

人参三七川芎提取物对复制性衰老内皮细胞的影响和钙黏蛋白的作用

王强¹, 雷燕^{1*}, 杨静¹, 修成全¹, 孙逸坤², 董玢², 欧阳竞锋¹

(1. 中国中医科学院医学实验中心, 北京 100700; 2. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100700)

[摘要] 目的: 观察人参三七川芎提取物对复制性衰老人心脏微血管内皮细胞(HCMEC)的影响和血管内皮钙黏蛋白(VE-cadherin)的作用。方法: 以HCMEC为研究对象, 第8代HCMEC建立复制性衰老HCMEC模型, 实验分为衰老模型组(衰老组)、白藜芦醇组($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、人参三七川芎低、中、高剂量组($50, 100, 200 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 相应药物作用24 h后, 采用 β -半乳糖苷酶(SA- β -gal)衰老染色鉴定, CCK-8检测细胞增殖能力, 流式细胞仪分析细胞周期, 采用激光免疫共聚焦显微镜观察VE-cadherin的形态学改变, Western blot检测VE-cadherin蛋白的表达情况。结果: 与衰老组比较, 人参三七川芎提取物各剂量组减少SA- β -gal衰老染色比例, 促进细胞的增殖, 减少 G_0/G_1 期细胞比例, 增加 G_2/M 期细胞比例, 保持VE-cadherin形态的完整性, 升高VE-cadherin蛋白的表达, 均具有明显的统计学差异($P < 0.05, P < 0.01$)。结论: 人参三七川芎提取物能够延缓衰老, 促进增殖和有丝分裂, 保持复制性衰老HCMEC VE-cadherin的完整性和蛋白的表达, 这可能是益气活血中药延缓内皮衰老的重要机制所在。

[关键词] 人参三七川芎提取物; 血管内皮钙黏蛋白; 复制性衰老

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)10-0123-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015100123

Effects of Extracts from Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma on Vascular Endothelial Cells and Cadherin in Replicative Senescence of Endothelial Cell Model

WANG Qiang¹, LEI Yan^{1*}, YANG Jing¹, XIU Cheng-kui¹, SUN Yi-kun², DONG Fen², OUYANG Jing-feng¹
(1. Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of extracts from Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma on vascular endothelial cells and cadherin in replicative senescence of human cardiac microvascular endothelial cells (HCMECs) model. **Method:** The replicative senescence HCMECs model was induced in HCMECs by generation cultivating to the eighth cells. The *in vitro* cultured HCMECs were divided into 5 groups: the eighth generation cell-senescence untreated group (old group), the resveratrol group ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), the low-, intermediate-and high-dose herbal treated groups ($50, 100, 200 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). The intervention time of drug was 24 h. Changes of HUVECs aging were observed by the senescence-associated β -galactosidase staining (SA- β -gal), cell proliferation was detected by using cell counting kit-8 (CCK-8), and cell cycle was analyzed by using flow cytometry. The morphological changes of VE-cadherin were observed by using laser confocal microscopy. The protein expression of VE-cadherin was observed by using Western blot. **Result:** Compared with the old group, the extracts from Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma could decrease the proportion of aging stained, promote cell proliferation, reduce the proportion of G_0/G_1 phase, increase the proportion of G_2/M phase, maintain the integrity of VE-cadherin, and promote the expression of VE-cadherin protein ($P < 0.05, P < 0.01$). **Conclusion:** The extracts from Ginseng Radix et

[收稿日期] 20150106(014)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81273976); 中国中医科学院自主选题(ZZ2013002)

[第一作者] 王强, 在读博士, 从事中西医结合心血管基础和临床研究, Tel: 15910455809, E-mail: wqwin21@163.com

[通讯作者] *雷燕, 博士, 研究员, 从事中西医结合心血管基础和临床研究, Tel: 01064089556, E-mail: 13651217893@163.com

Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma could delay aging, promote the proliferation and mitosis, maintain the integrity of VE-cadherin and promote the expression of VE-cadherin protein in replicative senescence of HCMEC model, which may contribute to the delay of *in vitro* HCMEC senescence for Chinese herbal medicines of nourishing qi and resolving blood stasis.

[Key words] extracts from Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma; VE-cadherin; replicative senescence

内皮细胞生物学改变是人类衰老和疾病的基础,内皮细胞功能失调是血管老化的主要特征之一^[1]。血管内皮钙黏蛋白(vascular endothelial cadherin, VE-cadherin)是形成和调节内皮细胞连接所必须的内皮细胞特异性钙黏蛋白。内皮连接处的黏附功能和蛋白表达水平在控制血管的通透性和白细胞聚集到组织起到决定性作用。除了控制连接的完整性,它还可以调节影响内皮细胞行为信号通路,比如增殖、生存、迁移、极性、其他连接蛋白的表达、有关血管的管和管腔的形成等^[2]。有文献报道,糖基化终末产物作为衰老过程中的主要的病理产物,可以导致人和牛血管内皮细胞 VE-cadherin 的损伤和蛋白表达减少^[3]。课题组前期通过观察人参三七川芎提取物干预复制性衰老内皮细胞,发现人参三七川芎提取物通过减少 ROS 的产生延缓内皮细胞的衰老^[4],但 VE-cadherin 角度研究较少,因此本研究主要以 VE-cadherin 作为细胞衰老改变的切入点,观察复制性衰老内皮细胞 VE-cadherin 的改变,分析益气活血药对衰老内皮细胞 VE-cadherin 的干预作用。

1 材料

1.1 细胞 人心脏微血管内皮细胞(human cardiac microvascular endothelial cells, HCMEC),美国 Sciencell 公司,批号 9596。

1.2 药物及试剂 川芎, Chuanxiong Rhizoma, 产自四川;人参, Ginseng Radix et Rhizoma, 产自吉林抚松镇;三七, Notoginseng Radix et Rhizoma, 产自云南。人参三七川芎为醇提物,由北京因科瑞斯医药科技公司提供(人参三七川芎原药初始比例为 2:3:4,经过醇提、浓缩、真空减压制成干膏粉),生药含量为 $4.286 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ 干膏,使用时用灭菌 PBS 液配置成 $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的贮存液,以 $0.22 \mu\text{m}$ 的滤器过滤分装,保存于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中。白藜芦醇购自中国食品药品检定研究院(批号 111535-200502),用 DMSO 溶解,配成 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的贮存液分装后避光保存于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 。内皮细胞生长因子(批号 12995),ECM 基础培养基(批号 13916),双抗(批号 13311),牛血浆纤连蛋白

(批号 12579),以上试剂均购自美国 Sciencell 公司;CCK-8 增殖试剂盒(上海东仁公司,批号 FP653),细胞衰老测定试剂盒(上海杰美基因医药科技有限公司,批号 11-52818-11),DNA 含量检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司,批号 KGA512),MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司,批号 KGA312),VE-Cadherin 小鼠单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司,批号 H2013),FITC 标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)(碧云天公司,批号 A0568),山羊抗兔 IgG(H+L)(美国 Jackson 公司,批号 115-035-003)。

1.3 仪器 FV1000 型共聚焦显微镜(日本 Olympus 公司),4000B 型倒置相差显微镜及成像系统(德国 Leica 公司),Delta320 型精密 pH 计(英国 Mettler-Toledo 公司),sepatech biofuge 28RS 型低温高速离心机(德国 Heraeus 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养和传代 根据内皮细胞培养方法操作,待各组细胞铺满瓶底 90% 左右时,用 0.25% 胰酶/EDTA 液消化,中和液中和,轻轻吹打后转移至 50 mL 离心管 $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 5 min,离心收集细胞,弃上清,加入 2~3 cm 的完全培养基,1:2 或 1:3 传代。

2.2 分组 实验分为 5 组,分为 8 代复制性衰老模型组(衰老组)、白藜芦醇组($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、人参三七川芎低、中、高剂量组($50, 100, 200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。药物均用 ECM 完全培养基稀释,干预 24 h。

2.3 指标检测

2.3.1 β -半乳糖苷酶(SA- β -gal)染色鉴定衰老 待 24 孔板内细胞生长至 70%~80% 时,小心抽去细胞培养液;每孔加入 500 μL GENMED 尼罗红荧光染色清理液,弃掉清理液后,每孔加入 500 μL GENMED 固定液,室温孵育 5 min;小心抽去固定液,每孔加入 500 μL GENMED 酸性液,清洗细胞表面,小心抽去酸性液,并重复一次操作;每孔加入 400 μL GENMED 染色工作液,在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱中孵育细胞呈现蓝色或过夜;在光学显微镜 10 倍

物镜下选取 100 ~ 200 个细胞,随机查找 3 个视野,计算蓝色细胞的比例。

2.3.2 CCK-8 检测细胞增殖能力 接种细胞 6×10^3 个/孔,置于 37 °C 培养箱中培养 24 h,待细胞融合达 70% 时,向每孔内加入 10 μ L 的 CCK-8 液,震荡均匀后,在 37 °C 培养箱中孵育 2 h,颜色呈深黄色,于酶标仪 450 nm 波长处检测吸光度 A。

2.3.3 流式细胞仪分析细胞周期 各组细胞用 0.25% 胰酶/EDTA 消化、中和液中和后,收集细胞,用 PBS 洗涤 2 次(离心 2 000 $r \cdot \min^{-1}$, 5 min),收集细胞并调整密度为 1×10^6 /mL,取 1 mL 的细胞悬液;制备的细胞悬液离心后,清洗 2 遍,去上清,在细胞内加入 1 mL 体积分数为 70% 冷乙醇 1 mL 4 °C 固定过夜,用 PBS 洗涤 2 次,500 μ L PBS 吹悬,200 目筛过滤;加入 100 μ L RNase A 37 °C 水浴 30 min,再用 400 μ L PI 染色混合均匀,4 °C 避光 30 min,上机检查,记录激发波长 488 nm 处红色荧光。

2.3.4 激光免疫共聚焦显微镜观察 VE-cadherin 的改变 用牛血浆纤连蛋白包被黑色玻璃底 96 孔板,按照 6×10^3 /孔接种细胞,据实验设计各组细胞经处理后,PBS 清洗细胞 2 遍,4% 多聚甲醛室温固定 15 min,PBS 漂洗 5 min \times 3 次;再用 0.5% X-100 于室温穿透 5 min,PBS 漂洗 5 min \times 3 次;以含 1% BSA 液室温封闭 1 h,PBS 漂洗 5 min \times 3 次,以 1:100 稀释的小鼠抗 VE-cadherin 一抗室温孵育 1.5 h,PBS 漂洗 5 min \times 3 次;然后以 1:300 稀释的 FITC 标记的羊抗小鼠 IgG 二抗室温避光孵育 1 h,PBS 漂洗 5 min \times 3 次,上机观察,以显示 VE-cadherin 的结构和分布。

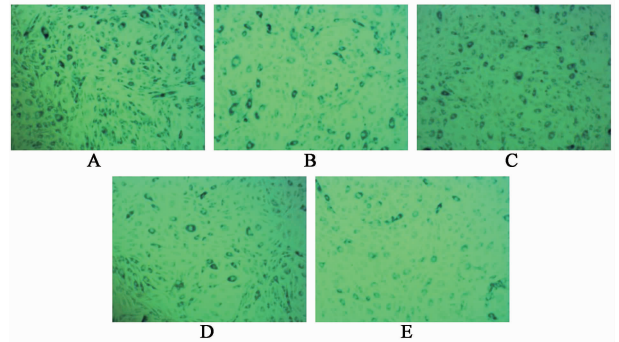
2.3.5 Western blot 检测内皮细胞 VE-cadherin 的蛋白表达 RIPA 蛋白抽提试剂提取各组总蛋白,BCA 法测定蛋白含量,调整蛋白浓度,煮沸变性 5 min,10% SDS-PAGE 电泳后半干转印仪转膜,5% BSA-TBST 封闭 1 h,1:500 稀释的一抗 4 °C 水平摇床孵育过夜,山羊抗鼠 IgG(H+L)二抗 1:10 000 室温孵育 40 min,Odyssey 荧光扫描, β -actin 为内参。

2.4 统计学分析 采用 SPSS 18.0 软件进行统计处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,组内比较用 LSD 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 SA- β -gal 细胞衰老的影响 通过各组 SA- β -gal 细胞衰老染色比较,与衰老组比较,白藜芦醇组、人参三七川芎低、中、高剂量组 SA- β -gal 蓝色染色比

例明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),但是人参三七川芎提取物各组与白藜芦醇组之间无统计学差异。见图 1,表 1。



A. 衰老组;B. 白藜芦醇 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;C. 人参三七川芎 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;D. 人参三七川芎 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;E. 人参三七川芎 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组(图 2~3 同)

图 1 SA- β -gal 细胞衰老情况比较(GENMED, $\times 100$)

Fig.1 Cell aging situation of SA- β -gal (GENMED, $\times 100$)

表 1 人参三七川芎提取物对 SA- β -gal 细胞衰老的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effects of extracts from Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma on SA- β -gal staining ratio ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	SA- β -gal 阳性染色率/%
衰老	-	77.93 \pm 3.24
白藜芦醇	10 ³⁾	43.12 \pm 9.15 ²⁾
人参三七川芎	50	50.66 \pm 0.97 ²⁾
	100	45.28 \pm 9.05 ²⁾
	200	44.46 \pm 3.35 ²⁾

注:与衰老组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;³⁾ 白藜芦醇单位为“ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ”(表 2~3 同)。

3.2 对细胞增殖能力的影响 通过 CCK-8 法检测细胞增殖能力表明,与衰老组比较,白藜芦醇组和人参三七川芎低、中、高剂量组细胞增殖能力明显增强,差异有统计学意义($P < 0.05$),但是人参三七川芎各组间与白藜芦醇组之间无统计学差异。见表 2。

表 2 人参三七川芎提取物对细胞增殖能力的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effects of extracts from Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma on cell proliferation ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	A
衰老	-	1.20 \pm 0.05
白藜芦醇	10 ³⁾	1.40 \pm 0.05 ²⁾
人参三七川芎	50	1.41 \pm 0.04 ²⁾
	100	1.47 \pm 0.05 ²⁾
	200	1.46 \pm 0.11 ²⁾

3.3 对细胞周期的影响 流式细胞周期分析显示,衰老组细胞停滞于 G_0/G_1 期, G_0/G_1 期细胞明显增

多, S 期细胞比例下降, G₂/M 期下降; 与衰老组比较, 白藜芦醇组 G₀/G₁ 期细胞比例明显下降, S 期细胞比例增多; 与衰老组比较, 人参三七川芎低、中、高剂量组 G₀/G₁ 期细胞比例明显下降, G₂/M 期增多, 人参三七川芎中剂量 S 期细胞比例增多; 人参三七川芎干预组和白藜芦醇组相比, G₂/M 期增多。见表 3。

表 3 人参三七川芎提取物对细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 3 Effects of extracts from Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma on cell cycle ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	细胞周期/%		
		G ₀ /G ₁ 期	S 期	G ₂ /M 期
衰老	-	82.85 ± 3.02	8.76 ± 3.85	8.39 ± 4.81
白藜芦醇	10 ³	62.05 ± 0.79 ²⁾	27.34 ± 2.90 ²⁾	10.61 ± 3.67
人参三	50	69.85 ± 0.50 ²⁾	9.53 ± 1.26	20.63 ± 1.77 ²⁾
七川芎	100	65.79 ± 1.14 ²⁾	18.62 ± 3.03 ²⁾	15.58 ± 4.17 ¹⁾
	200	70.52 ± 0.63 ²⁾	10.90 ± 1.65	18.58 ± 2.27 ²⁾

3.4 对 VE-cadherin 改变的影响 激光免疫共聚焦显微镜观察显示 VE-cadherin 主要分布于细胞膜, 正常细胞存在于细胞周围呈环状, 线条清晰连续, 细胞间连接紧密, 无明显缝隙。衰老过程 VE-cadherin 连接不完整, 线条粗糙, 细胞之间的连接存在断裂, 染色不清晰(箭头所示)。药物干预 24 h 后, 与衰老组比较, 白藜芦醇组染色清晰, 连接完整; 人参三七川芎干预各组染色较为清晰, 连接完整, 细胞间基本上没有断裂, 其中人参三七川芎高剂量组对 VE-cadherin 完整性保持较好, 箭头所示。见图 2。

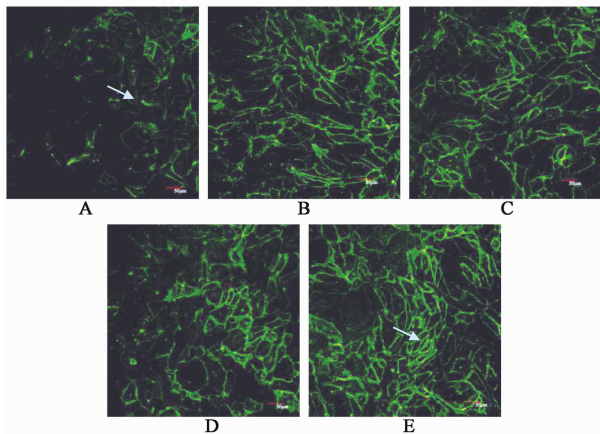


图 2 人参三七川芎提取物对 VE-cadherin 改变的影响 ($\times 200$)
Fig. 2 Effects of extracts from Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma on Morphology of VE-cadherin ($\times 200$)

3.5 对 VE-cadherin 蛋白表达的影响 与衰老组比

较, 白藜芦醇组和人参三七川芎低、中、高剂量组 VE-cadherin 的表达明显增多; 在药物干预组内, 白藜芦醇组、人参三七川芎中、高剂量组 VE-cadherin 的表达要多于人参三七川芎低剂量组。见图 3。

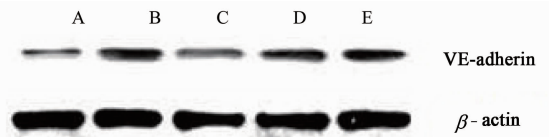


图 3 人参三七川芎提取物对 VE-cadherin 蛋白表达的影响
Fig. 3 Effects of extracts from Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma on expression of VE-cadherin

4 讨论

β -糖苷酶在衰老细胞表达, 在青年细胞难以表达, 因此选用 SA- β -gal 染色鉴定衰老^[5]。国外文献报道内皮细胞 SA- β -gal 染色在 60% 以上认为衰老有可比性^[6-7] 细胞存活和增殖检测方法主要包括间接观察 DNA 合成含量和直接测量细胞代谢活性 2 种。前者主要是 3H-TdR 掺入法, 后者主要为 MTT, XTT, MTS, CCK-8, WST-1 等。CCK-8 检测细胞增殖、细胞毒性实验的灵敏度更高, 数据可靠, 重复性好, 操作简单, 因此采用 CCK-8 法检测内皮细胞在衰老过程中的增殖情况^[8]。细胞的有丝分裂是细胞增殖旺盛的标志, 衰老细胞有丝分裂能力明显降低。因此实验中选用 SA- β -gal 衰老染色鉴定, CCK-8 检测细胞增殖能力、流式细胞仪分析细胞周期等是衡量延缓衰老的作用的重要方法。VE-cadherin 可以形成血管的网状结构, 保证血管的完整性, 调节内皮的适应性^[9]。其结构和功能的改变可引起细胞连接破坏, 细胞骨架结构改变, 从而导致细胞间缝隙形成, 血管通透性升高^[10], 进一步导致内皮细胞的衰老。VE-cadherin 主要分布于细胞膜, 存在于细胞周围呈环状, 线条清晰连续, 细胞间连接紧密, 无明显缝隙。衰老细胞则会出现线条逐渐呈断裂锯齿状, 甚至出现中断, 边缘也变得十分粗糙, 部分染色不清晰。

白藜芦醇通过舒张血管、改善血管内皮功能、抑制血管炎症反应、抗动脉粥样硬化、抗氧化应激、抗血管内皮细胞凋亡等作用保护血管内皮^[11]。本研究发白藜芦醇减少衰老内皮细胞 SA- β -gal 衰老染色的比例, 促进细胞的增殖, 减少 G₀/G₁ 期的比例, 增加 S 期的比例等延缓内皮细胞的衰老。此外白藜芦醇保持衰老内皮细胞 VE-cadherin 的完整和连续性, 上调 VE-cadherin 的蛋白表达。张氏通过白藜芦

醇干预人脐静脉内皮细胞,发现白藜芦醇减轻 H_2O_2 对内皮细胞生长活力抑制、降低凋亡、上调细胞周期蛋白 D1^[12]; Simão F 等通过观察白藜芦醇干预脑血管内皮细胞,发现白藜芦醇通过激活 PI3K/Akt 和 MAPK/ERK 信号通路维持 VE-cadherin 的结构^[13]。研究结果与本研究相一致。

气虚导致血瘀,瘀血内阻,产生一系列的病理变化^[14]。因此人体衰老的本质是气血失调,气虚血瘀。益气活血是延缓衰老的重要法则。人参、三七、川芎固定比例组方,现代药理学研究显示,3种药物的有效成分与抗衰老作用密切相关^[15],并具有扩张血管、抗炎、保护血管内皮功能、调节血管活性物质、促血管新生等功效^[16]。三药合用,可达到祛瘀生新、益气活血、活络通脉的作用。本研究发现,与衰老组相比,人参三七川芎各组均可以减少 SA- β -gal 蓝色染色的比例,促进细胞的增殖。从流式细胞周期来分析,人参三七川芎低、中、高剂量组主要是减少 G_0/G_1 期的比例,增加 G_2/M 期的比例。人参三七川芎组随着剂量升高而出现衰老染色下降和增殖加快的趋势,但是并无统计学差异。由此得知益气活血人参三七川芎可以延缓内皮细胞的衰老。这与杨氏通过观察人参三七川芎提取物干预复制性衰老内皮细胞可以延缓复制性衰老相一致^[17]。运用激光免疫共聚焦显微镜显示,与衰老组比较,白藜芦醇组和人参三七川芎低、中、高剂量组均可以保持衰老内皮细胞 VE-cadherin 的完整性,且人参三七川芎各组随着剂量的增加呈现一定的优势;Western blot 显示,白藜芦醇组和人参三七川芎低、中、高剂量组 VE-cadherin 蛋白的表达明显增多。段氏等通过通心络干预猪心梗再灌注后微血管内皮细胞观察,发现通心络保护急性心梗再灌注后内皮细胞 VE-cadherin 的完整性^[18],这与本研究结果相一致。

综上所述,人参三七川芎的提取物可以延缓内皮细胞的复制性衰老,保持复制性衰老内皮细胞 VE-cadherin 的完整性,上调 VE-cadherin 的表达,这可能是益气活血中药延缓内皮细胞衰老的机制所在。

[参考文献]

[1] Mannarino E, Pirro M. Endothelial injury and repair; a novel theory for atherosclerosis[J]. *Angiology*, 2008, 59 (2 Suppl): 69S-72S.

[2] Dejana E, Vestweber D. The role of VE-cadherin in vascular morphogenesis and permeability control[J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2013, 116: 119-44.

[3] Ma J, Liu T, Dong X. Advanced glycation end products of bovine serum albumin-induced endothelial-to-

mesenchymal transition in cultured human and monkey endothelial cells via protein kinase B signaling cascades [J]. *Mol Vis*, 2010, 9(16): 2669-2679.

[4] 杨静,雷燕,崔巍,等. 人参三七川芎提取物延缓内皮细胞复制性衰老的机制研究[J]. *中国中药杂志*, 2009, 34(12): 1544-1547.

[5] Dimri G P, 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 (20): 9363-9367.

[6] Yanaka M, Honma T, Sato K, et al. Increased monocytic adhesion by senescence in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2011, 75(6): 1098-1103.

[7] Cho J H, Kim M J, Kim J R. POZ/BTB and AT-hook-containing zinc finger protein 1 (PATZ1) inhibits endothelial cell senescence through a p53 dependent pathway[J]. *Cell Death Differ*, 2012, 19(4): 703-712.

[8] 石淙,万腊根. 细胞增殖的检测方法[J]. *实验与检验医学*, 2012, 30(2): 153-154.

[9] Dejana E. Endothelial cell-cell junctions: happy together [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, 5(4): 261-270.

[10] 赵克森,金丽娟. 休克的细胞和分子基础[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 38-82.

[11] 何东伟,刘新伟,庞勇,等. 白藜芦醇对大鼠缺血再灌注心肌细胞凋亡的抑制作用与 PI3K-Akt 信号通路的关系[J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(15): 2323-2326.

[12] 张贵娟. 白藜芦醇的提取及人脐静脉血管内皮细胞保护作用的研究[D]. 长沙: 长沙理工大学, 2013: 6.

[13] Simão F, Pagnussat A S, Seo J H, et al. Pro-angiogenic effects of resveratrol in brain endothelial cells; nitric oxide-mediated regulation of vascular endothelial growth factor and metalloproteinases [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2012, 32(5): 884-895.

[14] 赵延龙,闫润红,冯玉华. “虚-瘀-衰老”学说理论与实验研究进展[J]. *山西中医学院学报*, 2010, 11(4): 70-72.

[15] 周晓慧,周晓霞,杨鹤梅. 三七总皂甙防治动脉粥样硬化的研究进展[J]. *承德医学院学报*, 2003, 4(20): 350-352.

[16] 杨静,雷燕,崔巍,等. 人参三七川芎提取物延缓 Ang II 诱导内皮细胞衰老的机制研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2009, 29(6): 524-528.

[17] 杨静. 益气活血中药延缓血管老化的作用与机制研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2009.

[18] 段炼,杨跃进,张海涛,等. 猪急性心肌梗死再灌注后微血管内皮细胞损伤及通心络的保护作用[J]. *山东医药*, 2010, 50(36): 3-6.

[责任编辑 周冰冰]