

# 人参三七川芎提取物对复制性衰老血管平滑肌细胞 SM22 $\alpha$ 蛋白的影响

修成奎, 雷燕\*, 王强, 景晓杨, 姜明  
(中国中医科学院医学实验中心, 北京 100700)

**[摘要]** **目的:**观察人参三七川芎提取物对复制性衰老血管平滑肌细胞及其骨架蛋白相关蛋白平滑肌 22 $\alpha$ (SM22 $\alpha$ )的影响。**方法:**以人主动脉平滑肌细胞作为研究对象,复制性衰老 9 代细胞作为衰老模型,实验分为青年组(5 代细胞),模型组(9 代细胞),人参三七川芎提取物低、中、高(100,200,400 mg·L<sup>-1</sup>)剂量组及白藜芦醇组(10  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>),药物干预时间为 48 h。采用  $\beta$ -半乳糖苷酶特异染色法计算蓝染细胞比率,流式细胞技术分析细胞周期,免疫荧光染色观察细胞 SM22 $\alpha$  形态的改变,实时荧光定量-聚合酶链式反应(qPCR)和蛋白质免疫印迹(Western blot)检测 SM22 $\alpha$  的 mRNA 及蛋白表达情况。**结果:**与青年组比较,模型组细胞体积增大,形态不规则,G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期数量增多,S 期数量减少,且  $\beta$ -半乳糖苷酶染色蓝染数量减少( $P < 0.01$ ),符合衰老模型特点,且 SM22 $\alpha$  染色模糊暗淡,边缘不显,荧光强度明显减弱,SM22 $\alpha$  mRNA 及蛋白表达均下降( $P < 0.01$ )。与模型组比较,药物干预后,可以有效的增加  $\beta$ -半乳糖苷酶染色蓝染细胞数量,减少 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期的细胞数量,同时增加 S 期的细胞数量,增强 SM22 $\alpha$  荧光染色强度,使得 SM22 $\alpha$  mRNA 及蛋白表达均增加,并具有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。**结论:**复制性衰老的血管平滑肌细胞可以作为衰老研究的模型;骨架蛋白相关蛋白 SM22 $\alpha$  的形态、基因表达和蛋白表达在细胞衰老过程中改变明显,其可能与骨架蛋白一同参与了平滑肌细胞衰老的进程;人参三七川芎提取物一定程度上延缓了血管平滑肌细胞的老化,且对于 SM22 $\alpha$  有明显干预作用,并可能通过此作用及对骨架蛋白的作用一同延缓血管老化的进程。

**[关键词]** 衰老; 血管老化; 细胞骨架; 平滑肌 22 $\alpha$ ; 人参三七川芎提取物

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)11-0102-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016110102

## Effects of Extract from Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma on SM22 $\alpha$ Protein Expressions of Replicative Senescence Vascular Smooth Muscle Cells

XIU Cheng-kui, LEI Yan\*, WANG Qiang, JING Xiao-yang, JIANG Ming

(Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of extract from Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma (EGNC) on the smooth muscle 22 $\alpha$  (SM22 $\alpha$ ) expressions of replicative senescence vascular smooth muscle cells and cytoskeleton-associated protein. **Method:** With human aortic smooth muscle cells as the research objects and the replicative senescence 9<sup>th</sup> generation cells as the aging model, this experiment was divided into youth group (5<sup>th</sup> generation cells), model group (9<sup>th</sup> generation cell), EGNC low dose group (100 mg·L<sup>-1</sup>), middle dose group (200 mg·L<sup>-1</sup>), and high dose group (400 mg·L<sup>-1</sup>), resveratrol group (10  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>). The drug intervention time was 48 h.  $\beta$ -galactosidase staining method was used to calculate blue dye cell ratio. The cell cycle was analyzed by the flow cytometry. Immunofluorescent staining method was used to observe the morphological changes of SM22 $\alpha$ ; while the mRNA and protein expressions of

**[收稿日期]** 20160105(009)

**[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项目(ZZ2013002)

**[第一作者]** 修成奎,在读博士,从事中西医结合心血管方向研究,Tel:15120054697,E-mail:xiuchengkui@163.com

**[通讯作者]** \*雷燕,研究员,博士生导师,从事中西医结合心血管方向研究,Tel:010-64089556,E-mail:leiy999@163.com

SM22 $\alpha$  were detected by qPCR and Western blot respectively. **Result:** Compared with the youth group, the cell size was increased and shape was irregular in model; number of cells in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> stage was increased and number of cells in S stage was reduced; number of blue-dyed cells in  $\beta$ -galactosidase staining method was reduced ( $P < 0.01$ ), conforming to the characteristics of aging model; in addition, SM22 $\alpha$  staining was fuzzy and bleak, and the fluorescence intensity was weakened significantly, with reduced mRNA and protein expressions of SM22 $\alpha$  ( $P < 0.01$ ). As compared with the model group, drug intervention effectively reduced the number of blue-dyed cells, reduced the number of cells in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, increased the number of cells in S stage, enhanced the fluorescence staining intensity of SM22 $\alpha$ , and increased mRNA and protein expressions of SM22 $\alpha$ , with statistically significant difference ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The replicative senescence vascular smooth muscle cells can be used as aging research models. The morphology, gene and protein expressions of SM22 $\alpha$  were changed obviously in the process of cell aging, and it may involve in the process of cell aging together with cytoskeleton. EGNC delayed the aging of vascular smooth muscle cells to a certain extent and had obvious intervention effect on SM22 $\alpha$ , so it might delay the aging of vessels with the cytoskeleton indirectly.

[**Key words**] aging; vascular aging; cytoskeleton; SM22 $\alpha$ ; extract from Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma

平滑肌 22 $\alpha$  (smooth muscle 22alpha, SM22 $\alpha$ ) 蛋白,又称为转凝蛋白,是一种重要的细胞骨架相关蛋白,在分化型血管平滑肌细胞(VSMCs)中大量表达,可通过与肌动蛋白相互作用参与细胞骨架的重构和表型调节。SM22 $\alpha$  蛋白作为 VSMCs 的表型标志基因,在收缩型 VSMCs 中表达较高,另外其片段短小,使其成为研究 VSMCs 表型转化的常用标志性基因<sup>[1]</sup>。VSMCs 是血管壁中膜的主要成分,其表型转化是血管老化的重要病理学基础<sup>[2]</sup>,血管老化过程中,内皮屏障被破坏,中膜 VSMC 得以暴露,损伤处聚集大量白细胞和血小板并释放多种细胞因子,从而诱导 VSMC 发生表型转化<sup>[3]</sup>。有研究表明,VSMC 表型转化受细胞骨架结构和功能的影响<sup>[4]</sup>,其中 SM22 $\alpha$  作为细胞骨架相关蛋白,同时参与细胞骨架调解 VSMC 的表型转化<sup>[5-6]</sup>。

本课题组前期建立了生理性增龄及病理性高血压的老化血管平滑肌细胞模型,且人参三七川芎提取物干预效果明显,能够延缓老年大鼠 VSMC 的老化,增强其收缩能力<sup>[7]</sup>,并抑制复制性衰老血管平滑肌细胞的细胞骨架 F-actin 的表达等。本实验则以复制性衰老的平滑肌细胞作为研究对象,以平滑肌细胞的表型标志基因 SM22 $\alpha$  作为主要研究内容,观察衰老后 SM22 $\alpha$  的改变及人参三七川芎提取物对其的干预作用,且 SM22 $\alpha$  又作为细胞骨架相关蛋白,从而间接探讨细胞骨架与血管老化的关系。

## 1 材料

**1.1 细胞** 人主动脉平滑肌细胞 HASMC (美国 ScienCell 公司,批号 6110)。

**1.2 药物及试剂** 人参(吉林抚松镇)、三七(云南)、川芎(四川)均为道地药材,其中单味药成分经中国中医科学院中药研究所检测,符合 2015 年版《中国药典》的规定和标准。按 3:2:4 比例破碎最粗粉,经乙醇回收提取,醇提液回收至浓缩液,继续浓缩至稠膏,真空减压、干燥、粉碎并装袋,每 1 g 冻干粉相当于生药 4.286 g,此冻干粉合剂制备过程由北京因科瑞斯医药科技公司提供。冻干粉用磷酸盐缓冲液(PBS)配制成 25 g·L<sup>-1</sup> 的贮存液,以 0.22  $\mu$ m 的滤器过滤分装,-20  $^{\circ}$ C 保存。白藜芦醇[中国食品药品检定研究院,批号 111535-200502,用二甲基亚砜(DMSO)溶解,配制成 50 g·L<sup>-1</sup> 的贮存液,4  $^{\circ}$ C 保存];SMCM 基础培养基,胎牛血清(FBS),双抗 P/S Solution,生长因子 SMCGS,胰酶/EDTA 消化酶(美国 ScienCell 公司,批号分别为 1101,0010,0503,1152,0103);细胞衰老特异性  $\beta$ -半乳糖苷酶检测试剂盒(上海杰美基因公司,批号 GMS10012.1),细胞 DNA 含量检测试剂盒(南京凯基公司,批号 KGA512),兔 SM22 $\alpha$  多克隆抗体和兔甘油醛-3-磷酸脱氢酸(GAPDH)单克隆抗体(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab14106,ab181602);异硫氰酸荧光素(FITC)标记山羊抗兔 IgG(H+L),辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L),BCA 蛋白浓度测定试剂盒和超敏增强型化学发光试剂(ECL)试剂盒(上海碧云天公司,批号分别为 A0562,A0208,P0010,P0018);4% 多聚甲醛,5% BSA 封闭液,Triton X-100 穿透液和高效 RIPA 组织/细胞裂解液(北京索莱宝公司,批号分别为 P1110,SW3015,T8200,R0010);

GoScript™ 逆转录酶系统, GoTaq 实时 PCR 系统和 RQ1 Rnase-Free Dnase(美国 Promega 公司,批号分别为 A5001, A6001, M610A)。

**1.3 仪器** Multiskan MK3 型全自动酶标仪(美国 Thermo 公司), Cytomics FC500 型流式细胞仪(美国 Beckman 公司), FV1000 型激光共聚焦显微镜(日本 Olympus 公司), 4000B 型倒置相差显微镜及成像系统(德国 Leica 公司), CFX96 型 qPCR 仪(美国 Bio-Rad 公司), GeneGnome XRQ 型发光凝胶成像系统(英国 Syngene 公司)。

## 2 方法

**2.1 实验分组及药物浓度** 干预药物的浓度以 MTT 比色法检验细胞增殖来确定。实验分为 6 组,分别为青年组(5 代细胞),模型组(9 代细胞),人参三七川芎提取物低、中、高剂量组(100, 200, 400 mg·L<sup>-1</sup>)及白藜芦醇组(10 μmol·L<sup>-1</sup>),药物干预时间 48 h。

**2.2 β-半乳糖苷酶(SA-β-gal)染色** 鉴定衰老的程度 按照细胞衰老特异性 β-半乳糖苷酶检测试剂盒说明进行操作,将细胞以 8 × 10<sup>3</sup> 个/孔接种于 24 孔板,贴壁后,实验组给予药物干预 48 h。实验前将染色液与稀释液配成工作液,置于 37 °C 水浴。向 24 孔板加入 500 μL/孔清理液,清洗细胞表面后弃去,加入 500 μL/孔的固定液,室温孵育 5 min 后弃去,加入 500 μL/孔的酸性液,清洗细胞表面,并重复清洗 1 次,最后加入 400 μL/孔的工作液,37 °C 过夜。次日在光学显微镜下观察并计数,随机选取 3 个视野,计算蓝染细胞的数量。

**2.3 流式细胞仪分析细胞周期** 按照细胞 DNA 含量检测试剂盒说明进行操作,在细胞培养过程中,实验组分别给予药物干预,药物作用 48 h 后消化并收集细胞,用 DPBS 洗涤 2 次后弃上清,每组分别加入 70% 冰乙醇 1 mL 将细胞吹悬固定,4 °C 过夜。次日离心去除固定液,DPBS 洗涤后加入 RNase A 100 μL,37 °C 水浴 30 min,最后加入 PI 试剂 400 μL 染色混匀,4 °C 避光 30 min,上机检测。

**2.4 免疫荧光染色观察细胞 SM22α 形态的改变** 将细胞以 6 × 10<sup>3</sup> 个/孔接种于黑色 96 孔板,贴壁后,实验组药物干预 48 h。吸去原培养基,用 DPBS 清洗细胞 2 遍,4% 多聚甲醛 100 μL/孔,室温固定 15 min,DPBS 清洗细胞 3 遍,每遍 5 min;再用 0.5% Triton X-100 100 μL/孔,室温穿透 5 min,DPBS 清洗 3 遍,每遍 5 min;以 1% BSA 的封闭液室温封闭 1 h,DPBS 清洗 3 遍,每遍 5 min;以 1:100 稀释的兔抗 SM22α 一抗室温孵育 1.5 h,DPBS 清洗 3

遍,每遍 5 min;然后以 1:300 稀释的 FITC 标记的山羊抗兔 IgG 二抗室温避光孵育 1 h,DPBS 清洗 3 遍,每遍 5 min,上机观察,以显示 SM22α 的结构和分布。

**2.5 蛋白质免疫印迹(Western blot)检测 SM22α 蛋白的表达** 将收集到的细胞样本裂解、破碎并离心,按 BCA 蛋白浓度检测试剂盒说明进行蛋白浓度测定,加入 Loading buffer 于 100 °C 加热 5 min 备用。常规进行电泳及转膜操作,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,后洗膜缓冲液(TBST)洗膜。一抗稀释比例 1:1 000,4 °C 水平摇床孵育过夜,二抗用 5% 脱脂奶粉稀释,稀释比例 1:3 000,室温孵育 90 min,孵育后 TBST 洗膜。后将膜置于发光凝胶成像系统中,滴加配制的 ECL 显色液反应 1 min,曝光 10 min 后分析图像。

**2.6 实时荧光定量-聚合酶链式反应(qPCR)检测细胞 SM22α mRNA 的表达** 经过 RNA 抽提、沉淀、洗涤及再悬浮过程,得到 mRNA 样品后进行 Dnase 消化及 cDNA 的合成,最后进行 PCR 操作,PCR 反应体系 50 μL,其中 2 × GoTaq 实时 PCR 系统 25 μL,cDNA 模板 4 μL,无核酸酶的水 19 μL,上游和下游 PCR 引物各 1 μL。结果计算公式为相对表达量 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>。GAPDH 引物上游 5'-TCATTGACCTCAACTACATGG-3',下游 5'-TCGCTCCTGGAAGATGGTG-3'; SM22α 上游 5'-ACATGTTCCAGACTGTTGACCT-3',下游 5'-CCACGGTAGTGCCCATCATT-3'。

**2.7 统计学分析** 采用 SPSS 18.0 软件进行数据分析,计量资料均  $\bar{x} \pm s$  表示,多组样本采用单因素方差分析,先进行方差齐性检验,方差齐则两两比较采用 LSD 法;方差不齐则两两比较采用 Tamhane 法,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对 SA-β-gal 衰老染色的影响** 通过对各组染色结果的观察和计数,与青年组比较,模型组细胞蓝染数比例明显增多( $P < 0.01$ );与模型组比较,人参三七川芎提取物低、中、高剂量组及白藜芦醇组细胞蓝染数比例均明显降低( $P < 0.01$ )。见表 1。

**3.2 对细胞周期的影响** 细胞周期的检测,与青年组比较,模型组 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞明显增多,S 期细胞减少( $P < 0.01$ );与模型组比较,人参三七川芎提取物中、高剂量组及白藜芦醇组 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞明显减少,S 期细胞增多( $P < 0.01$ ),人参三七川芎提取物低剂量组则无统计学意义;G<sub>2</sub>/M 期细胞数目变化均无统计学意义。见表 1。

**3.3 对细胞 SM22α 形态学的影响** 免疫荧光结果

表 1 人参三七川芎提取物对 SA-β-gal 衰老染色细胞细胞周期的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 1 Effects of extract from Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma on SA-β-gal cell cycle ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	SA-β-gal 阳性染色率/%	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> 期/%	S 期/%	G <sub>2</sub> /M 期/%
青年	-	15.56 ± 1.46	72.35 ± 0.79	16.86 ± 1.68	10.80 ± 2.47
模型	-	85.38 ± 2.56 <sup>2)</sup>	80.00 ± 1.18 <sup>2)</sup>	6.79 ± 0.95 <sup>2)</sup>	13.22 ± 2.10
人参三七川芎提取物	100	59.37 ± 5.62 <sup>4)</sup>	79.20 ± 1.37	8.04 ± 1.38	12.76 ± 2.75
	200	45.56 ± 3.49 <sup>4)</sup>	75.67 ± 0.12 <sup>4)</sup>	8.43 ± 0.34 <sup>3)</sup>	15.89 ± 0.33
	400	49.58 ± 4.28 <sup>4)</sup>	75.85 ± 0.90 <sup>4)</sup>	12.16 ± 1.66 <sup>4)</sup>	11.99 ± 2.55
白藜芦醇	10 <sup>5)</sup>	43.64 ± 3.58 <sup>4)</sup>	70.77 ± 0.98 <sup>4)</sup>	14.22 ± 1.18 <sup>4)</sup>	15.01 ± 2.14

注:与青年组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ , 与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ ; <sup>5)</sup> 表示白藜芦醇组药物剂量单位为 μmol·L<sup>-1</sup> (表 2 同)。

的观察和分析,青年组平滑肌细胞呈纺锤体状且形态规则,细胞体积偏小,排列规律紧密,SM22α 均匀分布于细胞核周围,染色清晰饱满;模型组细胞体积增大且形态不规则,排列疏松紊乱,SM22α 染色模糊暗淡,边缘不显。各给药组细胞体积也有一定程度的增大,排列疏松不规则,SM22α 染色尚清晰可见,边缘略有模糊。见图 1。在 SM22α 荧光强度方面,与青年组比较,模型组 SM22α 荧光强度明显减弱 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,人参三七川芎提取物高剂量 SM22α 荧光强度明显增强 ( $P < 0.01$ ),人参三七川芎提取物中剂量及白藜芦醇组 SM22α 荧光强度增强 ( $P < 0.05$ ),而人参三七川芎提取物低剂量则无统计学差异。见表 2。

**3.4 对 SM22α mRNA 表达的影响** 与青年组比较,模型组 SM22α mRNA 表达量明显减少,具有显著性差异 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,人参三七川芎提取物中、高剂量及白藜芦醇组 SM22α mRNA 表达量明显增加,具有显著性差异 ( $P < 0.01$ ),人参三七川芎提取物低剂量组则无统计学意义。见表 2。

**3.5 对 SM22α 蛋白表达的影响** 与青年组比较,模型组的 SM22α 蛋白表达明显减少,具有显著差异性 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,人参三七川芎提取物低、中、高剂量组及白藜芦醇组 SM22α 蛋白表达增加,具有显著差异性 ( $P < 0.01$ )。见表 2,图 2。

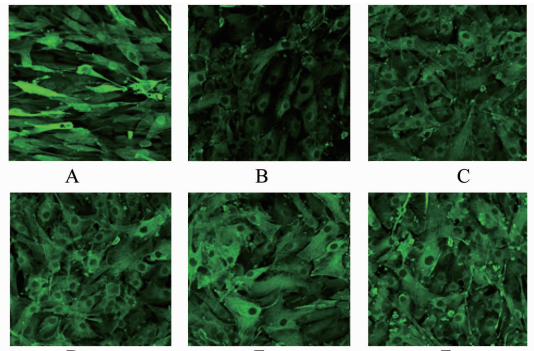


图 1 人参三七川芎提取物对细胞 SM22α 形态学的影响 (激光共聚焦, ×400)

Fig. 1 Effects of extract from Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma on morphology of SM22α (confocal laser scanning, ×400)

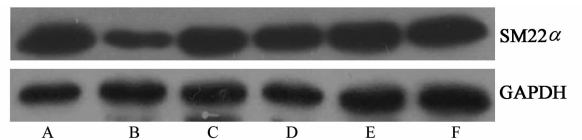


图 2 人参三七川芎提取物对 SM22α 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effects of extract from Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma on expression of SM22α protein

#### 4 讨论

血管老化的程度是决定老年人健康状况的重要因素,在衰老相关的各种疾病中,心血管系统疾病发

表 2 人参三七川芎提取物对 SM22α 荧光强度, mRNA 及蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effects of extract from Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma on fluorescence intensity of SM22α and expression of SM22α mRNA and protein ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	SM22α 荧光强度	SM22α mRNA	SM22α 蛋白
青年	-	0.81 ± 0.06	0.42 ± 0.02	1.89 ± 0.38
模型	-	1.11 ± 0.15 <sup>2)</sup>	0.10 ± 0.01 <sup>2)</sup>	0.69 ± 0.05 <sup>2)</sup>
人参三七川芎提取物	100	0.92 ± 0.07 <sup>4)</sup>	0.15 ± 0.01	1.21 ± 0.24 <sup>4)</sup>
	200	0.90 ± 0.09 <sup>4)</sup>	0.39 ± 0.02 <sup>4)</sup>	1.33 ± 0.30 <sup>4)</sup>
	400	0.99 ± 0.33	0.34 ± 0.06 <sup>4)</sup>	1.20 ± 0.26 <sup>4)</sup>
白藜芦醇	10 <sup>5)</sup>	0.96 ± 0.05 <sup>3)</sup>	0.36 ± 0.02 <sup>4)</sup>	1.10 ± 0.18 <sup>4)</sup>

病率为第一位<sup>[8]</sup>。血管平滑肌细胞的改变是血管老化的重要环节,通常表现为形态及表型的改变,而细胞骨架与细胞的形态和表型改变均有密切相关性。SM22 $\alpha$  是收缩型 VSMC 的标志蛋白,随着 VSMC 的衰老,其表达量会明显下降,会促使细胞由收缩型向合成型转化,并产生 I 型、III 型胶原,弹性纤维功能退化且数量减少,收缩功能显著降低<sup>[9]</sup>。同时,SM22 $\alpha$  也是重要的骨架蛋白相关蛋白,有研究表明,SM22 $\alpha$  存在细胞骨架肌动蛋白结合位点,且 VSMC 中 SM22 $\alpha$  与肌动蛋白纤维束和应力纤维共定位,并在其作用下,肌动蛋白纤维可形成平行的应力纤维结构<sup>[10]</sup>,从而对骨架蛋白具有调节作用。

目前细胞衰老的模型可分为复制性衰老、癌基因诱导衰老及氧化应激诱导衰老,其最终均可引发 DNA 损伤应答,促进细胞衰老的发生<sup>[11]</sup>。细胞衰老通常表现为细胞形态改变如增大、扁平、不规则等;细胞周期的阻滞,大量细胞停留于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期;细胞增殖及复制能力减弱;衰老特异性染色  $\beta$ -半乳糖苷酶染色阳性率增加;P16 及 P53 等参与衰老通路的因子表达增多;衰老相关异染色质灶形成等<sup>[12]</sup>。本研究则以体外复制性衰老的血管平滑肌细胞作为研究对象,以  $\beta$ -半乳糖苷酶染色和细胞周期作为判断细胞衰老程度的指标,以骨架蛋白相关蛋白 SM22 $\alpha$  作为主要的研究内容,观察人参三七川芎提取物对 SM22 $\alpha$  及衰老细胞的作用,从而探讨 SM22 $\alpha$  与血管平滑肌细胞衰老的关系。

实验结果表明复制性衰老的平滑肌细胞内  $\beta$ -半乳糖苷酶活性增加,衰老的细胞大量停留于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期,S 期细胞数量则明显减少,药物干预后 SA- $\beta$ -gal 染色细胞蓝染数目减少,周期则 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞减少,而 S 期细胞数明显增多。一方面鉴定了复制性衰老模型的老化程度,肯定了复制性衰老可以作为细胞衰老模型而进行下一步的研究,另一方面则明确了人参三七川芎提取物延缓细胞衰老的作用。SM22 $\alpha$  作为主要研究对象,在形态学方面,青年组均匀分布于细胞核周围,染色清晰饱满,而模型组染色模糊暗淡,边缘不显,荧光强度明显减弱,各给药组则染色亦清晰可见,边缘略有模糊,荧光强度较模型组明显增强;基因及蛋白表达方面,模型组 SM22 $\alpha$  mRNA 及蛋白表达较青年组均明显减弱,而各给药组则比模型组表达显著增强。

综上所述,复制性衰老的血管平滑肌细胞可以作为衰老研究的模型;骨架蛋白相关蛋白 SM22 $\alpha$  的形态、基因表达和蛋白表达在细胞衰老过程中改变

明显,其可能与骨架蛋白一同参与了平滑肌细胞衰老的进程;人参三七川芎提取物可以一定程度上延缓血管平滑肌细胞的老化,且对于 SM22 $\alpha$  有明显干预作用,并可能通过此作用及对骨架蛋白的作用一同延缓血管老化的进程。

#### [参考文献]

- [1] Fan Z, Li C, Qin C, et al. Role of the PI3K/AKT pathway in modulating cytoskeleton rearrangements and phenotype switching in rat pulmonary arterial vascular smooth muscles cells [J]. DNA Cell Biol, 2014, 33 (1):12-19.
- [2] 侯乐伟,廖明芳,景在平. SM22 $\alpha$  在血管平滑肌细胞中的作用[J]. 现代生物医学进展,2009,9(23):4553-4555.
- [3] Xu W, Guo T, Zhang Y, et al. The inhibitory effect of dexamethasone on platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell migration through up-regulating PGC-1 $\alpha$  expression [J]. Exp Cell Res, 2011, 317(8):1083-1092.
- [4] Wang Y H, Yan Z Q, Qi Y X, et al. Normal shear stress and vascular smooth muscle cells modulate migration of endothelial cells through histone deacetylase 6 activation and tubulin acetylation [J]. Ann Biomed Eng, 2010, 38(3):729-737.
- [5] Dong L H, Lv P, Han M. Roles of SM22 $\alpha$  in cellular plasticity and vascular diseases[J]. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets, 2012, 12(2):119-125.
- [6] Kim T R, Cho E W, Paik S G, et al. Hypoxia-induced SM22 $\alpha$  in A549 cells activates the IGF1R/PI3K/Akt pathway, conferring cellular resistance against chemo- and radiation therapy[J]. FEBS Lett, 2012, 586(4):303-309.
- [7] 陶丽丽,雷燕. 人参、三七、川芎提取物对血管平滑肌细胞衰老相关  $\beta$  半乳糖苷酶及 p16-cyclin D/CDK-Rb 通路的影响[J]. 中西医结合学报,2012,10(1):76-84.
- [8] Dantas A P, Jimenez-Altayo F, Vila E. Vascular aging: facts and factors[J]. Front Physiol, 2012, 3:325.
- [9] Gao H, Steffen M C, Ramos K S. Osteopontin regulates  $\alpha$ -smooth muscle actin and calponin in vascular smooth muscle cells[J]. Cell Biol Int, 2012, 36(2):155-161.
- [10] Fu Y, Liu H, Forsythe S, et al. Mutagenesis analysis of human SM22: characterization of actin binding [J]. J Appl Physiol, 2000, 89(5):1985-1990.
- [11] 赵思达,常春康. p53 与细胞衰老关系的研究进展[J]. 诊断学理论与实践,2014,13(6):636-639.
- [12] Qian Y, Chen X. Senescence regulation by the p53 protein family [J]. Methods Mol Biol, 2013, 965:37-61.

[责任编辑 周冰冰]