheski F, Shamshoum H, et al. Rosemary extract as a potential anti-hyperglycemic agent: current evidence and future perspectives [J]. *Nutrients*, 2017, 9: pii: E968.
- [4] Kontogianni VG, Tomic G, Nikolic I, et al. Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity [J]. *Food Chem*, 2013, 136: 120-129.
- [5] Tsai TH, Chuang LT, Lien TJ, et al. *Rosmarinus officinalis* extract suppresses *Propionibacterium acnes*-induced inflammatory responses [J]. *J Med Food*, 2013, 16: 324-333.
- [6] Zhao YT, Sedighi R, Sang SM. Carnosic acid as a major bioactive component in rosemary extract ameliorates high-fat-diet-induced obesity and metabolic syndrome in mice [J]. *J Agric Food Chem*, 2015, 63: 4843-4852.
- [7] Andrade JM, Faustino C, Garcia C, et al. *Rosmarinus officinalis* L.: an update review of its phytochemistry and biological activity [J]. *Future Sci OA*, 2018, 4: FSO283.
- [8] Shen CY, Jiang JG, Zhu W. Anti-ageing active ingredients from herbs and nutraceuticals used in traditional Chinese medicine: pharmacological mechanisms and implications for drug discovery [J]. *Br J Pharmacol*, 2017, 174: 1395-1425.
- [9] Loussouarn M, Krieger-Liszakay A, Havaux M. Carnosic acid and carnosol, two major antioxidants of rosemary, act through different mechanisms [J]. *Plant Physiol*, 2017, 175: 1381-1394.
- [10] Tap PH, Wen XL, Wang YZ, et al. The experimental study on effect of carnosic acid on delaying the aging process of human diploid 2BS fibroblasts [J]. *Acta Nutr Sin (营养学报)*, 2014, 36: 273-277.
- [11] Folch J, Busquets O, Ettcheto M, et al. Experimental models for aging and their potential for novel drug discovery [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2018, 16: 1466-1483.
- [12] Zhao FF, Zhou YZ, Gao L, et al. Advances in the study of the rat model of aging induced by D-galactose [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2017, 52: 347-354.
- [13] Mao GX, Wang Y, Qiu Q, et al. Salidroside protects human fibroblast cells from premature senescence induced by H₂O₂ partly through modulating oxidative status [J]. *Mech Ageing Dev*, 2010, 131: 723-731.
- [14] Wang WG, Zhou JB, Zhu ML. Morris water maze in the analysis of mouse phenotype [J]. *Chin J Cell Biol (中国细胞生物学学报)*, 2011, 33: 8-14.
- [15] Azman KF, Zakaria R. D-Galactose-induced accelerated aging

- model: an overview [J]. *Biogerontology*, 2019, 20: 763-782.
- [16] De Martinis M, Franceschi C, Monti D, et al. Inflamm-aging and lifelong antigenic load as major determinants of ageing rate and longevity [J]. *FEBS Lett*, 2005, 579: 2035-2039.
- [17] He S, Sharpless NE. Senescence in health and disease [J]. *Cell*, 2017, 169: 1000-1011.
- [18] Xia G, Wang X, Sun H, et al. Carnosic acid (CA) attenuates collagen-induced arthritis in db/db mice *via* inflammation suppression by regulating ROS-dependent p38 pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 108: 418-432.
- [19] Shwe T, Pratchayasakul W, Chattipakorn N, et al. Role of D-galactose-induced brain aging and its potential used for therapeutic interventions [J]. *Exp Gerontol*, 2018, 101: 13-36.
- [20] Bo-Htay C, Palee S, Apaijai N, et al. Effects of D-galactose-induced ageing on the heart and its potential interventions [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22: 1392-1410.