

高糖诱导人脐静脉内皮细胞衰老过程中活性氧和一氧化氮合酶/一氧化氮系统的变化

伊桐凝^{1a,2}, 张 锦^{1a}, 单海燕^{1b}

(1. 中国医科大学附属第一医院①内分泌科, ②干诊科, 辽宁 沈阳 110001; 2. 辽宁中医药大学附属医院内分泌科)

【摘要】 目的 观察高糖加速内皮细胞衰老过程中细胞内活性氧(ROS)水平和一氧化氮合酶/一氧化氮(NOS/NO)系统的变化。方法 将正常浓度糖(5.5 mmol/L)和高浓度糖(分别为 11、22、33 mmol/L)培养液作用于人脐静脉内皮细胞 48 h 后,用 β -半乳糖苷酶(β -gal)染色鉴定衰老细胞,用聚合酶链反应-酶联免疫吸附法(PCR-ELISA)检测端粒酶活性,用硝酸盐还原酶法检测细胞上清液总 NO 水平,用蛋白质免疫印迹法(Western blotting)分析内皮型一氧化氮合酶(eNOS)蛋白表达,用荧光酶标仪检测细胞内 NOS 活性,用流式细胞仪检测细胞内 ROS 水平。结果 高糖培养液作用于内皮细胞 48 h 后,与对照组比较,随糖浓度升高内皮细胞 β -gal 染色阳性细胞数明显增多,端粒酶活性下降,细胞 NO 合成减少,NOS 活性被抑制,细胞内 ROS 水平明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),但 eNOS 蛋白表达变化不明显。结论 高糖加速内皮细胞衰老进程,其作用机制可能与增强氧化应激,抑制 NOS/NO 系统有关。

【关键词】 高糖; 衰老; 端粒酶; 一氧化氮合酶; 一氧化氮; 活性氧

中图分类号:Q255;Q343.3 文献标识码:A DOI:10.3969/j.issn.1008-9691.2009.05.008

Alterations of reactive oxygen specie and nitric oxide synthase/nitrogen monoxidum system in the processes of endothelial cell senescence of human umbilical vein induced by high glucose YI Tong-ning*, ZHANG Jin, SHAN Hai-yan. * Department of Endocrinology and Metabolism, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning, China
Corresponding author: ZHANG Jin, Email: jinzhangcmu@yahoo.com.cn

【Abstract】 **Objective** To investigate the changes of reactive oxygen specie (ROS) and nitric oxide synthase/nitrogen monoxidum (NOS/NO) system accelerated in the processes of endothelial cell senescence after exposure to high glucose. **Methods** The human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were cultured with different concentrations of glucose at 5.5 mmol/L normal level and high levels 11, 22 and 33 mmol/L for 48 hours, respectively. Afterwards, SA- β -galactosidase (gal) staining was used to evaluate the senescence of cells. Telomerase activity was detected by polymerase chain reaction-enzyme linked immunosorbent assay (PCR-ELISA). The total NO level in the supernatant of cell culture was measured by nitrate reductase method. The endothelial nitric oxide synthase (eNOS) protein expression was analyzed by Western blotting. The NOS activity in the cells was detected by fluorescein enzyme labeling method. The ROS levels were measured by flow cytometry. **Results** After the endothelial cells were treated with high glucose concentrations for 48 hours, the numbers of SA- β -gal positive cells were significantly increased, especially in the 22 - 33 mmol/L cultures, much higher than the number in the normal glucose (5.5 mmol/L) culture. Along with the elevation of the glucose concentration, the number of the positive cells was increased steadily, showing a dose-dependent relationship. The telomerase activity was lowered; the NO synthesis was decreased and the activity of NOS was inhibited, but the changes of protein expression of eNOS was not significant; the ROS level in cells was obviously increased in all high glucose groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** High glucose accelerates the senescence of endothelial cells dose-dependently and the underlying mechanism may be associated with increasing oxidative stress and inhibiting NOS/NO system.

【Key words】 high glucose; senescence; telomerase; nitric oxide synthase; nitrogen monoxidum; reactive oxygen specie

基金项目:辽宁省教育厅科研项目(2004D159)

通信作者:张 锦,Email:jinzhangcmu@yahoo.com.cn

作者简介:伊桐凝(1979-),女(汉族),辽宁省人,博士研究生。

糖尿病大血管病变的病理基础主要是动脉粥样硬化性改变。最近研究发现,粥样硬化斑块处内皮细胞呈衰老细胞特征,如 β -半乳糖苷酶(β -gal)染色阳

性和端粒酶缩短等^[1];同时,衰老的内皮细胞因形态发生变化以及细胞内某些基因、蛋白表达的改变也会促进内皮功能障碍,加速动脉粥样硬化的发生发展^[2]。研究证实,内皮功能障碍和损伤是糖尿病血管并发症的早期病变,但其机制尚不十分清楚。因此,本实验中观察不同浓度糖对内皮细胞衰老程度的影响以及在此过程中活性氧(ROS)水平和一氧化氮合酶/一氧化氮(NOS/NO)系统的变化,为探讨高糖与内皮细胞衰老间的关系以及防治糖尿病大血管病变提供理论依据。

1 材料与与方法

1.1 主要试剂:人脐静脉内皮细胞株(HUVECs)购自美国 Cascade Biologics 公司,DMEM 培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司, β -gal 染色试剂盒及 NO、NOS、ROS 检测试剂盒购自上海碧云天生物试剂公司,端粒酶活性检测试剂盒购自德国 Roche Diagnostics 公司,内皮型一氧化氮合酶(eNOS)抗体购自美国 Santa Cruze 公司。

1.2 HUVECs 的培养:将生长于 DMEM 培养基中的 HUVECs 细胞株置于 CO₂ 培养箱中培养,每隔 2~3 d 更换 1 次培养液以维持细胞良好的生长状态,用胰蛋白酶消化传代,待细胞生长到 80% 融合时换成含 1% 胎牛血清的 DMEM 培养基继续培养 24 h,使细胞达到同步化后分组用于实验。

1.3 实验分组:将贴壁细胞按随机数字表法分成 4 组,对照组糖浓度 5.5 mmol/L,高糖低、中、高浓度组糖浓度分别为 11、22 和 33 mmol/L,培养 48 h。每组实验重复 3 次。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 β -gal 染色:将细胞接种于 6 孔板中,分组干预后,吸除细胞培养液,用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗细胞,戊二醛固定,PBS 洗 3 次,吸除 PBS,各孔加入 1 ml X-gal 染液,在无 CO₂ 条件下孵育 12~16 h。荧光显微镜下每组标本随机选取视野,至少观察 1 000 个细胞,胞质蓝染者为衰老细胞,计数阳性细胞占观察细胞总数的百分比。

1.4.2 细胞内端粒酶活性检测:采用聚合酶链反应-酶联免疫吸附法(PCR-ELISA),用 0.25% 胰蛋白酶消化、收集 2×10^5 个细胞,余步骤按试剂盒说明书操作,酶标仪读数并计算端粒酶的相对活性。

1.4.3 细胞上清液总 NO 含量检测:采用硝酸盐还原酶法测定 NO₂⁻/NO₃⁻ 水平,按试剂盒说明操作。

1.4.4 细胞内 NOS 活性检测:将细胞接种于平底 96 孔板中,细胞分组刺激后按说明书步骤装 DAF-FM DA 分子探针,37 °C 孵育 60 min,用荧光酶标仪检测细胞的相对荧光强度。

1.4.5 eNOS 蛋白表达检测:采用蛋白质免疫印迹法(Western blotting)。分组干预细胞后收集细胞,加细胞裂解液,离心提取蛋白并测其浓度;用凝胶电泳分离蛋白,加入抗 eNOS 抗体,洗 3 次后加入辣根过氧化物酶标记的二抗,用免疫荧光发光法(ECL)进行发光处理,X 线感光成像。

1.4.6 细胞内 ROS 检测:按试剂盒说明书操作,用流式细胞仪检测 10 000 个细胞的平均荧光强度。

1.5 统计学处理:采用 SPSS 13.0 分析软件,实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞衰老鉴定(彩色插页图 1;表 1): β -gal 染色显示,对照组细胞几乎不表达 β -gal,随葡萄糖浓度升高, β -gal 染色阳性细胞率逐渐增加且明显高于对照组,以高糖中、高浓度组最显著(P 均 < 0.05)。

2.2 端粒酶活性(表 1):细胞端粒酶活性随糖浓度增加而降低(P 均 < 0.05);高糖各浓度组明显低于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.3 细胞总 NO(表 1):细胞内 NO₂⁻/NO₃⁻ 水平随糖浓度增加呈剂量依赖性下降,中、高浓度组与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。

2.4 NOS 活性和 eNOS 蛋白表达(表 1):细胞内 DAF-FM DA 荧光强度随糖浓度升高而下降,说明 NOS 活性被抑制。Western blotting 结果显示,内皮细胞 eNOS 蛋白表达无明显变化。

表 1 各组 HUVECs 的 β -gal 染色阳性细胞、端粒酶活性及内皮细胞 NO、NOS、eNOS 蛋白和 ROS 变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	β -gal 染色阳性细胞 (%)	端粒酶活性 (%)	NO ₂ ⁻ /NO ₃ ⁻ (μ mol/L)	NOS 活性 (%)	eNOS 蛋白表达 (%)	ROS (荧光强度)
对照组	3	4.00±1.30	100.00±0	12.26±1.13	100.00±0	100.00±0	117.11±18.76
高糖低浓度组	3	7.00±1.73	91.32±4.01 ^a	10.52±0.83	89.92±5.80	100.63±3.15	159.84±27.25 ^a
高糖中浓度组	3	12.67±2.03 ^{ac}	78.44±3.78 ^{bc}	9.60±0.94 ^a	83.03±8.20 ^a	99.56±2.78	188.99±18.77 ^a
高糖高浓度组	3	16.00±2.26 ^{acd}	56.04±3.35 ^{bcd}	8.88±1.06 ^b	74.77±8.10 ^b	96.67±3.65	244.56±22.96 ^b

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与高糖低浓度组比较,^c $P < 0.05$;与高糖中浓度组比较,^d $P < 0.05$

2.5 细胞内 ROS(表 1):细胞内 ROS 水平随高糖浓度升高较对照组分别升高了 36.49%、61.38%、108.83%($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3 讨论

血管内皮细胞的分裂能力有限^[1],当受到外界刺激后,因不断分裂而发生衰老。在衰老过程中,各种生物活性因子的分泌也发生变化,造成内皮功能障碍,最终导致动脉粥样硬化^[2]。糖尿病大血管病变的病理基础主要是动脉粥样硬化性改变,始动因素使内皮细胞功能受损,我们推测高糖有可能通过加速内皮细胞衰老而导致糖尿病大血管病变。本实验中观察了不同糖浓度培养液对内皮细胞衰老程度的影响,选择 β -gal 染色和端粒酶活性来评估内皮细胞衰老的程度。 β -gal 染色阳性是细胞衰老的生物学标志之一,即细胞胞质中出现蓝色沉淀^[3]。端粒酶是一种核糖核蛋白逆转录酶,可以在缩短的端粒末端加上新的重复序列,保持端粒长度以延缓衰老进程^[4]。本实验证实,随糖浓度升高, β -gal 染色阳性的内皮细胞增加,细胞内端粒酶活性降低,说明高糖培养液剂量依赖性加速了内皮细胞衰老进程。

研究发现,衰老血管的舒张功能下降与内皮细胞分泌的 3 种主要血管扩张因子如 NO、前列环素和内皮依赖性超极化因子(EDHF)生成与释放减少有关^[5],其中又以 NO 最为重要。NO 作为具有多种功能的中间介质,可调节管腔大小、抑制血小板聚集、抗凋亡、抑制平滑肌细胞增殖、抑制细胞内黏附分子和趋化因子表达等,因而具有抗动脉粥样硬化的作用^[6]。最近研究发现,细胞内正常水平的 NO 在清除细胞内多余的氧自由基、维持端粒酶的活性,保持端粒的长度中也起重要作用^[7]。可见,内皮细胞内 NO 水平对于维护内皮细胞功能、延缓内皮细胞衰老起着重要的作用。本实验结果显示,随内皮细胞衰老程度加重,NO 水平降低。内皮细胞主要在 eNOS 的作用下产生 NO。为了进一步明确高糖诱导内皮细胞衰老过程中 NO 水平下降的原因,本实验中检测了 NOS 活性和 eNOS 蛋白表达,结果显示,NOS 活性随糖浓度增加而呈剂量依赖性下降,与 NO 变化趋势相符,未观察到 eNOS 蛋白表达变化。提示高糖加速内皮细胞衰老与 NOS/NO 系统变化有关。

本实验和其他研究中都观察到内皮细胞衰老过程中 eNOS 的表达和(或)活性降低^[5,7],但其机制目前还不明确。有学者认为可能与多种因素引发的氧化应激反应和氧化损伤有关。生理浓度的 ROS 是细胞维持正常生理活动所必需的^[8]。但大量的 ROS 除

直接造成生物膜损伤外,还能改变细胞内环境稳定性,引起细胞内 DNA、蛋白质的损伤或干扰信号转导通路。体外实验也证实,高糖可通过激活内皮细胞表面的还原型辅酶 I (NADPH)氧化酶而产生大量的 ROS^[9]。本研究显示,伴随细胞衰老程度加重,细胞内 ROS 水平增加;NOS 活性也随细胞衰老程度加重和 ROS 水平升高而受到抑制。推测高糖诱导内皮细胞衰老的机制可能与高糖刺激细胞产生大量 ROS 有关。过量的 ROS 消耗细胞内的 NO 并产生毒性更强的超氧亚硝酸盐(ONOO^-)^[10],抑制端粒酶活性,导致端粒缩短^[7]。已有文献报道,使用 NO 供体或自由基清除剂可逆转或延缓细胞衰老^[5,7]。

综上所述,在高糖作用下,随着 ROS 增加,NOS 和 NO 减少,内皮细胞出现衰老特征。推测高糖通过加速内皮细胞衰老而造成内皮功能障碍,最终导致动脉粥样硬化性病变。细胞内抗氧化防御系统 NOS/NO 在高糖促进内皮细胞衰老过程中被明显抑制,并随细胞内 ROS 水平升高,说明高糖诱导内皮细胞衰老的机制与氧化/抗氧化系统失衡有关。

参考文献

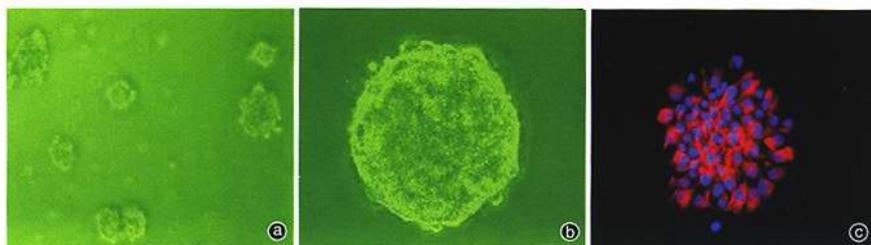
- [1] Holmång A, Jennische E, Björntorp P. Rapid formation of capillary endothelial cells in rat skeletal muscle after exposure to insulin[J]. *Diabetologia*, 1996, 39(2):206-211.
- [2] Bürrig KF. The endothelium of advanced arteriosclerotic plaques in humans [J]. *Arterioscler Thromb*, 1991, 11(6):1678-1689.
- [3] Unterluggauer H, Hütter E, Voglauer R, et al. Identification of cultivation-independent markers of human endothelial cell senescence in vitro[J]. *Biogerontology*, 2007, 8(4):383-397.
- [4] Minamino T, Miyauchi H, Yoshida T, et al. Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomere in endothelial dysfunction [J]. *Circulation*, 2002, 105(13):1541-1544.
- [5] Busse R, Fleming I. Regulation of endothelium-derived vasoactive autacoid production by hemodynamic forces [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2003, 24(1):24-29.
- [6] Albrecht EW, Stegeman CA, Heeringa P, et al. Protective role of endothelial nitric oxide synthase [J]. *J Pathol*, 2003, 199(1):8-17.
- [7] Brandes RP, Fleming I, Busse R. Endothelial aging [J]. *Cardiovasc Res*, 2005, 66(2):286-294.
- [8] Harman D. The free radical theory of aging [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2003, 5(5):557-561.
- [9] Jay D, Hitomi H, Griendling KK. Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications [J]. *Free Radic Biol Med*, 2006, 40(2):183-192.
- [10] 黄宗海,冯浩森,黄绪亮,等.一氧化氮合酶抑制剂 L-精氨酸对创伤性休克大鼠存活率的影响 [J]. *中国危重病急救医学*, 2004, 16(1):45-48.

(收稿日期:2009-02-08)

(本文编辑:李银平)

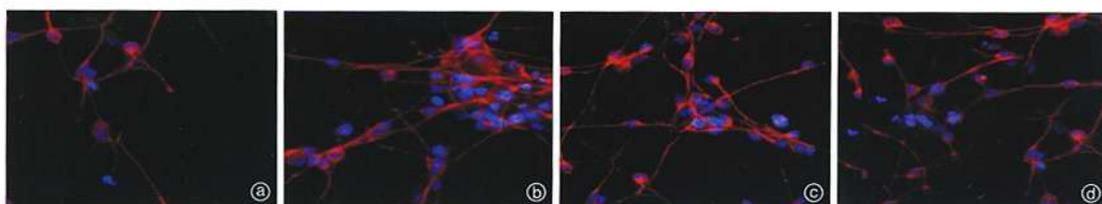
脑康 II 号对新生大鼠海马神经干细胞增殖分化的影响

(正文见259页)



①:培养4d($\times 100$), ②:培养8d($\times 400$), ③:培养7d巢蛋白阳性表达(红色为巢蛋白, 蓝色为细胞核, FITC 标记的荧光二抗染色, $\times 400$)

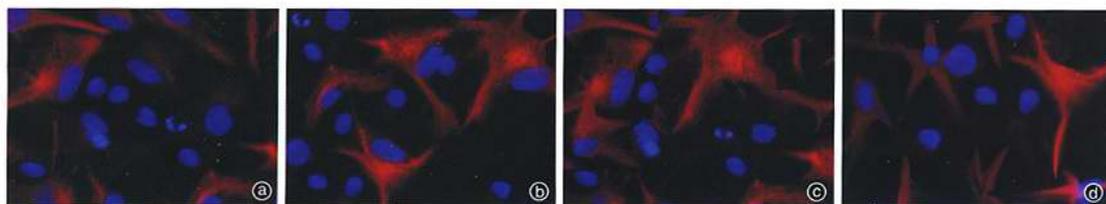
图1 倒置相差荧光显微镜下观察体外培养大鼠海马 NSCs 不同时间点的生长状态及巢蛋白阳性表达



①:对照组, ②:脑康 II 号大剂量组, ③:脑康 II 号中剂量组, ④:脑康 II 号小剂量组;

图中红色阳性细胞为 β -III-tubulin, 蓝色(DAPI 着色)为细胞核

图2 倒置相差荧光显微镜下观察各组体外培养大鼠海马 NSCs β -III-tubulin 阳性神经元改变(FITC 标记的荧光二抗染色, $\times 400$)



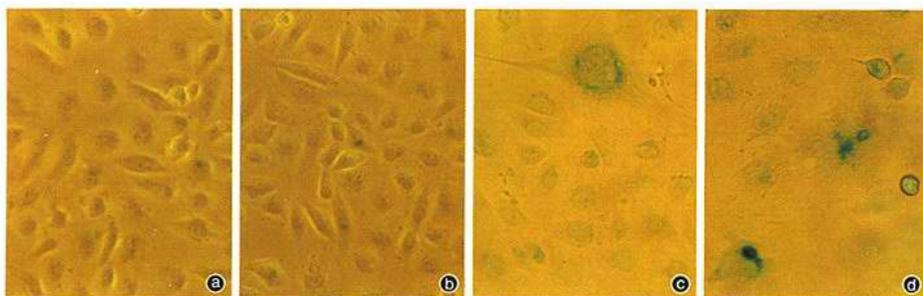
①:对照组, ②:脑康 II 号大剂量组, ③:脑康 II 号中剂量组, ④:脑康 II 号小剂量组;

图中红色阳性细胞为 GFAP, 蓝色(DAPI 着色)为细胞核

图3 倒置相差荧光显微镜下观察各组体外培养大鼠海马 NSCs GFAP 阳性星形胶质细胞改变(FITC 标记的荧光二抗染色, $\times 400$)

高糖诱导人脐静脉内皮细胞衰老过程中活性氧

和一氧化氮合酶/一氧化氮系统的变化 (正文见275页)



①:对照组, ②:高糖低浓度组, ③:高糖中浓度组, ④:高糖高浓度组

图1 荧光显微镜下观察鉴定各组 HUVECs 衰老程度(β -gal 染色, $\times 200$)