

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2015.08.018

人参三七川芎提取物对复制性衰老内皮细胞微丝形态学的影响

王 强¹, 雷 燕^{*}, 欧阳竞锋¹, 修成奎¹, 高永红², 赵明镜², 王 毅¹

(1. 中国中医科学院医学实验中心, 北京市东城区东直门内南小街 16 号, 100700; 2. 北京中医药大学东直门医院)

摘要 目的 探讨人参三七川芎提取物延缓内皮衰老的可能作用机制。方法 通过细胞体外传代, 将人心脏微血管内皮细胞 (HCMEC) 培养至第 8 代方法建立内皮细胞复制性衰老模型, 结合 β -半乳糖苷酶 (SA- β -gal) 染色、CCK-8 检测细胞增殖能力、流式细胞仪分析细胞周期方法进行衰老细胞鉴定。96 孔板按照 $6 \times 10^3 \sim 8 \times 10^3$ /孔接种细胞, 分为青年组、衰老组、白藜芦醇组和中药低、中、高剂量组, 每组 3 个复孔。青年组为 5 代青年细胞, 其余各组为 8 代复制性衰老细胞, 白藜芦醇组加浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇溶液 $100 \mu\text{l}$, 中药低、中、高剂量组分别加浓度为 50、100、200 mg/L 的人参三七川芎提取物 $100 \mu\text{l}$ 。观察各组 24 h、48 h、72 h 后纤维状肌动蛋白 (F-actin)、单体肌动蛋白 (G-actin) 的形态学改变。结果 衰老组细胞 SA- β -gal 染色阳性明显高于青年组 ($P < 0.01$); 衰老组较青年组细胞表现为 G0/G1 期细胞比例上升, S 期和 G2/M 期细胞比例下降, 细胞增殖能力降低 ($P < 0.01$)。衰老组 F-actin 出现断裂、应力纤维, G-actin 表现为向细胞周边区域伸展移位, 而细胞中央区域染色变弱; 白藜芦醇组和中药低、中、高剂量组可以维持复制性衰老 HCMEC 微丝的结构, 减少 G-actin 向 F-actin 的转变, 减少应力纤维的形成, 并且干预效果随着干预时间延长表现更加明显。结论 人参三七川芎提取物能够保持复制性衰老 HCMEC 微丝的正常形态, 这可能是其延缓内皮衰老的重要机制。

关键词 人参; 三七; 川芎; 提取物; 细胞衰老; 细胞微丝; 纤维状肌动蛋白; 单体肌动蛋白

中国已进入人口老龄化的快速发展时期, 2013 年底中国老年人口达 2.02 亿, 其中 80 岁以上高龄老年人口达 2300 万^[1]。针对老龄化及相关疾病的治疗是抗衰老的关键所在, 课题组前期应用人参、三七、川芎固定比例组方对衰老相关的氧化应激、细胞周期调节因子等方面的机制进行了研究, 发现可以减少复制性衰老内皮细胞活性氧产生和调节复制性平滑肌细胞周期因子^[2-3]。内皮细胞生物学改变是人类衰老和疾病的基础, 内皮细胞功能失调是血管老化的主要特征之一^[4]。纤维状肌动蛋白 (F-actin)、单体肌动蛋白 (G-actin) 作为微丝的主要表现形式, 两者之间的转化与血管内皮细胞的通透性、与内皮相关的血管舒缩功能、内皮凋亡等密切相关^[5-7]。因此, 本研究以 F-actin、G-actin 作为细胞衰老改变的切入点, 分析人参三七川芎提

取物对衰老内皮细胞 F-actin、G-actin 的干预作用。

1 材料

1.1 药品制备

人参, 产自吉林省; 三七, 产自云南省; 川芎, 产自四川省。经中国中医科学院中药研究所鉴定, 均符合《中华人民共和国药典》(2010 年版) 标准^[8]。人参三七川芎提取物, 原药人参、三七、川芎初始比例为 2: 3: 4, 经过醇提、浓缩、真空减压制成干膏粉, 生药含量为 4.286 g/g 干膏, 由北京因科瑞斯医药科技公司提供, 使用时用 PBS 液配置成 $25 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的贮存液, 以 $0.22 \mu\text{m}$ 的滤器过滤分装, 保存于 -20°C 冰箱中, 使用时用内皮细胞完全培养液稀释成相应浓度的干预液。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 $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的贮存液分装后保存于 4°C 冰箱, 使用时用内皮细胞完全培养液稀释成相应浓度的干预液。

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: wqwin21@163.com, (010) 84076318

1.2 细胞及试剂

人心脏微血管内皮细胞 (HCMEC, 货号 9596)、ECM 基础培养基 (货号 13916)、内皮细胞生长因子 (货号 12995)、胎牛血清 (货号 13301)、双抗 (货号 13311)、胰酶/EDTA 消化酶 (货号 13010)、胰酶中和液 (货号 12953)、冻存液 (货号 13779)、牛血浆纤连蛋白 (货号 12579) 均为美国 Sciencell 公司产品; 细胞衰老测定试剂盒 (上海杰美基因医药科技有限公司, 货号 11-52818-11); CCK-8 细胞增殖和毒性检测试剂盒 陈仁化学科技 (上海) 有限公司, 货号 FP653]; DNA 含量检测试剂盒 (南京凯基生物科技发展有限公司, 货号 KGA512); 罗丹明鬼笔环肽 (Molecular Probes 公司, 货号 1475357); Deoxyribonuclease I-Alexa Flour 488 conjugate (Molecular Probes 公司, 货号 1495819)。

1.3 仪器

CO₂ 细胞培养箱 (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); 流式细胞仪 (Beckman 公司, 型号 FC50); 激光免疫共聚焦显微镜 (日本 Olympus 公司, 型号 FV1000)。

2 方法

2.1 细胞培养及传代

HCMEC 按照内皮细胞培养方法操作, 待各组细胞铺满瓶底 80% ~ 90% 时, 用 0.25% 胰酶/EDTA 消化酶消化, 胰酶中和液中和, 轻轻吹打后转移至 50 ml 离心管 1000 r/min 离心 5 min, 收集细胞, 弃上清, 加入 2 ~ 3 ml 的完全培养基, 1 : 2 或 1 : 3 传代。

2.2 β -半乳糖苷酶 (SA- β -gal) 染色鉴定衰老细胞

β -糖苷酶在衰老细胞表达, 而在其他细胞则难以表达, 因此, 选用 SA- β -gal 染色鉴定衰老^[8]。有研究显示, 体外培养人脐静脉内皮细胞, 发现培养至第 8 代造成内皮细胞复制性衰老模型^[9], 国外文献报道内皮细胞 SA- β -gal 染色在 60% 以上认为是衰老细胞^[11-12]。步骤: 待 24 孔板内细胞生长至 70% 左右时, 抽去 24 孔板中的细胞培养液; 每孔加入 500 μ l GENMED 清理液, 清洗生长中的细胞表面; 小心抽去每孔里的清理液, 每孔加入 500 μ l GENMED 固定液, 覆盖整个生长表面, 室温孵育 5 min; 小心抽去固定液, 每孔加入 500 μ l

GENMED 酸性液, 清洗细胞表面, 小心抽去酸性液; 每孔加入 400 μ l GENMED 染色工作液, 覆盖整个细胞表面, 放进 37℃ 培养箱, 孵育 3 ~ 16 h, 最多不超过 24 h, 或细胞呈现蓝色; 在光学显微镜 10 倍物镜下选取 100 ~ 200 个细胞, 查找 3 个视野, 计算蓝色细胞的表达量, 即为 β -半乳糖苷酶染色阳性。

2.3 CCK-8 检测衰老细胞增殖能力

在 96 孔板中接种细胞 6×10^3 个 ~ 8×10^3 个 (体积 100 μ l), 置于 37℃ 培养箱中培养 24 h; 待细胞融合达 70% 左右, 向每孔内加入 10 μ l 的 CCK-8 液, 在 37℃ 培养箱中孵育 2 h, 酶标仪在 450 nm 波长处检测每孔的光密度。

2.4 激光免疫共聚焦显微镜观察细胞 F-actin、G-actin 的改变

用牛血浆纤连蛋白包被黑色玻璃底 96 孔板, 实验分为青年组、衰老组、白藜芦醇组和中药低、中、高剂量组, 按照 6×10^3 ~ 8×10^3 /孔接种细胞, 每组 3 个复孔。青年组为 5 代青年细胞, 其余各组为 8 代复制性衰老细胞, 白藜芦醇组加浓度为 10 μ mol/L 白藜芦醇溶液 100 μ l, 中药低、中、高剂量组分别加浓度为 50、100、200 mg/L 的人参三七川芎提取物 100 μ l。药物用 ECM 完全培养基液稀释, 干预时间分别为 24 h、48 h、72 h。当细胞生长至 70% ~ 80% 时, 用 PBS (pH = 7.4) 清洗细胞 2 遍, 用 4% 的多聚甲醛室温下固定 15 min, 用 PBS 清洗 5 min $\times$ 3 遍; 用 0.1% X-100 室温下穿透细胞 5 min, 用 PBS 清洗 5 min $\times$ 3 遍; 然后用罗丹明鬼笔环肽 100 μ l (1U) 和 Alexa Fluor 488 DNaseI 100 μ l (20 μ g/ml) 共染色 30 min, 再用 PBS 清洗 5 min $\times$ 3 遍, 上机观察, 以特异显示 F-actin、G-actin 的结构和分布。

2.5 流式细胞仪分析细胞周期

青年组和衰老组细胞用 0.25% 胰酶/EDTA 消化酶消化、收集细胞, 用 PBS 洗涤细胞 1 次 (2000 r/min, 5 min), 收集细胞并调整其浓度为 1×10^6 /ml, 取 1 ml 的细胞悬液; 制备的细胞悬液离心后, 清洗两遍, 去除上清, 在细胞内加入 1 ml 体积分数为 70% 冷乙醇 2 ml 4℃ 固定过夜, 用 PBS 洗涤 2 次, 去除固定液, 500 μ l PBS 吹悬, 200 目筛过滤; 加入 100 μ l RNaseA 37℃ 水浴 30 min, 再加入 400 μ l PI 染色混合均匀, 4℃ 避光 30 min, 上机检查, 记录激发波长 488 nm 处红色荧光。

表 1 青年组与衰老组人心脏微血管内皮细胞 β -半乳糖苷酶染色和细胞周期比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	β -半乳糖苷酶染色阳性	细胞周期 (%)		
			G0/G1 期	S 期	G2/M 期
青年组	3	10.22 $\pm$ 1.99	69.35 $\pm$ 1.27	18.95 $\pm$ 2.19	11.70 $\pm$ 3.45
衰老组	3	80.54 $\pm$ 2.78*	87.06 $\pm$ 1.24*	8.22 $\pm$ 1.81*	4.72 $\pm$ 3.04*

注:与青年组比较, * $P < 0.01$

2.6 统计学方法

采用 SPSS 18.0 软件进行统计处理, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 组内两两比较采用独立样本 t 检验。

3 结果

3.1 青年组和衰老组 HCMEC 细胞 SA- β -gal 染色结果比较

传代过程中出现细胞体积增大, 胞核明显甚至双核, 胞浆内颗粒增加, 变浑浊。随着传代次数的增加, 贴壁能力下降, 传代后期, 部分细胞脱落, 贴壁细胞活性较差。表 1 示, 青年组细胞与衰老组细胞 SA- β -gal 染色阳性差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 衰老组明显高于青年组。

3.2 青年组和衰老组 HCMEC 细胞周期的判定

表 1 示, 青年组较衰老组细胞表现为 G0/G1 期细胞比例下降, S 期和 G2/M 期细胞比例上升, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 提示衰老组细胞停滞于 G0/G1 期, S 期和 G2/M 期下降。

3.3 青年组和衰老组 HCMEC 细胞增殖能力比较

表 2 示, 与青年组比较, 衰老组细胞增殖能力降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

表 2 青年组与衰老组 HCMEC 细胞增殖能力比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	OD 值
青年组	6	0.899 $\pm$ 0.086
衰老组	6	0.712 $\pm$ 0.046*

注:与青年组比较, * $P < 0.01$

3.4 各组 HCMEC 细胞骨架 F-actin、G-actin 比较

青年组细胞 F-actin 主要分布在细胞周边, 线条完整连续, 显示出内皮细胞的典型的鹅卵石样轮廓, G-actin 主要分布在细胞中央区域, 呈致密圆形椭圆, 边界较为清晰圆润。衰老组 F-actin 边缘变得毛糙不规整, 逐渐出现锯齿样断裂, 趋于变细崩解消散, 部分出现非极性单行排列的肌动蛋白丝组成的应力纤维, 且染色变浅, G-actin 的变化表现为向细胞周边区域伸展移位, 胞浆区出现散点状染色, 部分出现边缘变模糊呈絮状向外延伸, 而细胞中央区域染色变弱。

药物干预 24 h 后, 白藜芦醇组及中药低、中、

高剂量组的应力纤维基本消失, G-actin 也在细胞中央清晰可见, 其中白藜芦醇组 F-actin 染色要较为清晰。与衰老组相比, 药物干预 48 h 后白藜芦醇组和中药低、中、高剂量组 F-actin 的边缘较清晰光滑, 且 F-actin 很少形成应力纤维, G-actin 边缘清晰, 主要集中在细胞中间。药物干预 72 h 后, 衰老组 F-actin、G-actin 形态不规则, 且染色不清晰, 与衰老组相比, 药物干预各组 F-actin 均匀分布于细胞周围, 且染色清晰, G-actin 则聚集于细胞中央; 其中随着中药干预时间的延长, F-actin、G-actin 分布和染色更加清晰, 中药各剂量组内差异并不明显。

4 讨论

细胞的衰老是永久细胞增殖周期的停滞, 这是对生长因子和其他促进细胞增殖因素的抵抗^[3]。有学者认为细胞衰老可以独立于癌症发生, 加速正常机体衰老的病理生理进程^[4]。复制性衰老是指正常人体细胞在体外环境中分裂能力受限的现象, 细胞衰老可以反映机体的衰老, 因此复制性衰老是“衰老在细胞水平的表现”^[5]。细胞骨架是指真核细胞质中的蛋白质纤维网架体系, 微丝作为细胞骨架主要组成部分, 可以调节内皮细胞的通透性和凋亡, 维持内皮的功能, 为细胞内外信号传递起到重要的作用。F-actin 由肌动蛋白组成的细丝, 由 G-actin 形成的多聚体。G-actin 和 F-actin 的聚合是可逆的, 随着组装和分解的平衡发生变化, 从而导致微丝的重塑, 表现出功能的改变^[6]。衰老过程 F-actin 外周致密带边缘变得毛糙不规整, 逐渐出现锯齿样断裂, 趋于变细崩解消散, 部分出现非极性单行排列的肌动蛋白丝组成的应力纤维, 而细胞中央区域的染色更致密明显。G-actin 的变化表现为向细胞周边区域伸展移位, 胞浆区出现点状和丝状染色, 部分出现边缘变模糊呈絮状向外延伸, 而细胞中央区域染色变弱, 虽然部分衰老细胞染色强度有所恢复, 但细胞间距离明显增大, G-actin/F-actin 的比例变大, 也表示应力纤维的形成^[7-13]。

抗衰老药物是一类以提高生命效率 (生存时间与生命活力的总和) 为最终目的的药物, 能从

多系统、多层次和多阶段来发挥其调整功能,能在遗传学上所界定的寿限内延迟衰老或提高生命质量^[9]。白藜芦醇作为多酚类,可以通过抗氧化、抗炎、保持端粒长度和端粒酶的活性、调节自噬、减少糖基化终末产物、保持线粒体的功能、激活 SIRT1 等通路起到延缓衰老的作用^[20-21]。因此,本研究中选择白藜芦醇作为对照药物。

中医学认为,气血是脏腑经络等组织器官进行生理活动的物质基础。气虚进而导致血瘀,瘀血内阻,产生一系列的病理变化^[22]。因此,人体衰老的本质是气血失调,气虚血瘀。现代药理学研究显示,人参、三七、川芎的有效成分与抗衰老作用密切相关^[23-24],并具有扩张血管、抗动脉粥样硬化、保护血管内皮功能、调节血管活性物质、促血管新生等功效^[25-26]。三药合用,可达到益气活血、祛瘀生新、通脉活络的作用。

本研究结果显示,与青年组相比,衰老组的 SA- β -gal 染色阳性率明显增加,细胞停滞于 G1/G0 期,分裂明显减少,表明衰老细胞的分裂和增殖能力明显降低。白藜芦醇组和中药各剂量组都可以减少应力纤维的形成,增加 G-actin 表达,分布于细胞中间,并且中药各剂量组随着干预时间的延长对 F-actin/G-actin 的改善更加明显。提示人参三七川芎提取物可以保持复制性衰老内皮细胞微丝的正常结构,且长期干预效果较好。

参考文献

- [1] 全国老龄工作委员会办公室,国家卫生和计划生育委员会. 中国老年人健康指南 [EB/OL]. [2013-10-17]. <http://shfl.mca.gov.cn/article/xgbd/201310/20131000531197.shtml>.
- [2] 杨静,雷燕,方素萍,等. 人参三七川芎提取物延缓血管紧张素 II 诱导内皮细胞衰老机制的研究 [J]. 中国中西医结合杂志,2009,29(6):524-528.
- [3] 陶丽丽,雷燕. 人参、三七、川芎提取物对血管平滑肌细胞衰老相关 β 半乳糖苷酶及 p16-cyclinD/CDK-Rb 通路的影响 [J]. 中国中西医结合学报,2012,10(1):76-82.
- [4] Mannarino E, Pirro E. Endothelial injury and repair: a novel theory for atherosclerosis [J]. Angiology, 2008, 59(2 Suppl):69S-72S.
- [5] 彭红艳,常青,唐海兰,等. 同型半胱氨酸对血管内皮细胞骨架的影响 [J]. 临床心血管病杂志,2008,24(4):294-297.
- [6] Eligini S, Songia P, Cavalca V, et al. Cytoskeletal architecture regulates cyclooxygenase-2 in human endothelial cells: autocrine modulation by prostacyclin [J]. J Cell Physiol, 2012, 227(12):3847-3856.
- [7] Suarez-Huerta N, Mosselmans R, Dumont JE, et al. Actin depolymerization and polymerization are required during apoptosis in endothelial cells [J]. J Cell Physiol, 2000, 184(2):239-245.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京:中国医药科技出版社,2010.
- [9] 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.
- [10] 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):1544-1547.
- [11] Yanaka M, Honma T, Sato K, et al. Increased monocytic adhesion by senescence in human umbilical vein endothelial cells [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2011, 75(6):1098-1103.
- [12] Cho JH, Kim MJ, Kim KJ, et al. POZ/BTB and AT-hook-containing zinc finger protein 1 (PATZ1) inhibits endothelial cell senescence through a p53-dependent pathway [J]. Cell Death Differ, 2012, 19(4):703-712.
- [13] Stein GH, Drullinger LF, Robetorye RS, et al. Senescent cells fail to express cdc2, cycA, and cycB in response to mitogen stimulation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(24):11012-11016.
- [14] Jeyapalan JC, Sedivy JM. Cellular senescence and organismal aging [J]. Mech Ageing Dev, 2008, 129(7-8):467-474.
- [15] Hayflick L. The limited in vitro lifespan of human diploid cell strains [J]. Exp Cell Res, 1965, 37:614-636.
- [16] 李琦,王晓刚,凌树宽,等. 模拟失重条件下硫氧还蛋白 1 对神经母细胞瘤细胞的微丝骨架保护作用研究 [J]. 航天医学与医学工程, 2013, 26(6):450-453.
- [17] 郭晓华. 晚期糖基化终末产物诱导内皮细胞通透性增高的作用机制 [D]. 广州:第一军医大学, 2005:6.
- [18] Orlova VV, Economopoulou M, Lupu F, et al. Junctional adhesion molecule-C regulates vascular endothelial permeability by modulating VE-cadherin-mediated cell-cell contacts [J]. J Exp Med, 2006, 203(12):2703-2714.
- [19] 许士凯. 现代抗衰老化学药物研究进展 [J]. 现代中西医结合杂志, 2005, 14(16):2083-2085.
- [20] Li H, Horke S, Förstermann U. Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention [J]. Trends Pharmacol Sci, 2013, 34(6):313-319.
- [21] Tomé-Carneiro J, González M, Larrosa M, et al. One-year consumption of a grape nutraceutical containing resveratrol improves the inflammatory and fibrinolytic status of patients in primary prevention of cardiovascular disease

- [1] . Am J Cardiol, 2012, 110(3): 356-363.
- [2] 赵延龙, 闫润红, 冯玉华. “虚-瘀-衰老”学说理论与实验研究进展 [J]. 山西中医学院学报, 2010, 11(4): 70-72.
- [3] 张嘉麟, 徐文安, 杨荫康, 等. 三七中人参皂甙对老年鼠血浆脂质及其代谢产物含量的影响 [J]. 昆明医学院学报, 2001, 22(1): 45-46.
- [4] 周晓慧, 周晓霞, 杨鹤梅. 三七总皂甙防治动脉粥样硬

化的研究进展 [J]. 承德医学院学报, 2003, 4(20): 350-352.

- [5] 接传红, 高健生, 李卫红. 川芎抗血管内皮细胞凋亡作用的研究 [J]. 中医眼科杂志, 2005, 15(4): 247-249.
- [6] 杨静, 雷燕, 崔巍, 等. 人参三七川芎提取物延缓 Ang II 诱导内皮细胞衰老的机制研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2009, 29(6): 524-528.

Effects of the Extracts from Renshen (*Panax ginseng*), Sanqi (*Panax notoginseng*) and Chuanxiong (*Ligusticum wallichii*) on Microfilament Morphology of Replicate Senescent Endothelial Cells

WANG Qiang¹, LEI Yan¹, OUYANG Jingfeng¹, XIU Chengkui¹, GAO Yonghong², ZHAO Mingjing², WANG Yi¹

(1. Experiment Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100700; 2. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicines)

ABSTRACT Objective To explore the underlying possible mechanism of delaying endothelial cells aging by the extracts from Renshen (*Panax ginseng*, 人参), Sanqi (*Panax notoginseng*, 三七) and Chuanxiong (*Ligusticum wallichii*, 川芎) (Ext). **Methods** By in vitro method for cell passage, the replicate senescent model of endothelial cells was established by human cardiac microvascular endothelial cells (HCMEC) developing into the 8th generation, the senescent cell was identified by modified stained with β -galactosidase (SA- β -gal), cell proliferation ability detection with CCK-8 and cell cycle analysis by flow cytometry. The cells were inoculated with 6×10^3 to 8×10^3 density per orifice in a 96-pore plate, and were divided into a young group, a senescent group, a resveratrol group and three Ext groups at low, middle, high dosage, 3 multiple pores in each group. The young group was the 5th young generate cells, while others were the 8th generation of replicate senescent cells. The cells in resveratrol group were added with 100 μ l 10 μ mol/L resveratrol solution, and the Ext groups at low, middle, high dosage were given 10 μ l Ext with concentration of 50, 100, or 200 mg/L, respectively. The morphology changes of filamentous actin (F-actin) and globular actin (G-actin) were observed after 24 h, 48 h and 72 h of treatment. **Results** The positive staining index of SA- β -gal was significantly higher in the senescent group than that in the young group ($P < 0.01$). The cells ratio of G0/G1 cycle was increased, while the ratio of G2/M was decreased, and the cell proliferation ability was obviously lower in the senescent group than in the young group ($P < 0.01$). In the senescent group, the F-actin appeared broken, stress fibers and the G-actin was shown extending shift to cell surrounding area, and the cell central area was weak dyeing. While in the resveratrol group and Ext groups at low, middle, and high dosage, the microfilament structure of replicate senescent HCMEC was maintained, less G-actin to F-actin transformation and less stress fibers formed. The intervention effect grew with the intervention time. **Conclusion** The Ext maintaining the normal microfilament form of replicate senescent HCMEC might be the underlying important mechanism.

Keywords Renshen (*Panax ginseng*); Sanqi (*Panax notoginseng*); Chuanxiong (*Ligusticum wallichii*); extracts cell aging; cell microfilament; filamentous actin; globular actin

(收稿日期: 2014-12-12; 修回日期: 2015-01-22)

编辑: 邓 媛