

人参皂苷 Rb1 通过 Sirt3/SOD2 通路延缓高糖诱导的人脐静脉内皮细胞衰老

柯世业¹, 石光耀¹, 刘定辉^{1,2}, 吴琳¹, 温仁辉¹, 朱洁明¹, 钱孝贤^{1,2}
(中山大学 1. 附属第三医院心血管内科, 2. 中西医结合研究所, 广东 广州 510630)

摘要:【目的】本研究拟探讨人参皂苷 Rb1 通过调节沉默信息调节因子 3/超氧化物歧化酶 2(Sirt3/SOD2) 通路延缓高糖诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)衰老的作用和机制。【方法】建立高糖(40 mmol/L 葡萄糖)诱导的 HUVEC 早熟性衰老模型, 根据衰老相关 β -半乳糖苷酶(SA- β -Gal)阳性率及 I 型纤溶酶原激活物抑制因子(PAI-1)和 P16 表达评估 HUVEC 衰老, 并采用 Annexin V-FITC /PI 排除细胞凋亡的发生。采用 Western blot 检测各组 Sirt3 与 SOD2 表达的变化。同时检测细胞内丙二醛(MDA)及 SOD2 活性的水平。【结果】40 mmol/L 葡萄糖处理 24 h 可成功诱导 HUVEC 衰老, 并未发生细胞凋亡, 早熟性衰老的 HUVEC SA- β -Gal 阳性率明显增多, PAI-1 及 P16 表达增多, Sirt3 及 SOD2 表达均减少, MDA 含量升高, SOD2 活性降低($P < 0.05$)。与高糖处理组比较, 40 μ mol/L 人参皂苷 Rb1 预处理延缓 HUVEC 早熟性衰老, SA- β -Gal 阳性率明显减少, PAI-1 及 P16 表达减少, Sirt3 及 SOD2 表达均增多, MDA 含量降低, SOD2 活性升高($P < 0.05$)。与人参皂苷 Rb1 处理组相比, Sirt3 特异性抑制剂 3-TYP 处理后, 人参皂苷 Rb1 保护作用消失, HUVEC PAI-1 及 P16 表达升高, Sirt3 及 SOD2 表达均减少。【结论】人参皂苷 Rb1 可通过激活 Sirt3/SOD2 信号通路延缓高糖诱导的 HUVEC 早熟性衰老。

关键词: 人参皂苷 Rb1; Sirt3/SOD2 通路; 人脐静脉内皮细胞; 衰老; 高糖

中图分类号: R339.3 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2019)03-0329-08

Ginsenoside Rb1 Attenuates Human Umbilical Vein Endothelial Cells Senescence Induced by High Glucose through Sirt3/SOD2 Pathway

KE Shi-ye¹, SHI Guang-yao¹, LIU Ding-hui^{1,2}, WU Lin¹, WEN Ren-hui¹, ZHU Jie-ming¹,
QIAN Xiao-xian^{1,2}

(1Department of Cardiology, The Third Affiliated Hospital, 2. Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Correspondence to: QIAN Xiao-xian; E-mail: qianxx@mail.sysu.edu.cn

Abstract: 【Objective】 To investigate the effect and mechanism of ginsenoside Rb1 attenuating human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) senescence induced by high glucose through Sirt3/SOD2 pathway. 【Methods】 The senescence of HUVEC induced by high glucose (40 mmol/L) was assessed by senescence-associated β -galactosidase (SA- β -Gal) staining, and the expression of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) and P16. Annexin V-FITC /PI was performed to measure apoptotic effect. The expression of sirtuins 3 (Sirt3) and superoxide dismutase 2 (SOD2) was detected by western blot. Meanwhile, the level of intracellular malondialdehyde (MDA) and the activity of SOD2 were measured. 【Results】 Treatment of HUVEC with high glucose for 24 hours induced premature senescence instead of apoptosis, as indicated by a larger proportion of the cells stained with SA- β -Gal and the up-regulated expression of PAI-1 and P16. Pretreatment of HUVEC with ginsenoside Rb1 (40 μ mol/L) could reverse endothelial cell senescence, as

收稿日期: 2018-12-12

基金项目: 国家自然科学基金(81370447); 广东省科技计划项目(2016A050502014)

作者简介: 柯世业, 硕士研究生, 住院医师, 研究方向: 动脉粥样硬化的防治, E-mail: keshiye@163.com; 钱孝贤, 通信作者, 教授, E-mail: qianxx@mail.sysu.edu.cn

indicated by the reduced SA- β -Gal positive cells and the down-regulated expression of PAI-1 and P16. Furthermore, ginsenoside Rb1 pretreatment upregulated the protein expression of Sirt3 and SOD2, and eventually increased the activity of SOD2 and decreased the level of MDA. 【Conclusion】 Ginsenoside Rb1 could antagonize high glucose-induced premature senescence of HUVEC via Sirt3/SOD2 signaling pathway.

Key words: Ginsenoside Rb1; Sirt3/SOD2 signaling pathway; Human umbilical vein endothelial cells; Senescence; High glucose

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2019, 40(3): 329-336]

糖尿病是心血管疾病的危险因素之一,糖尿病患者冠状动脉粥样硬化性心脏病的发病率及病死率是非糖尿病的2.40倍^[1]。研究发现高糖明显加速血管内皮细胞衰老,而内皮细胞衰老在冠状动脉粥样硬化等增龄相关性血管疾病的发病中发挥重要作用^[2]。因此,预防高糖诱导的内皮细胞衰老将有望成为防治糖尿病相关心血管疾病的一个新的靶点。沉默信息调节因子3(Sirtuin 3, Sirt3)是NAD⁺依赖的组蛋白去乙酰化酶,其主要位于线粒体内,可调节大部分线粒体蛋白赖氨酸乙酰化^[3-4]。研究发现Sirt3能增加超氧化物歧化酶2(superoxide dismutase 2, SOD2)活性,提高细胞抗氧化应激能力,Sirt3在心血管疾病的防治中发挥重要作用^[5-6]。我们既往研究发现,人参皂苷Rb1能通过抗氧化应激预防过氧化氢诱导的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)衰老^[7-8]。但人参皂苷Rb1对高糖诱导的HUVEC衰老的保护作用及其潜在机制尚未见报道。本研究旨在从Sirt3/SOD2通路探讨人参皂苷Rb1延缓高糖诱导的HUVEC衰老的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人参皂苷Rb1购自成都普菲德生物科技有限公司,分子式:C₅₄H₉₂O₂₃,分子量:1109.31,为白色粉末状结晶,高效液相色谱鉴定纯度 $\geq 98\%$;葡萄糖、内皮细胞生长因子(endothelial cell growth supplement, ECGS)购自Sigma-Aldrich; I型胶原酶、M199培养基和谷氨酰胺购自Gibco;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自上海吉泰依科赛公司;CCK-8、细胞裂解液、蛋白定量试剂盒(BCA法)和衰老相关 β -半乳糖苷酶(senescence-associated β -galactosidase, SA- β -Gal)染色试剂盒购自

上海碧云天;Annexin V-FITC/PI染色试剂盒和不含EDTA的2.5 g/L胰蛋白酶购自南京凯基;3-TYP购自美国Selleck公司;抗I型抗纤溶酶原激活物抑制剂(plasminogen activator inhibitor 1, PAI-1)、抗Sirt3、抗SOD2、抗P16和抗GAPDH抗体购自Cell Signaling Technology; II抗购自武汉博士德;丙二醛(malondialdehyde, MDA)测试盒和SOD活性检测试剂盒购自南京建成。

1.2 细胞分离培养

HUVEC原代分离培养及鉴别参考既往文献报道^[9-12],大致过程如下:取健康无菌新生儿脐带,PBS清洗3次,用1g/L I型胶原酶室温消化15 min,收集的I型胶原酶细胞混合液用1 200 r/min ($r=17$ cm)离心5 min,弃上清后用预温的完全培养基(800 mL/L M199, 200 mL/L FBS, 20 μ g/mL ECGS, 1 mmol/L 谷氨酰胺)重悬细胞,吹打混匀后种于培养瓶中培养。1-2代细胞用于后续实验。

1.3 CCK-8检测细胞活力

将HUVEC按 4×10^3 个细胞/孔接种于96孔板中并培养24 h后,用不同浓度的人参皂苷Rb1(10、20、30、40、50、60和70 μ mol/L)预处理细胞1 h,再用40 mmol/L葡萄糖刺激24 h。处理结束后,每孔加入10 μ L CCK-8溶液,用锡箔纸遮盖后将细胞置于37 $^{\circ}$ C下孵育1.5 h。最后使用酶标仪在450 nm测定各孔的吸光度值。

1.4 SA- β -Gal染色

SA- β -Gal染色参考既往文献报道^[11,13]。大致过程如下:用PBS轻轻清洗细胞2次,5 mL/L戊二醛溶液固定5 min后,每孔加入1 mL染色工作液,用锡箔纸遮盖后将细胞置于37 $^{\circ}$ C下孵育18 h。孵育结束后倒置显微镜下进行计数和拍照,SA- β -Gal染色阳性率计算方法为:连续计数400个细胞,计算出蓝染细胞(即SA- β -Gal染色阳性细胞)数目/400个细胞的百分比。

1.5 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术

用不含 EDTA 的 2.5 g/L 胰蛋白酶消化各实验组的 HUVEC, 2 000 r/min ($r = 17$ cm) 离心 5 min 收集细胞沉淀, PBS 轻轻清洗 2 遍后, 加入 500 μ L 试剂盒缓冲液重悬细胞于流式管中, 分别加入 Annexin V FITC 和 PI 各 5 μ L, 室温避光染色 15 min 后, 通过流式细胞术分析染色的细胞, 每个样品至少收集 10^4 个细胞。

1.6 Western blot 实验

细胞处理结束后弃去培养基, 用预冷的 PBS 轻轻冲洗 2 次, 加入适量细胞裂解液, 冰上充分裂解后用细胞刮刮取细胞蛋白, 置于 4 $^{\circ}$ C 超速离心机 1.2×10^4 r/min ($r = 8$ cm) 离心 10 min 后取上清, BCA 法测定蛋白含量。总蛋白煮沸 5~10 min, SDS-PAGE 分离后转移到 PVDF 膜上。用 50 g/L 脱脂奶粉溶液于室温封闭 1 h, 加入 PAI-1、PI6、Sirt3、SOD2 及 GAPDH (均为 1:1 000) I 抗 4 $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜。弃去 I 抗, 1 \times TBST 洗 5 min / 次 \times 3 次, 加入 II 抗 (1:10 000) 于室温孵育 1 h; 弃去 II 抗, 1 \times TBST 洗 5 min/次 \times 3 次, 用化学发光法曝光显影。最后使用 Image J 软件分析图像。

1.7 MDA 含量及 SOD2 活性的测定

用 PBS 轻轻清洗细胞 2 次, 加入细胞裂解液并用细胞刮刮取细胞, 于 4 $^{\circ}$ C 1.2×10^4 r/min ($r = 8$ cm) 离心 10 min 后取上清, BCA 法测定蛋白含量。分别利用 MDA 及 SOD 比色法检测试剂盒检测 HUVEC 细胞蛋白上清液中的 MDA 含量及 SOD2 活性水平。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 25.0 统计软件进行统计学分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 呈正态分布且方差齐性的数据组间差异性比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), 存在差异则采用 LSD- t 法进行组间两两比较。选取检验水准 $\alpha=0.05$, $P < 0.05$ (双侧) 为差异有统计学意义。

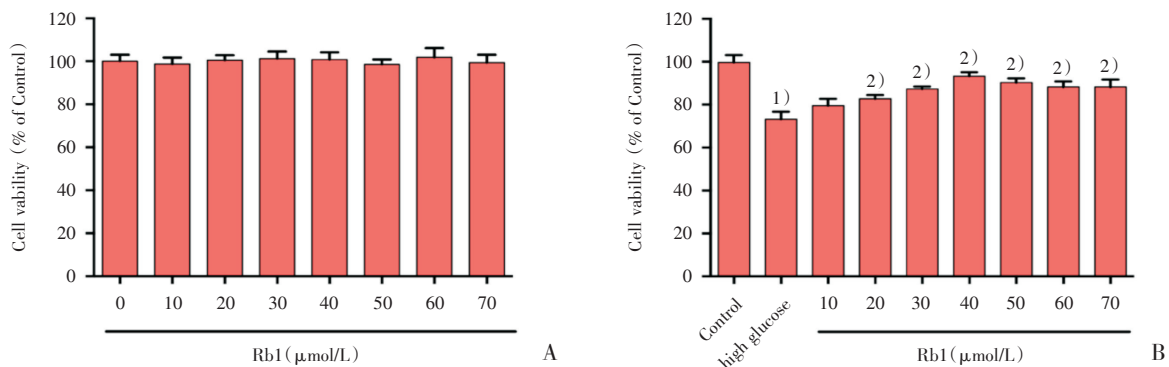
2 结果

2.1 不同浓度人参皂苷 Rb1 对内皮细胞活力的影响

HUVEC 接种于 96 孔板, 生长 24 h 后, 分别给予 10、20、30、40、50、60 和 70 μ mol/L 人参皂苷 Rb1。24 h 后, CCK-8 检测发现, 该浓度范围人参皂苷 Rb1 对内皮细胞的活性均没有影响(图 1A)。然后, 我们用该浓度范围的人参皂苷 Rb1 预处理内皮细胞 1 h 后, 相应加入 40 mmol/L 葡萄糖。培养 24 h 后, CCK-8 结果发现与正常对照组(5 mmol/L 葡萄糖处理)相比, 高糖组细胞活性降低, 而人参皂苷 Rb1 具有明显的细胞保护作用, 其中 40 μ mol/L 人参皂苷 Rb1 是最有效的人参皂苷 Rb1 浓度(图 1B)。所以, 后述的实验就选用 40 μ mol/L 人参皂苷 Rb1 这一浓度对细胞进行干预。

2.2 人参皂苷 Rb1 减轻高糖诱导的内皮细胞衰老

HUVEC 生长至 60%~70% 时, 先给予 40 μ mol/L 人参皂苷 Rb1 共同孵育 1 h 后, 相应加入 40 mmol/L 葡萄糖, 继续培养 24 h。结果发现人参皂苷 Rb1



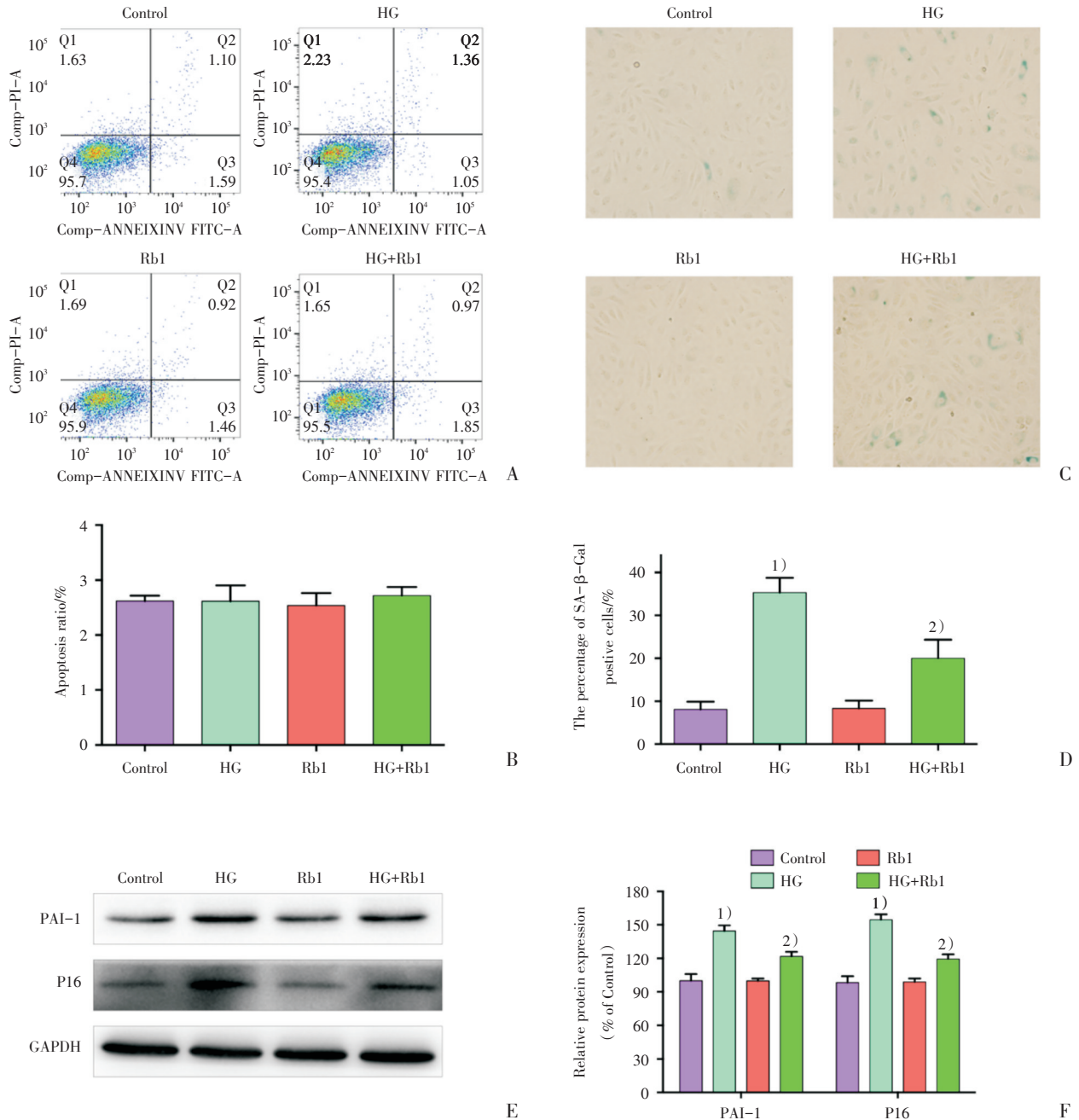
A: HUVEC were treated with ginsenoside Rb1 alone for 24 h. $F = 0.407$, $P = 0.884$. B: HUVEC were pretreated with ginsenoside Rb1 for 1 h and then exposed to high glucose for 24 h. $F = 24.143$, $P < 0.001$. 1) $P < 0.001$ vs control group; 2) $P < 0.001$ vs high glucose group by LSD- t test after ANOVA. $n = 3$

图1 人参皂苷 Rb1 对细胞活力的影响

Fig.1 The effects of ginsenoside Rb1 on cell viability

单独干预对PAI-1、P16蛋白表达和SA-β-Gal染色无显著影响;高糖组(HG组)细胞PAI-1、P16蛋白表达增加,SA-β-Gal染色阳性细胞率增加,与正常对照组相比具有显著差异;而40 μmol/L人参皂苷Rb1预处理能显著减少高糖诱导的PAI-1、P16蛋白表达,同时SA-β-Gal染色结果也证实了

40 μmol/L人参皂苷Rb1能明显减少SA-β-Gal阳性细胞数目(图2B、C)。另外,Annexin-V/FITC-PI双染流式细胞术结果提示高糖处理第1-2代HUVEC 24 h,各实验组的细胞凋亡没有明显差异(图2A),以排除实验中细胞凋亡效应的影响。



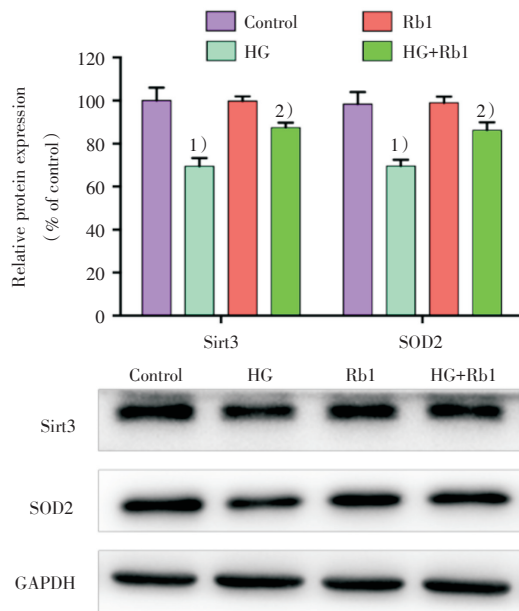
A、B: An analysis of apoptosis by flow cytometry. $F = 0.258, P = 0.853$. C、D: SA-β-gal staining was performed in each group. Senescent cells were stained with blue color. $F = 57.372, P < 0.001$. E、F: Western blot for determining the protein levels of PAI-1 and P16. $F = 67.963, P < 0.001$ for PAI-1; $F = 103.872, P < 0.001$ for P16. 1) $P < 0.001$ vs. control group; 2) $P < 0.001$ vs. HG group by LSD- t test after ANOVA. $n = 3$

图2 人参皂苷Rb1对高糖诱导的内皮细胞衰老的影响

Fig.2 The effects of ginsenoside Rb1 on high glucose (HG)-induced senescence in HUVEC

2.3 人参皂苷 Rb1 对 Sirt3 和 SOD2 蛋白表达的影响

为进一步探索人参皂苷 Rb1 抗高糖诱导内皮细胞衰老的机制,我们对 Sirt3 和 SOD2 的蛋白表达水平进行了检测。Western blot 结果提示 40 mmol/L 葡萄糖诱导的衰老 HUVEC 内 Sirt3 和 SOD2 蛋白表达水平均下降,而人参皂苷 Rb1 预处理能部分逆转衰老 HUVEC 内的 Sirt3 和 SOD2 蛋白表达水平的减低(图3)。



$F = 41.056, P < 0.001$ for SIRT3; $F = 35.652, P < 0.001$ for SOD2. 1) $P < 0.001$ vs. control group; 2) $P < 0.001$ vs. HG group by LSD- t test after ANOVA. $n = 3$

图3 人参皂苷 Rb1 对内皮细胞内 Sirt3 和 SOD2 蛋白表达的影响

Fig.3 The effects of ginsenoside Rb1 on the protein expression of Sirt3 and SOD2 in HUVEC

2.4 人参皂苷 Rb1 对内皮细胞 MDA 含量和 SOD2 活性的影响

SOD2 表达减少,直接影响细胞内 SOD2 活性。与正常对照组相比,衰老的内皮细胞中 SOD2 的活性明显降低,而人参皂苷 Rb1 预处理则部分逆转了 SOD2 活性的降低,同时,与正常对照组相比,衰老细胞中的 MDA 含量升高,而人参皂苷 Rb1 预处理则部分降低 MDA 含量(表1)。

2.5 3-TYP 显著抵消人参皂苷 Rb1 改善内皮细胞衰老的作用

上述结果表明人参皂苷 Rb1 可能通过调节 Sirt3/SOD2 信号通路改善高糖诱导的 HUVEC 衰老。为了进一步验证,我们通过使用 16 nmol/L Sirt3 特异性抑制剂 3-TYP 与人参皂苷 Rb1 同时预处理 HUVEC 1 h 后,加入 40 mmol/L 葡萄糖继续培养 24 h,通过 western blot 检测 PAI-1 和 P16 衰老蛋白指标研究 Sirt3 在人参皂苷 Rb1 中的作用。结果提示 HG + Rb1+3-TYP 组 Sirt3 和 SOD2 蛋白表达均较 HG+Rb1 组明显降低(图 4A);且 PAI-1 和 P16 蛋白表达均较 HG+Rb1 显著升高(图 4B)。这些结果说明加入 Sirt3 特异性抑制剂 3-TYP 后的衰老 HUVEC 不再受人参皂苷 Rb1 的保护。

3 讨论

综合上述研究结果,我们发现 40 mmol/L 葡萄糖可诱导原代 HUVEC 衰老,而 40 μ mol/L 人参皂苷 Rb1 通过 Sirt3/SOD2 信号通路在一定程度上延缓高糖诱导的 HUVEC 衰老。

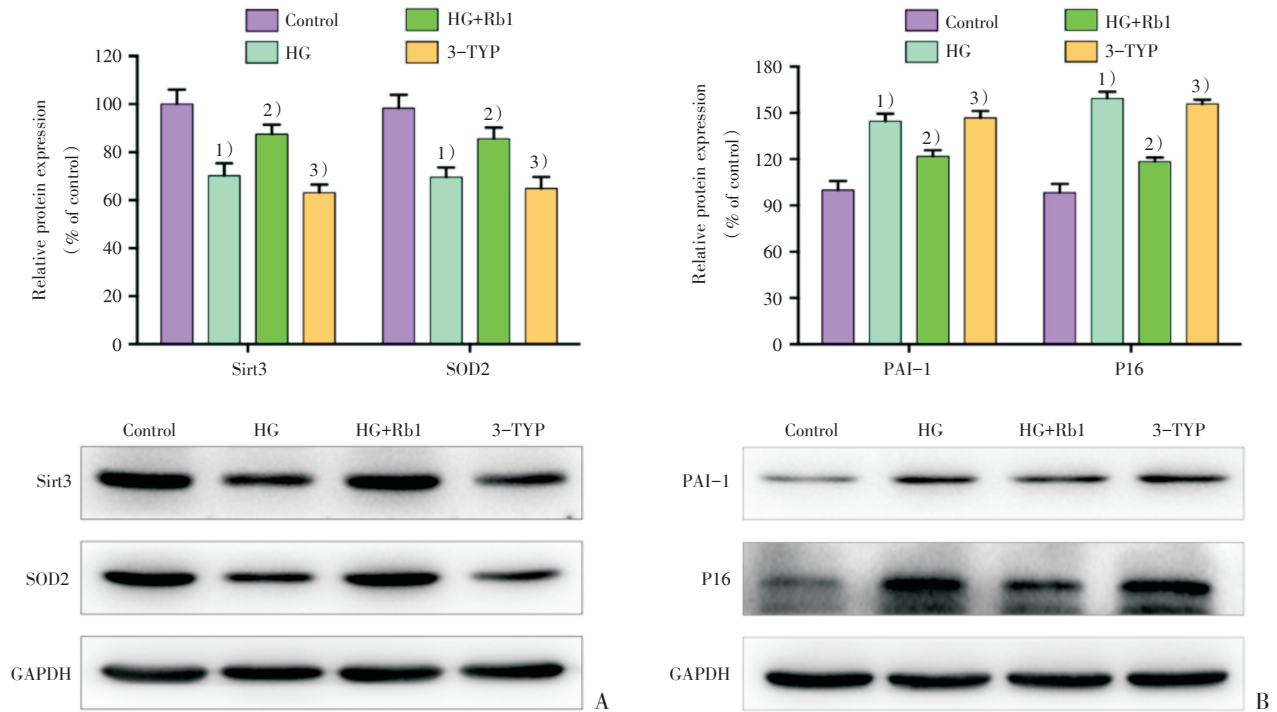
我国糖尿病发病率约为 9.9%,而 65~74 岁年

表1 人参皂苷 Rb1 对内皮细胞 MDA 含量和 SOD2 活性的影响

Table 1 The effects of ginsenoside Rb1 on MDA content and SOD2 activity in HUVEC ($\bar{x} \pm s$)

Groups	SOD2 activity/(U/mg protein)	MDA content/(nmol/mg protein)
Control	29.802 \pm 2.076	1.207 \pm 0.126
HG	22.370 \pm 1.151 ¹⁾	3.438 \pm 0.138 ¹⁾
Rb1	30.360 \pm 1.448	1.228 \pm 0.038
HG+Rb1	27.807 \pm 2.511 ²⁾	1.575 \pm 0.089 ²⁾
F	11.358	306.467
P	0.003	<0.001

1) $P < 0.001$ vs control group; 2) $P < 0.001$ vs HG group by LSD- t test after ANOVA. $n = 3$



$F=36.513, P<0.001$ for SIRT3; $F=30.011, P<0.001$ for SOD2. $F=60.725, P<0.001$ for PAI-1; $F=163.014, P<0.001$ for P16. 1) $P<0.001$ vs control group; 2) $P<0.001$ vs HG group; 3) $P<0.001$ vs HG+Rb1 group by LSD- t test after ANOVA. $n=3$

图4 抑制Sirt3表达和人参皂苷Rb1处理对SOD2蛋白表达及衰老蛋白表达的影响

Fig.4 The effects of 3-TYP and ginsenoside Rb1 on high glucose (HG)-induced protein expression of SIRT3 and SOD2 (A), PAI-1 and P16 (B) in HUVEC

龄组更是达到14.1%^[14]。血管性疾病是糖尿病最常见的并发症,并是糖尿病其他慢性并发症的病理基础。血管内皮功能障碍作为血管性疾病进程中一个早期的关键因素,在糖尿病患者中常可出现;长期的慢性高血糖被认为是导致内皮功能障碍的独立危险因素^[15]。因此,利用高糖诱导内皮细胞衰老的早熟性衰老模型模拟糖尿病患者内皮损伤,并探讨相应机制,寻求相关防治方法,能对糖尿病血管性疾病的未来防治策略提供更有效的策略。

Sirt3是一种位于线粒体内的去乙酰化酶,它可指导线粒体能量代谢和氧化应激,限制活性氧的积累^[16]。由于Sirt3对维持线粒体功能具有重要作用,而线粒体功能障碍是衰老过程的关键环节,因此Sirt3与衰老之间关系密切^[17]。Sirt3的激活与延长寿命相关。研究发现Sirt3基因敲除小鼠在第8周出现心肌肥大、纤维化等心脏衰老表现^[18]。SOD2是一种特定位于线粒体内的SOD,被认为是抑制线粒体活性氧的清除酶^[19]。研究发现Sirt3可以通过上调线粒体内SOD2的表达,提高

SOD2的活性,进而提高线粒体清除活性氧能力,抑制衰老及相关疾病的发生^[20]。

人参是我国传统的中药材,有很强的抗疲劳、延缓衰老、提高机体免疫与代谢的功能。人参皂苷Rb1是人参中起药理作用的主要成分之一^[21]。我们既往研究表明,人参皂苷Rb1在心血管系统及神经系统中具有保护作用。过氧化氢诱导内皮细胞衰老时,细胞活性氧、MDA水平升高,SOD1表达和活性降低,eNOS表达和NO含量下降,而人参皂苷可通过Sirt1去乙酰化eNOS增加NO含量有效地逆转这些改变^[8,22]。在体内实验中,人参皂苷Rb1通过减轻老年C57BL/6小鼠年龄相关性炎症反应和氧化应激水平,促进主动脉组织eNOS/NO表达改善内皮功能^[23];人参皂苷Rb1还能通过mTOR/p70S6K通路改善C57BL/6小鼠脑自然衰老^[24]。本研究中发现,CCK-8结果表明40 $\mu\text{mol/L}$ 人参皂苷Rb1为逆转40 mmol/L葡萄糖损伤的最有效浓度,在加入40 $\mu\text{mol/L}$ 人参皂苷Rb1预处理后,高糖诱导的内皮细胞衰老能被有效地遏制,SA- β -Gal阳性率明显降低,PAI-1及

P16 作为内皮细胞衰老特异性蛋白标志^[25-26],其表达减少,Sirt3 及 SOD2 表达增多,MDA 含量降低,SOD2 活性升高,而当加入 16 nmol/L Sirt3 特异性抑制剂 3-TYP 后,人参皂苷 Rb1 的抗衰老作用消失,说明人参皂苷 Rb1 具有抗高糖诱导内皮细胞衰老的作用,其抗衰老作用可能与人参皂苷 Rb1 调控 Sirt3/SOD2 信号通路有关。此研究进一步丰

富了人参皂苷 Rb1 抗内皮细胞衰老的机制。

本研究结果表明人参皂苷 Rb1 可通过激活 Sirt3/SOD2 信号通路部分抑制高糖诱导的 HUVEC 衰老。本课题拓展了我们对于人参皂苷 Rb1 抗内皮细胞衰老的认识,但仍需在更多的体内研究和临床试验进一步论证,最终用于糖尿病血管性并发症的防治。

参考文献

- [1] Bragg H, Holmes MV, Iona A, et al. Association between diabetes and cause-specific mortality in rural and urban areas of China[J]. *Jama*, 2017, 317(3): 280-289.
- [2] Daiber A, Steven S, Weber A, et al. Targeting vascular (endothelial) dysfunction [J]. *Br J Pharmacol*, 2017, 174(12): 1591-1619.
- [3] Rardin MJ, NEewman JC, Held JM, et al. Label-free quantitative proteomics of the lysine acetylome in mitochondria identifies substrates of SIRT3 in metabolic pathways [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(16): 6601-6606.
- [4] 余宗超,尹良红,刘璠娜.从线粒体动力学角度探索肾脏病治疗新策略[J]. *新医学*, 2016, 47(4): 205-209.
Yu ZC, Yin LH, Liu FN. New therapeutic strategy of kidney disease from the perspective of mitochondrial dynamics [J]. *J New Med*, 2016, 47(4): 205-209.
- [5] Song C, Fu BB, Zhang JC, et al. Sodium fluoride induces nephrotoxicity via oxidative stress-regulated mitochondrial SIRT3 signaling pathway [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(6): 672-685.
- [6] Koentges C, Pfeil K, Meyer-Steenbuck M, et al. Preserved recovery of cardiac function following ischemia-reperfusion in mice lacking SIRT3 [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2016, 94(1): 72-80.
- [7] Chen WJ, Wang JL, Luo Y, et al. Ginsenoside Rb1 and compound K improve insulin signaling and inhibit ER stress-associated NLRP3 inflammasome activation in adipose tissue [J]. *J Ginseng Res*, 2016, 40(4): 351-358.
- [8] Song ZM, Liu Y, Hao BS, et al. Ginsenoside Rb1 prevents H2O2-induced HUVEC senescence by stimulating sirtuin-1 pathway [J]. *Plos One*, 2014, 9(11): e12699.
- [9] Baudin B, Bruneel A, Bosselut N, et al. A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells [J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(3): 481-485.
- [10] 宋志明,余舒杰,杨建涛,等.硫化氢通过调节 Sirt1/eNOS 信号通路延缓人脐静脉内皮细胞衰老 [J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(2): 258-263.
Song ZM, Yu SJ, Yang JT, et al. Hydrogen sulfide attenuates human umbilical vein endothelial cells senescence via modulation of Sirt1/eNOS pathway [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2018, 34(2): 258-263.
- [11] 刘定辉,吴琳,余舒杰,等. Rb1 延缓人脐静脉内皮细胞早熟性衰老与 caveolin-1 表达的关系 [J]. *中国病理生理杂志*, 2017, 33(9): 1544-1550.
Liu DH, Wu L, Yu SJ, et al. Rb1 protects human umbilical vein endothelial cells from hydrogen peroxide-induced senescence: involvement of caveolin-1 [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2017, 33(9): 1544-1550.
- [12] 郝宝顺,刘雪莲,刘勇,等.瑞舒伐他汀对同型半胱氨酸损伤人脐静脉内皮细胞血管细胞间黏附分子-1 表达的影响 [J]. *广东医学*, 2015, 16(11): 1646-1648.
Hao BS, Liu XL, Liu Y, et al. Effect of rosuvastatin on the expression of vascular cell adhesion molecule-1 in human umbilical vein endothelial cells injured by homocysteine [J]. *Guangdong Med J*, 2015, 16(11): 1646-1648.
- [13] Dimri GP, 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.
- [14] Pan CW, Wang S, Qian DJ, et al. Prevalence, awareness, and risk factors of diabetic retinopathy among adults with known type 2 diabetes mellitus in an urban community in China [J]. *Ophthalmic Epi-*

- demiol, 2017, 24(3): 188-194.
- [15] Wang Q, Zhang M, Torres G, et al. Metformin suppresses diabetes-accelerated atherosclerosis via the inhibition of Drp1-mediated mitochondrial fission [J]. *Diabetes*, 2017, 66(1): 193-205.
- [16] Giralt A, Villarroya F. SIRT3, a pivotal actor in mitochondrial functions: metabolism, cell death and aging [J]. *Biochem J*, 2012, 444(1): 1-10.
- [17] Tseng AH, Shieh SS, Wang DL. SIRT3 deacetylates FOXO3 to protect mitochondria against oxidative damage [J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 63(1): 222-234.
- [18] Sundaresan NR, Gupta M, Kim G, et al. Sirt3 blocks the cardiac hypertrophic response by augmenting Foxo3a-dependent antioxidant defense mechanisms in mice [J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(9): 2758-2771.
- [19] Liang H, Van Remmen H, Frohlich V, et al. Gpx4 protects mitochondrial ATP generation against oxidative damage [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 356(4): 893-898.
- [20] Dikalova, AE, Itani, HA, Nazarewicz, RR, et al. Sirt3 impairment and SOD2 hyperacetylation in vascular oxidative stress and hypertension [J]. *Circ Res*, 2017, 121(5): 564-574.
- [21] Cheng Y, Shen LH, Zhang JT. Anti-amnestic and anti-aging effects of ginsenoside Rg1 and Rb1 and its mechanism of action [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2005, 26(2): 143-149.
- [22] Liu DH, Chen YM, Liu Y, et al. Ginsenoside Rb1 reverses H₂O₂-induced senescence in human umbilical endothelial cells: involvement of eNOS pathway [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2012, 59(3): 222-230.
- [23] 宋志明, 余舒杰, 杨建涛, 等. 人参皂苷 Rb1 通过抑制炎症反应及氧化应激改善老年小鼠内皮功能 [J]. *中国实验诊断学*, 2018, 22(6): 1066-1070.
- Song ZM, Yu SJ, Yang JT, et al. Ginsenoside Rb1 improves endothelial function via inhibition of inflammation and oxidative stress in aged mice [J]. *Chin J Lab Diagn*, 2018, 22(6): 1066-1070.
- [24] 彭沛, 宋志明, 刘勇, 等. 人参皂苷 Rb1 抗小鼠自然衰老及其对 mTOR/p70S6K 通路的影响 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2015, 36(2): 176-180.
- Peng P, Song ZM, Liu Y, et al. Effect of ginsenoside Rb1 on the brain aging of mouse and mTOR/p70S6K pathway [J]. *J SUN Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2015, 36(2): 176-180.
- [25] Roderik M, Kortlever, Paul J, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence [J]. *Nat Cell Biol*, 2006, 8(8): 877-884.
- [26] Zhang DH, Sun XL, Liu JL, et al. Homocysteine accelerates senescence of endothelial cells via DNA hypomethylation of human telomerase reverse transcriptase [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35(1): 71-78.

(编辑 孙慧兰)