

· 配伍 ·

人参-三七-川芎提取物延缓过氧化氢诱导的内皮细胞衰老中 线粒体氧化应激的作用

吴焯¹, 王强², 修成奎¹, 胡艳红¹, 马琰岩¹, 付莹坤³, 王雪¹, 雷燕^{1*}, 杨静^{1*}

(1. 中国中医科学院医学实验中心, 北京市中医药防治重大疾病基础研究重点实验室, 北京 100700;
2. 中国中医科学院望京医院, 北京 100102; 3. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100056)

[摘要] 目的:通过观察人参-三七-川芎提取物(GNC)对过氧化氢(H₂O₂)诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVECs)衰老中线粒体氧化应激的影响,探讨GNC对衰老HUVECs的治疗机制。方法:本研究以HUVECs作为研究对象,H₂O₂诱导内皮细胞衰老作为模型,实验分为空白组,H₂O₂组,H₂O₂+DMSO组(DMSO),白藜芦醇组(Resv)及GNC提取物低(GNC-L),中(GNC-M),高(GNC-H)质量浓度组,除空白组,H₂O₂组外,其余各组分别给予DMSO 1 mL·L⁻¹,Resv 8 μmol·L⁻¹,GNC 400,300,200 mg·L⁻¹药物干预,24 h后除空白组外给予300 μmol·L⁻¹ H₂O₂诱导HUVECs衰老,再给予正常培养基培养24 h。采用衰老特异性β-半乳糖苷酶(SA-β-gal)染色法鉴定细胞衰老程度,流式细胞仪分析细胞周期,采用Mito SOX RED荧光染色法测定细胞内线粒体活性氧(mtROS)水平,以JC-10为荧光探针检测细胞内线粒体膜电位变化,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测含锰超氧化物歧化酶(MnSOD)与磷酸化(p-)p66的蛋白表达。结果:SA-β-gal染色结果显示,与空白组比较,H₂O₂组SA-β-gal染色蓝染细胞显著增多(P<0.01);与H₂O₂组比较,各浓度组SA-β-gal染色蓝染细胞显著减少(P<0.01);细胞周期结果显示,与空白组比较,H₂O₂组G₀/G₁期细胞数量比例明显增多(P<0.05),G₂/M期细胞比例明显减少(P<0.05);与H₂O₂组比较,GNC各组及Resv组G₀/G₁期细胞数量比例明显减少(P<0.05),GNC-H组,Resv组在G₂/M期细胞比例明显增加(P<0.05)。线粒体ROS荧光结果显示,与空白组比较,H₂O₂组强度明显减弱(P<0.05);与H₂O₂组比较,GNC-H,GNC-M组强度明显增高(P<0.05);线粒体膜电位结果显示,与空白组比较,H₂O₂组荧光强度显著下降(P<0.01);与H₂O₂组比较,GNC-H,GNC-M,GNC-L组线粒体膜电位荧光强度显著增高(P<0.01),Resv组明显增高(P<0.05);Western blot结果显示,与空白组比较,H₂O₂组MnSOD含量明显降低(P<0.05);与H₂O₂组比较,GNC-H与GNC-M组表达明显增多(P<0.05);与空白组比较,H₂O₂组p-p66含量显著增高(P<0.01);与H₂O₂组比较,各用药组表达显著降低(P<0.01),表明用药后可减轻细胞内线粒体氧化应激反应。结论:中药人参-三七-川芎提取物可以延缓H₂O₂诱导的血管内皮细胞的衰老,药物干预后,细胞线粒体活性氧、线粒体膜电位及相关蛋白MnSOD,p-p66蛋白发生明显改善,氧化应激反应减轻,其机制可能是中药通过抑制线粒体氧化应激反应延缓血管内皮细胞衰老的进程。

[关键词] 衰老; 血管老化; 内皮细胞衰老; 人参-三七-川芎提取物; 氧化应激

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)24-0017-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20212409

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211029.1801.004.html>

[网络出版日期] 2021-11-01 11:38

Effect of Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma, and Chuanxiong Rhizoma Extract on Mitochondrial Oxidative Stress in Hydrogen Peroxide-induced Endothelial Cell Aging

WU Ye¹, WANG Qiang², XIU Cheng-kui¹, HU Yan-hong¹, MA Yan-yan¹, FU Ying-kun³,
WANG Xue¹, LEI Yan^{1*}, YANG Jing^{1*}

[收稿日期] 20210803(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81503448,82074260);中国中医科学院自主选题项目(ZZ2018014)

[第一作者] 吴焯,在读硕士,从事中西医结合心血管病方向研究,E-mail:wuye9992020@163.com

[通信作者] *雷燕,博士,研究员,博士生导师,从事中西医结合防治心血管病的基础和临床研究,E-mail:leiy999@163.com;

*杨静,博士,副研究员,硕士生导师,从事中西医结合心血管病方向研究,Tel:010-64089520,E-mail:yangjingdr@163.com

(1. Beijing Key Laboratory of Basic Research on Prevention and Treatment of Major Diseases by Traditional Chinese Medicine, Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. Wangjing Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China; 3. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100056, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma, and Chuanxiong Rhizoma extract (GNC) on mitochondrial oxidative stress in hydrogen peroxide (H_2O_2)-induced aging of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), and explore the therapeutic mechanism of GNC on aging HUVECs. **Method:** The HUVECs were classified into the control group (control), H_2O_2 model group (H_2O_2), H_2O_2 + DMSO group (DMSO, $1\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$), resveratrol group (Resv, $8\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), and low- ($200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), medium- ($300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), and high-dose ($400\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) GNC (GNC-L, GNC-M, and GNC-H) groups. Except control group and H_2O_2 group, the other groups were intervened with corresponding agents. Subsequently, $300\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ H_2O_2$ was given to other groups except the control group for 4 h to induce aging, and then the cells were cultured in normal media for 24 h. The aging degree, cell cycle, and mitochondrial reactive oxygen species (mtROS) level were determined by SA- β -galactosidase (SA- β -Gal) staining, flow cytometry, and MitoSox red fluorescence staining, respectively. JC-10 was used as a fluorescent probe to detect the changes in mitochondrial membrane potential, and Western blot was performed to detect the expression of manganese superoxide dismutase (MnSOD) and p-p66 proteins. **Result:** The SA- β -gal staining results showed that H_2O_2 group had increased blue-stained cells compared with other groups ($P<0.01$). Compared with those in the control group, the ratio of G_0/G_1 phase cells significantly increased ($P<0.05$) and that of G_2/M phase cells decreased ($P<0.05$) in the H_2O_2 group. Compared with those in the H_2O_2 group, the proportion of G_0/G_1 cells decreased ($P<0.05$) while that of G_2/M cells increased ($P<0.05$) in GNC-H groups and Resv group. The fluorescence staining for determining mitochondrial ROS level showed that the H_2O_2 group had weakened fluorescence intensity than the control, GNC-H, and GNC-M groups ($P<0.05$). The mitochondrial membrane potential fluorescence intensity of the H_2O_2 group was weaker than that of the control, GNC-H, GNC-M, and GNC-L groups ($P<0.01$), as well as the Resv group ($P<0.05$). Western blot showed that the protein level of MnSOD was significantly lower in the H_2O_2 group than in the control, GNS-H, and GNS-M groups ($P<0.05$), whereas the protein level of p-p66 showed an opposite trend ($P<0.01$), indicating that the medication can alleviate the intracellular mitochondrial oxidative stress. **Conclusion:** GNC can delay the H_2O_2 -induced aging of vascular endothelial cells. The GNC intervention significantly regulated the mitochondrial ROS, mitochondrial membrane potential, and related proteins MnSOD and p-p66 to alleviate oxidative stress. Chinese medicinal materials may delay the aging of vascular endothelial cells by inhibiting mitochondrial oxidative stress.

[Keywords] aging; vascular aging; aging of endothelial cells; Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma, and Chuanxiong Rhizoma extract; oxidative stress

人口老龄化导致心血管疾病的发病率持续增加,已成为全球致死和致残的主要原因之一^[1],因此研究延缓衰老意义重大。血管衰老是机体衰老的起始环节,在衰老进程中起重要作用^[2],血管内皮细胞衰老是血管衰老的关键过程之一,与血管衰老相关性疾病密切相关,许多药物如白藜芦醇(Resv),二甲双胍,补阳还五汤等都具有延缓细胞衰老的作用^[3-5]。氧化应激是活性氧(ROS)产生与氧化防御机制之间均衡的变化过程,被认为是参与衰老过程

的重要机制之一,与许多衰老相关疾病相关,根据“衰老自由基理论”,衰老是细胞成分累积氧化损伤的结果^[6-7],线粒体是ROS的主要来源,细胞衰老包括线粒体质量、膜电位和线粒体形态的改变^[8-9],线粒体功能障碍可能在细胞衰老过程中发挥重要的作用,因此线粒体氧化应激反应是近年来学者们研究细胞衰老的关注点之一^[10]。

本实验团队对于益气活血药人参-三七-川芎提取物(GNC)延缓血管衰老已有大量研究基础,目前

研究成果已证实GNC可通过不同的通路延缓内皮细胞衰老及大鼠、小鼠的血管老化,但对于其是否能通过抑制线粒体氧化应激途径延缓过氧化氢(H_2O_2)诱导的内皮细胞衰老,仍需进一步研究。因此本研究以 H_2O_2 诱导的衰老人脐静脉内皮细胞为研究对象^[11-12],探讨GNC对衰老内皮细胞氧化应激反应的干预作用,为明确GNC是否能延缓血管衰老提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞 人脐静脉内皮细胞,购于美国Sciencell公司,货号8000。

1.2 药物 中药提取物由人参、三七、川芎3味药材制成干膏粉,3味均为道地药材,以2:3:4的比例混合,投料量为1 000倍处方,磨碎后,70%乙醇提取后回收,浓缩(60~70℃),减压干燥后,制成GNC干膏粉,出膏率为23.33%,干膏粉1 g相当于生药4.286 g,由北京因科瑞斯医药科技公司制备。本研究对GNC中指标性成分阿魏酸、人参皂苷 R_g_1 、 R_b_1 、 R_e 及三七皂苷 R_1 进行了含量测定,分别为1.00, 55.84, 44.57, 6.47, 8.45 $mg \cdot g^{-1}$,均符合2020年版《中华人民共和国药典》的规定和标准^[13],并经中国中医科学院中药所何希荣老师鉴定。用灭菌超纯水配制,于微滤孔膜过滤后使用。白藜芦醇(美国Sigma-Aldrich公司,批号SLBL1881v)。

1.3 试剂 H_2O_2 溶液,线粒体膜电位检测试剂盒,甘氨酸,四甲基乙二胺(TMEDA)(美国Sigma-Aldrich公司,批号分别为323381, MAK159, VETEC V900144, SHBG9957V);ECM完全培养基,0.25%胰蛋白酶消化液,无血清细胞冻存液(美国Sciencell公司,批号分别为15635, 15150, 15625, 0103, 0133);细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒(日本同仁化学研究所,批号LG615);细胞周期快速检测试剂(北京达科为生物工程有限公司,批号DKW41-CCK-010/050/100);细胞衰老 β -半乳糖苷酶(SA- β -gal)检测试剂盒(上海Genmed Scientifics公司,批号2-211210014-4);MitoSOX™ RED线粒体超氧化物指示剂、光谱多色高范围蛋白质Ladder(美国Thermo公司,批号分别为1842725, 26625, 26616);高效RIPA裂解液(组织/细胞),BCA蛋白浓度测定试剂盒,5%BSA封闭液,4×十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离胶缓冲液,5×蛋白上样缓冲液,10×TBST(北京索莱宝公司,批号分别为SD-001/SN-002, PC0020, SW3015, S1051, S1052, P1041, T1081);脱脂奶粉(美国BD公司,批

号8032502);过硫酸铵(APS,北京库酷来搏科技有限公司,批号CA1991-100G);丙烯酰胺-双丙烯酰胺溶液(30%),电泳缓冲液(10×)(北京普利莱公司,批号分别为B1000, B1005);PVDF膜,蛋白免疫印迹法(Western blot)化学发光HRP底物(德国Millipore公司,批号分别为IPVH00010, WBKLS0100);含锰超氧化物歧化酶(MnSOD)抗体,磷酸化p66(p-p66)抗体,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(英国Abcam公司,批号分别为ab13533, ab53518, ab8245);辣根酶过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(H+L),HRP标记山羊抗小鼠IgG(H+L)(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为ZB-2301, ZB-2305)。

1.4 仪器 AE2000型倒置相差显微镜及成像系统(德国Motic公司);Forma 370型细胞培养箱(美国Thermo公司);6-16KS型台式离心机(美国Sigma公司);Synergy H1型全自动酶标仪(美国BioTek公司);TGL-16G型高速离心机(上海安亭科学仪器厂);AI680型超灵敏多功能成像仪(美国GE公司);生物安全柜(日本ESCO公司);CKX53型荧光显微镜, FV1000型激光共聚焦显微镜(日本Olympus公司);CytomicsFC500型流式细胞仪(美国Beckman公司);电泳槽系统,能量供应型通用电泳仪电源,半干转印槽,ChemiDoc Imaging System多功能成像系统(美国Bio-Rad公司);SK-0180-E型水平摇床(北京大龙兴创实验仪器有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养方法 将HUVECs培养于含ECM完全培养基的培养瓶中,置于37℃,5%CO₂培养箱孵育。镜下观察细胞为铺路石样生长,每2 d换液,待细胞长至80%左右,进行1:2传代,先吸除原有培养基,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗2次,加入0.25%胰蛋白酶1 mL消化1 min,镜下观察细胞变圆、皱缩,立即加入完全培养基2 mL中止,用吸管反复吹打至细胞脱落,将悬液移入离心管,1 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心5 min(离心半径9.49 cm,下同),弃去上清液,加入新鲜完全培养基重悬后移入新的培养瓶培养。按以上方法将细胞传至第5代开展实验。

2.2 CCK-8法检测细胞增殖情况 取处于对数生长期的HUVECs细胞制成细胞悬液,以 7×10^4 个/孔(100 μ L)接种于96孔板内,共10个组,分别为空白组, H_2O_2 诱导的衰老模型组,给予GNC干预的不同质量浓度组,质量浓度分别为25, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 800 $mg \cdot L^{-1}$,中药组先给予相应浓度的

GNC 干预 24 h; 24 h 后除空白组外, 均给予 $300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 诱导细胞衰老 4 h, 再给予正常培养基继续培养 24 h 后, 吸除孔内液体, 根据说明书加入 CCK-8 试剂, 1.5 h 后于酶标仪 450 nm 波长下检测吸光度 A 。

2.3 实验分组与造模 通过 2.2 项实验摸索出中药浓度, 将实验分为空白组, H_2O_2 诱导的衰老模型组, H_2O_2 +DMSO 组, Resv 组及 GNC 干预的高质量浓度 (GNC-H), 中质量浓度 (GNC-M), 低质量浓度 (GNC-L) 组。细胞以 1.5×10^5 个/孔接种于 6 孔板中, 除空白组, H_2O_2 组外, 各组分别给予 $1 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ DMSO, $8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Resv, 400, 300, 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 中药刺激 24 h; 24 h 后除空白组外, 各组在给予预实验基础上选择的 $300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 诱导细胞衰老 4 h^[14], 再给予正常培养基继续培养 24 h。

2.4 SA- β -gal 染色 将第 5 代 HUVECs 以 7×10^4 个/孔密度种入 12 孔板, 按 2.3 项方法给药、造模后, 小心抽去培养液, 加入染色清理液 1 mL 清洗细胞表面, 小心抽去后每孔加染色固定液 1 mL, 在室温下固定 5 min, 吸除固定液, 每孔加入染色酸性液 1 mL 清洗 2 次后, 每孔加染色工作液 800 μL , 放进 37°C , 无 CO_2 培养箱中孵育 3~16 h, 于显微镜下观察拍照并计数, 衰老特异性 β -半乳糖苷酶的阳性细胞呈蓝色, 计算蓝染细胞数量占视野总细胞量的比例。

2.5 流式细胞仪分析细胞周期 按 2.3 项分组造模给药处理后消化收集细胞, 调整密度为 1×10^6 个/mL, 用 DPBS 润洗细胞 2 次, 再次离心收集, 弃去上清液, 加入 4°C 预冷乙醇 1 mL, 于 4°C 冰箱固定过夜。次日以 $300 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min 收集细胞, 弃去上清液后, 每组加 RNase A 100 μL 重悬, 置于 37°C 水浴 30 min 后, 加入碘化丙啶 400 μL 混匀, 于 4°C 避光孵育 30 min, 用流式细胞仪上机进行细胞周期分析。

2.6 H_2O_2 造模下各组线粒体 ROS 荧光强度 利用超氧化物氧化 MitoSOX 红色荧光染色法将线粒体内活性氧 (mtROS) 可视化, 先对细胞进行造模给药处理后, 用 DPBS 小心清洗 2 次, 按 mtROS 检测说明书加 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 工作液, 37°C 避光孵育 10 min 后, 用 DPBS 清洗 2 次, 在荧光显微镜下观察并拍照。

2.7 H_2O_2 造模下线粒体膜电位荧光强度测定 以 JC-10 为荧光探针, 快速灵敏地检测细胞内线粒体膜电位变化。将 $100\times$ JC-10 染色工作液 50 μL 与 Buffer A 5 mL 混合后得到 JC-10 染色工作液; 配置

好的 JC-10 染色工作液加入 96 孔板的样品孔中, 50 μL /孔, 然后避光放入 37°C , 5% CO_2 培养箱孵育 30 min; 取出后, 每个样品孔加入 Buffer B, 50 μL /孔, 放置于酶标仪板内, 分别以激发光/发射光为 490 nm/525 nm 与 540 nm/590 nm 的荧光强度比值得到红色、绿色荧光值, 对红/绿荧光的比值进行比较, 得到线粒体膜电位结果。

2.8 Western blot 检测 MnSOD, p-p66 蛋白表达 将造模给药后的细胞消化收集, 每组加入裂解液 200 μL , 冰浴静置 1 h, 用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒对样品进行总蛋白测定, 加入 $5\times$ Loading buffer, 与样品体积比为 1:4, 于金属浴中 100°C 加热 10 min。电泳上样量为 30 μg /孔, 按照浓缩胶 100 V/分离胶 150 V 恒压电泳, 电泳后将凝胶进行半干转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 用 5% 脱脂奶粉按比例稀释一抗 (p-p66 1:1 000; MnSOD 1:5 000; GAPDH 1:5 000), 放入 4°C 孵育过夜。次日 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 然后加入按比例稀释的二抗 (1:1 万) 孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。将 PVDF 膜置于显影板, 加入 ECL 显影液, 凝胶系统采集图片, 采用 Image J 软件对图片进行分析。

2.9 统计学分析 本实验数据应用 SPSS 18.0 软件进行统计分析, 计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组样本采用单因素方差分析, 方差齐时采用最小显著性差异法 (LSD), 方差不齐则用 Tamhan 法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 H_2O_2 诱导的衰老 HUVECs 增殖能力的影响 与空白组比较, H_2O_2 组 A 显著降低 ($P<0.01$), 细胞增殖活力显著下降; 与 H_2O_2 组比较, 各浓度组 A 均明显上升 ($P<0.05$), 细胞增殖活力明显升高。根据 CCK-8 结果, 选取 400, 300, 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 为中药干预质量浓度, 分别为高、中、低质量浓度组, 进行后续实验。见表 1。

3.2 对 H_2O_2 诱导的 HUVECs 衰老的影响 与空白组比较, H_2O_2 组与 H_2O_2 +DMSO 组蓝染阳性细胞数显著增加 ($P<0.01$); 与 H_2O_2 组比较, GNC-H, GNC-M, GNC-L 组, Resv 组蓝染细胞显著减少 ($P<0.01$)。见表 2, 图 1。

3.3 对 H_2O_2 诱导的衰老 HUVECs 细胞周期的影响 与空白组比较, H_2O_2 组 G_0/G_1 期细胞数量比例增多, G_2/M 期细胞比例减少 ($P<0.05$); 与 H_2O_2 组比较, GNC 各组及 Resv 组 G_0/G_1 期细胞数量比例明显减少 ($P<0.05$); GNC-H 组, Resv 组在 G_2/M 期细胞比例增

表1 GNC对H₂O₂诱导的衰老HUVECs增殖能力的影响($\bar{x}\pm s$, n=6)

Table 1 Effect of GNC on proliferation of senescent HUVECs induced by H₂O₂ ($\bar{x}\pm s$, n=6)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	A
空白		0.82±0.07
H ₂ O ₂		0.50±0.03 ¹⁾
GNC	25	0.85±0.14 ²⁾
	50	0.80±0.02 ²⁾
	75	0.83±0.05 ²⁾
	100	0.84±0.08 ²⁾
	200	0.95±0.08 ²⁾
	300	0.96±0.05 ²⁾
	400	1.03±0.10 ²⁾
	1 000	0.78±0.07 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾P<0.05;与H₂O₂组比较²⁾P<0.05。

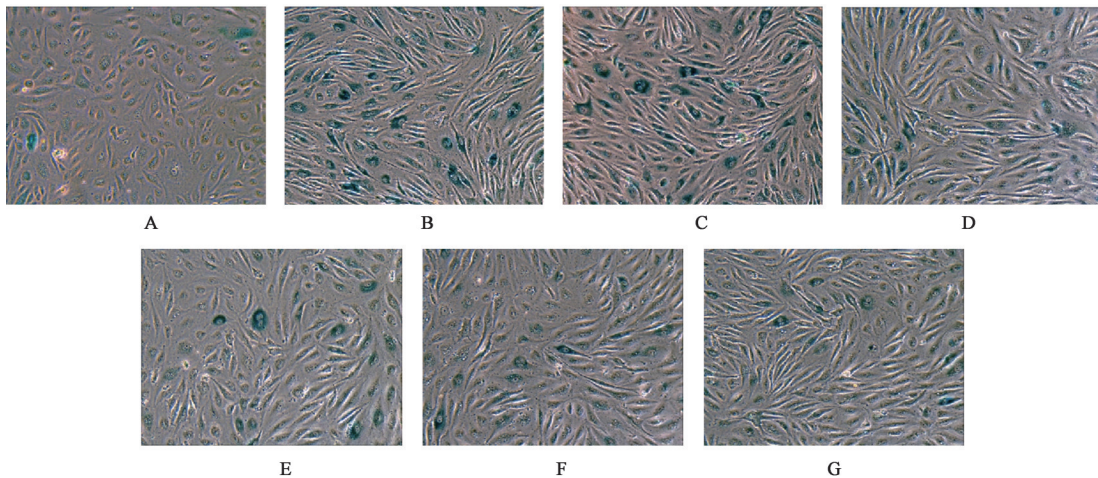
表2 GNC对H₂O₂诱导的HUVECs衰老的影响($\bar{x}\pm s$, n=3)

Table 2 Effect of GNC on senescence of HUVECs induced by H₂O₂ ($\bar{x}\pm s$, n=3)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	SA-β-gal 蓝染/%
空白		14.75±2.91
H ₂ O ₂		82.37±2.44 ¹⁾
H ₂ O ₂ +DMSO		81.82±3.00 ¹⁾
GNC	400	58.51±2.86 ²⁾
	300	51.07±4.03 ²⁾
	200	66.97±1.76 ²⁾
Resv	8 ³⁾	53.37±1.77 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾P<0.01;与H₂O₂组比较²⁾P<0.01;³⁾表示浓度单位为μmol·L⁻¹(表4同)。

加(P<0.05)。H₂O₂组与H₂O₂+DMSO组在G₀/G₁期, S期, G₂/M期差异均无统计学意义。见表3。



A. 空白组; B. H₂O₂组; C. DMSO组; D~F. GNC高、中、低质量浓度组; G. Resv组(图2, 3同)

图1 GNC对H₂O₂诱导的HUVECs衰老的影响(倒置显微镜, ×100)

Fig. 1 Effect of GNC on senescence of HUVECs induced by H₂O₂ (inverted microscope, ×100)

表3 GNC对H₂O₂诱导的衰老HUVECs细胞周期的影响($\bar{x}\pm s$, n=3)

Table 3 Effect of GNC on cell cycle of senescent HUVECs induced by H₂O₂ ($\bar{x}\pm s$, n=3)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	G ₀ /G ₁ 期	S期	G ₂ /M期
空白		53.08±2.95 ²⁾	12.93±10.54	31.71±11.89 ²⁾
H ₂ O ₂		88.90±4.03 ¹⁾	4.17±3.02	6.85±5.13 ¹⁾
H ₂ O ₂ +DMSO		86.52±6.25 ¹⁾	6.19±1.89	7.13±4.20 ¹⁾
GNC	400	61.88±1.55 ²⁾	9.41±5.67	26.50±6.39 ²⁾
	300	67.70±6.97 ²⁾	12.49±7.54	20.09±6.74
	200	68.47±8.89 ²⁾	10.20±7.14	22.96±7.55
Resv	8 ³⁾	62.62±0.83 ²⁾	8.76±4.49	27.99±4.09 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾P<0.05;与H₂O₂组比较²⁾P<0.05;³⁾表示浓度单位为μmol·L⁻¹。

3.4 对H₂O₂诱导的衰老HUVECs线粒体ROS荧光强度的影响 空白组细胞内线粒体ROS荧光强度

较弱,仅有少数细胞可以观察到荧光信号;H₂O₂模型组与H₂O₂+DMSO组荧光强度最高,大量细胞可

见较明亮的红色荧光信号,细胞边缘较清晰,胞质较明显;GNC各组与 Resv 组红色荧光强度比 H₂O₂

衰老模型组偏弱,比青年组荧光强度明显增强。见图2,表4。

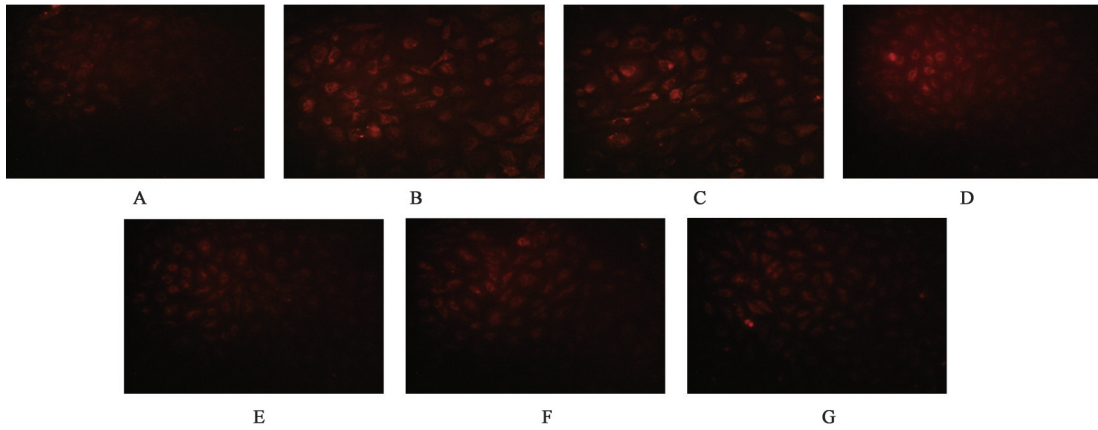


图2 GNC对H₂O₂诱导的衰老HUVECs线粒体ROS荧光强度的影响(免疫荧光,×100)

Fig. 2 Effect of GNC on fluorescence intensity of mitochondrial ROS in senescent HUVECs induced by H₂O₂ (IF, ×100)

表4 GNC对H₂O₂诱导的衰老HUVECs线粒体ROS荧光强度的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of GNC on fluorescence intensity of mitochondrial ROS in senescent HUVECs induced by H₂O₂ ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	线粒体ROS荧光值
空白		0.029±0.001
H ₂ O ₂		0.059±0.003 ¹⁾
H ₂ O ₂ +DMSO		0.063±0.004 ¹⁾
GNC	400	0.030±0.001 ²⁾
	300	0.030±0.001 ²⁾
	200	0.036±0.002
Resv	8 ³⁾	0.037±0.002

表5 GNC对H₂O₂诱导的衰老HUVECs线粒体膜电位荧光强度的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 5 Effect of GNC on fluorescence intensity of mitochondrial membrane potential of GNC on H₂O₂ induced senescent HUVECs ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	线粒体膜电位荧光值
空白		0.65±0.02
H ₂ O ₂		0.45±0.01 ¹⁾
H ₂ O ₂ +DMSO		0.46±0.01 ¹⁾
GNC	400	0.62±0.26 ³⁾
	300	0.59±0.33 ³⁾
	200	0.59±0.01 ³⁾
Resv	8 ⁴⁾	0.56±0.05 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾P<0.01;与H₂O₂组比较²⁾P<0.05,³⁾P<0.01;
⁴⁾表示浓度单位为μmol·L⁻¹。

3.5 对H₂O₂诱导的衰老HUVECs各组线粒体膜电位荧光强度的影响 与空白组比较,H₂O₂组,H₂O₂+DMSO组线粒体膜电位荧光强度显著下降(P<0.01);与模型组比较,GNC-H,GNC-M,GNC-L组及Resv组线粒体膜电位荧光强度明显升高(P<0.05,P<0.01)。见表5。

3.6 对H₂O₂诱导的衰老HUVECs各组MnSOD,p-p66蛋白表达的影响 在p-p66蛋白表达中,与空白组比较,H₂O₂模型组p-p66含量显著增高(P<0.01);与H₂O₂模型组比较,GNC-H,GNC-M,GNC-L和Resv组表达显著降低(P<0.01);在MnSOD蛋白表达中,与空白组比较,H₂O₂模型组MnSOD含量明显降低(P<0.05);与H₂O₂模型组比较,GNC-H与GNC-M组表达明显增多(P<0.05),GNC-L和Resv组表达虽有增高,但差异无统计学意义。见图3,表6。

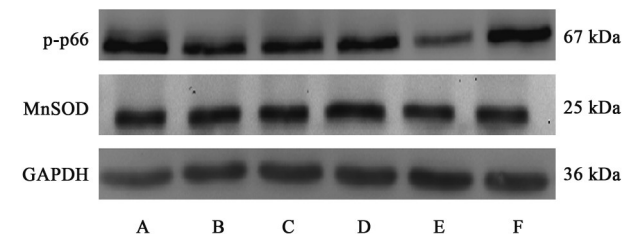


图3 各组HUVECs MnSOD,p-p66蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of MnSOD and p-p66 protein expression in each group of HUVECs

4 讨论

衰老作为不可逆的生物学过程,是许多慢性疾病的危险因素。随着老龄人口数迅速增加,衰老相关疾病如高血压、糖尿病、动脉粥样硬化等严重威胁人类健康,成为亟待解决的健康问题之一。血管衰老作为衰老进程的起始阶段,广泛存在于衰老相

表 6 GNC 对 H₂O₂ 诱导的衰老 HUVECs MnSOD, p-p66 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Effect of GNC on expression of MnSOD and p-p66 protein in senescent HUVECs induced by H₂O₂ ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	p-p66/GADPH	MnSOD/GADPH
空白		1.03±0.04	1.24±0.20
H ₂ O ₂		2.13±0.08 ²⁾	0.79±0.06 ¹⁾
GNC	400	1.16±0.21 ⁴⁾	1.04±0.10 ³⁾
	300	1.15±0.20 ⁴⁾	1.07±0.13 ³⁾
	200	0.70±0.28 ⁴⁾	0.95±0.18
Resv	8 ⁵⁾	1.42±0.11 ⁴⁾	0.93±0.11

注:与空白组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与 H₂O₂ 组比较³⁾P<0.05,⁴⁾P<0.01;⁵⁾表示浓度单位为 μmol·L⁻¹。

关性疾病中,衰老的血管会出现结构及功能的退行性改变,血管细胞衰老作为血管老化的基础,是研究血管老化的重要方向^[15]。

细胞衰老的过程主要包括线粒体自由基学说、氧化应激学说、端粒衰老学说及 DNA 损伤学说等,各种学说相互联系^[16],共同参与衰老这一过程。线粒体自由基理论在衰老学说中是重要学说之一,机体衰老的过程中,线粒体中 ATP 产生减少、膜电位降低和 ROS 水平增加,引起 DNA 结构和功能异常,导致线粒体氧化磷酸化水平下降,进一步引起 ROS 在体内堆积,直至超出体内清除 ROS 的能力,从而引起细胞及机体的衰老^[17-18]。正常生长的细胞按照 RNA 和蛋白质合成期(G₁),DNA 复制期(S),有丝分裂期(G₂),染色体等分期(M)的周期顺序进行分裂,衰老的细胞则会出现生长周期停滞。G₀/G₁期失控会引起细胞增殖紊乱,停滞于此期的细胞增多,处于 S 期及 G₂M 细胞减少,从而引起细胞衰老,因此,细胞周期能作为判断细胞是否衰老的指标之一^[19]。磷酸化是蛋白质翻译后修饰的重要方式之一,激酶和磷酸酶通过调控蛋白磷酸化程度,赋予其新的功能,广泛参与细胞内各种生命活动^[20]。p-p66 是 Shc 蛋白家族重要成员之一,氧化应激状态下,p-p66 能被 Jun 氨基末端激酶(JNK),蛋白激酶 Cβ(PKCβ)和 p53 等激活,促进线粒体产生 ROS,参与线粒体 ROS 生成并调控氧化应激反应^[21-22]。MnSOD 是线粒体中 ROS 的主要清除酶,可使超氧化物转化为 H₂O₂,随后可通过 H₂O₂ 酶转化为 O₂ 和水^[23]。细胞内 p-p66 被 p53 等激活后,产生 ROS,通过线粒体膜,抑制 FoxO 去磷酸化和激活,从而降低 MnSOD 的表达^[24-25],因此,p-p66 和 MnSOD 表达水平能够反映细胞内线粒体氧化应激情况。

中医理论认为气血是构成人体最基本的物质,生命的本质在于气血,《黄帝内经》云:“气血正平,长有天命”,王清任指出“元气既虚,必不能达于血管,血管无气,必得留而为瘀”,强调了人体气血充盈、调和,才能健康长寿,而气血虚衰,瘀滞不通则是衰老的危险因素。益气活血类方药在延缓衰老及防治衰老相关性疾病方面具有良好的疗效,中药人参、三七、川芎提取物的有效成分均具有较好的延缓衰老功效^[26-27],还具有扩血管、保护血管内皮细胞,以及促进血管新生等作用^[28-29],三药联用可达到益气活血、延年益寿的功效。在本研究中,H₂O₂ 造模诱导内皮细胞发生急性氧化应激反应,SA-β-gal 染色蓝染细胞比例增多,G₀/G₁期细胞增多,G₂/M 期细胞比例减少,出现生长停滞现象,表明细胞周期进程被抑制,出现细胞衰老早期的表现,线粒体内 ROS 表达显著增高,膜电位降低,MnSOD 蛋白表达下降,p-p66 表达上调,表明细胞内发生强烈的氧化应激反应,给予 GNC 干预后,SA-β-gal 染色蓝染细胞减少,G₀/G₁期细胞比例显著减少,G₂/M 期细胞比例增高,线粒体内 ROS 表达降低,膜电位升高,MnSOD 蛋白表达上升,p-p66 表达下调,说明 GNC 延缓 H₂O₂ 诱导的血管内皮细胞衰老的机制可能是通过抑制线粒体氧化应激反应完成的。研究中发现,GNC 中、高质量浓度组改善线粒体氧化应激的效果较显著,GNC 低质量浓度组虽然下调 p-p66 蛋白结果明显,但低于空白,其结果需要在下一步的研究中验证。且低质量浓度组在反映线粒体活性氧的部分指标中虽有改善趋势,但不完全有统计学差别,这或许与药物质量浓度有一定的关系,需要在未来研究中进一步明确。

综上所述,H₂O₂ 可诱导血管内皮细胞出现衰老表现,益气活血中药 GNC 干预后,线粒体内 ROS 含量、线粒体膜电位及相关蛋白 MnSOD, p-p66 发生改善,急性氧化应激反应减弱,因此认为,中药 GNC 可能通过抑制线粒体氧化应激反应延缓血管内皮细胞的衰老。然而 GNC 抑制线粒体氧化应激反应的具体信号通路与靶点,仍在进一步研究过程中。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] MAGENTA A, LORDE R, SYED S B, et al. Molecular therapies delaying cardiovascular aging: disease- or health-oriented approaches[J]. Vasc Biol, 2020, 2(1): R45-R58.

- [2] PUCA A A, CARRIZZO A, VILLA F, et al. Vascular ageing: the role of oxidative stress[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45(3):556-559.
- [3] 曹琼琼. 白藜芦醇在血管内皮细胞衰老-炎症中的机制研究[D]. 合肥:安徽医科大学, 2021.
- [4] 姜雪. 二甲双胍通过MBNL1/miR-130a-3p/STAT3途径延缓糖尿病肾病肾小管上皮细胞衰老[D]. 沈阳:中国医科大学, 2020.
- [5] 刘芸, 郑炎, 谢辉, 等. 血府逐瘀汤延缓大鼠骨髓源内皮祖细胞衰老的机制研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2018, 34(23):2723-2726.
- [6] PIETRI P, STEFANADIS C. Cardiovascular aging and longevity: JACC state-of-the-art review[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2021, 77(2):189-204.
- [7] WANG J C, BENNETT M. Aging and atherosclerosis: mechanisms, functional consequences, and potential therapeutics for cellular senescence [J]. *Circ Res*, 2012, 111(2):245-259.
- [8] DI MICCO R, KRIZHANOVSKY V, BAKER D, et al. Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(2):75-95.
- [9] CHILDS B G, DURIK M, BAKER D J, et al. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy[J]. *Nat Med*, 2015, 21(12):1424-1435.
- [10] VASILEIOU P V S, EVANGELOU K, VLASIS K, et al. Mitochondrial homeostasis and cellular senescence [J]. *Cells*, 2019, doi: 10.3390/cells8070686.
- [11] 肖新怀, 徐米清, 方燕龄. 丹参酮Ⅱ_A通过激活SIRT1/eNOS通路减轻过氧化氢诱导的人脐静脉内皮细胞衰老[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2019, 35(9):806-811.
- [12] 胡惠军, 潘勇权, 范晓娟, 等. 大蒜素激活SIRT1通路抑制过氧化氢诱导人脐静脉内皮细胞的衰老[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2016, 32(5):536-543.
- [13] 修成奎. 人参三七川芎提取物对衰老血管骨蛋白和自噬的干预作用及机制研究[D]. 北京:中国中医科学院, 2016.
- [14] 林捷琪, 阮云军, 杨儒于, 等. 不同浓度雌二醇对过氧化氢诱导的人脐静脉内皮细胞衰老模型的影响[J]. *中国临床解剖学杂志*, 2019, 37(5):528-533.
- [15] NORTHCOTT J M, CZUBRYT M P, WIGLE J T. Vascular senescence and ageing: a role for the MEOX proteins in promoting endothelial dysfunction[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2017, 95(10):1067-1077.
- [16] GORGOLIS V, ADAMS P D, ALIMONTI A, et al. Cellular senescence: defining a path forward[J]. *Cell*, 2019, 179(4):813-827.
- [17] YU B, MA J, LI J, et al. Mitochondrial phosphatase PGAM5 modulates cellular senescence by regulating mitochondrial dynamics [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1):2549.
- [18] GUAN R, CAI Z, WANG J, et al. Hydrogen sulfide attenuates mitochondrial dysfunction-induced cellular senescence and apoptosis in alveolar epithelial cells by upregulating sirtuin 1[J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(24):11844-11864.
- [19] 张颖, 保志军. 细胞周期调控机制在细胞衰老中的研究进展[J]. *老年医学与保健*, 2015, 21(6):425-427.
- [20] 于静晨, 张文婷, 姚玉峰. 细菌蛋白质磷酸化修饰研究进展[J]. *微生物学报*, 2021, 61(2):357-367.
- [21] PANI G, GALEOTTI T. Role of MnSOD and p66shc in mitochondrial response to p53 [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15(6):1715-1727.
- [22] 顾闻, 陈川. 氧化应激下的p66~(Shc)调控作用[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2014, 30(9):870-873.
- [23] DERUY E, GOSELIN K, VERCAMER C, et al. MnSOD upregulation induces autophagic programmed cell death in senescent keratinocytes [J]. *PLoS One*, 2010, 5(9):e12712.
- [24] PANI G, KOCH O R, GALEOTTI T. The p53-p66shc-manganese superoxide dismutase (MnSOD) network: a mitochondrial intrigue to generate reactive oxygen species [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009, 41(5):1002-1005.
- [25] PANI G, GALEOTTI T. Role of MnSOD and p66shc in mitochondrial response to p53 [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15(6):1715-1727.
- [26] 王洋, 雷燕, 杨静, 等. 人参三七川芎提取物对自然衰老大鼠血管外膜重构的干预机制[J]. *中国中西医结合杂志*, 2015, 35(12):1474-1481.
- [27] 雷燕, 杨静, 赵浩, 等. 人参三七川芎提取物延缓衰老小鼠血管老化的实验研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2010, 30(9):946-951.
- [28] WANG X, ZHANG J Q, XIU C K, et al. Ginseng-Sanqi-Chuanxiong (GSC) extracts ameliorate diabetes-induced endothelial cell senescence through regulating mitophagy via the AMPK pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 20207151946.
- [29] 方靖漪. 人参三七川芎提取物延缓高糖诱导的主动脉老化作用机制[D]. 广州:广东药科大学, 2019.

[责任编辑 周冰冰]