

血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 诱导血管内皮细胞衰老的形态学研究

单海燕¹, 白小涓¹, 刘 强¹, 陈香美²

(1. 中国医科大学附属第一医院循环内科, 辽宁省沈阳市 110001; 2. 中国人民解放军总医院肾病中心, 北京市 100853)

[关键词] 内科学; 血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$; 内皮细胞; 细胞衰老; 细胞凋亡; 超微结构

[摘要] 目的 探讨血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 诱导人脐静脉内皮细胞衰老与细胞凋亡的关系。方法 制备血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ RPMI1640 培养基培养人脐静脉内皮细胞, 采用四甲基偶氮唑蓝比色法测定内皮细胞存活率, β -半乳糖苷酶染色、细胞周期分析鉴定细胞衰老; 通过 Hoechst33258 荧光染色观察细胞形态学的变化, 透射电子显微镜观察衰老细胞的超微结构。结果 血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 诱导组存活的细胞数为对照组的 $81.9\% \pm 0.04\%$ ($P < 0.01$), 约 80% 的细胞呈现 β -半乳糖苷酶阳性染色, 流式细胞仪检测细胞周期停滞于 G_0 - G_1 , 荧光显微镜可见明显的细胞凋亡 ($P < 0.05$), 透射电子显微镜可见血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 诱导组细胞核染色质浓缩和凝聚。结论 血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 可诱导体外培养的内皮细胞衰老, 衰老的内皮细胞发生凋亡, 提示细胞凋亡参与了血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 诱导内皮细胞衰老的过程。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The Morphologic Study on the Senescence of Endothelial Cell Induced by Angiotensin $\text{Ang} \text{ II}$

SHAN Hai-Yan¹, BAI Xiao-Juan¹, LIU Qiang¹, and CHEN Xiang-Mei²

(1. Clinical Circulatory Section, First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China; 2. Department of Nephrology, General Hospital of People's Liberation Army, Beijing 100853, China)

[KEY WORDS] Angiotensin $\text{Ang} \text{ II}$; Endothelial Cell; Cell Senescence; Cell Apoptosis; Ultra-Microstructure[ABSTRACT] Aim To investigate the senescence and apoptosis of endothelial cells induced by angiotensin $\text{Ang} \text{ II}$ ($\text{Ang} \text{ II}$).

Methods Human umbilical vein endothelial cells (hUVEC) were cultured in vitro and intervened by $\text{Ang} \text{ II}$. The cell living rate was observed by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT); β -gal staining and cell cycle analysis were used to identify cell aging status. Apoptotic morphologic changes and percentage of apoptosis were assayed with Hoechst33258 and were observed under fluorescent microscope; transmission electric microscopy was used to evaluate the ultra-microstructure of hUVEC; cell senescence and cell apoptosis was used to study by transmission electric microscopy.

Results The cell living rate by $\text{Ang} \text{ II}$ induced cells was $81.9\% \pm 4.1\%$ of control ($P < 0.01$), the positive cell number of β -gal staining was significantly higher in $\text{Ang} \text{ II}$ induced cells than that in the control cells ($80.10\% \pm 6.81\%$ vs $0.18\% \pm 0.04\%$, $P < 0.01$); the cell cycle was at G_0 - G_1 ($P < 0.01$), S phase and G_2 /M phase were a tendency to disappearance in $\text{Ang} \text{ II}$ induced cells ($6.62\% \pm 0.42\%$ vs $2.12\% \pm 0.33\%$, $P < 0.01$), the apoptotic cells significantly increased under fluorescent microscope and transmission electric microscopy.

Conclusions Cell apoptosis is possibly an important factor for endothelial cells senescence and vascular aging.

内皮细胞生物学改变是人类衰老和疾病的基础, 内皮细胞功能紊乱是血管衰老的主要特征之一^[1]。衰老血管特征性的结构和功能改变主要表现为内皮功能失调和动脉硬化^[2]。大量研究指出, 血管结构功能随增龄发生改变即血管衰老直接改变了各种心血管病发生的阈值和严重度^[3,4], 因此, 血管衰老的观点已得到公认。近年来, 细胞凋亡与衰老关系的研究也频受到重视, 细胞凋亡与衰老过程中组织器官功能的退化及衰老相关疾病的发生发展密切相关, 如帕金森氏病、老年痴呆和动脉粥样硬化等

都被认为与器官的老化有关^[5]。目前细胞凋亡与血管衰老的关系尚不清楚, 为了解细胞凋亡在人脐静脉血管内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, hUVEC) 衰老过程中的作用, 我们建立血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ (angiotensin $\text{Ang} \text{ II}$) 诱导体外培养的 hUVEC 衰老模型, 观察 hUVEC 老化过程中细胞凋亡的变化, 为抗细胞凋亡和延缓细胞衰老以及防止动脉粥样硬化开辟新的途径。

1 材料与方法

1.1 材料

人脐静脉内皮细胞株 ECV304 由武汉大学特殊物种保藏中心提供; RPMI1640 培养基、HEPES 和 L-谷氨酰胺购自美国 Gibco 公司; $\text{Ang} \text{ II}$ 、二甲基亚砜 (DMSO) 和 Hoechst33258 购自美国 Sigma 公司; 四甲

[收稿日期] 2006-10-30 [修回日期] 2007-03-01

[基金项目] 国家 973 重点基础研究发展规划项目 (G2000057006)

[作者简介] 单海燕, 博士, 主要从事冠心病与心血管衰老的研究, E-mail 为 shanhy024@163.com。通讯作者白小涓, 教授, 博士研究生导师, 主要从事冠心病与心血管衰老的研究。陈香美, 教授, 博士研究生导师, 主要从事肾病及器官衰老机制的研究。

基偶氮唑蓝(MTT)购自美国BD公司。流式细胞仪(BD FACS Aria, 美国),透射电子显微镜(H-600-TEM, 日本),荧光显微镜(Olympus 公司, 日本)。

1.2 人脐静脉内皮细胞的培养和鉴定

将hUVEC贴壁生长于含10%胎牛血清的RPMI1640培养基中,在5%CO₂、37℃和完全饱和湿度的培养箱中培养,2~3天换液以维持良好生长状态。用0.25%胰蛋白酶进行消化、传代。内皮细胞呈多角形,单层铺路石状紧密排列。2%台盼蓝染色判断细胞活性,活细胞数占细胞总数的98%以上再用于实验。

1.3 四甲基偶氮唑蓝比色法测定细胞活性

将细胞(1×10^4 /孔)接种于96孔培养板中,每孔加100 μ L培养液置培养箱过夜,弃去培养液后,对照组(6孔)每孔加入100 μ L培养液,实验组(每组6孔)加入含不同浓度(10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 和 10^{-4} mol/L)Ang Ⅱ100 μ L培养液置培养箱培养48 h,终止培养前每孔加入MTT 10 μ L培养4 h,弃去培养液,每孔加入DMSO 150 μ L振荡摇匀,使结晶充分溶解,酶联免疫检测仪在570 nm下测定各孔光吸收值,以实验组与对照组光吸收值的百分比代表存活细胞的百分数。

1.4 人脐静脉内皮细胞衰老模型的建立

细胞长至亚汇合后,无血清同步培养6 h,加入终浓度为 10^{-6} mol/L Ang Ⅱ持续刺激48 h,第12 h和24 h再补充Ang Ⅱ一次,即为Ang Ⅱ诱导的hUVEC衰老模型。对照组为不含Ang Ⅱ的上述培养液培养48 h。

1.5 β -半乳糖苷酶染色

依据Serrano等^[6]和Dimri等^[7]提出经典衰老细胞的鉴定方法,用PBS(pH7.2)洗单层细胞一次,再以PBS(pH7.2)配置的0.5%戊二醛固定5 min,然后用PBS(pH7.2,含1 mmol/L MgCl₂)洗一次;在新鲜配置的X-gal染液(1 g/L X-gal, 0.12 mmol/L K₃Fe[CN]₆, 0.12 mmol/L K₄Fe[CN]₆, 1 mmol/L MgCl₂, PBS, pH6.0)中染色,37℃孵育12 h~16 h。

1.6 流式细胞仪分析细胞周期

用0.25%胰蛋白酶消化细胞,收集 1×10^6 个细胞,1000 r/min离心,用PBS洗2次后悬浮于500 μ L PBS中,充分吹散混匀,缓慢加入5 mL冷乙醇,4℃固定过夜。离心弃去乙醇,细胞用冷PBS洗2次后悬浮于0.5 mL PBS中。加入500 μ L碘化丙啶,4℃避光反应30 min。流式分析(激发光波长488 nm,发射光波长570 nm),细胞流速不超过60个/min;数据用BD公司提供的Modifit2.0进行分析。

1.7 荧光显微镜观察

收集标本后,常规细胞涂片固定,Hoechst33258染色后封片。荧光显微镜可见正常细胞核边界整齐,染色质分布均匀; 10^{-6} mol/L Ang Ⅱ诱导hUVEC则表现为浓染致密颗粒状荧光,观察后照相。镜下随机选取6个视野分别计数凋亡细胞和总细胞数,计算细胞凋亡百分率。

1.8 透射电子显微镜观察

将 1×10^7 个细胞轻轻刮下,1000 r/min离心10 min,弃上清液,用PBS洗细胞2次,小心弃上清液,轻轻加入2%戊二醛固定细胞团,常规脱水、包埋、超薄切片,醋酸铀-柠檬酸铅双染色,透射电子显微镜观察超微结构并摄片。每份标本随机取6个视野,观察细胞的结构和形态,并记录正常、衰老及凋亡的细胞。

1.9 统计学分析

采用SPSS 13.0软件进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料比较采用单因素ANOVA(方差分析), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞存活率

10^{-6} mol/L Ang Ⅱ培养hUVEC 48 h后,存活的细胞数为对照组的 $81.9\% \pm 0.04\%$ ($P < 0.01$); 10^{-7} mol/L Ang Ⅱ和 10^{-8} mol/L Ang Ⅱ组细胞存活与对照组相比无明显差异; 10^{-5} mol/L和 10^{-4} mol/L Ang Ⅱ组存活细胞数明显下降($P < 0.01$)。故本实验选用 10^{-6} mol/L Ang Ⅱ建立hUVEC的衰老模型。

2.2 细胞衰老鉴定

经Ang Ⅱ诱导后约80%的hUVEC出现蓝色的 β -半乳糖苷酶阳性染色(图1和表1)。

2.3 细胞周期分析

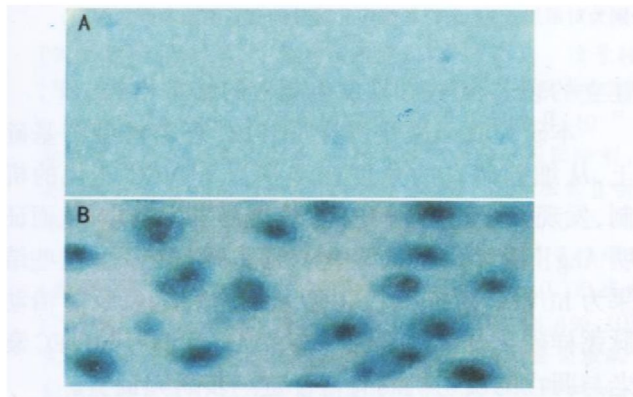
经Ang Ⅱ诱导后大部分hUVEC停滞于G₀/G₁期,S期及G₂/M期趋于消失,而对照组hUVEC的各期比例正常(表1)。两组间各周期的细胞数也有显著差异(表1和图2)。

2.4 衰老细胞的凋亡变化

正常hUVEC细胞核边界整齐,染色质分布均匀,故呈现体积较大的浅染核形态;Ang Ⅱ诱导的hUVEC则表现为细胞核浓染致密颗粒状、块状荧光,核出现不同程度的固缩,故呈现体积明显缩小的深染核形态。hUVEC在正常培养时极少数发生凋亡,经Ang Ⅱ诱导的hUVEC凋亡率明显上升,与对照组相比差异显著($P < 0.01$;表2和图3)。

表 1. 细胞衰老的指标变化 ($\bar{x} \pm s$)

指 标	对照组	Ang Ⅱ诱导组
细胞周期		
G ₀ -G ₁ 期	53.12% $\pm$ 5.83%	91.36% $\pm$ 6.45% ^a
G ₂ -M 期	16.32% $\pm$ 1.65%	2.12% $\pm$ 0.33%
S 期	30.46% $\pm$ 3.12%	6.62% $\pm$ 0.42%
β -半乳糖苷酶染色阳性	0.18% $\pm$ 0.04%	80.10% $\pm$ 6.81% ^a

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。图 1. β -半乳糖苷酶染色鉴定细胞衰老程度 ($\times 400$) A 为对照组, B 为血管紧张素 Ⅱ诱导组。表 2. 血管紧张素 Ⅱ诱导衰老细胞的凋亡百分率 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	凋亡率
对照组	2.12% $\pm$ 0.39%
Ang Ⅱ诱导组	31.84% $\pm$ 2.86% ^a

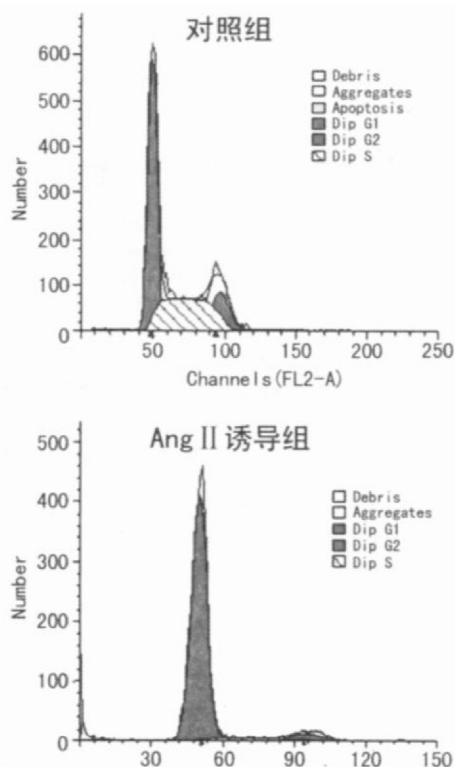
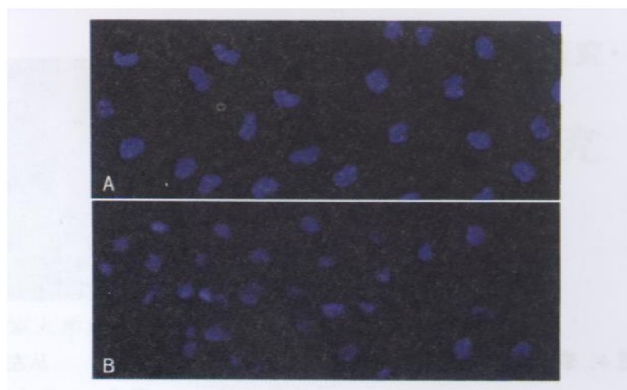
a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

图 2. 血管紧张素 Ⅱ诱导细胞衰老的细胞周期分析

图 3. 人脐静脉内皮细胞的 Hoechst33258 染色 ($\times 400$) A 为对照组, B 为血管紧张素 Ⅱ诱导组。

2.5 衰老细胞的超微结构及凋亡变化

透射电子显微镜观察 Ang Ⅱ诱导的 HUVEC 呈现细胞衰老状况, 衰老的细胞体积较大, 核形不规则, 核内异染色质凝集边聚, 胞质密度增高, 内有一些次级溶酶体、脂滴, 高尔基体扩张, 线粒体密度增高。衰老 HUVEC 凋亡后细胞核有的形状不规则, 有的核浓缩, 核内异染色质凝集, 沿核膜边集; 有的可见核碎裂, 呈多个块状。而对照组细胞核膜平整光滑, 染色质分布均匀(图 4)。

3 讨论

衰老是心血管疾病的独立危险因素, 高血压病、冠心病、心功能不全等心血管疾病的发生率随增龄急剧上升^[3,4]。血管的衰老和损伤是造成人类死亡的主要原因, 因此, 研究血管衰老的发生因素及防治措施意义重大。在老龄者的尸检中大多数可见到动脉硬化性改变, 且为主要原因之一^[8]。血管因增龄引起的老年退行性变化, 即血管衰老与病理过程的粥样硬化常合并一起, 且两者互为因果, 因此, 研究血管衰老对防治动脉硬化意义更大。内皮细胞生物学改变是人类衰老和疾病的基础^[1], 研究衰老的内皮细胞功能改变的机制是研究血管衰老的基础。内皮细胞凋亡是血管衰老的表现之一, 促进内皮细胞凋亡引起内皮功能不全从而诱导血管衰老^[3], 而血管内皮功能不全是动脉硬化发生的始动环节^[9]。近年来, 细胞凋亡与衰老关系的研究已成为热点, 细胞凋亡与衰老过程中组织器官功能的退化及衰老相关疾病的发生发展密切相关。但细胞凋亡与血管内皮细胞衰老关系未见报导, 本文观察了 Ang Ⅱ诱导的 HUVEC 衰老过程中的细胞凋亡现象。

目前血管紧张素系统在血管衰老机制研究中逐渐被重视。近年研究发现, 增龄相关的局部血管紧

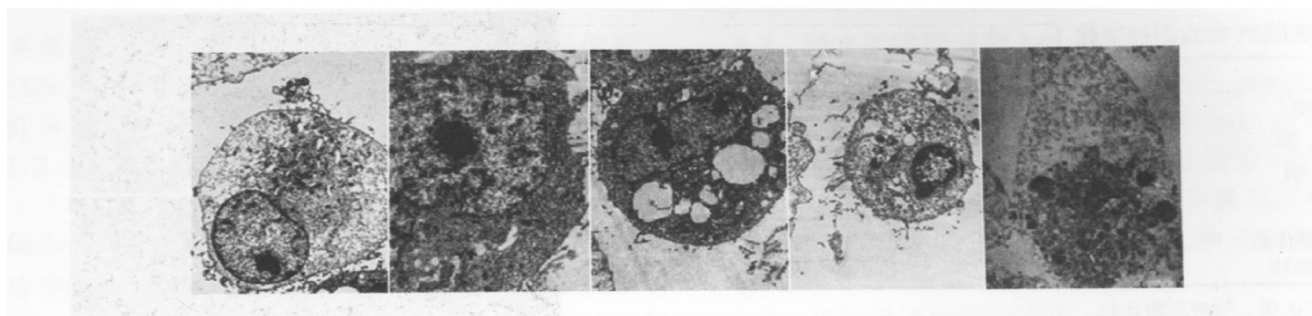


图4. 衰老细胞的超微结构及其凋亡变化 ($\times 6000$) 从左往右分别为对照组细胞、血管紧张素Ⅱ诱导的衰老细胞和凋亡细胞。

张素系统的改变在心血管衰老中有重要作用^[1]。研究显示衰老机体组织中 Ang Ⅱ含量上升, 给予 ARB 或 ACEI 后可逆转血管增龄的改变^[1, 10, 11], 说明 Ang Ⅱ与血管衰老关系密切, 提示随增龄血管局部增高的 Ang Ⅱ可能通过诱导内皮细胞衰老引起内皮功能失调, 内皮细胞生物学功能紊乱直接介导凝血、纤溶、血管炎性和抗炎因子、细胞内信号转导系统的异常^[10], 表现为血管的衰老改变及心血管病危险性增高。故本文用 Ang Ⅱ诱导 hUVEC 衰老模型, 参考近年来有关学者提出的衰老生物学方面的一些指标^[12], 并用下述两个有关衰老生物学标志的指标进行鉴定, 发现 Ang Ⅱ诱导的 hUVEC 中有 80% 细胞为衰老相关 β -半乳糖苷酶染色阳性, 流式细胞仪分析细胞周期发现大多数细胞停滞 G₀/G₁ 期, 而 S 期及 G₂/M 期趋于消失, 表明细胞分裂缓慢, 细胞增殖能力逐渐消失, 说明用 Ang Ⅱ诱导的方法已成功复制衰老的 hUVEC 模型, 可用于细胞衰老机制的研究。

衰老是基因控制下的程序化过程, 由基因程序所决定, 由于启动衰老的基因存在与“关闭了开关”基因(多效应时列基因)的存在^[13], 启动和关闭衰老现象的发生均按照时间程序进行, 称“程序性细胞死亡”或细胞凋亡。控制生长发育的基因在各个时期均可开启或关闭, 有些在生命晚期发挥作用的基因可能控制衰老, 基因发生突变或基因功能丧失, 是导致衰老主要原因^[13], 细胞凋亡可能参与衰老的相关变化。本实验用 Ang Ⅱ诱导的方法已成功复制衰老的 hUVEC 模型, 但有关细胞凋亡是否参与细胞衰老未见相关报道。为此, 本文观察了 Ang Ⅱ诱导 hUVEC 衰老过程中的凋亡现象, Ang Ⅱ在诱导 hUVEC 衰老的同时能促进细胞凋亡, 细胞核的改变是凋亡细胞最具特征性的形态学变化, 荧光显微镜及透射电子显微镜显示凋亡细胞较正常对照组明显增多, 说明衰老 hUVEC 容易凋亡, 提示细胞凋亡参与了老化细胞的终末阶段。有报道指出培养的猪肺血管内皮细胞在终末阶段细胞凋亡明显增加^[14], 这与我们

建立的衰老 hUVEC 易发生凋亡的结果相似。

本研究在 Ang Ⅱ诱导 hUVEC 衰老模型的基础上, 从细胞凋亡的角度初步探讨 hUVEC 老化的机制, 发现 Ang Ⅱ诱导 hUVEC 衰老易发生凋亡, 从而证明 Ang Ⅱ诱导 hUVEC 老化与细胞凋亡有关。这些结果为 hUVEC 的抗凋亡和延缓细胞衰老以及防治动脉粥样硬化开辟新途径。有关 Ang Ⅱ诱导 hUVEC 衰老与凋亡的确切机制有待于进一步研究证实。

[参考文献]

- [1] Challah M, Nadaud S, Philippe M, Battle T, Soulier F, Cornan B. Circulation and cellular markers of endothelial dysfunction with aging in rats [J]. *Am J Physiol*, 1997, **273**: H1 941-948.
- [2] 李虹, 白小涓, 陈香美. 血管紧张素Ⅱ和 NADPH 氧化酶与血管衰老的相关性研究[J]. *中国老年学杂志*, 2006, **26** (4): 493-495.
- [3] Lakatta EG, Levy D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises part I: aging arteries: a “set up” for vascular disease [J]. *Circulation*, 2003, **107**: 139-146.
- [4] 李虹, 白小涓, 陈香美. 血管衰老机理及检测指标的研究进展[J]. *中华医学杂志*, 2005, **85**: 212-215.
- [5] 彭黎明, 王曾礼 (主编). 细胞凋亡的基础与临床[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000, 213-218.
- [6] Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a [J]. *Cell*, 1997, **88** (5): 593-602.
- [7] Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, 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): 9 363-367.
- [8] 村上允孝, 龟山正邦 (邹元植译). 老年病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1985, 11-15.
- [9] 唐伟军, 陈美芳, 江俊麟, 邓晟, 黄惶, 谭斌, 等. 表没食子儿茶素没食子酸脂对低密度脂蛋白诱导的血管内皮损伤的保护作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, **14** (1): 21-24.
- [10] Minamino T, Miyauchi H, Yoshida T, Ishida Y, Yoshida H, Komuro I. Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomere in endothelial dysfunction [J]. *Circulation*, 2002, **105**: 1 541-544.
- [11] Michel JB, Heudes D, Michel O. Effect of chronic ANG I-converting enzyme inhibition on aging processes II. Large arteries [J]. *Am J Physiol*, 1994, **267**: 124-135.
- [12] 马宏, 张宗玉, 童坦君. 衰老的生物学标志[J]. *生理科学进展*, 2002, **33** (1): 65-68.
- [13] Protestio M, Caruso C. Apoptosis and ageing [J]. *Mech Ageing Dev*, 1998, **102**: 221-227.
- [14] Zhang J, Patel JM, Block ER. Enhanced apoptosis in prolonged culture of senescent porcine pulmonary artery endothelial cells [J]. *Mech Ageing Dev*, 2002, **123** (6): 613-625.

(此文编辑 文玉珊)