

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2017.06.016

人参三七川芎醇提物对衰老人心脏微血管内皮细胞自噬的影响

王强¹, 修成奎², 杨静², 雷燕^{2*}

(1. 中国中医科学院望京医院, 北京市朝阳区望京中环南路 6 号, 100102; 2. 中国中医科学院医学实验中心)

摘要 目的 观察人参三七川芎醇提物延缓内皮细胞衰老的可能作用机制。方法 实验分为衰老细胞组、自噬模型组、白藜芦醇组、人参三七川芎醇提物组, 除衰老细胞组外, 其余各组的衰老人心脏微血管内皮细胞 (HCMEC) 通过饥饿方法建立自噬模型。白藜芦醇组用 10 μmol/L 白藜芦醇溶液培养, 人参三七川芎醇提物组用 100 mg/L 人参三七川芎提取物溶液培养 48 h。采用电子显微镜观察细胞中自噬小体的形态学改变, western blot 法检测自噬蛋白 Beclin1、LC3B 表达情况。结果 与自噬模型组比较, 人参三七川芎醇提物组和白藜芦醇组细胞质中出现较多的独立双层及多层膜结构的自噬体。与自噬模型组比较, 人参三七川芎醇提物组和白藜芦醇组 Beclin1、LC3B 蛋白表达明显增多 ($P < 0.01$), 且白藜芦醇组 Beclin1、LC3B 蛋白的表达明显多于人参三七川芎醇提物组 ($P < 0.01$)。结论 人参三七川芎醇提物可促进衰老内皮细胞自噬体的产生及自噬蛋白的表达, 这可能是其延缓内皮衰老的重要机制之一。

关键词 衰老; 人参; 三七; 川芎; 心脏微血管内皮细胞; 自噬

自噬是细胞将衰老过剩的生物大分子 (如蛋白质) 及受损的细胞器运输到溶酶体进行分解代谢, 以实现细胞本身的代谢和相关细胞器的更新的过程。自噬与神经退行性疾病、肿瘤、心血管疾病、特发性肺纤维化、代谢性疾病以及骨关节炎等多种老年病都有密切关系^[1]。内皮细胞的功能紊乱是人类衰老和疾病的基础^[2]。自噬不仅参与内皮细胞的氧化反应, 而且参与动脉粥样硬化时细胞死亡和存活的调控^[3-4]。前期研究证实, 人参三七川芎提取物可以延缓人脐静脉内皮细胞的复制性衰老^[5], 改善复制性衰老人心脏微血管内皮细胞 (HCMEC) 的功能, 延缓衰老^[6]。有研究证实, 中药提取物姜黄素可以诱导人脐静脉内皮细胞自噬保护内皮细胞的氧化应激损伤^[7]。因此, 本研究观察人参三七川芎醇提物对复制性衰老 HCMEC 自噬的影响。

1 材料

1.1 药物

三七 [*PanaxNotoginseng*] 产自云南; 川芎

[*RhizomaChanxiong*] 产自四川; 人参 [*PanaxGinseng*] 产自吉林。人参三七川芎醇提物, 由北京因科瑞斯医药科技公司提供 (人参、三七、川芎生药比例为 2 : 3 : 4, 经过醇提、浓缩、减压制成干膏粉), 每克干膏生药 4.286 g, 使用时用灭菌 PBS 液配置成 25 μg/μl 的贮存液, 以 0.22 μm 的滤器过滤分装, 保存于 -20℃ 冰箱中。白藜芦醇购自中国食品药品检定研究院 (批号: 111535-200502), 用 DMSO 溶解, 配成 1 μg/μl 的贮存液, 分装后避光保存于 4℃。

1.2 细胞及试剂

HCMEC (批号 9596)、胎牛血清 (批号 13301)、内皮细胞生长因子 (批号 12995)、内皮细胞培养基 (批号 13916)、双抗 (批号 13311)、牛血浆纤连蛋白 (批号 12579)、胰酶中和液 (批号 12953)、胰酶/EDTA 消化酶 (批号 13010)、冻存液 (批号 13779) 均购自美国 Sciencell 公司; EBSS 平衡盐溶液 (美国 Gibco 公司, 批号 1605212); 兔 Beclin1 多克隆抗体 (货号: ab55878)、兔 LC3B 多克隆抗体 (货号 ab128025) 均购自英国 Abcam 公司; 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (H + L) (上海碧云天生物技术有限公司)

基金项目: 国家自然科学基金 (81273976); 中国中医科学院自主选题 (ZZ2013002)

* 通讯作者: Leiy999@163.com, (010) 64089556

司, 货号: A0208); 戊二醛溶液 (美国 SIGMA-ALDRICH 公司, 货号: G5882); 高效 RIPA 组织/细胞裂解液 (北京索莱宝公司, 货号 S3568)。

1.3 器材

超净工作台 (新加坡 ESCO 公司, 型号 SVE-4A1); CO₂ 细胞培养箱 (日本 SANYO 公司, 型号 MCO-20AIC); 倒置相差显微镜及成像系统 (德国 Leica 公司, 型号 4000B); 精密 pH 计 (英国 Mettler-Toledo 公司, 型号 Delta320); 低温高速离心机 (德国 Heraeus 公司, 型号 separetechbiofuge 28RS); 透射电子显微镜 (日本 HITACHI 公司, 型号 H7650); LKB-V 超薄切片机 (德国 Leica 公司, 型号 emuc-6)。

2 方法

2.1 造模方法

选择生长状态良好的 8 代 HCMEC 细胞, 参照文献 [8] 建立 HCMEC 衰老模型。用含内皮细胞培养基培养 24 h, 然后用 EBSS 平衡盐溶液饥饿细胞 0 h、1 h、2 h、4 h、6 h, 各饥饿时间均重复 3 次以上, 电镜下观察若细胞胞浆内可见大量囊泡状结构的自噬小体时则选择为建立自噬模型的细胞饥饿时间 [9], 再进行如下实验。

2.2 实验分组

实验分为衰老细胞组、自噬模型组、白藜芦醇组、人参三七川芎醇提取物组。白藜芦醇组用终浓度为 10 μmol/L 白藜芦醇溶液培养, 人参三七川芎醇提取物组用终浓度为 100 mg/L 人参三七川芎醇提取物溶液培养, 药物均用内皮细胞培养基稀释, 培养 48 h。

2.3 透射电镜下观察内皮细胞自噬小体

各组将 5×10^5 个衰老 HCMEC 接种于 25 cm² 培养瓶中培养, 24 h 后除衰老细胞组外其余各组建立自噬模型, 各药物组采用相应药物培养 48 h, 用 0.25% 胰酶/EDTA 消化酶消化, 收集细胞。PBS 漂洗 2 次, 离心成团, 在 EP 管中加入 2% 戊二醛 4℃ 固定过夜, PBS 漂洗, 1% 锇酸固定, 1% 醋酸铀块染, 梯度丙酮脱水, 包埋液包埋固化, 半薄切片及甲苯胺蓝染色进行定位, LKB-V 超薄切片机超薄切片, 透射电镜下观察内皮细胞自噬小体。

2.4 western blot 法检测内皮细胞 LC3 B 和 Beclin1 蛋白表达

将 1.5×10^5 个衰老 HCMEC 接种于 6 孔板培养, 24 h 后除衰老细胞组外其余各组建立自噬模

型, 各药物组采用相应药物培养 48 h, 用 0.25% 胰酶/EDTA 消化酶消化, 收集细胞约 $0.5 \times 10^6 \sim 0.5 \times 10^6$ 个/组, 漂洗 2 次, 离心成团。RIPA 蛋白抽提试剂提取各组总蛋白, BCA 法测定蛋白含量, 调整蛋白浓度, 煮沸变性 5 min, 10% SDS-PAGE 电泳后半干转印仪转膜, 5% BSA-TBST 封闭 1 h, 按照比例稀释 Beclin1 (1 : 500)、LC3B (1 : 1000) 一抗, 4℃ 水平摇床孵育过夜, 山羊抗兔 IgG (H + L) 1 : 3000 室温孵育 40 min, 上机荧光扫描, GAPDH 为内参。

2.5 统计学方法

采用 SPSS 18.0 软件进行统计处理, 数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 组内比较用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 饥饿不同时间 HCMEC 自噬小体形成情况

图 1 示, 透射电镜下可见, 饥饿 0 h, 细胞核较大, 核仁明显, 胞浆内清晰可见线粒体、内质网等细胞器。饥饿 2 h 后, 细胞胞浆内可见大量囊泡状结构的自噬小体, 在高倍镜下可见双层膜结构, 包含着未消化的胞浆成分或细胞器。随着饥饿时间的延长, 细胞的形态出现破坏, 且自噬体数量明显减少。由此选择饥饿 2 h 作为建立自噬模型的时间。

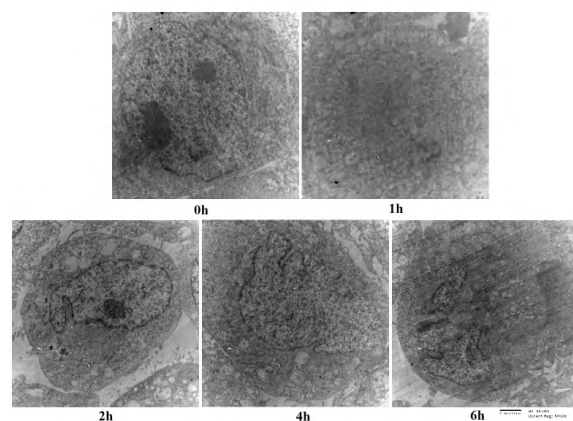


图 1 透射电镜下饥饿不同时间衰老人心脏微血管内皮细胞自噬小体形成情况 ($\times 8000$)

3.2 各组衰老 HCMEC 细胞自噬小体情况

图 2 示, 衰老细胞组中虽然线粒体、内质网等结构清晰可见, 但是未发现明显的双层结构的自噬小体。自噬模型组在细胞边缘部分可见散在含有双层结构的自噬小体。与自噬模型组相比, 人参三七川芎醇提取物组细胞质中出现较多的独立双层及多层膜结构的自噬小体, 白藜芦醇组细胞质中独立双层及多层膜结构的自噬小体呈现较多。

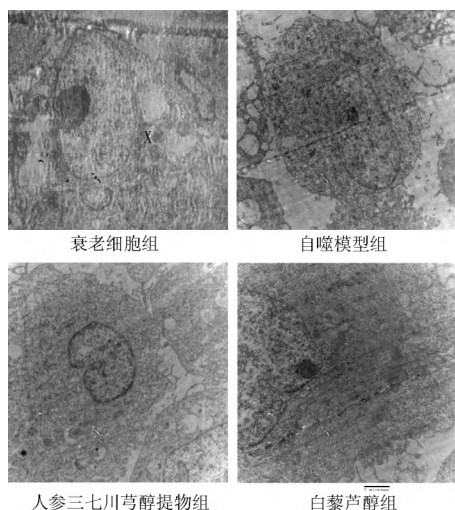


图2 各组衰老人心脏微血管内皮细胞
自噬小体 (×8000)

3.3 各组衰老 HCMEC 中 Beclin1、LC3B 蛋白表达比较

表1示,与自噬模型组比较,人参三七川芎醇提物组和白藜芦醇组 Beclin1、LC3B 蛋白表达明显增多,衰老细胞组 Beclin1、LC3B 蛋白表达明显减少($P < 0.01$);与人参三七川芎醇提物组比较,白藜芦醇组 Beclin1、LC3B 蛋白的表达明显增多($P < 0.01$)。

表1 各组衰老人心脏微血管内皮细胞中 Beclin1、
LC3 B 蛋白表达比较 (/GAPDH, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本	Beclin1	LC3 B
衰老细胞组	3	0.586 ± 0.010*	0.690 ± 0.020*
自噬模型组	3	0.716 ± 0.008	0.835 ± 0.021
人参三七川芎醇提物组	3	0.764 ± 0.008*	0.995 ± 0.119*
白藜芦醇组	3	0.967 ± 0.047*△	1.456 ± 0.088*△

注:与自噬模型组比较,* $P < 0.01$;与人参三七川芎醇提取物组比较,△ $P < 0.01$

4 讨论

自噬是降解损伤或丧失功能的蛋白或细胞器,提供能量和原材料,维持细胞稳态和更新的关键细胞机制。衰老过程中细胞自噬能力下降,损伤细胞大量堆积,出现细胞功能障碍,有研究发现自噬现象的增加与延缓衰老有密切关系^[1],自噬减少是内皮细胞功能失调的主要机制^[1],可以限制血管紧张素Ⅱ对内皮功能失调的破坏作用^[2]。在自噬过程中,如果自噬的下游步骤被阻断或者自噬降解减少,则会出现自噬体数量的增多。自噬体数量的检测方法主要包括电镜或光学显微镜观察 LC3 的位置,生化方法检测 LC3 表达形式的改变。电子

显微镜所见的自噬体的典型结构是包含与溶酶体融合过程中,未消化的胞质内容的双膜结构,比如线粒体和内质网的碎片等细胞器。通过定量 LC3 也能估计自噬的数量,自噬过程中 LC3A 向 LC3B 转化增多。LC3B 的数量与自噬小体的数量一定程度上成正比,因此许多研究通过电镜方法观察自噬数量、蛋白印迹的方法检测 LC3B 的比值来反映自噬现象的发生^[3]。Beclin1 是哺乳动物参与自噬的特异性基因,其表达上升,可刺激自噬的发生。

本研究结果发现,人参三七川芎醇提取物可以促进自噬体的产生,同时使 LC3B、Beclin1 蛋白表达增加,说明其延缓内皮衰老的作用可能与促进自噬发生密切相关。另有研究结果显示,白藜芦醇可以诱导血管内皮细胞的自噬从而减轻内皮细胞的炎症损伤,可以通过脱乙酰酶和脱乙酰基酶诱导自噬,延长模型生物体的寿命^[4-13]。而本研究中白藜芦醇组 LC3B、Beclin1 蛋白表达比人参三七川芎醇提取物组更多,表明白藜芦醇促进衰老内皮细胞自噬体的产生要优于人参三七川芎醇提取物组。综上所述,人参三七川芎醇提取物可以延缓血管内皮细胞的衰老,其机制可能与促进自噬体的产生,增加自噬蛋白 LC3B、Beclin1 的表达密切相关。

参考文献

- [1] 花芳,余娇娇,李珂,等. 自噬影响衰老及老年病的研究进展 [J]. 药理学,2014,49(6):764-773.
- [2] MANNARINO E, PIRRO M. Endothelial injury and repair: a novel theory for atherosclerosis [J]. Angiology, 2008, 59(2 Suppl): 69S-72S.
- [3] CAO B, FAN L, XIANG R. Crosstalk between autophagy and apoptosis in endoplasmic reticulum during atherosclerosis [J]. Acta Biophysica Sinica, 2013, 29(12): 911-918.
- [4] RAZANI B, FENG C, COLEMAN T, et al. Autophagy links inflammasomes to atherosclerotic progression [J]. Cell Metab, 2012, 15(4): 534-544.
- [5] 杨静,雷燕,崔巍,等. 人参三七川芎提取物延缓内皮细胞复制性衰老的机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(12): 1544-1548.
- [6] 王强. 益气活血中药对衰老血管内皮细胞骨架蛋白的干预作用及机制研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2015: 118.
- [7] TAKIZAWA Y, KOSUGE Y, AWAJI H, et al. Up-regulation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), silencing type information regulation 2 homologue 1 (SIRT1) and autophagy-related genes by repeated treatments with resveratrol in human umbilical vein endothelial cells [J].

Br J Nutr, 2013, 110(12): 2150-2155.

王强,雷燕,欧阳竞锋,等. 人参三七川芎提取物对复制性衰老内皮细胞微丝的形态学影响 [J]. 中医杂志, 2015, 56(8): 699-702.

吕雷,林康,高伟阳,等. 饥饿诱导增生性瘢痕成纤维细胞自噬发生 [J]. 中国病理生理杂志, 2013, 29(2): 330-333.

RUBINSZTEIN DC, MARIÑO G, KROEMER G. Autophagy and aging [J]. Cell, 2011, 146(5): 682-695.

林小龙,马晓峰,李爽,等. 影响血管内皮细胞自噬的因素及其相关机制探讨 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2012, 39(3): 234-240.

NUSSENZWEIG SC, VERMA S, FINKEL T. The role of autophagy in vascular biology [J]. Circ Res, 2015, 116(3): 480-488.

MIZUSHIMA N, YOSHIMORI T, LEVINE B. Methods in mammalian autophagy research [J]. Cell, 2010, 140(3): 313-326.

陈明亮. 白藜芦醇在血管内皮细胞的生物利用特点和抗炎机制研究 [D]. 重庆: 第三军医大学, 2013: 14.

BENNETZEN MV, MARIÑO G, PULTZ D, et al. Phosphoproteomic analysis of cells treated with longevity-related autophagy inducers [J]. Cell Cycle, 2012, 11(9): 1827-1840.

Effect of Renshen [*Radix Ginseng*, 人参], Sanqi [*Radix Notoginseng*, 三七] and Chuanxiong [*Rhizoma Ligustici Chuanxiong*, 川芎] Alcohol Extract on Autophagy of Senile Human Cardiac Microvascular Endothelial Cells

WANG Qiang¹, XIU Chengkui², YANG Jing², LEI Yan²

(1. Wangjing Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100102; 2. Experimental Researcher Center, China Academy of Chinese Medical Sciences)

ABSTRACT Objective To observe the possible mechanism about alcohol extract of Renshen [*Radix Ginseng*, 人参], Sanqi [*Radix Notoginseng*, 三七] and Chuanxiong [*Rhizoma Ligustici Chuanxiong*, 川芎] in postponing endothelial cells senescence. **Methods** The experimental subjects were divided into the senile cells group, the model of autophagy group, the resveratrol group and the alcohol extract of Renshen, Sanqi and Chuanxiong group. Except for the senile cells group, human senescent cardiac microvascular endothelial cells were made into model of autophagy by hunger in the rest of the groups. The resveratrol group was cultivated with 10 μ mol/L of resveratrol solution, and the alcohol extract of Renshen, Sanqi and Chuanxiong group was cultivated with 100 mg/L of alcohol extract solution of Renshen, Sanqi and Chuanxiong, both for 48 h. Morphological changes of autophagosome in the cells were observed by using electron microscope, and expressions of autophagy protein Beclin1 and LC3B were detected with western blot method. **Results** Compared with the model of autophagy group, there were more autophagosome with independent double and multilayer membrane structure in cytoplasm in the resveratrol group and the alcohol extract of Renshen, Sanqi and Chuanxiong group. Compared with the model of autophagy group, the expression of Beclin1 and LC3B significantly increased in the resveratrol group and the alcohol extract of Renshen, Sanqi and Chuanxiong group ($P < 0.01$). Compared with the alcohol extracts of Renshen, Sanqi and Chuanxiong group, the expression of Beclin1 and LC3B significantly increased in the resveratrol group ($P < 0.01$). **Conclusion** The alcohol extract of Renshen, Sanqi and Chuanxiong may promote autophagosome to generate in senescent endothelial cells and autophagy protein to express. This may be the one of the important mechanisms about postponing endothelial senescence.

Keywords senility; Renshen [*Radix Ginseng*, 人参]; Sanqi [*Radix Notoginseng*, 三七]; Chuanxiong [*Rhizoma Ligustici Chuanxiong*, 川芎]; cardiac microvascular endothelial cells; autophagy

(收稿日期: 2016-07-17; 修回日期: 2016-11-06)

编辑: 王利芬