· 药理 ·

人参-三七-川芎提取物对高糖高脂诱导血管内皮细胞衰老的影响

王雪[1], 修成奎[1], 杨静[1], 方靖漪[2], 雷燕[1*]
(1. 中国中医科学院 医学实验中心, 北京 100700;
2. 广东药科大学 中医药研究院广东省代谢性疾病中西医结合研究中心, 广州 510006)

[摘要] **目的:**观察益气活血中药人参、三七、川芎提取物延缓高糖高脂诱导的血管内皮细胞衰老的分子生物学机制。**方法:**采用 40 mmol·L^{-1}葡萄糖和 100 μmol·L^{-1}棕榈酸钠造模,实验分为空白组、模型组和中药低、中、高剂量组(50,100,200 mg·L^{-1}),干预 48 h。采用细胞增殖与活性检测(CCK-8)检测细胞增殖能力;细胞衰老 β-半乳糖苷酸(SA-gal)染色检测细胞衰老程度;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测细胞 p16,p21 蛋白表达水平的变化;免疫荧光检测 p-H2A.X(Ser139)表达,线粒体 ROS(mtROS)产生和线粒体膜电位(MMP)改变。**结果:**与空白组比较,模型组细胞增殖能力及 MMP 水平降低($P<0.01$),SA-β-gal 蓝染细胞数量,mtROS 生成和 p16,p21,p-H2A.X(Ser139)表达增加($P<0.05$,$P<0.01$);而与模型组比较,人参-三七-川芎提取物可提高细胞增殖能力和 MMP 水平($P<0.01$),减少 SA-β-gal 蓝染细胞数量和 mtROS 生成($P<0.01$),并能够降低 p16,p21 和 p-H2A.X(Ser139)的表达水平($P<0.05$,$P<0.01$)。**结论:**益气活血中药人参-三七-川芎提取物能够延缓高糖高脂引起的血管内皮细胞衰老,其机制可能与升高线粒体膜电位,减少 ROS 生成引起的 DNA 损伤累积有关。

[关键词] 益气活血药; 人参-三七-川芎提取物; 血管内皮; 细胞衰老
[中图分类号] R2-0;R22;R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2019)01-0124-06
[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190125
[网络出版地址] http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181015.1733.016.html
[网络出版时间] 2018-10-17 15:25

Interventional Effect and Mechanism of Extract of Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma on Vascular Endothelial Cellular Senescence Induced by High Glucose and High Fat

WANG Xue[1], XIU Cheng-kui[1], YANG Jing[1], FANG Jing-yi[2], LEI Yan[1*]
(1. *Medical Experiment Center*, *China Academy of Chinese Medical Sciences*, *Beijing* 100700, *China*;
2. *Chinese Medicine Research Institute of Guangdong Pharmaceutical University*, *Guangdong Research Center for Integrative Medicine in Metabolic Diseases*, *Guangzhou* 510006, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To explore the mechanism of extract of Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma in delaying the senescence of vascular endothelial cells induced by high glucose and high fat. **Method**: The 40 mmol·L^{-1} glucose and 100 μmol·L^{-1} palmitate were used to induce endothelial cell senescence. The experiment was divided into control group, model group and low, medium and high-dose traditional Chinese medicine groups (50, 100, 200 mg·L^{-1}). The intervention lasted for 48 h. Cell proliferation was detected by cell counting kit-8 (CCK-8); cell senescence was detected by senescence

[收稿日期] 20180709(007)
[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81673822),中国中医科学院自主选题(ZZ2017011)
[第一作者] 王雪,在读博士,从事中西医结合心血管病相关研究,E-mail:wx20087278@163.com
[通信作者] *雷燕,首席研究员,博士生导师,从事中西结合心血管方向研究,Tel:010-64089556,E-mail:13651217893@163.com

β-galactosidase staining; p16 and p21 protein expression levels were detected by Western blot; p-H2A.X (Ser139) expression, mitochondria ROS (mtROS) production and changes in mitochondrial membrane potential (MMP) were detected by immunofluorescence. **Result**: Compared with the control group, in model group, the cell proliferation ability and the number of SA-β-gal blue-stained cells decreased ($P < 0.01$), while the mtROS production and the expressions of p16, p21 and p-H2A.X (Ser139) increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, extract of Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma can increase cell proliferation and MMP levels ($P < 0.01$), and reduce the number of SA-β-gal blue-stained cells, the mtROS production, and expression levels of p16, p21 and p-H2A.X (Ser139) ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion**: The above results suggest that extract of Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma delay of endothelial cellular senescence induced by high glucose and high fat, and its mechanism may be related to increasing mitochondrial membrane potential and reducing DNA damage accumulation caused by ROS production.

[**Key words**] replenishing Qi and activating blood circulation medicine; extract of Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma; vascular endothelium; cell senescence

2 型糖尿病是以高血糖和脂代谢异常为特征的慢性代谢性疾病,已成为严重威胁人类健康的疾病之一[1]。流行病学研究表明,心血管疾病是糖尿病的主要并发症,是糖尿病患者致死的首要原因,约 60% 的糖尿病患者死于心血管并发症。内皮功能紊乱是导致糖尿病心血管并发症的主要原因,血管内皮细胞衰老在其中发挥关键作用。体内外高糖、高脂环境通过氧化应激和炎症反应诱导内皮细胞衰老[2],随之获得衰老相关分泌表型[3-4],活化和分泌大量炎症细胞因子[5-6],促进血管慢性炎症扩散、单核细胞累积和血栓形成[7-9],加速血管内皮功能紊乱和糖尿病心血管并发症形成[10]。

人参、三七、川芎属于益气活血中药范畴,药理学研究显示其有效成分均有较好的抗衰老功效,且还有扩张血管、逆转动脉粥样硬化斑块、保护血管内皮细胞、调节血管活性物质以及促进血管新生等作用[11-14]。目前研究多集中在高糖或高脂导致的血管内皮功能紊乱或者损伤。本课题组在前期研究的基础上,通过构建高糖高脂诱导的血管内皮细胞衰老模型,探讨人参-三七-川芎提取物能否延缓细胞衰老,为糖尿病及心血管并发症的治疗提供新思路。

1 材料

1.1 细胞 人主动脉内皮细胞(human aortic endothelial cells, HAEC)批号 6100,购自美国 Sciencell 公司。

1.2 药物及试剂 人参、三七、川芎合剂冻干粉由北京因科瑞斯医药科技公司制备提供。药物为道地药材,按 2∶3∶4 比例破碎成粗粉,经过醇提、浓缩、真空减压制成干膏粉,最终每克冻干粉相当于生药 4.286 g,使用时以杜氏磷酸盐缓冲液(DPBS)配制成 10 $g \cdot L^{-1}$ 的贮存液,以 0.22 μm 的滤器过滤分装,保存于 -20 ℃ 冰箱中。内皮细胞培养基、胎牛血清、内皮细胞生长因子、青霉素/链霉素溶液、胰酶消化液、细胞冻存液(美国 Sciencell 公司,批号分别为 1001,0025,1052,0503,0103,0133);*D*-葡萄糖,棕榈酸钠(美国 Sigma 公司,批号分别为 SLBR0902V, SLBV2022);无脂肪酸 BSA(d-BSA)(北京索莱宝科技有限公司,批号 1206F052);细胞活性和细胞增殖检测(CCK-8)试剂盒(日本同仁化学研究所,批号 LG615);细胞衰老 β-半乳糖苷酶(SA-β-gal)检测试剂盒,线粒体膜电位(MMP)检测 JC-1 染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为 C0602,C2006);JC-1,MitoSOX RED 荧光探针(美国 Thermo 公司,批号分别为 1904328,1906247);p-H2A.X(Ser139)兔单克隆抗体(美国 CST 公司,批号 9718);p21 兔单克隆抗体,p16 兔单克隆抗体,β-肌动蛋白(β-actin)多克隆抗体,山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(Alexa Flour488)(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab109199,ab51243,ab16039,ab1500777);辣根酶标记山羊抗兔 IgG(H + L)(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 ZB-2301)。

1.3 仪器 AE2000 型倒置相差显微镜及成像系统(中国麦克奥迪实业集团有限公司);Forma 370 型细胞培养箱(美国 Thermo 公司);Synergy H1 型全自动酶标仪(美国 Bio-Tek 公司);FV1000 型激光共聚焦显微镜(日本 Olympus 公司);Mini-PROTEAN Tetra Cell 型电泳槽系统,PowerPac universal power supply 型通用电泳仪电源,Trans-blot sp cell 型半干

转印槽(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 HAEC 细胞培养 HAEC 细胞培养于含 5% 胎牛血清、内皮生长因子、青霉素/链霉素(100 U·L^{-1}/100 mg·L^{-1})的完全培养基,于饱和适度的 5% CO_2 培养箱 37 ℃培养,2 ~ 3 d 换液 1 次。培养至细胞融合度在 80% ~90% 左右,按照 1∶2 或 1∶3继续传代培养。棕榈酸钠溶于 DPBS(95 ℃助溶)配成 20 mmol·L^{-1}溶液,将 d-BSA 按质量/体积溶于 DPBS(55 ℃助溶)配成 20% d-BSA 溶液,将棕榈酸钠趁热加入到等体积的 d-BSA 中,配成 10 mmol·L^{-1}的棕榈酸钠(含 10% d-BSA)存储液,4 ℃保存备用。

2.2 高糖高脂诱导细胞衰老模型建立及分组 高糖/高脂培养基模拟 2 型糖尿病状态,本实验用不同浓度 *D*-葡萄糖和棕榈酸钠诱导 HAEC 衰老,根据文献报道[15],结合前期预实验结果细胞形态、细胞增殖能力、细胞衰老染色检测评估细胞衰老程度,筛选出高糖高脂诱导细胞衰老的最佳造模浓度,然后用不同质量浓度人参-三七-川芎提取物处理细胞。实验分为空白组、模型组(40 mmol·L^{-1}葡萄糖 + 100 μmol·L^{-1}棕榈酸钠)和人参-三七-川芎低、中、高剂量组(50,100,200 mg·L^{-1}),药物均用 ECM 完全培养基稀释,干预 48 h。

2.3 指标检测

2.3.1 细胞增殖能力检测 本研究采用 CCK-8 检测细胞增殖能力。细胞 5 × 10^3 个/孔接种于 96 孔板,每组设立 6 个复孔,待细胞贴壁后,每组进行相应的处理,处理 48 h 后,向每孔内加入 CCK-8 液 10 μL,置于 37 ℃培养箱中孵育 2 ~ 3 h,于450 nm处检测吸光度 *A*。

2.3.2 SA-*β*-gal 染色观察细胞增殖情况 待测细胞以 2 × 10^4 个/孔接种于 24 孔板中,细胞贴壁后,吸除细胞培养液,用 DPBS 洗涤 1 次,每孔加入 SA-*β*-gal染色固定液 250 μL,室温固定 15 min 后,吸除细胞固定液,用 DPBS 洗涤细胞 3 次,每孔加入染色工作液 250 μL,置于无 CO_2 的 37 ℃培养箱中孵育过夜。倒置光学显微镜下观察并计数,计算蓝染细胞数量占视野内总细胞量的比例。

2.3.3 免疫荧光检测细胞 DNA 双链损伤情况 根据实验设计各组细胞进行相应处理后,吸除培养液,DPBS 清洗 2 遍,每次 5 min,4% 多聚甲醛常温固定 15 min,DPBS 清洗 3 遍,每次 5 min;再用 0.1% Tritonx-100 通透 10 min,DPBS 清洗 3 遍;加入 5% BSA 封闭液 37 ℃封闭 1 h;弃去封闭液后加入 p-H2A.X 一抗(1∶500 稀释),4 ℃过夜;次日用 DPBS 清洗 3 遍后,加入荧光标记二抗(1∶1 000 稀释),37 ℃避光孵育 1 h;DPBS 清洗 3 遍,加 DAPI 室温孵育 5 min;DPBS 清洗 3 遍,加 DPBS 置于共聚焦显微镜下观察。

2.3.4 线粒体 ROS(mtROS)检测 采用 Mito SOX RED 荧光染色法测定细胞内 mtROS 水平。细胞进行相应处理后,DPBS 清洗 2 遍,按照 mtROS 检测说明书加入 MitoSOX RED 荧光探针 5 μmol·L^{-1},37 ℃避光孵育 10 min,DPBS 清洗 2 遍,置于共聚焦显微镜下观察。

2.3.5 MMP 检测 MMP 检测是以 JC-1 为荧光探针,能快速灵敏地检测细胞内 MMP 变化。细胞进行相应处理后,加入等体积的细胞培养液和 JC-1 染色工作液,37 ℃避光孵育 20 min,预冷的 JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次,置于共聚焦显微镜下观察并记录结果。正常情况下,细胞的 MMP 较高,JC-1 荧光探针聚集在线粒体的基质中,形成聚合物,可以产生红色荧光;当 MMP 降低时,JC-1 荧光探针不能聚集在基质中,不能形成聚合物,产生绿色荧光。

2.3.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测衰老相关蛋白 p16,p21 蛋白的表达 按照 RIPA 蛋白抽提试剂说明提取各组总蛋白,经 BCA 法测定蛋白含量后调整蛋白浓度,加入 5 × SDS 上样缓冲液,99 ℃变性 5 min;12% SDS-PAGE 电泳后半干转印至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,一抗(1∶2 000)4 ℃过夜;TBST 清洗 3 次,每次 5 min,二抗(1∶3 000)室温孵育 1 h;TBST 清洗 3 次,每次 5 min,化学发光法(ECL)显示目的条带。采用 Image Lab 图像分析系统对条带灰度值进行分析,并以 *β*-actin 为内参照。

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

3 结果

3.1 对 HAEC 细胞增殖能力的影响 通过各组 CCK-8 检测比较发现,与空白组比较,高糖高脂干预 48 h 可显著抑制血管内皮细胞的增殖($P < 0.01$);与模型组比较,人参-三七-川芎提取物组可显著促进细胞的增殖,并且呈剂量依赖性升高($P < 0.01$)。见表 1。

3.2 对 HAEC 细胞衰老 SA-*β*-gal 染色的影响 各组 SA-*β*-gal 细胞衰老染色比较,高糖高脂模型组 SA-*β*-gal 蓝色染色比例显著增加($P < 0.01$);50,

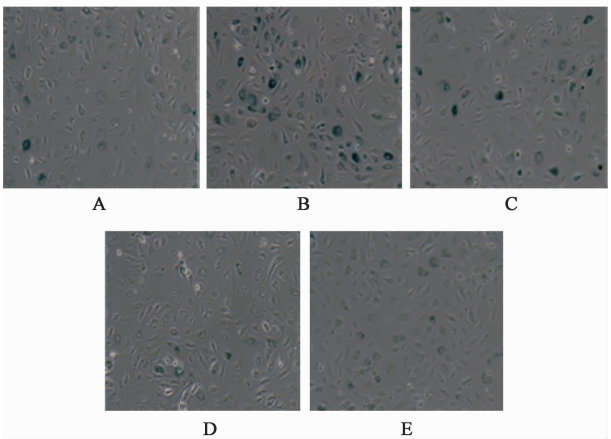
表 1　人参-三七-川芎提取物对 HAEC 细胞增殖能力的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 1　Effect of extract of Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma on HAECcell viability($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	质量浓度/mg·L^{-1}	细胞增殖能力(A)
空白	–	0.91 ± 0.03
模型	–	0.67 ± 0.02$^{2)}$
人参-三七-川芎提取物	50	0.84 ± 0.05$^{4)}$
	100	0.89 ± 0.04$^{4)}$
	200	1.00 ± 0.03$^{4)}$

注:与空白组比较$^{1)}$ $P<0.05$, $^{2)}$ $P<0.01$;与模型组比较$^{3)}$ $P<0.05$, $^{4)}$ $P<0.01$(表 2,3 同)。

100,200 mg·L^{-1}人参-三七-川芎提取物处理后均可显著减低 SA-β-gal 蓝色染色的阳性比例($P<0.01$)。见图 1,表 2。



A. 空白组;B. 模型组;C. 人参-三七-川芎提取物低剂量组;D. 人参-三七-川芎提取物中剂量组;E. 人参-三七-川芎提取物高剂量组(图 2 同)

图 1　人参-三七-川芎提取物对 HAEC 细胞 SA-β-gal 染色的影响(SA-β-gal, ×200)

Fig. 1　Effect of extract of Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma on SA-β-gal staining of HAEC(SA-β-gal staining, ×200)

3.3　对 HAEC 衰老相关蛋白 p16,p21 蛋白的影响　与空白组比较,模型组 HAEC p16,p21 蛋白含量明显升高($P<0.05$,$P<0.01$);与模型组比较,益气活血人参-三七-川芎提取物组中 p16,p21 蛋白表达含量明显下降($P<0.05$,$P<0.01$)。见图 2,表 3。

3.4　对 HAEC DNA 双链损伤的影响　为了进一步探索高糖高脂诱导细胞衰老的具体机制及人参-三七-川芎提取物的干预作用,本实验选择人参-三七-川芎提取物最佳剂量 200 mg·L^{-1}进行后续研究。H2A.X 是 DNA 双链损伤的生物标记物,参与多种因素诱导的细胞衰老过程。激光免疫共聚焦显微镜观察结果显示,高糖高脂组内 p-H2A.X(Ser139)表达水平较正常组细胞增高;与模型组比较,人参-三七-川芎提取物处理 48 h 后,可明显降低细胞内 p-H2A.X(Ser139)的水平。见图 3。

表 2　益气活血药对 HAEC SA-β-gal 染色的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2　Effect of extract of Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma on SA-β-gal staining of HAEC($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	质量浓度/mg·L^{-1}	SA-β-gal 阳性染色率/%
空白	–	3.24 ± 0.53
模型	–	30.26 ± 4.40$^{2)}$
人参-三七-川芎提取物	50	10.13 ± 0.44$^{4)}$
	100	5.70 ± 0.47$^{4)}$
	200	4.82 ± 1.19$^{4)}$

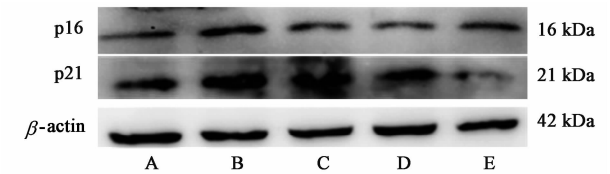


图 2　HAEC 衰老相关蛋白 p16,p21 蛋白表达电泳

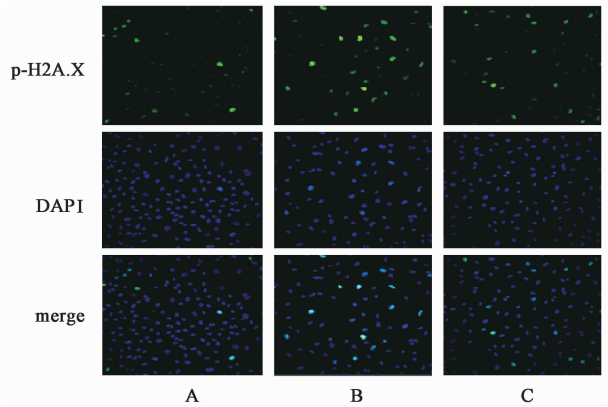
Fig. 2　Electrophoresis of protein p16 expression and p21 of HAEC

表 3　人参-三七-川芎提取物对 HAEC 衰老相关蛋白 p16,p21 的影响($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Table 3　Effect of extract of Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma on senescence-associated protein p16 and p21 of HAEC($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

组别	质量浓度/mg·L^{-1}	p16/β-actin	p21/β-actin
空白	–	1.83 ± 0.22	1.43 ± 0.32
模型	–	2.66 ± 0.27$^{2)}$	2.33 ± 0.52$^{1)}$
人参三七川芎提取物	50	1.90 ± 0.38$^{4)}$	1.80 ± 0.40
	100	1.98 ± 0.447$^{3)}$	1.81 ± 0.25
	200	1.72 ± 0.43$^{4)}$	1.59 ± 0.20$^{3)}$

3.5　对 HAEC mtROS 和 MMP 的影响　为了进一步探索人参-三七-川芎提取物延缓高糖高脂诱导内皮细胞衰老的机制,本研究检测线粒体膜电位和 mtROS 的生成。结果显示高糖高脂刺激可导致 mtROS 生成增加,人参-三七-川芎提取物干预后可减低细胞内 mtROS 含量,见图 4;与正常组比较,模型组红色荧光比例明显下降,人参-三七-川芎提取



A. 空白组;B. 模型组;C. 人参-三七-川芎提取物组(200 mg·L^{-1})(图 4,5 同)

图 3　人参-三七-川芎提取物对 HAEC DNA 双链损伤的影响

Fig. 3　Effect of extract of Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma on double-stranded DNA of HAEC

物组红/绿荧光比例升高,提示高糖高脂可降低线粒体膜电位水平,人参-三七-川芎提取物干预可提高线粒体膜电位水平,见图 5。

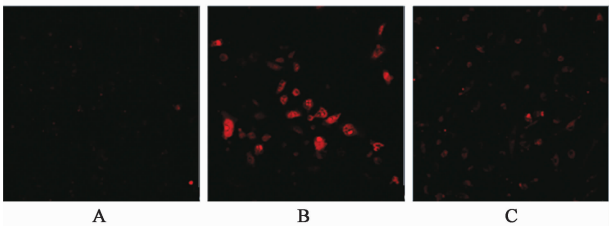


图 4　人参-三七-川芎提取物对 HAEC 线粒体 ROS 的影响

Fig. 4　Effect of extract of Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma on mitochondrial ROS of HAEC

4　讨论

血管内皮细胞是血管系统与血液之间的重要屏障,通过合成和释放多种活性物质调节血管功能,在维持血管稳态中发挥重要作用。越来越多证据表明,血管内皮细胞衰老在内皮功能失常及相关性血管疾病中发挥重要作用[2,16]。糖尿病患者长期处于糖脂代谢紊乱的状态,高糖和高脂刺激可导致血管内皮细胞不断分裂而进入衰老期,造成血管内皮完整性丧失和功能紊乱,促进血管并发症的形成[17-18]。本研究采用葡萄糖联合棕榈酸共同处理 HAEC 细胞后,证实了高糖高脂环境可加速血管内皮细胞的衰老进程,表现在细胞增殖能力下降,SA-β-gal 蓝染比例增加和细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 p16 和 p21 表达水平升高。

中医理论认为气血是构成人体的最基本物质,

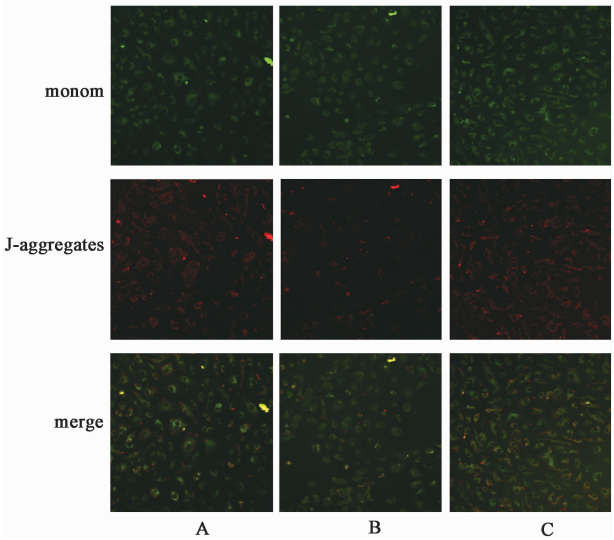


图 5　人参-三七-川芎提取物对 HAEC 线粒体膜电位的影响

Fig. 5　Effect of extract of Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma on mitochondrial membrane potential of HAEC

是脏腑经络等组织器官进行生理活动的物质基础。气血虚衰,血脉不通是衰老的危险因素,如《黄帝内经·灵枢·天年篇》曰:“血气虚,脉不通,真邪相攻,乱而相引,故中寿而尽也”,其认为机体气血旺盛,循环不息则健康长寿,反之则早夭。中药人参、三七、川芎属于益气活血中药的范畴,在心脑血管疾病的中医治疗中被广泛的应用。3 味中药联合应用,则可达到益气活血、通脉活络、延年益寿的功效。本研究结果显示,益气活血药各组均可以促进细胞增殖,减少 SA-β-gal 蓝染细胞数量,并降低 p16 和 p21 表达水平,提示益气活血药有效延缓高糖高脂诱导的内皮细胞衰老,可能为糖尿病及心血管并发症的治疗提供有效的方法。

研究表明,线粒体是细胞内 ROS 产生的主要场所,诸多因素如钙离子超载、氧化应激过度、能量耗竭都会造成线粒体受损,加速细胞内 ROS 的累积,过量的 ROS 能直接损伤 DNA,使 DNA 链聚积、烷化断裂,导致基因序列改变、基因突变,加速细胞的衰老[19-22]。实验结果显示,葡萄糖和棕榈酸处理 48 h 后,内皮细胞线粒体膜电位水平下降,mtROS 生成增加,并伴随 DNA 双链损伤的生物标记物 p-H2A.X 表达的增加,表明高糖高脂刺激损伤了内皮细胞的线粒体,加速细胞内 ROS 的生成,造成了 DNA 损伤累积,成为诱导内皮细胞衰老的主要原因。而与高脂高糖模型组比较,益气活血药组细胞内线粒体膜电位水平升高,mtROS 生成减少,p-H2A.X 表达水平下降。以上结果提示,人参-三七-川芎提取物可能

是通过保护线粒体,减少 ROS 引起 DNA 的损伤累积,从而达到延缓内皮细胞衰老的作用。

综上所述,益气活血中药人参-三七-川芎提取物能够延缓高糖高脂引起的血管内皮细胞衰老,其机制可能与升高线粒体膜电位,减少 ROS 生成引起的 DNA 损伤累积有关,这为 2 型糖尿病及心血管并发症的治疗提供新的治疗思路。

[参考文献]

[1] Guariguata L, Whiting D R, Hambleton I, et al., Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2014, 103(2): 137-149.

[2] 梅颖,吴利春,刘朝奇. 高糖高脂诱导内皮细胞衰老的实验研究[C]//中国生物化学与分子生物学会. 全国学术会议论文集. 杭州,2016:149.

[3] Ungvari Z, Kaley G, De Cabo R, et al. Mechanisms of vascular aging: new perspectives[J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2010, 65(10): 1028-1041.

[4] Rodríguezmañas L, Elassar M, Vallejo S, et al. Endothelial dysfunction in aged humans is related with oxidative stress and vascular inflammation[J]. Aging Cell, 2009, 8(3):226-238.

[5] Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld L C, et al. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network[J]. Cell, 2008, 133(6):1019-1031.

[6] Acosta J C, O'Loghlen A, Banito A, et al. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. [J]. Cell, 2008, 133(6):1006-1018.

[7] Prattichizzo F, De N V, La S L, et al. "Inflammaging" as a druggable target: a senescence-associated secretory phenotype—centered view of type 2 diabetes[J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, doi:10.1155/2016/1810327.

[8] Perticone F, Maio R, Tassone J E, et al. Interaction between uric acid and endothelial dysfunction predicts new onset of diabetes in hypertensive patients[J] Int J Cardiol, 2013, 167(1):232-236.

[9] Arunachalam G. SIRT1 regulates hyperglycemia-induced vascular senescence [J]. Le Journal De Physique Colloques, 2011, 2011(35):BMP27.

[10] 杨晓春,鲍陶陶,储全根. 基于 p38MAPK 通路探讨丹蛭降糖胶囊对 2 型糖尿病模型大鼠血管病变的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(3):116-120.

[11] 王强,雷燕,杨静,等. 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[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(10):123-127.

[12] 修成奎,雷燕,王强,等. 人参三七川芎提取物对复制性衰老血管平滑肌细胞 SM22α 蛋白的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(11):102-106.

[13] 赖小华,雷燕,杨静,等. 基于 microRNA-34a/SIRT1/p53 通路探讨三七皂苷 R_1 对血管内皮细胞衰老的影响[J]. 中国中药杂志,2018,43(3):577-584.

[14] 修成奎,雷燕,王强,等. 人参三七川芎提取物对复制性衰老血管平滑肌细胞骨架蛋白微丝的影响[J]. 中国中药杂志,2016,41(3):484-489.

[15] LIU N, WU J, ZHANG L, et al. Hydrogen sulphide modulating mitochondrial morphology to promote mitophagy in endothelial cells under high-glucose and high-palmitate[J]. J Cell Mol Med, 2017, 21(12): 3190-3203.

[16] Hayashi T, Matsui-Hirai H, Miyazaki-Akita A, et al. Endothelial cellular senescence is inhibited by nitric oxide: implications in atherosclerosis associated with menopause and diabetes[J]. Pro Natl Acad Sci USA, 2006, 103(45):17018-17023.

[17] Yokoi T, Fukuo K, Yasuda O, et al. Apoptosis signal-regulating kinase 1 mediates cellular senescence induced by high glucose in endothelial cell[J]. Diabetes, 2006, 55(6):1660-1665.

[18] Voghel G, Thorin-Trescases N, Farhat N, et al. Cellular senescence in endothelial cells from atherosclerotic patients is accelerated by oxidative stress associated with cardiovascular risk factors[J]. Mech Ageing Dev, 2007, 128(11):662-671.

[19] Balestrieri M L, Rienzo M, Felice F, et al. High glucose downregulates endothelial progenitor cell number via SIRT1[J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1784(6):936-945.

[20] Eringa E C, Serne E H, Meijer R I, et al. Endothelial dysfunction in (pre)diabetes: characteristics, causative mechanisms and pathogenic role in type 2 diabetes[J]. Rev Endocr Metab Disord, 2013, 14(1):39-48.

[21] Erusalimsky J D. Vascular endothelial senescence: frommechanisms to pathophysiology [J]. J Appl Physiol, 2008, 106(1): 326-332.

[22] 范婧尧,陈宇,米雪楠,等. Angiotensin Ⅱ 和高血糖诱导血管内皮细胞衰老的协同作用机制[J]. 中国病理生理杂志,2012,28(11):2040-2041.

[责任编辑 周冰冰]