

人参皂苷 Rb1 通过抑制 NF- κ B p65 介导的炎症和氧化应激改善内皮细胞复制性衰老

周彬¹, 吴琳¹, 凌叶盛¹, 余舒杰¹, 刘定辉¹, 柯世业¹, 刘勇¹, 郝宝顺¹, 钱孝贤^{1,2}
(1. 中山大学附属第三医院心血管内科, 广东广州 510630; 2. 中山大学中西医结合研究所, 广东广州 510630)

摘要:【目的】本研究旨在探讨人参皂苷 Rb1 对内皮细胞复制性衰老的作用和机制。【方法】建立人原代脐静脉内皮细胞(HUVEC)复制性衰老模型, 根据细胞形态的变化、衰老相关 β -半乳糖苷酶(SA- β -Gal)染色阳性率和纤溶酶原激活物抑制剂 1(PAI-1)的表达水平评估 HUVEC 衰老; 将复制性衰老模型细胞分为 0、20、40、80、100 $\mu\text{mol/L}$ Rb1 组, 不同浓度人参皂苷 Rb1 处理衰老细胞 48 h 后观察衰老指标 SA- β -Gal 染色和 PAI-1 蛋白变化, 每组 3 个复孔; 采用 Western blot 方法检测对照组(CPDL 2 的 HUVEC)、模型组(衰老细胞组)及人参皂苷 Rb1 组核因子 κ B p65(NF- κ B p65)的活性, 每组 3 个复孔; 检测对照组、模型组及人参皂苷 Rb1 组细胞培养液中氧化应激和炎症指标, 每组 3 个复孔。【结果】累计细胞群体倍增值(CPDL)16 的 HUVEC 可作为复制性衰老模型; 与 0 $\mu\text{mol/L}$ Rb1 组相比, 80 $\mu\text{mol/L}$ Rb1 组 SA- β -Gal 染色阳性细胞数和 PAI-1 蛋白表达均明显降低($P < 0.001$); 复制性衰老细胞中超氧化物歧化酶(SOD)的活力明显低于对照组($P < 0.001$), 而丙二醛(MDA)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的含量及 NF- κ B p65 的活性均明显高于对照组($P < 0.001$), 80 $\mu\text{mol/L}$ 人参皂苷 Rb1 处理后 SOD 活力明显增加($P < 0.05$), MDA、IL-6、TNF- α 的产量明显减少($P < 0.05$), NF- κ B p65 活性降低($P < 0.001$)。【结论】人参皂苷 Rb1 可通过抑制 NF- κ B p65 介导的氧化应激和炎症反应延缓复制性内皮细胞衰老。

关键词: 人参皂苷 Rb1; 炎症; 氧化应激; NF- κ B p65; 复制性细胞衰老

中图分类号: R339.3*8 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2018)06-835-09

Ginsenoside Rb1 Ameliorates the Replicative Senescence of Endothelial Cells by Suppressing Inflammation and Oxidative Stress Via NF- κ B p65

ZHOU Bin¹, WU Lin¹, LING Ye-sheng¹, YU Shu-jie¹, LIU Ding-hui¹, KE Shi-ye¹, LIU Yong¹, HAO Bao-shun¹, QIAN Xiao-xian^{1,2}

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

Corresponding to: QIAN Xiao-xian, E-mail: xiaoxianq@qq.com

Abstract: 【Objective】 To explore the effect and mechanism of ginsenoside Rb1 on replicative senescence of endothelial cells. 【Methods】 Establish the replicative senescence model of primary human umbilical vein endothelial cells (HUVEC): the morphological change of the cells, the proportion of senescence-associated β -galactosidase (SA- β -Gal) positive cells and the plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) expression were detected to assess the senescence model; replicative senescence model cells were divided into 0, 20, 40, 80 and 100 $\mu\text{mol/L}$ Rb1 group, SA- β -Gal staining positive cells and PAI-1 protein level were measured after treatment of senescent cells with different concentrations of Ginsen-

收稿日期: 2018-07-11

基金项目: 国家自然科学基金(81370447); 广东省医学科研基金(A2017014); 广东省科技计划项目(2016A050502014)

作者简介: 周彬, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 动脉粥样硬化的防治, E-mail: zb4280@163.com; 钱孝贤, 通信作者, 教授, E-mail:

xiaoxianq@qq.com

oside Rb1 for 48 h, 3 multiple pores in each group. NF- κ B p65 and p-NF- κ B p65 protein expression in normal cell group (CPDL 2 HUVEC), model group (senescent cell group) and ginsenoside Rb1 group were detected by RT-PCR, 3 multiple pores in each group; the markers of oxidative stress and inflammation in cell culture solution were measured, 3 multiple pores in each group. 【Results】HUVEC with CPDL 16 have been chosen as the replicative senescence model in this research. Compared with the 0 μ mol/L Rb1 group, the SA- β -Gal positive cells and protein expression level of PAI-1 were significantly decreased ($P < 0.001$) in 80 μ mol/L Rb1 group. Compared with the control group, the production of MDA, IL-6 and TNF- α and NF- κ B p65 activity were significantly increased ($P < 0.001$) in model group, but the activity of SOD was significantly decreased ($P < 0.001$). However, Compared with the model group, the activity of SOD was increased ($P < 0.05$), the production of MDA, IL-6 and TNF- α were decreased ($P < 0.05$) and the activity of NF- κ B p65 was decreased ($P < 0.001$) in 80 μ mol/L Rb1 group. 【Conclusions】Ginsenoside Rb1 ameliorates the replicative senescence of endothelial cells by suppressing inflammation and oxidative stress via NF- κ B p65.

Key words: ginsenoside Rb1; inflammation; oxidative stress; NF- κ B p65; replicative cells senescence

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2018, 39(6): 835-843]

衰老指生物体随着时间的推移,在形态、结构和生理功能方面出现的全身性、循序渐进的退化过程,是生命过程的必然规律。衰老一般可分为2类,即生理性衰老(自然衰老)及病理性衰老。随着我国老年化人口的增加,衰老已成为许多增龄相关性心脑血管疾病的主要危险因素^[1],如冠状动脉粥样硬化性心脏病、高血压、脑卒中、神经退行性疾病等,对社会和家庭的危害日益严重。因此,探讨衰老发生的机制,寻找延缓衰老的干预方法对于衰老相关疾病的防治具有十分重要的意义。研究表明,机体内自由基及慢性炎症均参与了衰老的自然进程^[2-3]。基于氧化应激与炎症、衰老的密切关系,De la Fuent等^[4]提出了氧化-炎症衰老学说(oxidation-inflammation theory of aging, oxi-inflamm-aging),该学说认为,氧化应激和炎症反应之间形成螺旋上升的恶性循环,加速衰老的进程,阻断其中某一环节,可以延缓衰老。NF- κ B p65是NF- κ B家族重要的一个亚单位,是炎症信号通路的分子“开关”。促炎细胞因子通过产生氧自由基和激活信号通路诱导细胞衰老,而氧自由基所致的氧化应激也可以通过产生含氧衍生物,进一步激活炎症细胞,放大炎症反应^[5]。因此NF- κ B成为加剧氧化应激和炎症反应这个恶性循环的重要物质,这可能是其调控衰老的核心机制。有研究表明,NF- κ B p65在衰老组织或细胞中活性增加,抑制它的活性可以减轻或者减缓衰老^[6-7]。人参皂苷是人参中含量最多的成分,具有很强的抗氧化活性,我们既往研究发现,人参皂苷

Rb1能够保护过氧化氢诱导的早熟性细胞衰老^[8],但具体机制尚不清楚,而且未在复制性细胞衰老模型上进行过研究。本研究通过建立符合人体自然衰老生理情况的人脐带内皮细胞复制性衰老模型,观察人参皂苷Rb1对复制性内皮细胞衰老的作用,并进一步探讨其作用机制。

1 材料与amp;方法

1.1 药物和试剂

人参皂苷Rb1(分子式:C₅₄H₉₂O₂₃,分子质量:1109.31)购自成都普菲德生物技术有限公司。M199购自美国Hyclone,胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、I型胶原酶、0.05% EDTA胰酶、无血清培养基(serum free medium, SFM)购自美国GIBCO公司。预染蛋白marker购自Thermo公司。内皮细胞生长添加剂购自美国Sigma-Aldrich公司。NF- κ B p65、磷酸化NF- κ B p65、抗血浆纤溶酶原激活物抑制剂-1(plasminogen activator inhibitor 1, PAI-1)多抗购自美国proteintech Group公司、兔抗GAPDH多抗购自美国ProteinTech Group公司。辣根酶标记羊抗兔IgG和羊抗小鼠IgG购自于武汉博士德生物工程有限公司。 β 半乳糖苷酶(senescence-associated β -galactosidase, SA- β -Gal)染色试剂盒购自碧云天生物技术研究so。白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)及肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)ELISA试剂盒购自MultiSciences公司。超氧化物歧化酶(super-

oxide dismutase, SOD)活性、丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。全蛋白提取试剂盒、蛋白定量试剂盒(BCA法)购自南京凯基生物科技发展公司。

1.2 细胞分离、培养、鉴定及细胞“年龄”的计算

本研究经中山大学附属第三医院医学伦理委员会批准,符合 Helsinki 申明中的原则。原代培养参考 Bandin 等^[9]报道的方法,取健康无菌新生儿脐带, PBS 冲洗 3 遍,然后用 0.1% I 型胶原酶消化 15 min,收集胶原酶细胞混合液, 1 200 r/min ($r = 17$ cm)离心 5 min,弃上清,加完全培养基混匀种于培养瓶里培养。当细胞生长密度达 90%以上时用 0.05%胰酶消化细胞,按 1:3 传代培养。细胞“年龄”用累计细胞群体倍增值(cumulative population doubling level, CPDL)表示,CPDL 的计算公式为:PD (population doublings) = $(\lg F - \lg I) / 0.301$ (F 表示细胞达到传代水平时的细胞数; I 表示上一次种入的细胞数),每次传代计算得到的 PD 与之前 PD 总和相加即为 CPDL。CPDL 能比较客观地反应出细胞的“年龄”,在实验中,比代数的重复性更好。取 CPDL 2 和 CPDL 30 细胞,检测细胞表面标志物 CD31。

1.3 细胞衰老模型建立及分组

1.3.1 建立脐静脉内皮细胞复制性衰老模型 对不同 CPDL 时期的脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)进行细胞形态、SA- β -Gal 染色以及 PAI-1 的蛋白表达的观察,当上述衰老相关指标出现并且比较稳定时,该 CPDL 时期的细胞即作为本实验的衰老模型。

1.3.2 探讨 Rb1 抗内皮细胞复制性衰老的最佳浓度 将细胞分为 0(对照组)、20、40、80、100 μ mol/L Rb1 组,将不同浓度的药物加入细胞培养液中培养 48 h,检测衰老相关指标。

1.3.3 探讨人参皂苷 Rb1 抗内皮衰老机制 将细胞分为:对照组(CPDL 2 细胞组),模型组(衰老细胞组)、Rb1 组。Rb1 组的浓度由前一步骤确定;加药 48 h 后,收集细胞培养液、提取细胞蛋白进行相关检测。

1.4 细胞衰老相关的 SA- β -Gal 染色

吸去细胞培养液,六孔板每孔加入 1 mL SA- β -Gal 染色固定液,室温下固定 10 min,然后吸去细胞固定液,用 PBS 洗涤细胞 3 次,每次 3 min,吸去 PBS,每孔加入 1 mL 染色工作液。用保鲜膜封

住 37 $^{\circ}$ C 孵育过夜,倒置显微镜下观察、计数和拍照,连续计数 400 个细胞,统计其中的蓝染细胞,蓝染细胞数/400 即为染色阳性率。

1.5 免疫蛋白印迹

取已干预和培养好的细胞,采用总蛋白提取试剂盒提取细胞总蛋白,用 BCA 法对提取的蛋白进行浓度测定。取 30 μ g 总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,然后转移到 PVDF 膜上。用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h 后,加入相应抗体,4 $^{\circ}$ C 摇床过夜孵育洗膜;然后用 II 抗室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次后使用化学发光法曝光显影。最后用 Quantity One 软件扫描条带,分析图像。

1.6 酶联免疫吸附试验(ELISA)

细胞培养液 IL-6 及 TNF- α 含量经 ELISA 测定,严格按试剂盒说明书操作。

1.7 SOD 活力测定

采用黄嘌呤氧化酶法(羟胺法)测定 SOD 活力。按照 SOD 测试盒说明书进行操作,简述如下:取 0.05 mL 细胞培养液作为待测样品加入测定管中,对照管中加入 0.05 mL 蒸馏水,然后在测定管和对照管中各加入试剂一 1 mL,试剂二、试剂三、试剂四各 0.1 mL,用旋涡混匀器充分混匀,置 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴 40 min,分别加入 2 mL 显色剂,混匀,室温放置 10 min,取上清,550 nm 处,放入酶标仪测吸光度值。计算: SOD 活力(U/mL) = $(A_{\text{对照管}} - A_{\text{测定管}}) / A_{\text{对照管}} \div 50\% \times$ 反应体系的稀释倍数 \times 样本测试前的稀释倍数。

1.8 MDA 含量测定

1.8.1 测定意义 机体通过酶系统和非酶系统产生氧自由基,后者能攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸引发脂质过氧化作用,并由此形成脂质过氧化物,使组织细胞受损伤。

1.8.2 操作方法 按照 MDA 测试盒说明书进行操作,简述如下:取 0.1 mL 细胞培养液作为待测样品加入测定管和对照管中,然后在测定管和对照管中各加入试剂一 0.1 mL,在标准管中加入标准品和试剂一各 0.1 mL,在空白管中加入无水乙醇和试剂一各 0.1 mL,将各管混匀(摇动几下试管架),随后在标准管、空白管和测定管中各加入试剂二 3 mL,试剂三 1 mL,对照管中加入试剂二 3 mL 和 50% 冰醋酸 1 mL。旋涡混匀器混匀,试管口用保鲜薄膜扎紧,用针头刺一小孔,95 $^{\circ}$ C 水浴 40 min,取出后流水冷却,然后 3 500 r/min ($r = 8$ cm),

离心 10 min。取上清, 532 nm 处, 放入酶标仪测吸光度值。

1.8.3 计算公式 $\text{MDA 含量 (nmol/mL)} = (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) / (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \times \text{标准品浓度 (10 nmol/mL)} \times \text{样本测试前稀释倍数}$ 。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 20.0 software 进行分析, 计量资料以表示, 组间均数比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ (双侧) 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HUVEC 的鉴定

流式细胞术检测 CPDL 2 和 CPDL 30 的内皮

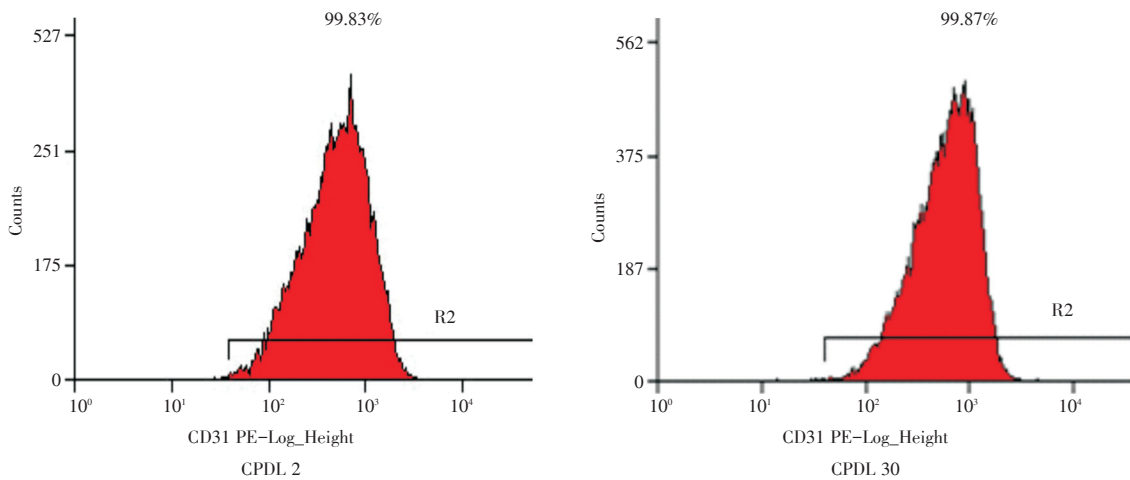


图 1 流式细胞术检测内皮细胞表面 CD31

Fig.1 Detection of the CD31 on HUVEC surface by flow cytometry

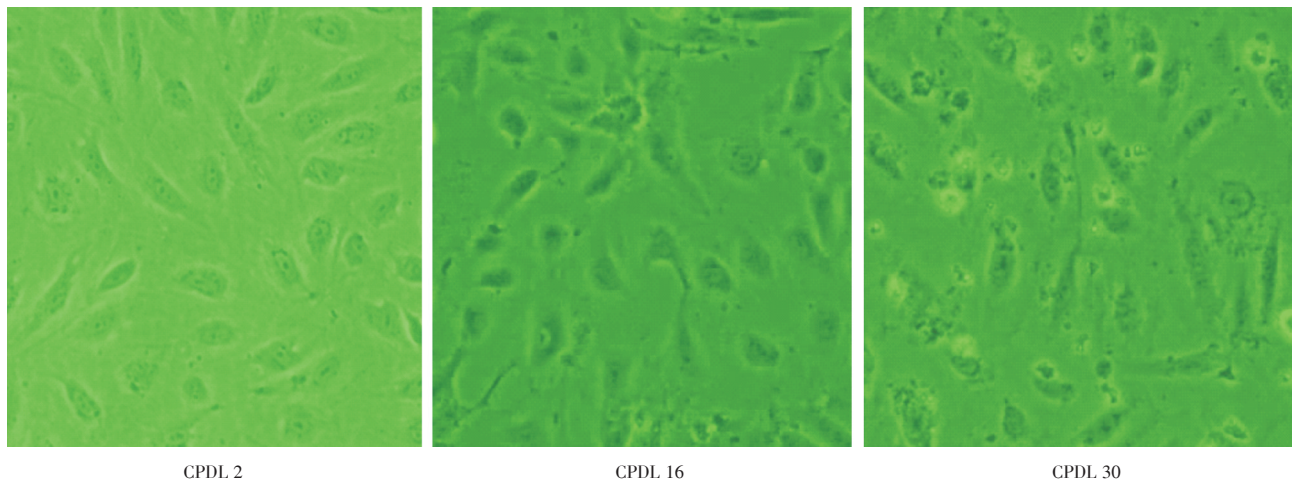


图 2 显微镜下不同 CPDL 的 HUVEC 形态 ($\times 200$)

Fig.2 The morphology changes of HUVEC at different CPDL ($\times 200$)

细胞 CD31 抗原阳性率均在 99% 以上, 符合内皮细胞特性 (图 1)。

2.2 HUVEC 的复制性衰老的建立

本实验发现, 随着 CPDL 的增加, 细胞呈现出生长缓慢, 边界模糊, 胞体增大, 细胞形态由短梭形变为长梭形, 生长出长“触角”, 贴壁细胞减少等改变。CPDL 16 时显微镜下可见部分细胞形态发生改变, CPDL 30 时可见整个视野下细胞形态均发生变化 (图 2)。

我们以每次传代细胞的时间为横轴, 以相应传代细胞时间点计算所得 CPDL 为纵轴绘制 HUVEC 的 CPDL 增长曲线 (图 3), 从增长曲线可以看出, 当 $\text{CPDL} > 25$ 时, 细胞增殖速度明显减慢, 进入平台期。

接下来, 我们对不同 CPDL 细胞进行衰老相

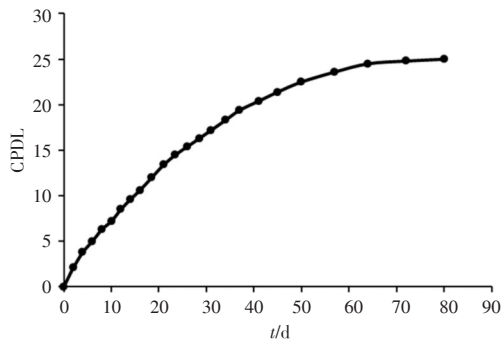


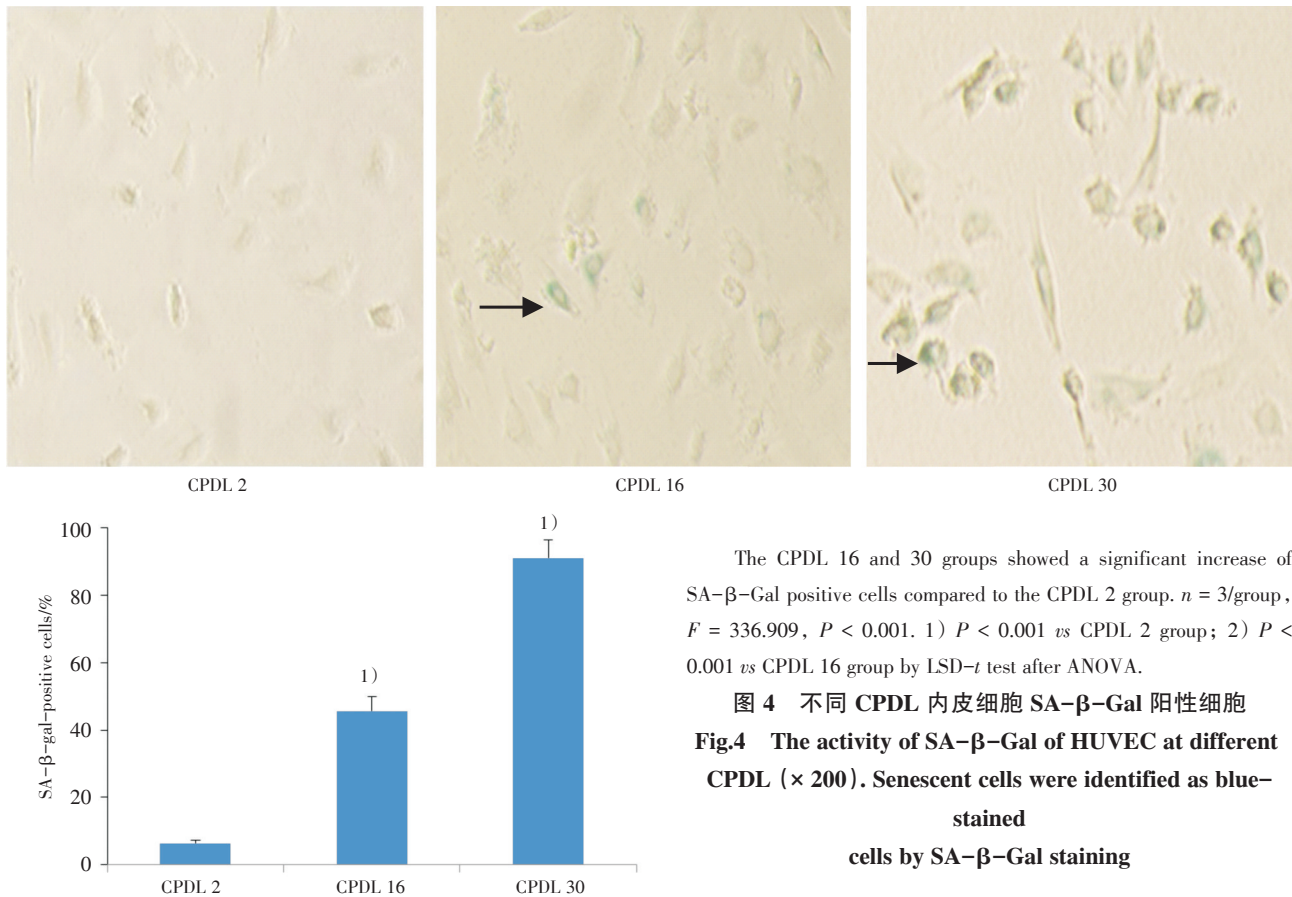
图3 HUVEC的CPDL增长曲线
Fig.3 The CPDL growth curve graph of HUVEC

关的SA-β-Gal染色(图4箭头所示)以及衰老指标PAI-1蛋白检测。随着CPDL的增加,SA-β-Gal阳性细胞及PAI-1蛋白表达均增多(图5)。LSD-*t*检验,与CPDL 2组相比,CPDL 16组SA-β-Gal阳性细胞数和PAI蛋白表达水平较均明显增加($P < 0.001, P = 0.007$);与CPDL 16组相比,CPDL 30组SA-β-Gal阳性细胞数和PAI蛋白表达水平较均明显增加($P < 0.001, P = 0.006$)。

本课题组前期研究还对CPDL 4、CPDL 6、CPDL 8、CPDL 10进行了PAI-1蛋白表达的检测,发现CPDL 6细胞即可出现衰老的性状,CPDL 10已经比较明显。本实验中,CPDL 16以后细胞衰老出现的相关指标更加稳定,由于当CPDL > 25时细胞增殖进入停滞平台期,因此,CPDL 16~25的HUVEC可作为复制性衰老模型进行研究,为节约时间及经济成本,本实验选用CPDL 16的HUVEC作为复制性衰老模型进行后续的实验研究。

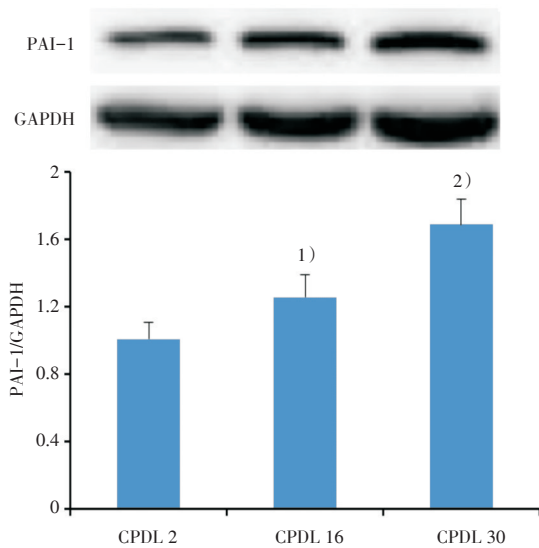
2.3 人参皂苷Rb1对HUVEC复制性衰老的影响

我们将不同浓度的人参皂苷Rb1分别加入CPDL 16的HUVEC中,培养48 h后,我们同时对衰老相关指标SA-β-Gal染色以及PAI-1的蛋白表达进行测定(图6-7)。LSD-*t*检验,人参皂苷Rb1 (20、40、80和100 μmol/L)作用于复制性衰老HUVEC,与对照组相比,SA-β-Gal染色阳性细胞数明显降低($P = 0.038, P = 0.029, P < 0.001, P = 0.032$),以80 μmol/L Rb1组效果最佳。衰老相关蛋白表达的结果也证实了80 μmol/L人参皂苷Rb1能最明显减少PAI-1的表达水平($P <$



The CPDL 16 and 30 groups showed a significant increase of SA-β-Gal positive cells compared to the CPDL 2 group. $n = 3/\text{group}$, $F = 336.909, P < 0.001$. 1) $P < 0.001$ vs CPDL 2 group; 2) $P < 0.001$ vs CPDL 16 group by LSD-*t* test after ANOVA.

图4 不同CPDL内皮细胞SA-β-Gal阳性细胞
Fig.4 The activity of SA-β-Gal of HUVEC at different CPDL (×200). Senescent cells were identified as blue-stained cells by SA-β-Gal staining



The CPDL 16 and 30 groups showed a significant increase of PAI-1 protein expression compared to the CPDL 2 group. $n = 3/\text{group}$, $F = 33.575$, $P = 0.001$. 1) $P = 0.007$ vs CPDL 2 group; 2) $P = 0.006$ vs CPDL 16 group by LSD- t test after ANOVA.

图5 不同CPDL的内皮细胞PAI蛋白的表达

Fig.5 The expression of PAI-1 of HUVEC at different CPDL

0.001 vs 0 $\mu\text{mol/L}$ Rb1 group)。综合图6-7的结果, 80 $\mu\text{mol/L}$ 人参皂苷Rb1能明显改善HUVEC复制性衰老, 因此, 我们选择了此浓度用于后续的研究。

2.4 人参皂苷Rb1对模型细胞氧化应激指标的影响

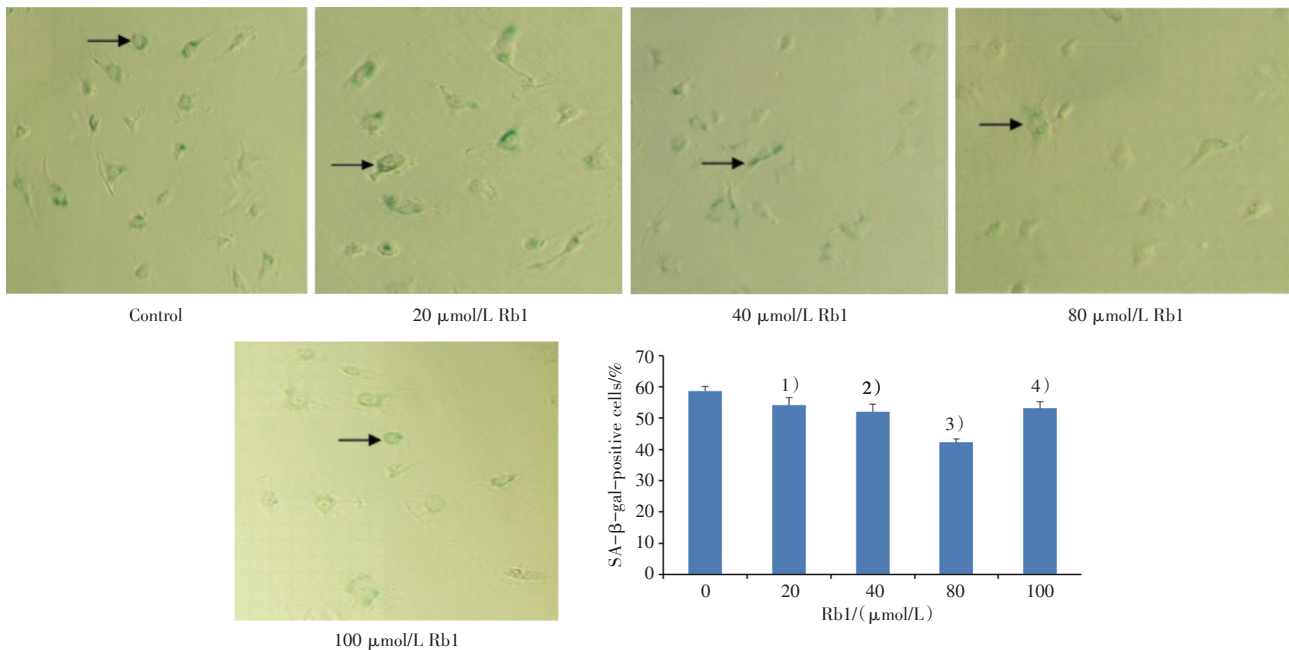
各组细胞培养48 h后取细胞培养液检测细胞内SOD活力和MDA含量。结果显示: 模型组SOD的活力明显低于正常对照组($P < 0.001$), 而MDA的含量明显高于对照组($P < 0.001$), Rb1组SOD的活力较模型组明显升高($P < 0.001$), 而MDA的含量大幅下降($P = 0.002$; 表1)。

2.5 人参皂苷Rb1对模型细胞炎症指标的影响

各组细胞培养48 h后采用ELISA方法检测细胞培养液中IL-6和TNF- α 含量。结果显示: 模型组IL-6、TNF- α 的含量均明显高于对照组($P < 0.001$ 、 $P < 0.001$), Rb1组IL-6、TNF- α 的含量较模型组均明显减少($P = 0.002$ 、 $P = 0.002$; 表2)。

2.6 人参皂苷Rb1对模型细胞NF- κ B p65的影响

各组细胞培养48 h后检测细胞NF- κ B p65和



Senescent cells were identified as blue-stained cells by SA- β -Gal staining ($\times 200$). The 20, 40, 80, 100 $\mu\text{mol/L}$ Rb1 groups showed a significant reduction of SA- β -Gal positive cells compared to the 0 $\mu\text{mol/L}$ Rb1 group. $n = 3/\text{group}$, $F = 22.832$, $P = 0.001$. 1) $P = 0.038$ vs 0 $\mu\text{mol/L}$ Rb1 group (control group); 2) $P = 0.029$ vs 0 $\mu\text{mol/L}$ Rb1 group (control group); 3) $P < 0.001$ vs 0 $\mu\text{mol/L}$ Rb1 group (control group); 4) $P = 0.032$ vs 0 $\mu\text{mol/L}$ Rb1 group (control group) by LSD- t test after ANOVA.

图6 不同浓度人参皂苷Rb1对细胞SA- β -Gal染色的影响

Fig.6 The effect of Rb1 in different concentrations on cellular SA- β -Gal staining

表 1 细胞 SOD 活力和 MDA 含量测定

Table 1 Changes of the level of MDA and the activity of SOD in HUVEC

Groups	SOD/(U/mL)	MDA/(nmol/mL)
Control	51.0 ± 1.3	0.93 ± 0.11
Model	31.9 ± 2.8 ¹⁾	1.57 ± 0.16 ¹⁾
Rb1	44.2 ± 1.0 ²⁾	1.25 ± 0.14 ³⁾
<i>F</i>	80.866	93.675
<i>P</i>	< 0.001	< 0.001

Control group: HUVEC with CPDL2; Model group: HUVEC with CPDL16; Rb1 group: 80 μmol/L Rb1-treated group. *n* = 3/group, 1) *P* < 0.001 vs control group; 2) *P* < 0.001 vs model group; 3) *P* = 0.002 vs model group by LSD-*t* test after ANOVA.

表 2 细胞 IL-6 和 TNF-α 含量测定

Table 2 Changes of the level of IL-6 and TNF-α in HUVEC

Groups	IL6/(ng/mL)	TNF-α/(pg/mL)
Control	1.41 ± 0.13	19.0 ± 1.4
Model	3.82 ± 0.31 ¹⁾	42.2 ± 1.9 ¹⁾
Rb1	2.93 ± 0.14 ²⁾	32.4 ± 3.1 ²⁾
<i>F</i>	104.674	79.820
<i>P</i>	< 0.001	< 0.001

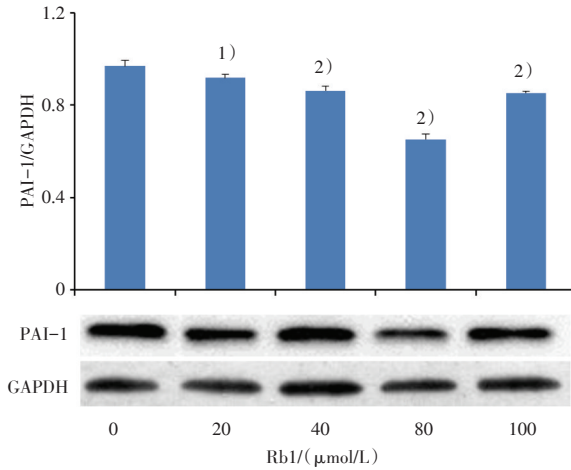
Control group: HUVEC with CPDL2; Model group: HUVEC with CPDL16; Rb1 group: 80 μmol/L Rb1-treated group. *n* = 3/group, 1) *P* < 0.001 vs control group; 2) *P* = 0.002 vs model group by LSD-*t* test after ANOVA.

p-NF-κB p65 蛋白量, p-NF-κB p65/ NF-κB p65 用来评估 NF-κB p65 的活性。结果显示:与对照组相比,模型组的 NF-κB p65 的活性明显增加 (*P* < 0.001), 而 Rb1 组显著降低了其活性 (*P* < 0.001 vs Model group; 图 8)。

3 讨论

本研究发现, 80 μmol/L 人参皂苷 Rb1 能明显降低衰老细胞 NF-κB p65 的活性, 增加 SOD 活力, 降低 MDA、IL-6、TNF-α 的水平, 减少 SA-β-Gal 染色阳性细胞数目及 PAI-1 蛋白的表达, 有效延缓 HUVEC 复制性衰老。

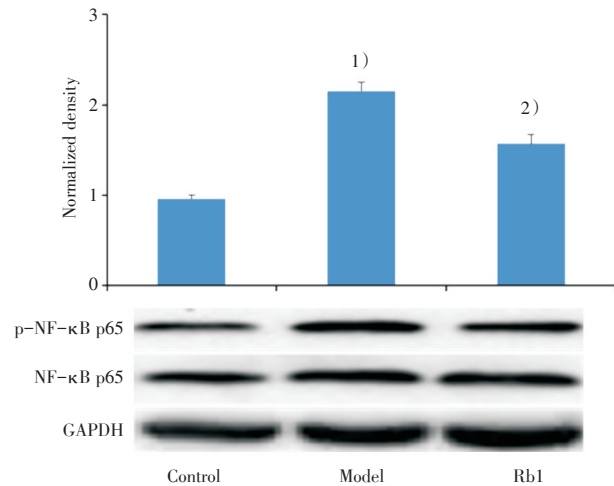
衰老的内皮细胞与年龄相关性血管疾病如动



The 20, 40, 80, 100 μmol/L Rb1 groups showed a significant reduction of PAI-1 protein expression compared to the 0 μmol/L Rb1 group. *n* = 3/group, *F* = 128.485, *P* < 0.001. 1) *P* = 0.004 vs 0 μmol/L Rb1 group (control group); 2) *P* < 0.001 vs 0 μmol/L Rb1 group (control group) by LSD-*t* test after ANOVA.

图 7 不同浓度人参皂苷 Rb1 对细胞 PAI-1 表达的影响

Fig.7 The effect of Rb1 in different concentrations on PAI-1 protein expression



Control group: HUVEC with CPDL2; Model group: HUVEC with CPDL16; Rb1 group: 80 μmol/L Rb1-treated group. *n* = 3/group, *F* = 138.387, *P* < 0.001. 1) *P* < 0.001 vs control group; 2) *P* = *P* < 0.001 vs model group by LSD-*t* test after ANOVA.

图 8 人参皂苷 Rb1 对细胞 NF-κB p65 活性的影响

Fig.8 The effect of Rb1 on the activation of NF-κB p65 in HUVEC

脉粥样硬化等密切相关^[10-12]。细胞衰老模型分为复制性衰老模型和早熟性衰老模型, 复制性衰老

模型由于更符合人体自然衰老的生理过程,目前得到越来越多的研究和应用。本实验中观察到,CPDL16以后细胞衰老出现的相关指标更加稳定。镜下观察内皮细胞体积变大,边界模糊,形态扁平,其衰老染色阳性率超过50%,同时PAI-1的表达也明显增多,衰老表型和分子变化符合细胞衰老模型的特点。

氧化-炎症反应学说是细胞衰老的主流学说^[4]。人类的静态衰老被认为是一种慢性、系统性、低程度的氧化应激和炎症状态^[3,13]。我们课题组前期研究发现,过氧化氢诱导的早熟性HUVEC与正常HUVEC相比,细胞内MDA及氧自由基明显增加,SOD活性降低^[8]。

NF- κ B p65在炎症反应调控中具有关键作用。研究表明,在许多年龄相关性疾病,如动脉粥样硬化、心脏病、糖尿病等疾病中,NF- κ B都处于长期持续激活状态^[14]。阻断内皮细胞的NF- κ B信号能防止与年龄相关的胰岛素抵抗和血管衰老,并能显著延长寿命^[15]。

中药人参作为传统的名贵中药,在我国已有

上千年的应用历史。人参皂苷Rb1是其中含量最多的重要单体成分,现代研究表明,人参皂苷Rb1对血管内皮及神经细胞具有保护作用^[8,16]。谈善军等^[17]发现人参皂苷Rb1能上调术后疲劳综合征大鼠的抗氧化酶CAT、SOD、GSH-Px的活性,减少MDA的生成。Wu等^[18]研究者在高脂饲养的肥胖小鼠模型上证实人参皂苷Rb1可以减少肥胖诱导的炎症因子IL-6、IL-1 β 等的表达。本研究结果显示:复制性衰老细胞中SOD的活力含量明显低于对照组,而MDA、IL-6、TNF- α 的含量及NF- κ B p65的活性明显高于对照组,经人参皂苷Rb1干预后,以上作用都能有效地被逆转,内皮细胞衰老也有显著改善。

本研究结果表明人参皂苷Rb1可通过抑制NF- κ B p65介导的氧化应激和炎症反应延缓复制性内皮细胞衰老。本课题探讨了人参皂苷Rb1延缓复制性内皮细胞衰老的可能机制,但仍需在体内及临床研究中进一步论证,最终用于增龄相关性心血管疾病的防治。

参考文献

- [1] Niccoli T, Partridge L. Ageing as a risk factor for disease[J]. *Curr Biol*, 2012, 22(17): R741-752.
- [2] Schöttker B, Saum KU, Jansen EH, et al. Oxidative stress markers and all-cause mortality at older age: a population-based cohort study[J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2015, 70(4): 518-524.
- [3] Cevenini E, Monti D, Franceschi C. Inflamm-aging[J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2013, 16(1): 14-20.
- [4] De la Fuente M, Miquel J. An update of the oxidation-inflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging[J]. *Curr Pharm Des*, 2009, 15(26): 3003-3026.
- [5] Kriete A, Mayo KL. Atypical pathways of NF- κ B activation and aging[J]. *Exp Gerontol*, 2009, 44(4): 250-255.
- [6] Salazar G, Huang J, Feresin RG, et al. Zinc regulates Nox1 expression through a NF- κ B and mitochondrial ROS dependent mechanism to induce senescence of vascular smooth muscle cells[J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 108(8): 225-235.
- [7] Yang S, Li J, Chen Y, et al. MicroRNA-216a promotes M1 macrophages polarization and atherosclerosis progression by activating telomerase via the Smad3/NF- κ B pathway[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2018, 22(8): 356-365.
- [8] Liu DH, Chen YM, Liu Y, et al. Rb1 protects endothelial cells from hydrogen peroxide-induced cell senescence by modulating redox status[J]. *Biol Pharm Bull*, 2011, 34(7): 1072-1077.
- [9] Baudin B BA, Bosselut N, Vaubourdolle M. A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells[J]. *Nat protoc*, 2007, 2(3): 481-485.
- [10] Paneni F, Diaz Cañestro C, Libby P, et al. The aging cardiovascular system: understanding it at the cellular and clinical levels[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2017, 69(15): 1952-1967.
- [11] Tesaro M, Mauriello A, Rovella V, et al. Arterial ageing: from endothelial dysfunction to vascular calcification[J]. *J Intern Med*, 2017, 281(5): 471-482.

- [12] Incalza MA, D'Oria R, Natalicchio A, et al. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases [J]. *Vascul Pharmacol*, 2018, 100(23): 1-19.
- [13] Ji LL, Leeuwenburgh C, Leichtweis S, et al. Oxidative stress and aging: role of exercise and its influences on antioxidant systems [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1998, 854(8): 102-117.
- [14] Cuaz-Perolin C, Billiet L, Bauge E, et al. Anti-inflammatory and antiatherogenic effects of the NF- κ B inhibitor acetyl-11-keto-beta-boswellic acid in LPS-challenged ApoE^{-/-} mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(2): 272-277.
- [15] Hasegawa Y, Saito T, Ogihara T, et al. Blockade of the nuclear factor- κ B pathway in the endothelium prevents insulin resistance and prolongs life spans [J]. *Circulation*, 2012, 125(9): 1122-1133.
- [16] 彭沛, 宋志明, 刘勇, 等. 人参皂苷Rb1抗小鼠脑自然衰老及其对mTOR/p70S6K通路的影响 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2015, 36(2): 176-180.
- [17] 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.
- [17] 谈善军, 余震, 董千铜, 等. 人参皂苷Rb1对术后疲劳综合征大鼠骨骼肌氧化应激的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2012, 32(11): 1535-1538.
- [18] Tan SJ, Yu Z, Dong QT, et al. Effects of ginsenoside Rb1 on the oxidative stress in the skeletal muscles of rats with postoperative fatigue syndrome [J]. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*, 2012, 32(11): 1535-1538.
- [18] Wu Y, Yu Y, Szabo A, et al. Central inflammation and leptin resistance are attenuated by ginsenoside Rb1 treatment in obese mice fed a high-fat diet [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e92618.
- (编辑 孙慧兰)

(上接第817页 from page 817)

- cisplatin sensitivity of β -catenin gene expression [J]. *J Clin Otorhinolaryngol Head Neck Surg*, 2015, 29(13): 1143-1147.
- [12] K Tseng OL, Spinelli JJ Gotay CC, et al. Aromatase inhibitors are associated with a higher fracture risk than tamoxifen: a systematic review and meta-analysis [J]. *Ther Adv Musculoskelet Dis*, 2018, 10(4): 71-90.
- [13] Love RR. Tamoxifen therapy in primary breast cancer: Biology, efficacy and side effects [J]. *Nat Cancer Inst*, 2001, 93(13): 1008-1013.
- [14] Liu Y, Huang L, Guan X, et al. ER- α 36, a novel variant of ER α , is involved in the regulation of Tamoxifen-sensitivity of glioblastoma cells [J]. *Steroids*, 2016, 111(8): 127-133.
- [15] Harmalkar M, Upraity S, Kazi S, et al. Tamoxifen-Induced Cell Death of Malignant Glioma Cells Is Brought About by Oxidative-Stress-Mediated Alterations in the Expression of BCL2 Family Members and Is Enhanced on miR-21 Inhibition [J]. *J Mol Neurosci*, 2015, 57(2): 197-202.
- [16] Robins HI, Won M, Seiferheld WF, et al. Phase 2 trial of radiation plus high-dose tamoxifen for glioblastoma multiforme: RTOG protocol BR-0021 [J]. *Neuro Oncol*, 2006, 8(1): 47-52.
- [17] Balça-Silva J, Matias D, Do Carmo A, et al. Glioblastoma entities express subtle differences in molecular composition and response to treatment [J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(3): 1341-1352.
- [18] Balça-Silva J, Matias D, do Carmo A, et al. Tamoxifen in combination with temozolomide induce a synergistic inhibition of PKC-pan in GBM cell lines [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1850(4): 722-32.
- [19] Singh RK, Kumar S, Gautam PK, et al. Protein kinase C- α and the regulation of diverse cell responses [J]. *Biomol Concepts*, 2017, 8(3-4): 143-153.
- (编辑 徐杰)