

· 基础研究 ·

自然衰老大鼠血管老化中细胞骨架的改变及
人参三七川芎提取物的干预作用

修成全 雷 燕 王 强 景晓杨 姜 明

摘要 **目的** 观察人参三七川芎提取物对自然衰老大鼠胸主动脉及骨架蛋白的影响。**方法** 50 只 SD 雄性大鼠(8~9 月龄)按体重随机分为模型组、中药低、中、高剂量组及白藜芦醇组,每组各 10 只,模型组大鼠正常饲养至 21 月龄;各给药组大鼠分别从 18 月龄开始药物干预,中药低、中、高剂量组给药剂量分别为 576、1 152、2 305 mg/kg,白藜芦醇组给药剂量为 50 mg/kg,模型组按体重给予等体积的纯净水,每日 1 次,连续灌胃 3 个月;同时以 10 只 SD 雄性大鼠(3 月龄)作为青年对照组(青年组)。应用 HE 染色观察胸主动脉血管形态的改变, β -半乳糖苷酶(SA- β -gal)特异染色法计算蓝染组织比率,免疫荧光染色观察骨架蛋白 F-actin 形态的改变,Western blot 法检测骨架蛋白 F-actin 和 SM22 α 表达情况。**结果** 与青年组比较,模型组血管内膜损伤且不光滑,中膜明显增生且排列紊乱,弹力板扭曲、断裂、结构不完整,外膜增生明显,SA- β -gal 染色组织蓝染比率明显增加($P < 0.01$),F-actin 荧光强度及蛋白表达明显增多($P < 0.01$),而 SM22 α 蛋白表达明显减少($P < 0.01$)。药物干预后,各给药组血管壁内皮轻度受损,弹力膜结构较完整,中膜及外膜厚度明显降低($P < 0.01$);SA- β -gal 染色中药中剂量及白藜芦醇组蓝染比率减少($P < 0.05$),而中药低、高剂量蓝染比率改变无统计学意义($P > 0.05$);各给药组 F-actin 荧光强度明显降低($P < 0.01$);蛋白表达方面,中药中、高剂量组及白藜芦醇组 F-actin 蛋白表达减少($P < 0.01$),而中药低剂量组改变则无统计学意义($P > 0.05$),各给药组 SM22 α 蛋白表达增加($P < 0.01$)。**结论** 细胞骨架微丝蛋白 F-actin 形态及蛋白表达在衰老过程中改变明显,其相关蛋白 SM22 α 蛋白表达亦改变明显,可能共同参与了血管老化的进程;人参三七川芎提取物可以一定程度上延缓血管老化,且对于血管 F-actin 和 SM22 α 蛋白有明显干预作用,可能间接通过此作用延缓了血管老化的进程。

关键词 衰老;血管老化;细胞骨架;人参三七川芎提取物

Changes on Cytoskeleton in the Process of Vascular Aging of Natural Aging Rats and Intervention Effects of Extracts from *Radix Ginseng*, *Radix Notoginseng*, and *Rhizoma Chuanxiong* XIU Cheng-kui, LEI Yan, WANG Qiang, JING Xiao-yang, and JIANG Ming Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100700)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of extracts from *Radix Ginseng*, *Radix Notoginseng*, and *Rhizoma Chuanxiong* (RGRNRCX) on the thoracic aorta and skeleton protein of the natural aging rats. **Methods** Totally 50 SD male rats (8–9 months old) were randomly divided into model group, low dose, middle dose and high dose RGRNRCX treated group (576, 1 152, 2 305 mg/kg), and resveratrol group (50 mg/kg) according to body weight, 10 in each group. Rats in the model group were fed till 21 months old. Rats in each interventional group were intervened from month 18. Equal volume of pure water was given to rats in the model group according to body weight. All medication was administered once per day by gastrogavage for 3 consecutive months. Meanwhile, 10 male 3-month-old SD rats were recruited as a young control group. HE staining was used to observe the changes of vascular morphology of the thoracic aorta. SA- β -gal was used to calculate blue dye cell ratio. The configuration changes of F-actin were observed by immunofluorescent staining. The expressions of skeleton protein F-actin and SM22 α

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81273976);中国中医科学院自主选题(No. ZZ2013002)

作者单位:中国中医科学院医学实验中心(北京 100700)

通讯作者:雷燕, Tel: 010-64089556, E-mail: leiyan999@163.com

DOI: 10.7661/j. cjim. 20170703. 147

were detected by Western blot. Results Compared with the young control group, the intima was injured and not smooth in the model group, the tunica media was hyperplasia obviously and disarranged. The elastic plate was twisted and broken, with incomplete structure. The tunica externa was obviously proliferated. The blue dye cell ratio of SA- β -gal staining increased significantly ($P < 0.01$). The fluorescence intensity and protein expression of F-actin increased obviously ($P < 0.01$), while the protein expression of SM22 α obviously decreased ($P < 0.01$). The damage of intima was not so severe with quite complete elastic membrane in each drug intervention groups. The thickness of tunica media and tunica externa obviously decreased ($P < 0.01$). The blue dye cell ratio of SA- β -gal staining was reduced in middle dose RGRNRCX treated group and the resveratrol group ($P < 0.05$). Changed blue dye cell ratio of SA- β -gal staining was not statistically different in low and high dose RGRNRCX treated groups ($P > 0.05$). F-actin fluorescence intensity decreased obviously in each intervention group ($P < 0.01$). F-actin protein expression decreased in each intervention group ($P < 0.01$). F-actin protein expression decreased in high and middle dose RGRNRCX treated groups and the resveratrol group ($P < 0.01$). Changed F-actin protein expression was not statistically different in low dose RGRNRCX treated group ($P > 0.05$). SM22 α protein expression increased in each intervention group ($P < 0.01$). Conclusions The configuration and protein expression of F-actin changed obviously in the process of cell aging. SM22 α expression changed obviously. They might be involved in vascular aging. The extracts from RGRNRCX could delay vascular aging to some extent and have obvious intervention effect on F-actin and SM22 α . It might delay vascular aging indirectly.

KEYWORDS aging; vascular aging; cytoskeleton; Extracts from *Radix Ginseng*, *Radix Notoginseng*, and *Rhizoma Chuanxiong*

目前随着老龄化的进程,与衰老相关的各种疾病发生率也随之上升。其中血管老化的程度是决定老年人健康状况的重要因素,在衰老相关的疾病中,心血管系统疾病发病率为第一位^[1],严重威胁着老龄人口的健康。血管老化过程中,内皮屏障被破坏,中膜暴露,诱导平滑肌细胞发生表型转化^[2],中膜与外膜随之异常增生。有研究表明,细胞骨架的动态改变是促使平滑肌细胞迁移、增殖及表型变化的重要细胞内信号^[3]。细胞骨架是存在于细胞中的蛋白质纤维网架体系,对细胞的形状、运动、物质运输等起到重要作用,主要包括微管和微丝。肌动蛋白(actin)是细胞骨架微丝的主要成分,通常以单体(G-actin)或聚合体(F-actin)形式存在于细胞内,是研究细胞骨架的重要指标,平滑肌 SM22 α 蛋白,又称转凝蛋白,是一种重要的细胞骨架相关蛋白,在分化型血管平滑肌细胞中大量表达,可通过与肌动蛋白相互作用参与细胞骨架的重构和表型调节^[4]。本课题组的前期研究对血管内皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞的衰老及益气活血中药的作用机制进行了探讨^[5]。本实验在此基础上,以细胞骨架为切入点,建立自然衰老大鼠模型,并给予人参三七川芎提取物干预,观察人参三七川芎提取物延缓血管老化的作用,并试探讨细胞骨架与血管老化的关系。

材料与方法

1 动物 健康 SD 雄性大鼠(8~9 月龄)50 只,

体重(540 $\pm$ 30)g,购于北京维通利华公司,饲养于中国中医科学院西苑医院实验动物中心,单笼饲养,温度、湿度、通风条件及屏障环境符合 SPF 级标准,饲养至 21 月龄,10 只 SD 雄性大鼠(3 月龄)作为青年对照组(青年组),体重(240 $\pm$ 20)g,实验动物许可证号 SCXK(京)2012-0001。本实验符合动物保护、动物福利和伦理原则,符合国家实验动物福利伦理的相关规定。

2 药物 人参、三七、川芎合剂冻干粉,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(Rb1、Rg1、Re、三七皂苷及阿魏酸)检测符合药典的规定和标准,按 3:2:4 比例破碎成粗粉,乙醇回收提取,滤过后弃药渣,醇提液回收浓缩至稠膏,冷冻干燥至干膏,每克冻干粉含生药 4.286 g,以纯净水配制成相应的浓度。白藜芦醇购自上海融禾医药科技发展有限公司,批号:140903,使用时用 0.5% 羧甲基纤维素钠配制成相应浓度的混悬液。

3 试剂及仪器 GENMED 冰冻切片组织衰老特异性 β -半乳糖苷酶(SA- β -gal)检测试剂盒(上海杰美基因,批号:GMS10012.3);小鼠 F-actin 单克隆抗体(英国 Abcam 公司,批号:ab205);辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG(上海碧云天生物技术公司,批号:A0216);FITC 标记山羊抗小鼠 IgG(上海碧云天生物技术公司,批号:A0568);兔 GAPDH 单克隆抗体(英国 Abcam 公司,批号:ab181602);辣根过氧化物

物酶标记山羊抗兔 IgG(上海碧云天生物技术公司,批号:A0208);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术公司,批号:P0010);超敏 ECL 化学发光试剂盒(上海碧云天生物技术公司,批号:P0018);高效 RIPA 组织/细胞裂解液(北京索莱宝公司,批号:R0010);激光共聚焦显微镜(日本 Olympus,型号 FV1000);发光凝胶成像系统(SYNGENE,型号 GeneGnome XRQ);光学显微镜(日本 Olympus,型号 BX51)。

4 实验分组及给药方法 实验大鼠按体重随机分为 5 组:模型组、中药低、中、高剂量组及白藜芦醇组,每组各 10 只,模型组大鼠正常饲养至 21 月龄;各给药组分别从 18 月龄开始药物干预,按照大鼠与人的表面积比较法换算出大鼠的临床等效剂量,确定中药低、中、高剂量组给药剂量分别为 576、1 152、2 305 mg/kg,白藜芦醇组给药剂量为 50 mg/kg,模型组按体重给予等体积的纯净水,每日 1 次,连续灌胃 3 个月;同时以 10 只 SD 雄性大鼠(3 月龄)作为青年对照组(青年组)。实验过程中,大鼠自然死亡或灌胃不当致死共 8 只,剩余 52 只,其中青年组 10 只,模型、中药低、高剂量组各 8 只,中药中剂量、白藜芦醇组各 9 只。

5 检测指标及方法

5.1 HE 染色观察胸主动脉血管形态 取大鼠胸主动脉,经固定后,常规石蜡包埋、切片,二甲苯脱蜡,经各级乙醇至水洗,苏木素染色 5 min,冲洗,盐酸乙醇分化后清水浸泡 15 min,置伊红液染色 2 min,常规脱水,透明,封片。光学显微镜下观察并拍照,利用 Image-Pro Plus 6.0 软件测量中膜及外膜的厚度。

5.2 SA- β -gal 染色蓝染比率判定血管衰老程度 实验前将 GENMED 染色液(Reagent E)与 GENMED 稀释液(Reagent D)以 1:19 配制成工作液,混匀后置入 37 °C 恒温水槽预热;室温下,向冰冻切片滴加 GENMED 清理液(Reagent A)至铺满整个切片;移去切片上的清理液,并滴加 GENMED 固定液(Reagent B)至铺满整个切片,室温固定 10 min;移去切片上的固定液,滴加 GENMED 酸性液至铺满整个切片,室温孵育 5 min 后移去酸性液,并重复此步骤两次;滴加 GENMED 工作液至铺满整个切片,37 °C 湿润培养 3~24 h 至组织呈现蓝色,即刻在光学显微镜下观察和拍照,并利用 Image-Pro Plus 6.0 软件测量蓝染部分的平均光密度值。

5.3 免疫荧光染色观察骨架蛋白 F-actin 形态 石蜡切片脱蜡,枸橼酸钠缓冲液抗原修复,冷却后 TBS 漂洗,常温封闭,一抗孵育(4 °C 过夜),洗涤,二

抗避光孵育(室温)1 h,上机观察并拍照,并利用 Image-Pro Plus 6.0 软件测量荧光强度。

5.4 F-actin、SM22 α 蛋白表达检测 用眼科剪将血管组织剪碎,加入 100 μ L 含 PMSF 的 RIPA 裂解液,匀浆至无明显沉淀,4 °C 16 000 g 离心 10 min,用 BCA 试剂盒进行蛋白定量,加入 1/3 体积的 4 $\times$ Loading buffer,100 °C 加热变性 10 min。进行电泳及转膜后,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,一抗 4 °C 孵育过夜(一抗稀释比例 1:500)。1 $\times$ TBST 洗膜 3 $\times$ 10 min,二抗室温孵育 60 min(稀释比例 1:3 000),TBST 洗涤 3 $\times$ 10 min。将膜平铺并滴加配置好的 ECL 反应液 500 μ L,曝光 10 min。

6 统计学方法 应用 SPSS 18.0 软件进行统计分析,其中计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组样本采用单因素方差分析,用 Levene 法检验方差齐性,若方差齐,采用 LSD 法进行两两比较;若方差不齐,则采用 Tamhane 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

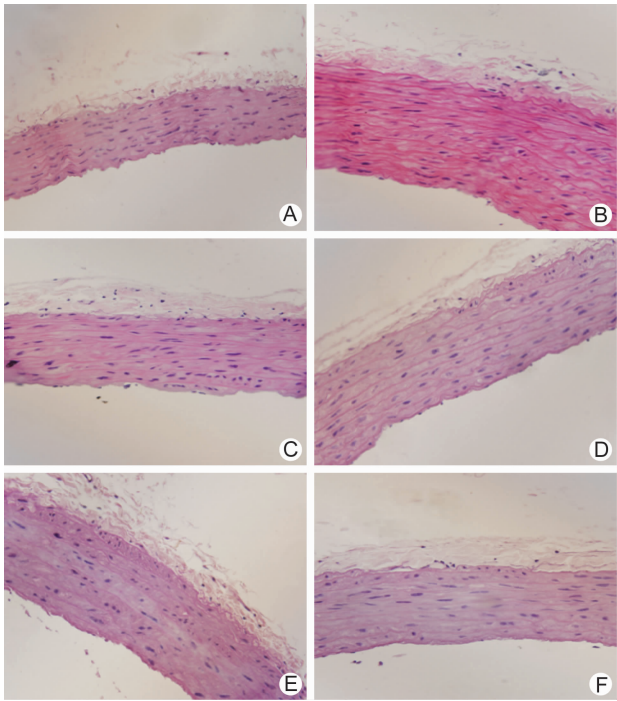
1 各组大鼠胸主动脉 HE 染色比较(图 1,表 1) 青年组血管内皮细胞排列光滑,中膜平滑肌细胞排列规则,各层弹力膜结构完整清楚,外膜未见明显增生;模型组内膜损伤且光滑,中膜明显增生且排列紊乱,弹力板扭曲、断裂、结构不完整,外膜增生明显;各给药组血管壁内皮轻度受损,中膜增厚不明显,弹力膜结构较完整,扭曲、断裂现象较少出现,外膜增生不明显。与青年组比较,模型组中膜及外膜厚度明显增加($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组中膜及外膜厚度明显降低($P < 0.01$)。

2 各组大鼠胸主动脉 SA- β -gal 染色比较(图 2,表 1) 与青年组比较,模型组组织蓝染比率明显增加($P < 0.01$);与模型组比较,中药中剂量及白藜芦醇组蓝染比率减少($P < 0.05$, $P < 0.01$),而中药低、高剂量蓝染比率改变无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠胸主动脉中膜、外膜厚度及蓝染组织平均光密度值 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	血管壁中膜厚度 (μ m)	血管壁外膜厚度 (μ m)	蓝染组织平均 光密度值
青年	10	72.02 $\pm$ 8.79	55.57 $\pm$ 7.34	0.003 $\pm$ 0.001
模型	8	133.35 $\pm$ 10.36 *	118.37 $\pm$ 11.50 *	0.012 $\pm$ 0.003 *
中药低剂量	8	109.64 $\pm$ 7.99 $\Delta\Delta$	89.70 $\pm$ 7.51 $\Delta\Delta$	0.012 $\pm$ 0.003
中药中剂量	9	98.65 $\pm$ 9.02 $\Delta\Delta$	84.81 $\pm$ 9.99 $\Delta\Delta$	0.005 $\pm$ 0.002 Δ
中药高剂量	8	101.20 $\pm$ 8.08 $\Delta\Delta$	84.98 $\pm$ 9.97 $\Delta\Delta$	0.009 $\pm$ 0.002
白藜芦醇	9	94.02 $\pm$ 8.73 $\Delta\Delta$	80.11 $\pm$ 9.46 $\Delta\Delta$	0.004 $\pm$ 0.001 $\Delta\Delta$

注:与青年组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$



注:A 为青年组;B 为模型组;C 为中药低剂量组; D 为中药中剂量组;E 为中药高剂量组;F 为白藜芦醇组;下同
图 1 各组大鼠胸主动脉 HE 染色形态学比较 (×400)

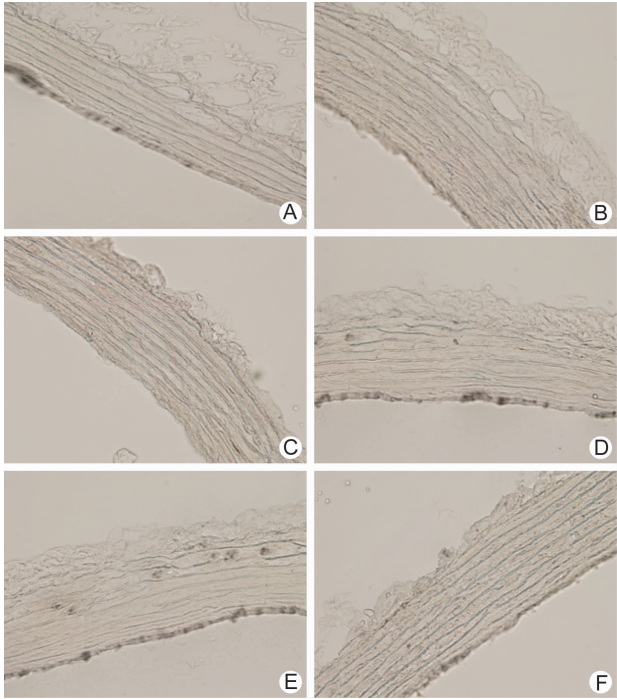


图 2 各组大鼠主胸动脉 SA-β-gal 染色比较 (×400)

3 各组大鼠胸主动脉 F-actin 免疫荧光染色比较(图 3,表 2) 与青年组比较,模型组 F-actin 荧光强度明显增加($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组 F-actin 荧光强度明显降低($P < 0.01$)。

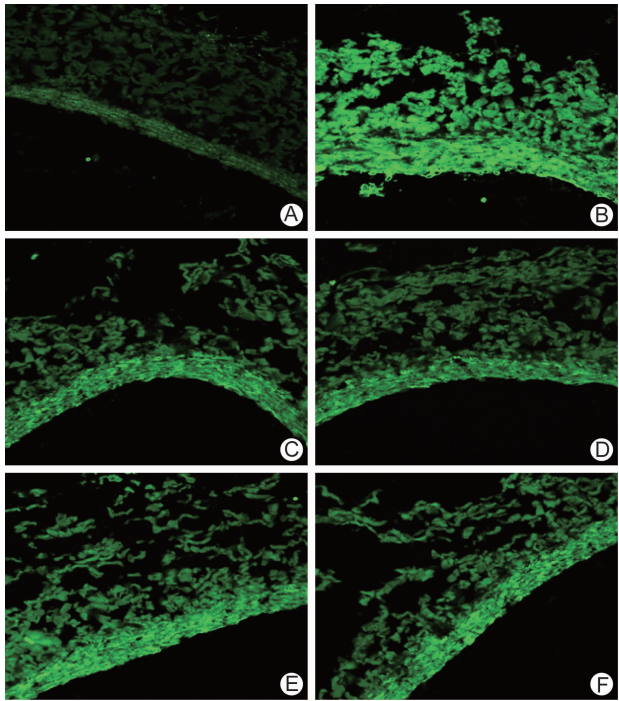


图 3 各组大鼠主动脉激光共聚焦显微镜下 F-actin 形态学比较 (免疫荧光染色,×400)

4 各组大鼠胸主动脉 F-actin、SM22 α 蛋白表达比较(图 4,表 2) 与青年组比较,模型组 F-actin 蛋白表达明显增多($P < 0.01$);与模型组比较,中药中、高剂量组及白藜芦醇组 F-actin 蛋白表达减少($P < 0.01$),而中药低剂量组改变则无统计学意义($P > 0.05$)。与青年组比较,模型组 SM22 α 蛋白表达明显减少($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组 SM22 α 蛋白表达增加($P < 0.01$)。

表 2 各组大鼠胸主动脉 F-actin 荧光强度及 F-actin、SM22 α 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	Factin 荧光强度	Factin/GAPDH	Sm22 α /GAPDH
青年	10	31.26 $\pm$ 4.89	0.13 $\pm$ 0.03	0.63 $\pm$ 0.04
模型	8	77.32 $\pm$ 4.08 *	0.37 $\pm$ 0.04 *	0.26 $\pm$ 0.03 *
中药低剂量	8	52.61 $\pm$ 5.45 Δ	0.38 $\pm$ 0.03	0.61 $\pm$ 0.06 Δ
中药中剂量	9	47.09 $\pm$ 1.91 Δ	0.25 $\pm$ 0.03 Δ	0.51 $\pm$ 0.03 Δ
中药高剂量	8	61.39 $\pm$ 2.82 Δ	0.28 $\pm$ 0.03 Δ	0.51 $\pm$ 0.05 Δ
白藜芦醇	9	54.66 $\pm$ 4.09 Δ	0.19 $\pm$ 0.02 Δ	0.48 $\pm$ 0.02 Δ

注:与青年组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

讨 论

血管老化是人体老化的重要过程之一,且对老化具有调节作用,其主要特征表现在弹性动脉顺应性下降以及血管修复、新生能力降低^[6],可归因于内皮细胞衰老、平滑肌细胞变形以及基质增生等。同时很多与老化有关的组织功能障碍可能继发于血管完整性损

伤和微循环系统功能障碍,且在血管肥大、脑缺血、糖尿病等病理损伤中均能观察到^[7]。细胞骨架肌动蛋白具有收缩、保持细胞的形状、运动、细胞间黏附等多种功能^[8],且与调节衰老的哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)通路、胰岛素/胰岛素样生长因子(IGF-1)通路和去乙酰化酶(SIRT3)通路密切相关^[9-11]。SM22 α 存在于细胞骨架肌动蛋白结合位点,对骨架蛋白具有调节作用,且血管老化促使细胞由收缩型向合成型转化,并产生I型、III型胶原,弹性纤维功能退化,而SM22 α 表达量明显下降^[10]。

气血充盈和畅是人体健康长寿的必要条件。《素问·生气通天论》有“气血以流,长有天命”的论述,气虚则生化不足,不能充养四肢百骸,且气虚血行不利,瘀血内阻,脏腑得不到濡养从而衰退,因此气虚血瘀是衰老的重要病机,故《灵枢·天年》篇认为“血气虚,脉不通,真邪相攻,乱而相引,故中寿而终也。”本方属中医学益气活血的治法范畴,在心脑血管疾病的治疗中被广泛的应用,其中人参可以清除氧自由基,扩张冠状动脉及脑血管^[11],三七有降血脂、抗炎等作用^[12],川芎则有保护血管内皮细胞、调节免疫作用^[13],三味中药联合应用,可达到益气活血、通脉活络、延年益寿的功效。

本研究以自然衰老大鼠为研究对象,观察衰老过程中细胞骨架形态及表达量的改变,以及人参三七川芎提取物的干预作用,从而探讨细胞骨架与血管老化的关系。实验结果表明,HE染色模型组血管内膜损伤且不光滑,中膜明显增生且排列紊乱,弹力板扭曲、断裂、结构不完整,外膜增生明显;各给药组血管壁内皮受损尚可,中膜增厚不明显,弹力膜结构较完整,扭曲、断裂现象较少出现,外膜增生不明显。SA- β -gal染色模型组组织蓝染比率明显增加,而各给药组则能降低组织蓝染比率。细胞骨架方面,模型组F-actin荧光强度及蛋白表达明显增多,而SM22 α 蛋白表达明显减少,药物干预后则能减少F-actin荧光强度及蛋白表达量同时增加SM22 α 的蛋白表达。

综上所述,细胞骨架微丝蛋白F-actin形态及蛋白表达在衰老过程中改变明显,二者相关蛋白SM22 α 蛋白表达亦改变明显,其可能共同参与了血管老化的进程;人参三七川芎提取物可以一定程度上延缓血管老化,且对于血管F-actin和SM22 α 蛋白有明显干预作用,其可能间接通过此作用延缓了血管老化的进程。

参 考 文 献

- [1] Dantas AP, Jiménez-Altao F, Vila E. Vascular aging: facts and factors[J]. Front Physiol, 2012, 3: 325.
- [2] Xu W, Guo T, Zhang Y, et al. The inhibitory effect of dexamethasone on platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell migration through up-regulating PGC-1 α expression[J]. Exp Cell Res, 2011, 317(8): 1083-1092.
- [3] Lampugnani MG. Endothelial adherens junctions and the actin cytoskeleton: an 'infinity net'[J]. J Biol, 2010, 9(3): 16.
- [4] Fan Z, Li C, Qin C, et al. Role of the PI3K/AKT pathway in modulating cytoskeleton rearrangements and phenotype switching in rat pulmonary arterial vascular smooth muscles cells[J]. DNA Cell Biol, 2014, 33(1): 12-19.
- [5] 王洋, 曹燕, 杨静, 等. 人参三七川芎提取物对自然衰老大鼠血管外膜重构的干预机制[J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(12): 1474-1481.
- [6] Novella S, Heras M, Hermenegildo C, et al. Effects of estrogen on vascular inflammation: a matter of timing[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012, 32(8): 2035-2042.
- [7] Oberley LW. Free radicals and diabetes[J]. Free Rad Biol Med, 1998, 5(2): 113-124.
- [8] Flavahan NA, Bailey SR, William A, et al. Imaging remodeling of the actin cytoskeleton in vascular smooth muscle cells after mechanosensitive arteriolar constriction[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol Flavahan, 2005, 288(2): H660-H669.
- [9] Harkcom WT, Ghosh AK, Sung MS, et al. NAD⁺ and SIRT3 control microtubule dynamics and reduce susceptibility to antimicrotubule agents[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111(24): E2443-E2452.
- [10] Gao H, Steffen MC, Ramos KS. Osteopontin regulates α -smooth muscle actin and calponin in vascular smooth muscle cells[J]. Cell Biol Int, 2012, 36(2): 155-161.
- [11] 雷秀娟, 冯凯, 孙立伟, 等. 人参皂苷抗衰老机制的研究进展[J]. 氨基酸和生物资源, 2010, 32(1): 44-47.
- [12] 刘刚, 刘育辰, 鲍建才, 等. 三七药理作用的研究进展[J]. 人参研究, 2005, 17(3): 12-15.
- [13] 舒冰, 周重建, 马迎辉, 等. 中药川芎中有效成分的药理作用研究进展[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(9): 1043-1047.

(收稿:2016-03-13 修回:2017-05-20)

责任编辑:李焕荣
英文责编:张晶晶