

· 基础研究 ·

十两茶提取物抗氧化型低密度脂蛋白诱导的内皮细胞衰老机制研究

刘礼军¹, 杜万红^{1,2*}, 刘小阳², 张 勇², 郭 赛¹, 罗昔金¹

(¹湖南师范大学第二附属医院老年病科, 长沙 410003; ²解放军第163医院老年病科, 长沙 410003)

【摘要】目的 探讨十两茶提取物对氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导衰老细胞模型的影响及其可能的机制。**方法** 将人脐静脉内皮细胞(HUVECs)株于含有10%牛血清的DMEM培养液中培养,使用ox-LDL孵育建立衰老细胞模型,用β-半乳糖苷酶染色法评价内皮细胞的衰老状态,分别予以不同剂量十两茶提取物及辛伐他汀预处理,检测培养液中活性氧(ROS)、非对称二甲基精氨酸(ADMA)、二甲基精氨酸二甲胺水解酶(DDAH)以及端粒酶活性水平。**结果** ox-LDL诱导的内皮细胞衰老模型中β-半乳糖苷酶染色阳性的细胞数量显著增加,细胞内ROS水平、ADMA水平增强,DDAH和端粒酶活性降低,而十两茶提取物预处理可明显抑制这一过程($P < 0.05$)。**结论** 十两茶提取物在ox-LDL诱导的内皮细胞衰老进程中起抑制作用,其机制可能与降低细胞内ROS、ADMA水平以及提高DDAH水平和端粒酶活性有关。

【关键词】 十两茶提取物; 内皮细胞; 衰老; 抑制

【中图分类号】 R363

【文献标识码】 A

【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2015.02.033

Effect of Shiliang tea extracts on ox-LDL-induced senescence in endothelial cells and underlying mechanism

LIU Li-Jun¹, DU Wan-Hong^{1,2*}, LIU Xiao-Yang², ZHANG Yong², GUO Sai¹, LUO Xi-Jin¹

(¹Department of Geriatrics, the Second Affiliated Hospital of Hunan Normal University, Changsha 410003, China; ²Department of Geriatrics, Chinese PLA Hospital No.163, Changsha 410003, China)

【Abstract】 Objective To determine the effect of the extract of Shiliang tea (a traditional tea from Anhua county, Hunan Province, China) on the senescence cells induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) and investigate the underlying potential mechanism. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were cultured in the DMEM containing 10% bovine serum, and then treated with ox-LDL to establish the model of senescent cells. β-galactose glucoside enzyme staining was used to evaluate the senescence of the endothelial cells. Simvastatin (10μmol/L, positive control) and different doses of the extract of Shiliang tea (1.0, 2.5 and 5.0g/L) were used to treat the cells before ox-LDL inducement. The levels of reactive oxygen species (ROS) and asymmetric dimethylarginine (ADMA), and the activities of dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) and telomerase in culture medium were detected. **Results** In the senescence model of the endothelial cells induced by ox-LDL, the amount of positive cells of β-galactose glucoside enzyme staining was significantly increased, the levels of ROS and ADMA were enhanced, and the activities of DDAH and telomerase were reduced. However, the pretreatment of the extract of Shiliang tea restrained the process apparently ($P < 0.05$). **Conclusion** The extract of Shiliang tea plays a restraining role in the senescence process of endothelial cells induced by ox-LDL, which might be through reducing the levels of ROS and ADMA and improving the activities of DDAH and telomerase.

【Key words】 extract of Shiliang tea; endothelial cells; senescence; inhibition

Corresponding author: DU Wan-Hong, E-mail: duge@263.net

十两茶产于湖南安化一带,是安化的传统黑茶,又名花卷茶,因每卷茶的净含量为过去的十两而得名。有文献报道,十两茶提取物在动物模型中能改善血管内皮依赖性舒张功能,并有抑制动脉粥样斑

块形成的作用,还能显著降低血脂和非对称二甲基精氨酸(asymmetric dimethylarginine, ADMA)水平^[1]。本实验使用氧化型低密度脂蛋白(oxidative low density lipoprotein, ox-LDL)诱导建立人脐静脉

内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 株衰老模型^[2], 对模型细胞添加十两茶提取物进行处理, 研究其在内皮细胞衰老进程中的作用和机制, 为心血管疾病的治疗和预防提供一定的依据。

1 材料与方法

1.1 实验试剂和仪器

HUVECs (北京肿瘤研究所); DMEM培养基 (美国Gibco公司); 辛伐他汀^[3] (德国默克公司); 牛血清 (杭州四季青公司); 胰蛋白酶 (美国Sigma公司); 活性氧检测试剂盒 (碧云天生物研究所); 十两茶 (湖南茶叶股份有限公司白沙溪茶厂) 提供; 倒置相差显微镜 (日本Olympus公司)。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 细胞培养 HUVECs细胞用含10%牛血清的DMEM细胞培养液培养, 调整细胞浓度后随机分成正常组、模型组、实验组和阳性药物对照组, 实验组再分成3个不同的剂量组, 十两茶提取物剂量分别是1.0, 2.5和5.0g/L。

1.2.2 十两茶提取物的制备及其有效成分含量测定 十两茶研碎, 置于电子天平上称重, 每克茶叶加入12ml沸水, 1h后, 将茶叶水紧密过滤, 冷却, 采用低温真空浓缩设备对滤液浓缩, 冷冻干燥后得到十两茶提取物。用高效液相色谱分析仪检测儿茶酚胺含量为22.43%; 紫外分光光度计检测提取物的茶多酚含量为52.1%。

1.2.3 ox-LDL诱导衰老细胞模型的建立 取健康新鲜血浆, 用密度梯度法制备ox-LDL^[4], Lowry法测定LDL蛋白的含量, 加入10mol/L 硫酸铜37℃下孵育24h, 测定丙二醛含量, 评价其氧化程度。将辛伐他汀用蒸馏水配成10μmol/L浓度。

1.2.4 实验分组及处理 将模型组、实验组和阳性药物对照组加入ox-LDL诱导细胞衰老, 实验组加十两茶提取物 (剂量分别为1, 2.5和5g/L) 处理48h, 阳性药物对照组加入辛伐他汀处理。

1.2.5 观察指标的测定 β-半乳糖苷酶活性测定法检测细胞衰老, 化学荧光法测定细胞内的氧自由基; 测定被二甲基精氨酸二甲胺水解酶 (DDAH) 代谢的ADMA的量可以计算出DDAH的活性, 将正常对照组的DDAH活性定为100%, 其他各组的DDAH活性以与正常对照组的百分比表示^[5,6]; 高效液相色谱法测定ADMA含量。端粒酶活性使用TRAP-银染法测定, 结果使用GelPro软件进行分析。

1.3 统计学处理

应用SPSS19.0统计软件包对数据进行统计学分析。所有实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用两组独立样本的t检验, 多组数据采用单因素方差分析, 当方差分析有显著差异时, 进一步用q检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 十两茶提取物对ox-LDL诱导的衰老内皮细胞的作用

使用β-半乳糖苷酶染色法评价细胞衰老状态。如图1所示, β-半乳糖苷酶染色后, 正常对照组仅见少量阳性细胞 (图1A), 而ox-LDL (100mg/L) 处理组细胞胞浆蓝色沉淀着色加深, 阳性细胞数明显增多 (图1B)。加入十两茶提取物处理后, β-半乳糖苷酶染色阳性的细胞数明显降低, 呈浓度依赖性, 阳性细胞数量按照十两茶提取物1.0, 2.5和5.0g/L的浓度依次递减 (图1C, 图1D, 图1E)。阳性药物对照组加入10μmol/L的辛伐他汀后, 也明显抑制了β-半乳糖苷酶染色阳性细胞的增多 (图1F)。

在显微镜下随机挑选5个高倍视野, 在200个细胞中计数阳性细胞数量, 算出阳性率, 绘制成柱状图 (图2)。结果发现, ox-LDL处理组与正常对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$), ox-LDL处理组的阳性细胞数量远多于正常对照组。2.5和5.0g/L剂量的十两茶提取物预处理组, β-半乳糖苷酶染色阳性细胞数呈明显降低, 并呈浓度依赖性 ($P < 0.05$)。阳性药物对照组也能显著降低ox-LDL诱导的β-半乳糖苷酶阳性细胞增加 ($P < 0.05$)。

2.2 十两茶提取物对细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的影响

ROS是细胞衰老过程中的一个重要机制。经ox-LDL诱导的HUVECs细胞显示强信号的荧光。而2.5和5.0g/L的十两茶提取物预处理组和10μmol/L辛伐他汀处理组的细胞荧光信号显著减弱, 说明两者能明显抑制氧化应激 (表1)。

2.3 十两茶提取物对内皮细胞DDAH/ADMA的影响

ox-LDL (100mg/L) 孵育HUVECs 48h, 检测发现培养液中ADMA水平明显增高。然而, 经2.5和5.0g/L的十两茶提取物和10μmol/L辛伐他汀药物处理后, 细胞中由ox-LDL诱导增高的ADMA明显被抑制, DDAH以及端粒酶活性的降低也显著被抑制 (表1)。

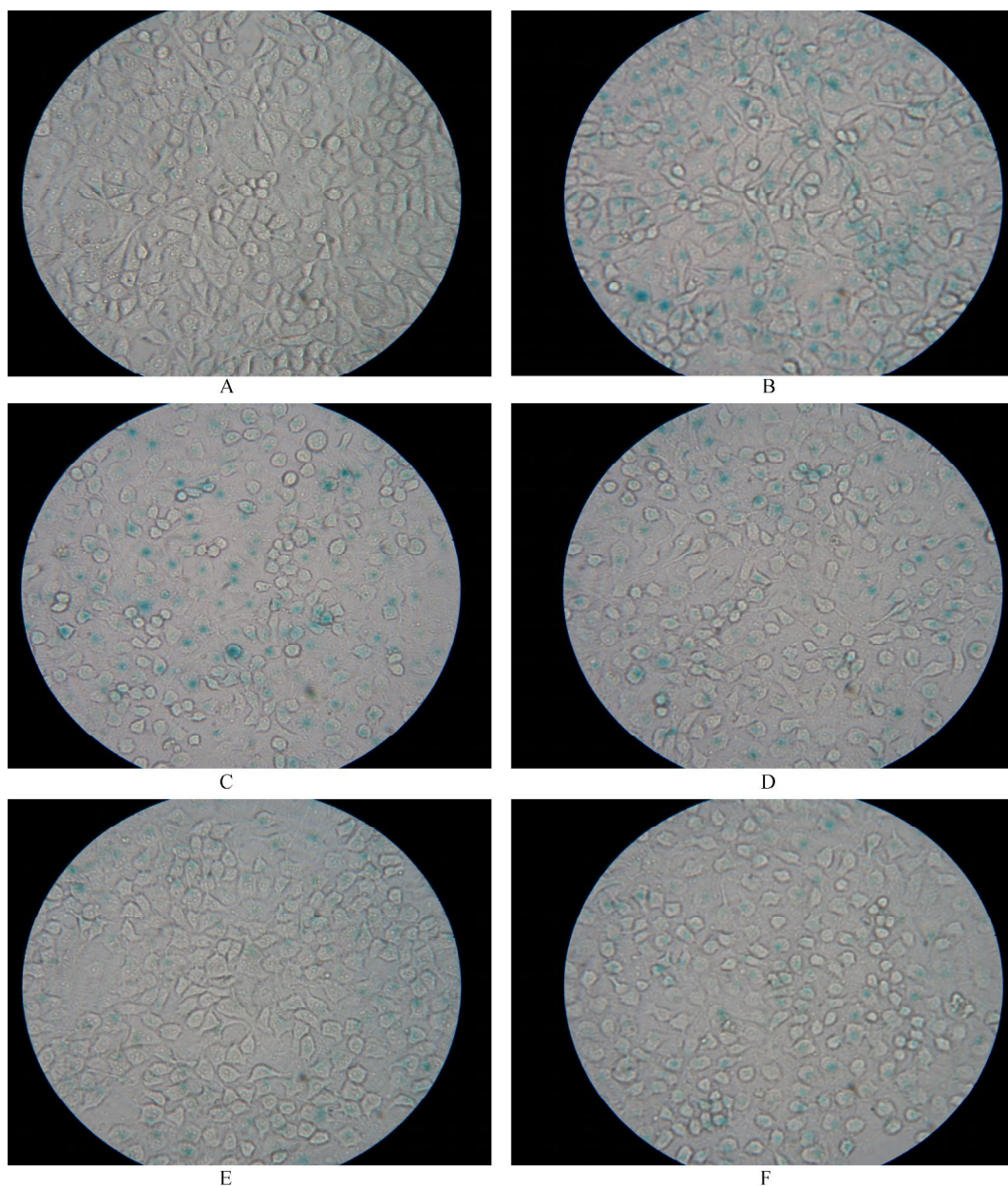


图1 各组衰老细胞数目

Figure 1 Senescent cells number of all groups ($\times 200$)

A: control group; B: ox-LDL group; C, D, E: Shiliang tea groups (1.0, 2.5 and 5.0g/L); F: simvastatin group

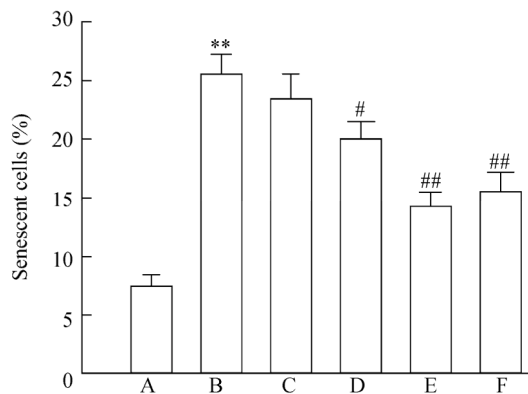


图2 十两茶提取物对ox-LDL诱导细胞 β -半乳糖苷酶活性增加的影响

Figure 2 Effects of water extract of Shiliang tea on beta-galactosidase activity increased in ox-LDL induced cells

A: control group; B: ox-LDL group; C, D, E: Shiliang tea groups (1.0, 2.5 and 5.0g/L); F: simvastatin group. Compared with control group, ** $P < 0.01$; compared with ox-LDL group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

3 讨论

大量研究表明,动脉粥样硬化发生发展的高危因素之一就是衰老^[7]。血管细胞衰老的特征性变化与很多年龄相关性血管疾病的变化都是相符合的,这些变化包括抗衰老基因表达下调,NO生物利用度降低,氧化应激增高等等。衰老相关的心血管异常和动脉粥样硬化的一个重要的病理生理学特征就是内皮功能发生异常^[8],很多心血管疾病中都发现有血管内皮功能的紊乱;体外实验中发现,一些损伤因素如ox-LDL能导致内皮细胞加速衰老,研究也发现ox-LDL浓度依赖性地上调内皮细胞血凝素ox-LDL受体-1的表达,激活凋亡信号,最终导致细胞的凋亡,而辛伐他汀在降脂作用外还可以降低血

表1 十两茶提取物对ox-LDL诱导细胞ROS、ADMA、DDAH、端粒酶活性水平的影响

Table 1 Effects of water extract of Shiliang tea on ROS, ADMA, DDAH level and telomerase activities in ox-LDL induced cells (n = 6, $\bar{x} \pm s$)

Group	ROS(%)	ADMA(μmol/L)	DDAH(μmol/L)	Telomerase activities(%)
Control	420 ± 51	0.43 ± 0.03	100.0 ± 4.5	1.00 ± 0.11
ox-LDL	1657 ± 205**	1.43 ± 0.12**	45.8 ± 3.2**	0.60 ± 0.08**
ox-LDL + 1.0g/L Shiliang tea	1432 ± 179	1.35 ± 0.14	50.4 ± 3.8	0.64 ± 0.10
ox-LDL + 2.5g/L Shiliang tea	1100 ± 101 [#]	0.94 ± 0.09 [#]	67.4 ± 4.7 [#]	0.86 ± 0.06 [#]
ox-LDL + 5.0g/L Shiliang tea	870 ± 59 ^{##}	0.67 ± 0.04 ^{##}	82.4 ± 4.1 ^{##}	0.94 ± 0.04 ^{##}
ox-LDL + simvastatin	967 ± 79 ^{##}	0.84 ± 0.05 ^{##}	78.9 ± 3.9 ^{##}	0.82 ± 0.07 [#]

ROS: reactive oxygen species; ADMA: asymmetric dimethylarginine; DDAH: dimethylarginine dimethylaminohydrolase. Compared with control group, **P < 0.01; compared with ox-LDL group, [#]P < 0.05, ^{##}P < 0.01

浆ox-LDL浓度，调节大鼠动脉内皮细胞的ROS和ADMA水平，从而抵抗ox-LDL诱导的HUVECs衰老，且其作用呈浓度依赖性^[9-11]。本实验用ox-LDL诱导产生衰老细胞模型，使用辛伐他汀处理组作为阳性药物对照组。

茶叶具有抗衰老作用，因其富含多酚类化合物^[12]，其单体成分表没食子儿茶素和没食子酸酯能延缓神经元衰老。产于湖南安化的十两茶是黑茶的一种，有文献报道十两茶提取物在动物模型中有改善血管内皮依赖性舒张功能的作用，还能降低血脂和ADMA水平^[1]。本实验结果表明，十两茶提取物对ox-LDL所诱导的内皮细胞β-半乳糖苷酶的活性有抑制作用，提示十两茶提取物能够抑制ox-LDL诱导的内皮细胞衰老。

研究发现，ADMA水平增加与衰老密切相关^[13]。很多老年人血管内膜增厚，球囊扩张引起血管损伤时内膜会发生增生，两者是类似的，而在球囊损伤血管内膜后再生的内皮细胞内发现ADMA水平增加^[14]。ADMA水平增加还出现在传代诱导的衰老内皮细胞内，另外，常规培养内皮细胞后，加入外源性ADMA能直接加速内皮细胞衰老，其原因可能是ADMA诱导了氧化应激^[15,16]，端粒酶可以维持端粒的稳定性，当端粒酶缺乏或者失活时，端粒DNA不能得到及时的修复，细胞从而走向衰老和死亡。综上所述，ADMA、ROS、端粒酶活性是细胞衰老过程中的重要调节因子，而十两茶提取物通过对这些因子的调节可以对ox-LDL诱导的内皮细胞衰老过程起抑制作用。

【参考文献】

[1] Du WH, Liu ZH, Shi L, *et al.* Effect of the extract of Hua-juan tea on blood lipids and endothelial function in hypercholesterolemic rats[J]. *Cent South Pharm*, 2008, 6(2): 129-132. [杜万红, 刘仲华, 施玲, 等. 花卷茶提取物对高胆固醇血症大鼠血脂和内皮功能的影响[J]. *中南药学*, 2008, 6(2): 129-132.]

[2] Zhang XP, Zhang GH, Wang YY, *et al.* Oxidized low-density lipoprotein induces hematopoietic stem cell senescence[J]. *Cell Biol Int*, 2013, 37(9): 940-948.

[3] Ota H, Eto M, Kano MR, *et al.* Induction of endothelial nitric oxide synthase, SIRT1, and catalase by statins inhibits endothelial senescence through the Akt pathway[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(11): 2205-2211.

[4] Jiang DJ, Jiang JL, Zhu HQ, *et al.* Demethylbellidifolin preserves endothelial function by reduction of the endogenous nitric oxide synthase inhibitor level[J]. *J Ethnopharmacol*, 2004, 93(2-3): 295-306.

[5] Jiang DJ, Jia SJ, Dai Z, *et al.* Asymmetric dimethylarginine induces apoptosis via p38 MAPK/caspase-3-dependent signaling pathway in endothelial cells[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2006, 40(4): 529-539.

[6] Antoniadis C, Demosthenous M, Tousoulis D, *et al.* Role of asymmetrical dimethylarginine in inflammation-induced endothelial dysfunction in human atherosclerosis[J]. *Hypertension*, 2011, 58(1): 93-98.

[7] Al-Shaer MH, Choueiri NE, Correia ML, *et al.* Effects of aging and atherosclerosis on endothelial and vascular smooth muscle function in humans[J]. *Int J Cardiol*, 2006, 109(2): 201-206.

[8] Matsumoto S, Gotoh N, Hishinuma S, *et al.* The role of hypertriglyceridemia in the development of atherosclerosis and endothelial dysfunction[J]. *Nutrients*, 2014, 6(3): 1236-1250.

[9] Vasilev V, Matrozoza J, Elenkova A, *et al.* Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and soluble vascular cell adhesion molecule 1(sVCAM-1) as circulating markers for endothelial dysfunction in patients with pheochromocytoma[J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2013, 121(9): 551-555.

[10] Zhang XP, Zhang GH, Wang YY, *et al.* Oxidized low-density lipoprotein induces hematopoietic stem cell senescence[J]. *Cell Biol Int*, 2013, 37(9): 940-948.

[11] Hayashi T, Matsui-Hirai H, Miyazaki-Akita A, *et al.* Endothelial cellular senescence is inhibited by nitric

- oxide: implications in atherosclerosis associated with menopause and diabetes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(45): 17018-17023.
- [12] Egan PB. Nutrition interventions for aging healthy. Supplements set the foundation[J]. *Adv Nurse Pract*, 2010, 18(8): 14-17, 23.
- [13] Graham DA, Rush JW. Cyclooxygenase and thromboxane/prostaglandin receptor contribute to aortic endothelium-dependent dysfunction in aging female spontaneously hypertensive rats[J]. *J Appl Physiol* (1985), 2009, 107(4): 1059-1067.
- [14] Demiralay R, Gursan N, Erdem H. Regulation of nicotine-induced apoptosis of pulmonary artery endothelial cells by treatment of N-acetylcysteine and vitamin E[J]. *Hum Exp Toxicol*, 2007, 26(7): 595-602.
- [15] Novella S, Dantas AP, Segarra G, *et al.* Aging-related endothelial dysfunction in the aorta from female senescence-accelerated mice is associated with decreased nitric oxide synthase expression[J]. *Exp Gerontol*, 2013, 48(11): 1329-1337.
- [16] Yuan Q, Peng J, Liu SY, *et al.* Inhibitory effect of resveratrol derivative BTM-0512 on high glucose-induced cell senescence involves dimethylaminohydrolase/asymmetric dimethylarginine pathway[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2010, 37(5-6): 630-635.
- (编辑: 周宇红)

· 消 息 ·

《中华老年多器官疾病杂志》“临床病理讨论”栏目征稿

临床病理讨论 (Clinicopathological Conference, CPC) 是临床实践中的一个重要环节, 是多个学科合作对患者进行个体化诊治的一种形式, 尤其对于一些疑难和罕见病例尤为重要。综合患者的临床表现、实验室检查、影像学检查和病理检查等各项结果, 一方面可以明确疾病的诊断并制定治疗方案, 使患者受益, 另一方面亦有利于为临床医师提供更好的经验和更开阔的思路, 提高医师的诊疗能力。一篇好的临床病理讨论, 往往是教科书上找不到的活教材, 也是其他文体难以取代的好形式。

“临床病理讨论”一直以来都是本刊的一个特色栏目, 深受广大读者喜爱。所刊登的一般多为回顾性的病例讨论与总结, 旨在总结经验、吸纳教训和传播知识。在工作实践中, 我们根据广大读者和作者的建议, 对临床病理讨论文章的格式进行了调整。(1) 作者在文题下署名 (而非仅在文末注明由何人整理), 作者拥有本文的著作权。(2) 文章正文为中文 (而非以前的中英文对照), 正文前有言简意赅的中英文摘要。论文性质等同于本刊“论著”。(3) 所选病例可以是疑难、罕见病例, 也可以是诊断明确、但病情危重或有诸多并发症、治疗上甚为棘手的病例, 亦可为其他对临床实践有指导或提示意义的病例。

本刊热忱欢迎广大专家学者为本刊撰写或推荐相关稿件。

具体格式请参考本刊近期发表的“临床病理讨论”文章。

地址: 100853 北京市复兴路28号, 《中华老年多器官疾病杂志》编辑部

电话: 010-66936756

网址: <http://www.mode301.cn>

E-mail: zhldnqg@mode301.cn