

松果菊苷延缓人脐静脉内皮细胞衰老的机制

https://doi.org/10.12307/2022.970

田甜, 欧阳·菊艳, 李瑜, 米叶赛·艾尼瓦尔, 何娟丽, 李振华, 王红

投稿日期: 2021-12-06

采用日期: 2022-02-08

修回日期: 2022-03-01

在线日期: 2022-03-14

中图分类号:

R446; R318; R453

文章编号:

2095-4344(2022)31-05014-06

文献标识码: B

文章快速阅读:

研究来源

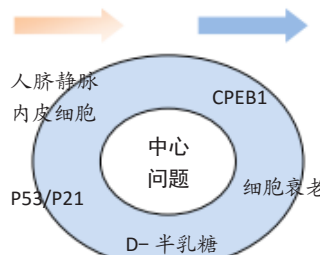
- 内皮细胞
- 松果菊苷
- 抗衰老
- CPEB1
- 保护作用
- 半乳糖

研究分支

- 氧化应激
- 人脐静脉内皮细胞
- 细胞衰老
- 内皮细胞衰老
- 外源性
- 抗衰老药物

研究去除

- 松果菊苷
- 人脐静脉内皮细胞
- 氧化损伤
- 初步研究
- 抗衰老
- 分子机制



文题释义:

胞质多聚腺苷酸化元素结合蛋白1(cytoplasmic polyadenylation element binding protein, CPEB1): 是一种高度保守的RNA结合蛋白, 将翻译抑制剂招募到其目的mRNA 3'非翻译区, 并与特定序列结合调控mRNA的聚腺苷化。CPEB1广泛参与生物过程, 包括细胞周期进程、增殖与肿瘤、细胞衰老和炎症等。

沉默信息调节因子2相关酶类1(silent mating type information regulation 2 homolog 1, SIRT1): 是Sirtuin蛋白家族的一员, 是负责细胞调控的组蛋白去乙酰化酶, 参与细胞周期调控、DNA修复、凋亡和炎症、自噬和衰老, 并在多种疾病中起保护作用, 包括神经退行性疾病、心血管疾病、代谢综合征和肿瘤等。

摘要

背景: 前期工作发现同型半胱氨酸通过活性氧加速脐静脉内皮细胞衰老, 此次实验初步研究影响内皮细胞衰老的相关机制。

目的: 探讨松果菊苷对人脐静脉内皮细胞中CPEB1、SIRT1、P53、P21基因表达的影响。

方法: 体外培养人脐静脉内皮细胞, 加入10 g/L D-半乳糖构建细胞衰老模型, CCK-8法分析松果菊苷(0, 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500 mg/L)预处理12, 24 h后的细胞增殖活性, 筛选松果菊苷最佳质量浓度及干预时间; 然后将人脐静脉内皮细胞分为5组: 正常对照组, D-半乳糖组, 松果菊苷100, 200, 300 mg/L组。β-半乳糖苷酶染色法检测松果菊苷预处理12 h后细胞染色阳性率, 实时荧光定量-聚合酶链反应、蛋白免疫印迹法检测松果菊苷预处理12 h后人脐静脉内皮细胞中CPEB1、Sirt1、P53、P21 mRNA的表达和CPEB1、Sirt1、P21蛋白的表达。

结果与结论: ①CCK-8检测结果表明: 松果菊苷预处理12 h的细胞存活率明显高于预处理24 h, 与D-半乳糖组相比, 松果菊苷100, 200, 300 mg/L组均不同程度提高细胞活力($P < 0.000 1$), 3组间对比差异有显著性意义($P < 0.01$); ②与正常对照组相比, D-半乳糖组β-半乳糖苷酶染色阳性率最高($P < 0.000 1$), 100, 200, 300 mg/L松果菊苷预处理12 h后, 可一定程度降低β-半乳糖苷酶染色阳性率($P < 0.000 1$); ③与正常对照组相比, D-半乳糖组CPEB1、P53、P21 mRNA表达水平平均升高($P < 0.000 1$), Sirt1 mRNA表达水平降低($P < 0.000 1$); 与D-半乳糖组相比, 100, 200, 300 mg/L松果菊苷预处理12 h后, CPEB1、P53、P21 mRNA表达水平平均降低($P < 0.000 1$), Sirt1 mRNA表达水平平均升高($P < 0.000 1$); 蛋白免疫印迹分析结果与实时荧光定量-聚合酶链反应分析结果一致; ④结果表明, 松果菊苷可能通过下调CPEB1、P53、P21表达水平, 上调Sirt1表达水平, 来延缓D-半乳糖诱导的人脐静脉内皮细胞衰老。

关键词: 松果菊苷; 人脐静脉内皮细胞; 衰老; CPEB1; Sirt1; P53; P21

Mechanism by which echinacoside delays the senescence of human umbilical vein endothelial cells

Tian Tian, Ouyang-Juyan, Li Yu, Miyesai-Ainiwaer, He Juanli, Li Zhenhua, Wang Hong

Second Department of Comprehensive Internal Medicine, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Tian Tian, Master candidate, Second Department of Comprehensive Internal Medicine, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Corresponding author: Wang Hong, MD, Professor, Master's supervisor, Second Department of Comprehensive Internal Medicine, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Abstract

BACKGROUND: Preliminary work has found that homocysteine accelerates the aging of umbilical vein endothelial cells through reactive oxygen species. This experiment preliminarily studies the relevant mechanisms affecting endothelial cell aging.

新疆医科大学第一附属医院综合内二科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830000

第一作者: 田甜, 女, 1994年生, 新疆医科大学第一附属医院在读硕士, 主要从事老年相关疾病及机制研究。

通讯作者: 王红, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 新疆医科大学第一附属医院综合内二科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830000

https://orcid.org/0000-0002-2453-0802 (田甜)

基金资助: 克拉玛依市科技计划项目(2017RC001A-16), 项目负责人: 王红; 新疆医科大学研究生创新创业项目(CXC2021008),

项目负责人: 田甜

引用本文: 田甜, 欧阳·菊艳, 李瑜, 米叶赛·艾尼瓦尔, 何娟丽, 李振华, 王红. 松果菊苷延缓人脐静脉内皮细胞衰老的机制 [J].

中国组织工程研究, 2022, 26(31):5014-5019.



OBJECTIVE: To investigate the effects of echinacoside on the expression of cytoplasmic polyadenylate binding protein 1 (CPEB1), sirtuin1 (SIRT1), P53 and P21 genes in human umbilical vein endothelial cells.

METHODS: Human umbilical vein endothelial cells were cultured *in vitro*. D-galactose 10 g/L was used to construct cell aging model. The proliferation viability of cells treated with echinacoside (0, 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500 mg/L) for 12 and 24 hours was analyzed by CCK-8 assay, and the optimal mass concentration and intervention time of echinacoside were screened. Human umbilical vein endothelial cells were divided into normal control group, D-galactose group and echinacoside groups (100, 200, and 300 mg/L). β -Galactosidase staining was used to detect the positive staining rate of cells after echinacoside pre-intervention for 12 hours. Real time RT-PCR and western-blot assay were used to detect the mRNA expression levels of CPEB1, Sirt1, P53 and P21 and the protein expression levels of CPEB1, Sirt1 and P21 in human umbilical vein endothelial cells after echinacoside pretreatment for 12 hours.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The results of CCK-8 assay showed that the survival rate of echinacoside group at 12 hours was significantly higher than that at 24 hours. Compared with the D-galactose group, cell viability increased in the echinacoside 100, 200, and 300 mg/L groups to varying degrees ($P < 0.0001$), and there was a significant difference among the three groups ($P < 0.01$). (2) Compared with the normal control group, the D-galactose group had the highest positive rate of β -galactosidase staining ($P < 0.0001$). 100, 200, and 300 mg/L echinacoside pretreatment for 12 hours could reduce the positive rate of β -galactosidase staining to a certain extent ($P < 0.0001$). (3) Compared with the normal control group, the mRNA expression levels of CPEB1, P53 and P21 were increased ($P < 0.0001$), and the expression level of SIRT1 mRNA was decreased ($P < 0.0001$) in the D-galactose group. Compared with the D-galactose group, 100, 200, and 300 mg/L echinacoside pretreatment for 12 hours decreased the mRNA expression levels of CPEB1, P53, and P21 ($P < 0.0001$), but increased Sirt1 mRNA expression ($P < 0.0001$). Western blot assay results were consistent with real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction results. (4) These findings indicate that echinacoside may delay D-galactose-induced human umbilical vein endothelial cell senescence by down-regulating CPEB1 and P53/P21 expression levels and up-regulating Sirt1 expression levels.

Key words: echinacoside; human umbilical vein endothelial cells; aging; CPEB1; Sirt1; P53; P21

Funding: Science and Technology Plan Project of Karamay City, No. 2017RC001A-16 (to WH); Postgraduate Innovation Entrepreneurship Project of Xinjiang Medical University, No. CXCXY2021008 (to TT)

How to cite this article: TIAN T, OUYANG JY, LI Y, AINIWAER M, HE JL, LI ZH, WANG H. Mechanism by which echinacoside delays the senescence of human umbilical vein endothelial cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(31):5014-5019.

0 引言 Introduction

心血管疾病是一种衰老性疾病,对衰老机制的研究将有助于人们了解衰老的发生情况,从而寻找预防和治疗衰老和衰老相关疾病的方法^[1]。研究表明,细胞衰老在年龄相关疾病的进展中起着关键作用^[2-3]。细胞衰老是一种无限期的生长停滞状态,其共同特征包括DNA损伤、激活p53/p21、p16/pRb通路以及衰老相关 β -半乳糖苷酶在pH值为6时高表达^[4-5],其他相关特征包括细胞骨架改变、细胞扁平化、细胞质中形成空泡和衰老相关异染色质病灶的出现^[6]。

近年来研究发现中医药在延缓细胞衰老过程中发挥重要作用,松果菊苷(echinacoside, ECH)是一种天然的苯乙醇苷,具有抗菌、抗癌、抗糖尿病、抗炎、抗肥胖、抗氧化、抗病毒和神经保护特性,在预防和治疗各种人类疾病中有一定的潜力^[7-8]。松果菊苷是中药肉苁蓉的主要活性成分,该化合物首次从国际知名植物中华辣椒的根中分离出来,也是柑橘的主要有效成分之一,大量研究表明,松果菊苷具有广泛的药理作用,包括抗氧化、神经保护、肝脏保护、抗炎、抗肿瘤、改善记忆以及免疫调节等,迄今为止,肉苁蓉属(Orobanchaceae)和紫锥菊属(菊科)是制备松果菊苷的主要天然植物来源^[9]。松果菊苷可通过促使G₁期细胞进入S期和G₂期,抑制活性氧的产生,来延缓人成纤维细胞MRC-5的衰老^[10]。

松果菊苷具有心血管保护活性,可提高人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)的存活率,减少乳酸脱氢酶、丙二醛、细胞间黏附分子1的分泌和细胞内活性氧的产生^[11]。但松果菊苷对内皮细胞衰老的作用及机制尚不清楚,该研究旨在探讨松果菊苷对人脐静脉内皮细胞作用的相关信号通路CPEB1、Sirt1、P53、P21基因表达的影响,了解其对人脐静脉内皮细胞的保护作用及其潜在的分子机制。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 分组对照的细胞实验,多组间差异采用方差分析,两组间比较采用t检验。

1.2 时间及地点 实验于2021年2-8月在新疆医科大学第一附属医院科技楼完成。

1.3 材料 内皮细胞培养基(ECM)(ScienCell, Lot:32720);内皮细胞生长因子(ScienCell, Lot:32186);胎牛血清(Hyclone, Lot:RB35946);DMEM/HIGH GLUCOSE(Hyclone Lot:AF29584962);胰蛋白酶(0.25%Trypsin-EDTA)(Hyclone, Lot:2133226);磷酸盐缓冲液(Hyclone, Lot:AF29584962);二甲基亚砜(BioFroxx, Lot:EZ2811E252);松果菊苷(成都曼斯特, A0282);D-半乳糖(索莱宝, D8310);CCK-8溶液(Dojindo, Lot: SJ682); β -半乳糖苷酶染色试剂盒(上海碧云天);兔单克隆抗体Sirt1(Abcam, Ab189494);兔多克隆抗体CPEB1(Abcam, Ab3465);P21抗体(Proteintech Lot:00085901);兔抗GAPDH抗体(Abcam, Ab9485);山羊抗兔二抗;RIPA裂解液(索莱宝, Lot:20190920);PMSF蛋白酶抑制剂(索莱宝, Lot:20190312);BCA蛋白定量分析试剂盒(Thermo, Lot:UB276924);4 \times 蛋白质上样缓冲液(索莱宝, Lot:20200317);SDS-PAGE凝胶制备试剂盒(索莱宝, Lot:20191218);Maker(Proteintech, PL00001);PVDF膜;10 \times TBST缓冲液(索莱宝, Lot:20200907);显色试剂盒(Biosharp, Lot:21299536);TRIzol总RNA提取试剂(Ambion, Lot:257402);反转录试剂盒(Takara, Lot:AK81979A);上机试剂盒(Takara, Lot:AKF0106A);引物(上海生工)。

1.4 实验方法

1.4.1 人脐静脉内皮细胞的分离培养 该实验符合新疆医科大学第一附属医院的相关伦理要求(医院伦理批件号: IACUC-20180223-04),已签署涉及人的生物医学研究受试者知情同意书。

筛选新疆医科大学第一附属医院产科无妊娠期基础疾病的健康孕妇，顺产 / 剖腹产后无菌获取 15–20 cm 的新生儿脐带，放入配置好的含有 1% 双抗的 4 °C PBS 中，用封口膜将瓶口封闭好放入冰盒中快速拿回实验室。在无菌细胞超净台中，首先用 10 mL 注射器 (去掉针头) 吸入预热的无菌 PBS，然后注射器对准脐静脉管腔入口，缓慢打入无菌 PBS，反复冲洗脐静脉管腔，直至流出无血色 PBS；其次，用止血钳将脐带一端夹闭，用 10 mL 注射器吸入胰酶缓慢打入另一端脐静脉入口，使脐带充盈至 80%–90%，将夹闭好的脐带置于大皿中放入细胞温箱中孵育 12 min 左右，期间每隔 2 min 轻揉脐带以充分消化细胞；最后，将混有细胞的胰酶液体放入 15 mL 离心管，并加入 2 倍胰酶量的完全培养基终止消化，常规离心 (1 000 r/min, 5 min)，弃上清液，加入 1 mL ECM 培养基缓慢吹打，接种在培养皿中，放置细胞温箱中培养。

人脐静脉内皮细胞的培养及鉴定

细胞来源:	新生儿脐带
原代培养方法:	酶消化法
细胞培养基:	ECM 培养基
原代培养时间:	原代细胞培养 48 h 换液，之后两三天换液 1 次，培养 7–10 d 开始传代
细胞传代:	细胞融合至 80% 用胰酶消化传至下 1 代，按 1 : 3 比例传代，5–7 d 传 1 代，共传 4 代
细胞鉴定:	采用蛋白免疫印迹法鉴定细胞
伦理学批准:	该实验经过新疆医科大学第一附属医院伦理学委员会批准

1.4.2 细胞衰老模型建立 将分离培养的人脐静脉内皮细胞传代至第 4 代，加入含 10 g/L D- 半乳糖的 ECM 培养液培养 24 h，构建细胞衰老模型，采用 β - 半乳糖苷酶染色鉴定。

1.4.3 CCK-8 法筛选松果菊苷作用浓度及干预时间 取第 4 代对数生长期人脐静脉内皮细胞以 6×10^3 个 / 孔接种于 96 孔板中，加入 100 μ L ECM 培养过夜，细胞贴壁后，分别加入 0, 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500 mg/L 的松果菊苷预处理 12, 24 h，然后加入质量浓度为 10 g/L 的 D- 半乳糖诱导 24 h，酶标仪 450 nm 波长处检测各孔的吸光度值。

1.4.4 细胞分组 将第 4 代人脐静脉内皮细胞分成正常对照组、D- 半乳糖组、松果菊苷 100, 200, 300 mg/L 组。

1.4.5 β - 半乳糖苷酶原位染色 将第 4 代人脐静脉内皮细胞接种至 6 孔板， 3×10^4 个 / 孔，待细胞长满 80% 孔底，正常对照组加入 ECM 培养液，D- 半乳糖组加入 ECM 培养液培养 12 h 后加入 10 g/L 的 D- 半乳糖诱导 24 h 构建衰老模型，松果菊苷 100, 200, 300 mg/L 组加入配制好的质量浓度分别为 100, 200, 300 mg/L 的松果菊苷干预 12 h，然后加入 10 g/L 的 D- 半乳糖诱导 24 h，用无血清 DMEM 冲洗 1 遍，加入 1 mL 固定液，室温固定 15 min，弃固定液，DMEM 冲洗 3 遍，每次 3 min，按照说明书配比每孔加入 1 mL β - 半乳糖苷酶染色工作液，在光学显微镜下观察计数蓝染细胞，蓝染细胞 / 总细胞数即为阳性率。

1.4.6 实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) Trizol 法提取各组干预后的人脐静脉内皮细胞总 RNA，将其反转录为 cDNA，以单链 cDNA 为模板，使用 SYBR 荧光染料、高效 PCR 酶进行 qRT-PCR 扩增，用 GAPDH 作内参。qRT-PCR 扩增结果以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。引物序列见表 1。

表 1 | Real time RT-PCR 相关基因引物序列
Table 1 | Primer sequences for real time RT-PCR related genes

基因	引物序列 (5'-3')	
	Forward	Reverse
Sirt1	CCC CAT GAA GTG CCT CAG AT	TGG GTG GCA ACT CTG ACA AA
CPEB1	CGG TGT CCT CCC AAA GGT AA	GGA TCA CCT GCA CCT CCT TG
P21	AGG AGG CGC CAT GTC AGA ACC	TCC TGT GGG CGG ATT AGG GCT
P53	ATG GAG GAG CCG CAG TCA G	TCA GTC TGA GTC AGG CCC TTC
GAPDH	TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC	GGC ATG GAC TGT GGT CAT GA

1.4.7 Western blot 实验 收集各组干预后的人脐静脉内皮细胞，用含 PMSF 的 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白，吸取上清后用 BCA 试剂盒测定蛋白含量，通过十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离 20 μ L 蛋白样品并转移至聚偏氟乙烯膜，脱脂奶粉室温封闭 2 h 后，加入 GAPDH、Sirt1、CPEB1、P21 一抗 4 °C 孵育过夜，次日加入二抗室温孵育 2 h，1 \times TBST 洗膜，显色。Image Lab 软件分析结果，以 GAPDH 表达水平作为内参，各蛋白 / 内参的灰度值比值来计算各蛋白相对表达量，实验均重复 3 次。

1.5 主要观察指标 ①各组人脐静脉内皮细胞 β - 半乳糖苷酶染色阳性率；②各组人脐静脉内皮细胞中 Sirt1、CPEB1、P21 蛋白表达水平；③各组人脐静脉内皮细胞中 Sirt1、CPEB1、P53、P21 mRNA 表达水平。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 23.0 软件进行数据分析。计量资料符合正态分布，以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间差异采用方差分析，两组间比较采用 t 检验， $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。文章统计学方法已经通过新疆医科大学第一附属医院生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 CCK-8 法筛选松果菊苷最佳质量浓度及干预时间 由图 1 可见，松果菊苷预处理 12 h 组明显比 24 h 组细胞存活率高。松果菊苷预处理 12 h 组中：①与正常对照组相比，D- 半乳糖组细胞存活率明显下降， $P < 0.000 1$ ，说明 D- 半乳糖对细胞有一定损伤作用；②与 D- 半乳糖组相比，松果菊苷 100, 200, 300 mg/L 组均促进细胞增殖，其中松果菊苷 200 mg/L 组与松果菊苷 100 mg/L 组相比， $P < 0.01$ ，松果菊苷 300 mg/L 组与松果菊苷 200 mg/L 组相比， $P < 0.01$ ，松果菊苷 300 mg/L 组与松果菊苷 100 mg/L 组相比， $P < 0.001$ ，松果菊苷 300 mg/L 组促进细胞增殖作用最明显；③随着松果菊苷质量浓度的增加，细胞增殖活力一开始呈上升趋势，松果菊苷 300 mg/L 组促进细胞增殖作用最明显，但随着松果菊苷质量浓度继续增加，反而抑制细胞增殖活力，说明松果菊苷在一定质量浓度范围内对人脐静脉内皮细胞活性起促

进作用, 调整松果菊苷质量浓度在适当范围内是延缓人脐静脉内皮细胞衰老的关键。

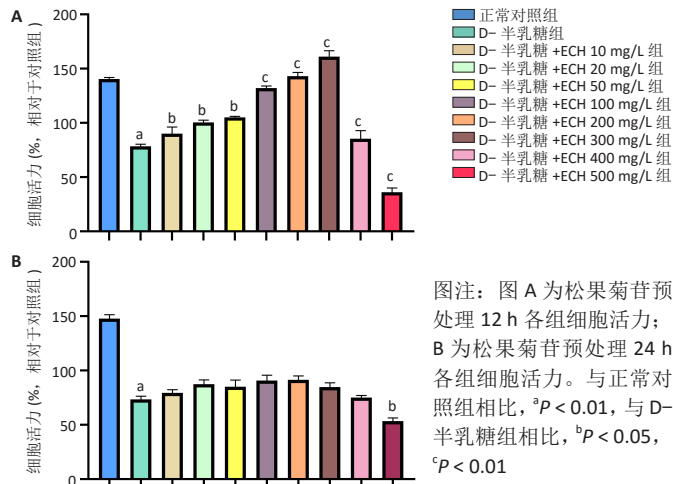


图1 | 松果菊苷(ECH)不同质量浓度及作用时间下人脐静脉内皮细胞的活力
Figure 1 | Viability of human umbilical vein endothelial cells under different mass concentrations and treatment time of echinacoside

2.2 松果菊苷减少β-半乳糖苷酶染色阳性率 β-半乳糖苷酶在衰老细胞中高表达, 在衰老前细胞、静止细胞、永生细胞中不表达, 是最常用的衰老标志物。如图2所示, 与正常对照组比, D-半乳糖组β-半乳糖苷酶染色阳性细胞增多, D-半乳糖可诱导脐静脉内皮细胞衰老; 100, 200, 300 mg/L松果菊苷预处理12 h后, 可在一定程度降低β-半乳糖苷酶染色阳性率, 与D-半乳糖组相比较差异有显著性意义, 表明松果菊苷对D-半乳糖诱导的人脐静脉内皮细胞有一定保护作用, 可以减少β-半乳糖苷酶染色阳性率。

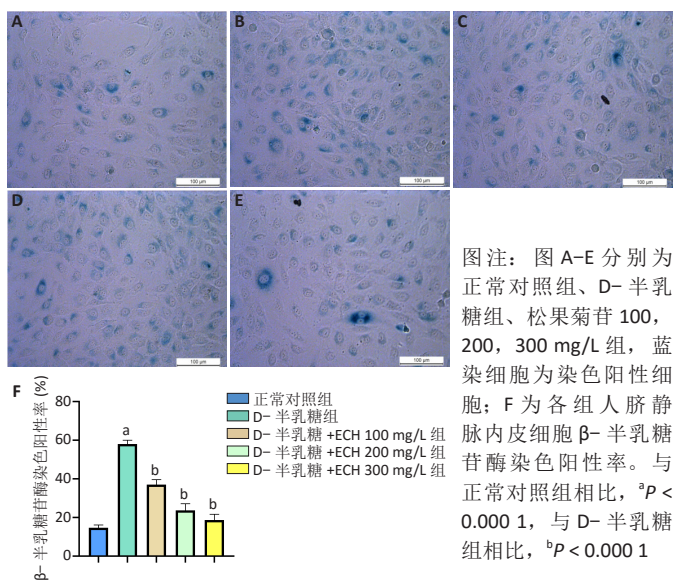


图2 | 不同质量浓度松果菊苷(ECH)干预后人脐静脉内皮细胞β-半乳糖苷酶染色(标尺=100 μm)
Figure 2 | β-Galactosidase staining of human umbilical vein endothelial cells after intervention with different mass concentrations of echinacoside (scale bars=100 μm)

2.3 松果菊苷对人脐静脉内皮细胞中CPEB1、Sirt1、P53、P21 mRNA及蛋白表达水平的影响 如图3所示, 与正常对照组相比, D-半乳糖组Sirt1 mRNA表达水平明显下降, CPEB1、P53、P21 mRNA表达水平均升高。与D-半乳糖组相比, 松果菊苷100, 200, 300 mg/L组Sirt1 mRNA表达均不同程度升高, CPEB1、P53、P21 mRNA表达水平均下降。如图4所示, Sirt1、CPEB1、P21蛋白表达趋势与PCR结果一致。这些证据表明松果菊苷可缓解D-半乳糖诱导的人脐静脉内皮细胞衰老损伤, 这种保护作用可能通过上调Sirt1表达, 下调CPEB1、P53、P21表达水平实现。

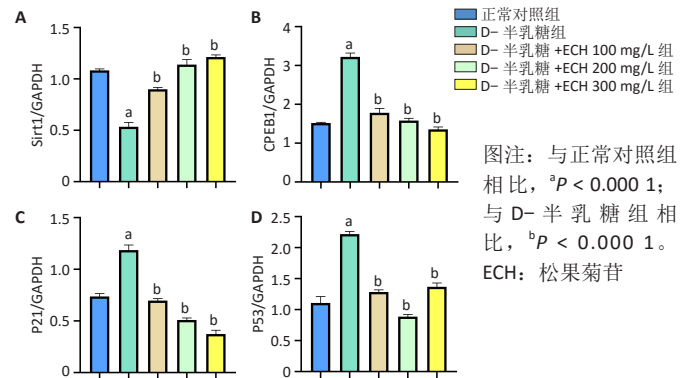


图3 | 各组人脐静脉内皮细胞中Sirt1、CPEB1、P53、P21 mRNA表达水平
Figure 3 | mRNA expression levels of Sirt1, CPEB1, P53 and P21 in human umbilical vein endothelial cells of each group

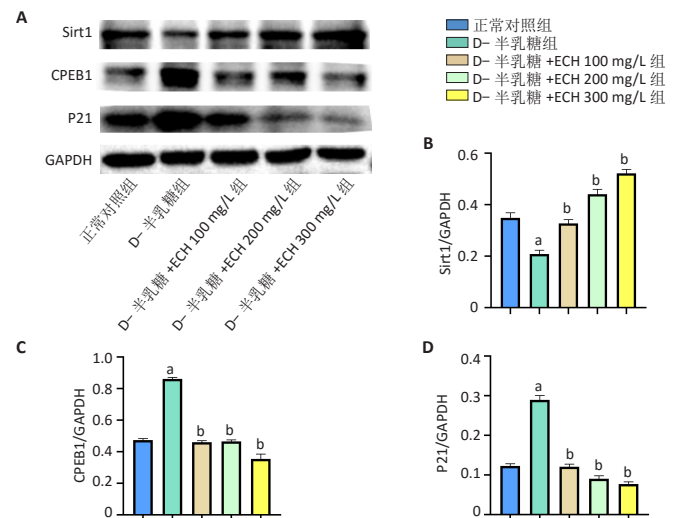


图4 | 各组人脐静脉内皮细胞中Sirt1、CPEB1、P21蛋白表达水平
Figure 4 | Protein expression levels of Sirt1, CPEB1 and P21 in human umbilical vein endothelial cells of each group

3 讨论 Discussion

研究表明内皮细胞衰老是导致血管老化的主要机制之一^[12-13]。课题组前期工作发现同型半胱氨酸通过活性氧加速内皮细胞衰老, 这一过程与端粒酶失活有关^[14]。此次为进一步探讨影响内皮细胞衰老的相关机制, 以D-半乳糖构建细

胞衰老模型, 探讨松果菊苷对人脐静脉内皮细胞相关信号通路 Sirt1、CPEB1、P53、P21 基因表达的影响。

Sirt1 是一种 NAD⁺ 依赖的去乙酰化酶, 参与细胞周期调控、DNA 修复、凋亡和炎症^[15]、自噬和衰老^[16], 并在多种疾病中起保护作用, 包括神经退行性疾病、心血管疾病、代谢综合征和肿瘤^[17]。此外, Sirt1 能够使多种蛋白质的赖氨酸残基发生去乙酰化, Sirt1 还能去乙酰化非组蛋白底物, 包括 p53、Ku70、FOXO3、PGC1- α 、PARP-1 和 NF- κ B^[18-19]。Sirt1 在内皮细胞中高度表达, 被公认是长寿基因^[20]。随着年龄的增长, 内皮 Sirt1 表达降低导致基因组不稳定, 诱导 P53 蛋白去乙酰化, 促使细胞衰老^[21-22]。由此可见, Sirt1 通过乙酰化和去乙酰化这些蛋白来改变它们的转录和酶活性以及蛋白质水平, 从而广泛参与调节细胞衰老、凋亡、炎症、活性氧的产生、DNA 损伤和修复以及血管生成^[23-24]。P53 和 P21 都是参与内皮细胞衰老和动脉粥样硬化形成的关键信号分子^[25-26]。BIAN 等^[27] 用氧化低密度脂蛋白构建人脐静脉内皮细胞衰老模型及动脉粥样硬化模型, 研究表明, 长链非编码 RNA NORAD 通过 NF- κ B 和 p53-p21 信号通路减缓内皮细胞衰老、内皮细胞凋亡和动脉粥样硬化。P53 作为抑制恶性细胞存活的肿瘤抑制因子, 可诱导细胞的多种反应, 包括分化、衰老、DNA 修复和抑制血管生成, 导致细胞周期停滞和细胞凋亡^[28]。老年人发生血管内皮功能障碍后, 可激活 P53 基因与其下游 P21 基因启动子区域结合, 促使 P21 蛋白增加并抑制细胞周期进程^[29]。此次研究结果表明 P53 和 P21 在衰老细胞中高表达, Sirt1 则是内皮细胞保护因子, 松果菊苷可以上调 Sirt1 表达水平, 下调 P53、P21 表达水平。

目前评估衰老细胞的方法是通过联合检测多种生化标志物(如 P53、P21、P16、Sirt1 和 β -半乳糖苷酶等), 但由于缺乏通用的可检测指标, 寻找更加确定的衰老标志物一直是大家关注的问题^[30]。CPEBs 是新近发现的一组蛋白, 可介导 mRNA 翻译和胞质多聚腺苷酸化过程, 包括调节细胞衰老和增殖及其病理表现等^[31]。BURNS 等^[32] 发现在 CPEB1 基因敲低的细胞中, P53 mRNA 具有异常短的 poly(A) 尾巴, 翻译效率降低, 导致 P53 蛋白水平下降、活性氧减少以及糖酵解增加, 进而控制细胞衰老。BURNS 等^[33] 进一步验证在人成纤维细胞中, 细胞衰老是 P53 mRNA 协同 CPEB1 进行翻译调节的, 当 CPEB1 耗竭时, 细胞耗氧量减少, β -半乳糖苷酶染色的细胞减少, P53 mRNA 及蛋白水平均降低, 细胞寿命延长。XU 等^[34] 用氧化低密度脂蛋白干预人脐静脉内皮细胞构建动脉粥样硬化模型, 发现 CPEB1 小干扰 RNA(siRNA) 抑制氧化应激、炎症和凋亡, CPEB1 水平降低可通过 SIRT1/LOX-1 信号通路对氧化低密度脂蛋白诱导的内皮细胞凋亡和炎症有保护作用。但 CPEB1 与内皮细胞衰老的相关性尚未明确验证, 此次实验通过体外细胞水平简单验证 CPEB1 与内皮细胞衰老相关, 在 qRT-PCR 及 Western 印迹半定量分析中, D-半乳糖组 CPEB1 mRNA 及蛋白表达水平均明显高于正常对照组。但

后期还需进一步在动物水平上做进一步的验证。在小鼠胚胎成纤维细胞中, 诱导其衰老的是 P53、pRb、P19 和 P16 基因, 若缺乏上述 4 种肿瘤抑制因子, CPEB 则无法诱导细胞衰老^[35]。这引发后续实验需要思考的问题: 在人脐静脉内皮细胞中是否也是如此? 若敲除 P53 基因, CPEB1 是否还能在人脐静脉内皮细胞中表达?

大量实验研究已经证明了松果菊苷的强大抗氧化特性, 在体内实验中, 松果菊苷可以促进血管性痴呆大鼠或亚急性衰老小鼠模型的抗氧化、抗疲劳和抗应激能力, 松果菊苷能够降低转录调节蛋白 BACH1 的蛋白水平, 增强血红素加氧酶 1 mRNA 水平, 下调 P53 的表达, 上调 Sirt1 的表达^[36]。此次体外细胞实验中, CCK-8 结果分析显示, 松果菊苷预处理 12 h 组明显比 24 h 组细胞存活率高, 100, 200, 300 mg/L 松果菊苷干预 12 h 对细胞增殖活力有明显促进作用, 但随着松果菊苷质量浓度的增加, 反而抑制细胞增殖活力。YOU 等^[37] 在探讨松果菊苷通过阻断 TGF- β 1/smad 信号传导通路来抑制肝星状细胞活化中, 发现随着松果菊苷质量浓度的增加, 肝星状细胞活力呈下降趋势, 不同浓度区间对细胞活力可呈现促进或者抑制作用。艾江等^[38] 在研究松果菊苷对人增生性瘢痕成纤维细胞 TGF- β 1/Smads 信号通路影响的实验中, 表明松果菊苷作用 48 h 的细胞毒性明显高于 24 h。调整松果菊苷质量浓度在适当范围内及合适的干预时间是延缓人脐静脉内皮细胞衰老的关键。 β -半乳糖苷酶染色结果说明松果菊苷可缓解 D-半乳糖诱导的人脐静脉内皮细胞衰老。qRT-PCR 及 Western blot 半定量分析结果进一步表明, 松果菊苷可能是通过上调 Sirt1 表达, 下调 CPEB1、P53、P21 表达来缓解 D-半乳糖诱导的人脐静脉内皮细胞衰老。这与 ZHU 等^[39] 发现在人成纤维细胞中松果菊苷可下调 p53 的表达, 上调 Sirt1 的表达水平结果一致。

综上所述, 此次研究结果表明: 松果菊苷对 D-半乳糖诱导的人脐静脉内皮细胞衰老具有一定保护作用, 其作用机制可能是通过上调 Sirt1 表达, 下调 CPEB1 及 P53、P21 表达实现的, CPEB1 基因是潜在的内皮细胞衰老相关靶分子。

作者贡献: 田甜负责实验实施、论文撰写, 欧阳·菊艳、李瑜负责实验数据分析处理, 田甜、米叶赛·艾尼瓦尔负责细胞培养、指标检测, 何娟丽、李振华负责数据和文章的校对, 王红负责实验设计。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》; 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次文字和图表查重; 文章经小同行外审专家双盲审稿, 同行评议认为文章符合期刊发表宗旨。

4 参考文献 References

- [1] SHEN CY, JIANG JG, YANG L, et al. Anti-ageing active ingredients from herbs and nutraceuticals used in traditional Chinese medicine: pharmacological mechanisms and implications for drug discovery. *Br J Pharmacol.* 2017;174(11):1395-1425.
- [2] NORTH BJ, SINCLAIR DA. The intersection between aging and cardiovascular disease. *Circ Res.* 2012;110(8):1097-1108.
- [3] VAN DEURSEN JM. The role of senescent cells in ageing. *Nature.* 2014;509(7501):439-446.
- [4] BRUN C, JEAN-LOUIS F, ODDOS T, et al. Phenotypic and functional changes in dermal primary fibroblasts isolated from intrinsically aged human skin. *Exp Dermatol.* 2016;25(2):113-119.
- [5] JOHMURA Y, NAKANISHI M. Multiple facets of p53 in senescence induction and maintenance. *Cancer Sci.* 2016;107(11):1550-1555.
- [6] ZHANG R, ADAMS PD. Heterochromatin and its relationship to cell senescence and cancer therapy. *Cell Cycle.* 2007;6(7):784-789.
- [7] ALIPIEVA K, KORKINA L, ORHAN IE, et al. Verbascoside--a review of its occurrence, (bio)synthesis and pharmacological significance. *Biotechnol Adv.* 2014;32(6):1065-1076.
- [8] WU L, GEORGIEV MI, CAO H, et al. Therapeutic potential of phenylethanoid glycosides: A systematic review. *Med Res Rev.* 2020;40(6):2605-2649.
- [9] LIU J, YANG L, DONG Y, et al. Echinacoside, an Inestimable Natural Product in Treatment of Neurological and other Disorders. *Molecules.* 2018;23(5):1213.
- [10] WANG N, JI S, ZHANG H, et al. Herba Cistanches: Anti-aging. *Aging Dis.* 2017;8(6):740-759.
- [11] 李欢, 宋安齐, 薛嘉虹, 等. 松果菊苷对血管内皮细胞损伤的保护作用 [J]. *西安交通大学学报 (医学版)*, 2013, 34(3):387-392.
- [12] DONATO AJ, MORGAN RG, WALKER AE, et al. Cellular and molecular biology of aging endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;89(Pt B):122-135.
- [13] LÓPEZ-OTÍN C, BLASCO MA, PARTRIDGE L, et al. The hallmarks of aging. *Cell.* 2013;153(6):1194-1217.
- [14] 庞明, 刘展, 李韶山, 等. 同型半胱氨酸对血管内皮细胞衰老的影响 [J]. *新疆医学*, 2020, 50(7):670-674.
- [15] LAMICHANE S, BAEK SH, KIM YJ, et al. MHY2233 Attenuates Replicative Cellular Senescence in Human Endothelial Progenitor Cells via SIRT1 Signaling. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:6492029.
- [16] PANG J, XIONG H, OU Y, et al. SIRT1 protects cochlear hair cell and delays age-related hearing loss via autophagy. *Neurobiol Aging.* 2019;80:127-137.
- [17] XIE L, HUANG R, LIU S, et al. A positive feedback loop of SIRT1 and miR17HG promotes the repair of DNA double-stranded breaks. *Cell Cycle.* 2019;18(17):2110-2123.
- [18] NAKAGAWA T, GUARENTE L. Snapshot: sirtuins, NAD, and aging. *Cell Metab.* 2014;20(1):192.
- [19] KASZUBOWSKA L, FOERSTER J, KWIATKOWSKI P, et al. NKT-like cells reveal higher than T lymphocytes expression of cellular protective proteins HSP70 and SOD2 and comparably increased expression of SIRT1 in the oldest seniors. *Folia Histochem Cytobiol.* 2018;56(4):231-240.
- [20] GUO Y, XING L, QIAN C, et al. Involvement of Flavonoids from the Leaves of *Carya cathayensis* Sarg. in Sirtuin 1 Expression in HUVEC Senescence. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2018;2018:8246560.
- [21] SHEN P, DENG X, CHEN Z, et al. SIRT1: A Potential Therapeutic Target in Autoimmune Diseases. *Front Immunol.* 2021;12:779177.
- [22] FANG Y, WANG X, YANG D, et al. Relieving Cellular Energy Stress in Aging, Neurodegenerative, and Metabolic Diseases, SIRT1 as a Therapeutic and Promising Node. *Front Aging Neurosci.* 2021;13:738686.
- [23] YAO H, RAHMAN I. Perspectives on translational and therapeutic aspects of SIRT1 in inflammaging and senescence. *Biochem Pharmacol.* 2012;84(10):1332-1339.
- [24] RAMIS MR, ESTEBAN S, MIRALLES A, et al. Caloric restriction, resveratrol and melatonin: Role of SIRT1 and implications for aging and related-diseases. *Mech Ageing Dev.* 2015;146-148:28-41.
- [25] MAEDA M, TSUBOI T, HAYASHI T. An Inhibitor of Activated Blood Coagulation Factor X Shows Anti-Endothelial Senescence and Anti-Atherosclerotic Effects. *J Vasc Res.* 2019;56:181-190.
- [26] WARBOYS CM, DE LUCA A, AMINI N, et al. Disturbed flow promotes endothelial senescence via a p53-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34:985-995.
- [27] BIAN W, JING X, SUN Y, et al. Downregulation of LncRNA NORAD promotes Ox-LDL-induced vascular endothelial cell injury and atherosclerosis. *Aging (Albany NY).* 2020;12(7):6385-6400.
- [28] RYAN KM, PHILLIPS AC, VOUSDEN KH. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol.* 2001;13(3):332-337.
- [29] MORGAN RG, IVES SJ, LESNIEWSKI LA, et al. Age-related telomere uncapping is associated with cellular senescence and inflammation independent of telomere shortening in human arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013;305(2):H251-258.
- [30] CASELLA G, MUNK R, KIM KM, et al. Transcriptome signature of cellular senescence. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(14):7294-7305.
- [31] FERNÁNDEZ-MIRANDA G, MÉNDEZ R. The CPEB-family of proteins, translational control in senescence and cancer. *Ageing Res Rev.* 2012;11(4):460-472.
- [32] BURNS DM, RICHTER JD. CPEB regulation of human cellular senescence, energy metabolism, and p53 mRNA translation. *Genes Dev.* 2008;22(24):3449-3460.
- [33] BURNS DM, D'AMBROGIO A, NOTTROT S, et al. CPEB and two poly(A) polymerases control miR-122 stability and p53 mRNA translation. *Nature.* 2011;473(7345):105-108.
- [34] XU K, REN G. Depletion of CPEB1 protects against oxidized LDL-induced endothelial apoptosis and inflammation through SIRT1/LOX-1 signalling pathway. *Life Sci.* 2019;239:116874.
- [35] GROISMAN I, IVSHINA M, MARIN V, et al. Control of cellular senescence by CPEB. *Genes Dev.* 2006;20(19):2701-2712.
- [36] HU GS, HUR YJ, JIA JM, et al. Effects of 2-aminoindan-2-phosphonic acid treatment on the accumulation of salidroside and four phenylethanoid glycosides in suspension cell culture of *Cistanche deserticola*. *Plant Cell Rep.* 2011;30(4):665-674.
- [37] YOU SP, MA L, ZHAO J, et al. Phenylethanol Glycosides from *Cistanche tubulosa* Suppress Hepatic Stellate Cell Activation and Block the Conduction of Signaling Pathways in TGF- β 1/smads as Potential Anti-Hepatic Fibrosis Agents. *Molecules.* 2016;21(1):102.
- [38] 艾江, 余扬, 费蒙辉, 等. 松果菊苷对人增生性瘢痕成纤维细胞 TGF- β 1/Smads 信号通路影响的实验研究 [J]. *中国美容整形外科杂志*, 2021, 32(3):187-189.
- [39] ZHU H, CHENG C, ZHANG C, et al. Echinacoside suppresses cellular senescence of human fibroblastic cells by down-regulation of p53. *J Chin Pharm Sci.* 2011;1(5):523-528.

(责任编辑: MZH, ZN, ZH)