

人参-三七-川芎提取物对内皮微粒介导HUVECs衰老的干预作用

于博文^{1,2}, 胡艳红¹, 杨静¹, 修成奎¹, 王雪¹, 雷燕^{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. 中国中医科学院博士后科研流动站, 北京 100700)

[摘要] **目的:**观察人参-三七-川芎提取物对延缓内皮微粒(EMPs)诱导的血管内皮细胞衰老的影响,并探索其作用机制。**方法:**以人脐静脉内皮细胞(HUVECs)为研究对象,复制性衰老10~12代细胞作为衰老模型,实验分为年轻组(2~4代细胞)、衰老组(10~12代细胞)、单纯EMPs干预组(提取衰老细胞产生的EMPs来干预年轻细胞)以及中药低、中、高剂量组(200,300,400 mg·L⁻¹)。结合衰老相关 β 半乳糖苷酶(SA- β -gal)染色法和碘化丙啶(PI)单染法检测细胞周期来判断细胞衰老程度。采用细胞活性和细胞增殖检测(CCK-8)法筛选给药浓度,两步离心法分离出EMPs,藻红蛋白(PE) CD31抗体或异硫氰酸荧光素(FITC) Annexin V标记分离得到的EMPs,并用流式细胞术进行定量,2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(DCFDA)染色检测细胞内活性氧(ROS)水平。**结果:**与衰老组比较,中药给药组可显著降低衰老细胞SA- β -gal活性($P<0.01$),使细胞周期S期阻滞得到恢复($P<0.01$),并降低衰老细胞分泌CD31⁺ EMPs及Annexin V⁺ EMPs的数量($P<0.05$)。与年轻组比较,单纯EMPs干预组可诱导年轻细胞SA- β -gal活性增强($P<0.01$),细胞周期阻滞于S期($P<0.05$),与衰老组比较,但在EMPs干预的同时给予中药干预后,可明显抑制EMPs介导增强的SA- β -gal活性($P<0.05$),并使S期阻滞得到恢复。中药组还可明显抑制EMPs诱导的细胞内ROS增高($P<0.05, P<0.01$)。**结论:**人参-三七-川芎提取物可通过影响EMPs延缓复制性血管内皮细胞衰老,其机制可能与抑制EMPs诱导的细胞内ROS水平增高有关。

[关键词] 内皮微粒; 衰老; 人参-三七-川芎提取物; 活性氧(ROS); 人脐静脉内皮细胞(HUVECs)

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)08-0050-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210506

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210301.1029.001.html>

[网络出版日期] 2021-3-1 10:43

Effect of Ginseng Radix et Rhizoma-Notoginseng Radix et Rhizoma-Chuanxiong Rhizoma Extract on HUVECs Senescence Mediated by Endothelial Microparticles

YU Bo-wen^{1,2}, HU Yan-hong¹, YANG Jing¹, XIU Cheng-kui¹, WANG Xue¹, LEI Yan^{1*}

(1. Beijing Key Laboratory of Research of Chinese Medicine on Prevention and Treatment for Major Diseases, Medical Experiment Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. Center for Post-doctoral Studies, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Ginseng Radix et Rhizoma-Notoginseng Radix et Rhizoma-Chuanxiong Rhizoma extract on endothelial microparticles (EMPs)-induced vascular endothelial cell senescence, and explore the possible mechanism. **Method:** Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were used as the research objects, and the aged model was established with 10-12 passages of replicative senescence cells. The experimental cells were divided into young group (2-4 passage cells), aged group (10-12

[收稿日期] 20201210(005)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81673822);中国中医科学院院级自主选题(ZZ2019014)

[第一作者] 于博文,博士,在站博士后,从事中西医结合心血管病研究,E-mail:yubowenbucm@qq.com

[通信作者] *雷燕,博士,研究员,从事中西医结合心血管病研究,Tel:010-64089556,E-mail:13651217893@163.com

passage cells), only EMPs intervention group (extract EMPs produced by aged cells to intervene young cells) and low dose, middle dose and high dose drug intervention groups (200, 300, 400 mg·L⁻¹). Senescence related β -galactosidase (SA- β -gal) staining and cell cycle propidium iodide (PI) staining were used to determine cell senescence. Cell counting kit-8 (CCK-8) assay was used to screen the drug concentration. EMPs were extracted by two-step centrifugation, EMPs labeled with phycoerythrin (PE) anti-human CD31 antibody or fluorescein isothiocyanate (FITC) annexin V were detected by flow cytometry, intracellular reactive oxygen species (ROS) were detected by 2', 7'- dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) staining. **Result:** After treatment with the drug, SA- β -gal activity of the aged cells significantly decreased ($P<0.01$), the S phase arrest was restored ($P<0.01$), and the number of CD31⁺ EMPs and annexin V⁺ EMPs secreted by aged cells decreased ($P<0.05$). Compared with the young group, only EMPs intervention group could induce increased SA- β -gal activity and S phase arrest in young cells ($P<0.05, P<0.01$). However, after intervention of EMPs and the drug, EMPs-mediated increase of SA- β -gal activity was significantly inhibited and S phase arrest was restored ($P<0.05$). The increase of intracellular ROS induced by EMPs was also significantly inhibited by the drug ($P<0.05, P<0.01$). **Conclusion:** Ginseng Radix et Rhizoma-Notoginseng Radix et Rhizoma-Chuanxiong Rhizoma extract can delay the senescence of vascular endothelial cells by influencing EMPs, and the mechanism may be related to the inhibition of increased intracellular ROS induced by EMPs.

[Key words] endothelial microparticles; senescence; Ginseng Radix et Rhizoma-Notoginseng Radix et Rhizoma-Chuanxiong Rhizoma extract; reactive oxygen species (ROS); human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)

我国是全球老龄人口最多的国家,预计到2025年老龄人口将突破3亿,开展延缓衰老的研究对健康事业意义重大^[1]。心血管疾病、糖尿病等与衰老密切相关的疾病,都存在血管老化的病理改变,而血管内皮细胞衰老是血管老化的重要特征^[2-3]。近年来,内皮微粒(EMPs)在衰老以及血管性疾病中的作用引起了学者们的重视。EMPs是从激活或损伤的内皮细胞上脱落的微小囊泡,其直径约0.1~1 μm ,含有胞浆,膜蛋白, RNA 和微小 RNA (miRNA),具有母体细胞来源的膜磷脂结构及蛋白质成分,并携带有母体细胞源的膜表面分子标记物^[4]。EMPs可参与细胞间信息传递及各种病理过程^[5-6],是反映内皮损伤及内皮功能障碍的新标记物^[7]。

本课题组一直致力于益气活血中药人参-三七-川芎提取物延缓血管老化的研究,明确了人参-三七-川芎提取物延缓血管老化的干预疗效及部分关键作用机制,如抗氧化应激、抗血管紧张素 II (Ang II) 干预等^[8-10],但尚未涉及人参-三七-川芎提取物对 EMPs 的作用及机制。本研究以复制性人脐静脉内皮细胞(HUVECs)衰老为模型^[11],探索 EMPs 对 HUVECs 衰老的影响及人参-三七-川芎提取物的干预作用,为进一步研究人参-三七-川芎提取物延缓血管老化提供实验依据。

1 材料

1.1 药物 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,单味药成分检测符合药典的规定和标准,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1 g冻干粉相当于生药4.286 g^[12]。使用时用磷酸盐缓冲液(PBS)配制成10 g·L⁻¹的贮存液,用0.22 μm 的滤器过滤分装,保存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。

1.2 细胞 HUVECs购自美国ScienCell公司(批号8000)。

1.3 试剂 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/乙二胺四乙酸(EDTA)消化液0.05%,细胞冻存液,磷酸盐缓冲液(美国ScienCell公司,批号分别为1001, 1001-prf, 0500, 1052, 0503, 0183, 0133, 0303);细胞活性和细胞增殖检测(CCK-8)试剂盒(同仁化学研究所,批号LG615);细胞衰老C12FDG lacZ基因表达试剂盒, CountBright Absolute Counting Beads (美国Molecular Probes公司,批号分别为I-2904, C36950);细胞周期碘化丙啶(PI)/RNase染色缓冲液,异硫氰酸荧光素(FITC)Annexin V(美国BD公司,批号分别为550825, 556420);藻红蛋白(PE)人CD31抗体(美国Biolegend公司,批号303106);DCFDA细胞活性氧(ROS)检测试剂盒(美国

Abcam公司,批号 ab113851)。

1.4 仪器 AE2000型倒置相差显微镜及成像系统(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);Cytomics FC500型和 CytoFLEX LX型流式细胞仪,Optima L-100 XP型超速离心机(美国 Beckman 公司);Accuri C6型流式细胞仪(美国 BD 公司);Synergy H1型全自动酶标仪(美国 Bio-Tek 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养及传代 将 HUVECs 放于 37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养,当细胞密度在 90% 以上时传代。倒掉原培养基,杜氏磷酸盐缓冲液(DPBS)洗后加入胰酶/EDTA 消化液,等细胞皱缩变圆时中止消化,收集细胞并 1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min(离心半径 15.7 cm)。弃上清后重悬,按照 1:2 传代培养。

2.2 复制性衰老模型建立及分组 通过传代的方法将 HUVECs 培养至 10~12 代,建立复制性衰老模型^[11]。年轻内皮细胞(young ECs)采用第 2~4 代 HUVECs;衰老内皮细胞(aged ECs)采用第 10~12 代 HUVECs。实验分为年轻组(young ECs),衰老组(aged ECs),单纯 EMPs 干预组(EMPs+young ECs)以及人参-三七-川芎提取物低、中、高剂量组(200, 300, 400 mg·L⁻¹)。

2.3 CCK-8 法检测细胞增殖活力 将细胞以 5×10³ 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,药物作用 48 h 后,将孔板中原液体吸出,向每孔内加入用基础培养基稀释成含 10% CCK-8 的试剂液,置于 37 °C 培养箱中孵育 2~3 h,于酶标仪 450 nm 波长处检测吸光度 A。

2.4 细胞衰老 β-半乳糖苷酶(SA-β-gal)荧光染色检测衰老程度 将细胞接种于 6 孔板中培养至 80% 融合度,吸除原培养基,加入含氯喹 300 μmol·L⁻¹ 的培养基孵育 1 h,吸除后加入含 C₁₂ 的二-β-D-半乳糖苷糖苷(FDG) 33 μmol·L⁻¹ 的培养基孵育 1 h,吸除后用冷 DPBS 洗涤 1 次,消化细胞后用流式细胞仪检测荧光强度。

2.5 PI 单染法检测细胞周期 消化并收集细胞,500×g 离心 5 min,弃上清。将细胞悬液加入 70% 冷乙醇中,固定过夜。500×g 离心 5 min,弃上清。加入 PI/RNase 染色液 400 μL,充分混匀细胞,37 °C 孵育 15 min 后上流式细胞仪检测。

2.6 两步离心法分离出 EMPs 在无菌条件下,通过两步离心法从衰老细胞的培养基中收集 EMPs。在室温下 800×g 离心 15 min,去除细胞和细胞碎片;

然后在 13 000×g,4 °C 下离心 60 min,弃上清,用缓冲液或培养基重悬 EMPs 用于检测或干预。

2.7 流式细胞术检测 EMPs 数量 首先,对 EMPs 进行标记。取已制备好的 EMPs 悬浮液样本 50 μL,加入 5 μL PE CD31 抗体或 FITC Annexin V 孵育 15 min(加入 CD31 抗体的样本需在冰上孵育,加入 Annexin V 的样本需常温孵育),再加入 staining buffer 或 Annexin V binding buffer 400 μL 稀释待测。然后,用已知直径的标准微球对流式细胞仪进行尺寸校准,圈定 0.1~1 μm 范围的门;最后,在上机检测前向样本中加入已知浓度的标定珠,圈定相应的标定珠门,从而计数定量。计数算法为 A/B×C/D=EMPs 样品浓度/μL,A=EMP 事件数,B=标定珠事件数,C=指定批次的标定珠数量(标定珠数量/50 μL),D=样本体积(μL)。根据计数结果,对应地算出每组 EMPs 总量,在收取样本的同时对每组进行细胞计数。CD31⁺ EMPs 及 Annexin V⁺ EMPs 的统计结果为每 1×10³ 个细胞产生的 CD31⁺ EMPs 及 Annexin V⁺ EMPs 数量。计数定量后根据 CD31⁺ EMPs 样本浓度,稀释 EMPs 至 1×10⁴ 个/mL,并进行干预研究。

2.8 细胞内 ROS 检测 用不含酚红的完全培养基重悬细胞并接种于底部透明、四壁全黑的 96 孔板中,每孔 100 μL,待细胞贴壁后对各组进行相应的处理,并培养 24 h 或 48 h。在处理完成前 1 h 时,在处理培养基中将 DCFDA 稀释至 20 μmol·L⁻¹,并预热至 37 °C。处理完成前 45 min,直接向 96 孔板中加入 DCFDA 稀释液 100 μL,放回至培养箱中避光孵育 45 min 后,用酶标仪在 485 nm/535 nm 处读取终点,计算荧光强度。

2.9 统计学分析 采用 GraphPad Prism 7.0 软件进行统计分析,所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 Student's *t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 人参-三七-川芎提取物对 HUVECs 增殖活力的影响 与 aged ECs 组比较,药物质量浓度在 100~500 mg·L⁻¹ 时,细胞增殖能力显著升高(*P*<0.01)。药物质量浓度在 500 mg·L⁻¹ 时,其增强细胞活力的程度不如在 400 mg·L⁻¹ 时,因此高剂量干预质量浓度选择 400 mg·L⁻¹。人参-三七-川芎提取物低、中剂量干预质量浓度分别选择 200, 300 mg·L⁻¹。药物质量浓度在 600 mg·L⁻¹ 时,细胞增殖能力与未用药时无明显差异。而质量浓度为 800 mg·L⁻¹ 时,显著抑

制细胞增殖($P<0.01$)。本研究后续实验选择200, 300, 400 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为药物干预内皮细胞的低、中、高剂量。见表1。

3.2 人参-三七-川芎提取物对 aged ECs SA- β -gal 染色的影响

与 aged ECs 组比较, 人参-三七-川芎

表1 人参-三七-川芎对衰老 HUVECs 增殖能力的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)
Table 1 Effect of Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma (RSC) on cell viability of aged HUVECs ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞增殖能力/%
aged ECs		100.00 \pm 4.58
人参-三七-川芎提取物	100	116.00 \pm 4.91 ²⁾
	200	117.60 \pm 3.12 ²⁾
	300	116.60 \pm 3.53 ²⁾
	400	116.30 \pm 5.34 ²⁾
	500	108.30 \pm 2.67 ²⁾
	600	100.00 \pm 2.42
	800	51.88 \pm 6.21 ²⁾

注:与 aged ECs 组比较 ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ (表2, 4同)。

表3 人参-三七-川芎提取物对 aged ECs 48 h 后细胞周期的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of RSC on cell cycle of aged ECs treated with RSC for 48 h ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	G_0/G_1 期/%	S期/%	G_2/M 期/%
young ECs		63.97 \pm 1.76	24.44 \pm 0.77	11.60 \pm 1.39
aged ECs		52.00 \pm 2.78 ²⁾	31.86 \pm 4.78 ²⁾	16.12 \pm 4.90 ¹⁾
人参-三七-川芎提取物	200	72.44 \pm 1.33 ²⁾	19.94 \pm 3.22 ¹⁾	7.63 \pm 2.39
	300	73.51 \pm 3.64 ²⁾	20.02 \pm 5.57 ¹⁾	6.82 \pm 3.17 ²⁾
	400	73.86 \pm 6.31 ²⁾	21.20 \pm 5.34 ¹⁾	4.93 \pm 2.10 ²⁾

注:与 young ECs 组比较 ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

3.4 人参-三七-川芎提取物对 aged ECs 分泌 EMPs 分泌数量的影响

与 aged ECs 组比较, 人参-三七-

提取物显著降低 SA- β -gal 活性($P<0.01$)。见表2。

表2 人参-三七-川芎提取物对 aged ECs 48 h 后 SA- β -gal 活性的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Effect of RSC on SA- β -gal activity of aged ECs treated with RSC for 48 h ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	SA- β -gal 活性
aged ECs		1.00 \pm 0.02
人参-三七-川芎提取物	200	0.94 \pm 0.01 ²⁾
	300	0.88 \pm 0.02 ²⁾
	400	0.81 \pm 0.01 ²⁾

3.3 人参-三七-川芎提取物对 aged ECs 细胞周期的影响 与 young ECs 组比较, aged ECs 组的 S 期细胞所占百分比显著增高($P<0.01$), G_0/G_1 期细胞所占百分比显著降低($P<0.01$), G_2/M 期细胞所占百分比明显增高($P<0.05$), 即 aged ECs 周期阻滞于 S 期。药物干预 aged ECs 48 h 后, 与 aged ECs 比较, S 期细胞所占百分比明显减少($P<0.05$), 并且与 young ECs 组无明显差异。见表3。

表4 人参-三七-川芎提取物对 aged ECs 48 h 后 EMPs 分泌数量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of RSC on number of EMPs secreted by aged ECs after RSC intervention for 48 h ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	CD31 ⁺ EMPs	Annexin V ⁺ EMPs
aged ECs		553.30 \pm 71.93	200.30 \pm 102.00
人参-三七-川芎提取物	200	415.30 \pm 72.61 ¹⁾	57.33 \pm 20.98 ¹⁾
	300	427.00 \pm 31.32 ¹⁾	61.67 \pm 15.28 ¹⁾
	400	395.00 \pm 10.15 ¹⁾	46.33 \pm 10.07 ¹⁾

3.5 EMPs 诱导 young ECs 早衰及人参-三七-川芎提取物的干预作用 与 young ECs 组比较, SA- β -gal 活性显著增强($P<0.01$); 与 EMPs+young ECs 组比较, 人参-三七-川芎提取物低、中、高剂量组干预 48 h 后, SA- β -gal 活性明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)。见表5。

川芎提取物干预 aged ECs 48 h 后, CD31⁺ EMPs, Annexin V⁺ EMPs 数量明显降低($P<0.05$)。见表4。

3.6 EMPs 诱导 young ECs 细胞周期阻滞及人参-三七-川芎提取物的干预作用 与 young ECs 组比较, EMPs 干预 young ECs 48 h 后, S 期细胞所占百分比明显增高($P<0.05$); 与 EMPs+young ECs 组比较, 低、中、高剂量人参-三七-川芎提取物对 EMPs 诱导的 S 期阻滞情况差异无统计学意义, 并且各期细胞

表5 EMPs对 young ECs SA-β-gal活性的影响及人参-三七-川芎提取物的干预作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of EMPs on SA-β-gal activity of young ECs and intervention of RSC ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	SA-β-gal活性
young ECs		0.16±0.01
EMPs+young ECs		1.00±0.03 ²⁾
人参-三七-川芎提取物	200	0.90±0.02 ³⁾
	300	0.79±0.06 ⁴⁾
	400	0.56±0.03 ⁴⁾

注:与 young ECs组比较 ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01;与 EMPs+young ECs组比较 ³⁾P<0.05, ⁴⁾P<0.01(表6,7同)。

表6 EMPs对 young ECs细胞周期的影响及人参-三七-川芎提取物的干预作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Effect of EMPs on cell cycle of young ECs and intervention of RSC ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	G ₀ /G ₁ 期/%	S期/%	G ₂ /M期/%
young ECs		58.45±6.54	22.91±3.46	18.65±8.95
EMPs+young ECs		56.93±4.05	31.40±1.95 ¹⁾	14.17±8.49
人参-三七-川芎提取物	200	54.63±1.43	19.89±8.12	25.48±7.09
	300	56.61±1.82	17.88±9.99	25.53±8.75
	400	58.52±1.45	21.16±8.96	20.32±7.94

表7 EMPs对 young ECs内 ROS的影响及人参-三七-川芎提取物的干预作用 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 7 Effect of EMPs on intracellular ROS of young ECs and intervention of RSC ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	24 h ROS	48 h ROS
young ECs		11 703.00±191.30	9 467.00±343.60
EMPs+young ECs		16 977.00±820.40 ²⁾	13 883.00±1 106.00 ²⁾
人参-三七-川芎提取物	200	12 479.00±488.30 ⁴⁾	12 568.00±1 170.00
	300	12 146.00±518.60 ⁴⁾	12 684.00±1 598.00
	400	12 792.00±563.80 ⁴⁾	11 843.00±1 502.00 ³⁾

4 讨论

血管老化是人体衰老发生的关键性因素,在衰老研究中非常重要。多项研究表明,血管内皮细胞衰老是血管老化的重要病理改变,并且在内皮功能障碍及相关性血管疾病中发挥重要作用^[13]。

目前多项研究表明,EMPs是反映内皮损伤及内皮功能障碍的新标志物^[7],而内皮损伤及功能障碍又是内皮衰老的始动因素^[14-15],因此EMPs可能与内皮细胞衰老关系密切。RAITOHARJU等^[16]提出EMPs可通过多种分子途径影响血管衰老,从而调控动脉粥样硬化的早期和晚期阶段。DIEHL等^[17]证实微粒是miRNA的主要转运载体,由其母细胞进行特异性包装,并通过血液中循环的微粒将基因调节功能从微粒释放细胞转移到靶细胞上。

分布与 young ECs组差异无统计学意义。见表6。

3.7 EMPs对 young ECs内 ROS的影响及人参-三七-川芎提取物的干预作用 与 young ECs组比较,EMPs干预 young ECs 24 h及48 h后,细胞内 ROS水平均显著增高(P<0.01)。与 EMPs+young ECs组比较,不同剂量药物干预24 h后,均可显著抑制EMPs诱导的 ROS增高(P<0.01),并且可使细胞内 ROS恢复至与 young ECs组无显著差异。但在干预48 h后,仅高剂量的人参-三七-川芎提取物可明显抑制EMPs诱导的 ROS增高(P<0.05),而低、中剂量的人参-三七-川芎提取物仅有抑制 ROS增高的趋势。见表7。

而 miRNA 被报道可参与内皮细胞衰老的调控机制,影响内皮细胞和平滑肌细胞的血管反应性和血管重建^[16,18]。此外,研究表明微粒脱落增多与内皮功能障碍有关,而内皮功能障碍是衰老及血管性疾病的主要表现^[14-15]。因此,EMPs与内皮细胞衰老之间的关系值得深入研究。本研究将EMPs作为单一影响因素,干预内皮细胞,观察其对内皮细胞衰老的影响。

由于EMPs的表面含有磷脂酰丝氨酸分子及特异性抗原CD31分子,因此本研究分别采用磷脂结合蛋白Annexin V和CD31抗体对EMPs进行标记,应用流式细胞术对EMPs进行定量,证明了aged ECs分泌的EMPs显著增多。由于衰老会引起细胞体积增大、细胞周期改变以及pH依赖性β-半乳糖苷酶表达等^[19-20],本研究联合采用了SA-β-gal染色法

及细胞周期检测两种方式对衰老进行表征,用两步离心法分离制备出EMPs用于干预,证明了EMPs可诱导 young ECs 早衰,并导致细胞周期阻滞于S期。

益气活血是中医防治老年性疾病和心血管疾病最常用的治法之一,体现了标本兼顾、通补兼施的治疗法则,符合衰老气虚血瘀的病理状态。清·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”,因此,采用“益气活血”的药物配伍,方能发挥“化瘀而不伤正,益气而不留瘀”之效。中药人参、三七、川芎属于益气活血中药的范畴,广泛应用于心脑血管疾病的中医治疗中。药理学研究显示,上述3种中药的有效成分均具有较好的抗衰老功效,并且还具扩张血管、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^[21-22]。

本研究采用低、中、高剂量的人参-三七-川芎提取物对衰老组细胞进行干预,发现衰老组细胞的SA- β -gal活力随着药物浓度的增高而降低,即药物浓度越高,其延缓衰老的作用越强;在改善细胞周期方面,该药物可使衰老组细胞周期S期阻滞得到恢复;在影响细胞分泌EMPs方面,该药物可降低衰老组细胞分泌EMPs的数量。进一步,探究人参-三七-川芎提取物对EMPs所诱导的 young ECs 早衰的影响。发现药物浓度越高,其延缓EMPs介导的 young ECs 早衰的程度越强;并且,该药物还可使EMPs所诱导的S期阻滞情况得到恢复。

过量ROS是氧化应激的主要原因,既往研究表明,氧化应激是内皮细胞衰老的主要诱因,可介导Ang II诱导的血管内皮细胞早衰及复制性内皮细胞衰老^[23]。虽然ROS与内皮细胞衰老密切相关,然而EMPs是否通过ROS介导内皮细胞衰老尚不完全清楚。本研究明确了aged ECs产生的EMPs可诱导 young ECs 发生氧化应激。进一步,证明了人参-三七-川芎提取物的干预,抑制了EMPs诱导的细胞内ROS水平升高,这可能是该药物能够延缓EMPs介导 young ECs 早衰的原因。

综上所述,本研究发现细胞所分泌的EMPs会导致HUVECs早衰;益气活血中药人参-三七-川芎提取物不仅能够抑制衰老HUVECs分泌EMPs的数量,还可延缓EMPs介导的年轻HUVECs早衰,其机制可能与抑制EMPs诱导的细胞内ROS增高有关。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 杜玉慧. 中国人口老龄化时间空间分布及影响因素分析[D]. 郑州:郑州大学,2018.
- [2] VEERASAMY M, FORD G A, NEELY D, et al. Association of aging, arterial stiffness, and cardiovascular disease: a review [J]. *Cardiol Rev*, 2014,22(5): 223-232.
- [3] YUAN Q, HU C P, GONG Z C, et al. Accelerated onset of senescence of endothelial progenitor cells in patients with type 2 diabetes mellitus: role of dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 and asymmetric dimethylarginine [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015,458(4): 869-876.
- [4] CURTIS A M, EDELBERG J, JONAS R, et al. Endothelial microparticles: sophisticated vesicles modulating vascular function [J]. *Vasc Med*, 2013, 18(4): 204-214.
- [5] ZHOU H, SHI W, ZHOU B, et al. Tissue factor-factor VIIa regulates interleukin-8, tissue factor and caspase-7 expression in SW620 cells through protease-activated receptor-2 activation [J]. *Mol Med Rep*, 2010,3(2): 269-274.
- [6] RAUTOU P E, VION A C, AMABILE N, et al. Microparticles, vascular function, and atherothrombosis [J]. *Circ Res*, 2011,109(5): 593-606.
- [7] DENG F, WANG S, ZHANG L. Endothelial microparticles act as novel diagnostic and therapeutic biomarkers of diabetes and its complications: a literature review [J]. *Biomed Res Int*, 2016, doi: 10.1155/2016/9802026.
- [8] 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, doi:10.1155/2020/7151946.
- [9] 胡艳红. 益气活血药延缓糖尿病血管衰老及其并发症心脑血管老化的机制研究[D]. 北京:中国中医科学院, 2020.
- [10] 王佳丽,修成奎,杨静,等. 人参三七川芎提取物对高糖高脂诱导血管衰老小鼠肠道菌群的影响[J]. *中国中药杂志*, 2020,45(12): 2938-2946.
- [11] YI S, LIN K, JIANG T, et al. NMR-based metabolomic analysis of HUVEC cells during replicative senescence [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(4): 3626-3646.
- [12] 胡艳红,杨静,修成奎,等. 人参-三七-川芎提取物延缓高糖诱导的小鼠血管钙化的机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020,26(8): 13-20.

- [13] REGINA C, PANATTA E, CANDI E, et al. Vascular ageing and endothelial cell senescence: molecular mechanisms of physiology and diseases [J]. *Mech Ageing Dev*, 2016, 159: 14-21.
- [14] KARBACH S, WENZEL P, WAISMAN A, et al. eNOS uncoupling in cardiovascular diseases-the role of oxidative stress and inflammation [J]. *Curr Pharm Des*, 2014, 20: 3579-3594.
- [15] GUSTAFSON C M, SHEPHERD A J, MILLER V M, et al. Age- and sex-specific differences in blood-borne microvesicles from apparently healthy humans [J]. *Biol Sex Differ*, 2015, 6: 10.
- [16] RAITOHARJU E, LYYTIKAINEN L P, LEVULA M, et al. miR-21, miR-210, miR-34a, and miR-146a/b are up-regulated in human atherosclerotic plaques in the Tampere Vascular Study [J]. *Atherosclerosis*, 2011, 219 (1): 211-217.
- [17] DIEHL P, FRICKE A, SANDER L, et al. Microparticles: major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation [J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 93(4): 633-644.
- [18] STASZEL T, ZAPAŁA B, POLUS A, et al. Role of microRNAs in endothelial cell pathophysiology [J]. *Pol Arch Med Wewn*, 2011, 121: 361-366.
- [19] NASSRALLY M S, LAU A, WISE K, et al. Cell cycle arrest in replicative senescence is not an immediate consequence of telomere dysfunction [J]. *Mech Ageing Dev*, 2019, 179: 11-22.
- [20] NOREN HOOTEN N, EVANS M K. Techniques to induce and quantify cellular senescence [J]. *J Vis Exp*, 2017, doi: 10. 3791/55533.
- [21] 赖小华. 基于网络药理学初步探讨益气活血药延缓血管衰老的作用机制 [D]. 广州: 广东药科大学, 2018.
- [22] 刘长英, 周莉, 董兴鲁, 等. 益气活血逐瘀法治疗脑小血管病的理论探讨 [J]. *世界中医药*, 2021, 16(1): 134-136.
- [23] KHEMAIS-BENKHIAT S, IDRIS-KHODJA N, RIBEIRO T P, et al. The redox-sensitive induction of the local angiotensin system promotes both premature and replicative endothelial senescence: preventive effect of a standardized crataegus extract [J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2016, 71 (12) : 1581-1590.

[责任编辑 周冰冰]