

[文章编号] 1007-3949(2007)15-09-0657-04

•实验研究•

衰老大鼠动脉顺应性与凋亡相关指标变化及缬沙坦对其影响

单海燕¹, 白小涓¹, 宗志红², 孟小娜², 陈香美³(1. 中国医科大学附属第一医院循环内科, 2. 中国医科大学生物化学教研室, 辽宁省沈阳市 110001;
3. 解放军总医院肾内科 全军肾病中心暨重点实验室, 北京市 100853)

[关键词] 内科学; 血管衰老; 细胞凋亡; 动脉硬化; Bcl-2; 半胱氨酸天门冬氨酸蛋白酶 3; 缬沙坦

[摘要] 目的 探讨衰老大鼠动脉顺应性与凋亡相关指标变化及缬沙坦对其影响, 为阐明血管衰老对动脉硬化诊治的重要意义。方法 Wistar 大鼠分为青年组、衰老组及缬沙坦组, 测定血浆丙二醛、超氧化物歧化酶水平, 同时采用恒速注入流体方法测定大鼠颈动脉血管的顺应性, 并利用免疫组织化学染色法、反转录-聚合酶链式反应和蛋白免疫印迹法分析各组凋亡相关基因 Bcl-2 mRNA 及蛋白表达、半胱氨酸天门冬氨酸蛋白酶 3 活性变化水平。结果 与衰老组相比, 缬沙坦组血浆丙二醛浓度明显降低 ($P < 0.05$), 超氧化物歧化酶浓度明显升高 ($P < 0.05$); 颈动脉血管的顺应性增高, 其中弹性面积差异有显著性 ($P < 0.05$); 主动脉血管 Bcl-2 阳性内皮细胞百分率增高 ($P < 0.05$), 半胱氨酸天门冬氨酸蛋白酶 3 表达降低 ($P < 0.05$); Bcl-2 mRNA 及蛋白表达水平明显增高 ($P < 0.05$), 半胱氨酸天门冬氨酸蛋白酶 3 活性水平降低 ($P < 0.01$)。结论 血管衰老有其特征性生理改变, 凋亡相关基因 Bcl-2 表达下调、半胱氨酸天门冬氨酸蛋白酶 3 活性增高可能是血管衰老的重要分子机制之一, 缬沙坦对血管衰老有一定保护作用, 为延缓血管衰老以及防治动脉硬化开辟新途径。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The Effect of Valsartan on Arterial Compliance and Indexes Associated with Apoptosis in Aging Rat

SHAN Hai-Yan¹, BAI Xiao-Juan¹, ZHONG Zhi-Hong², Meng Xiao-Na², and CHEN Xiang-Mei³

(1. Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Chinese Medical University, 2. Department of Biochemistry, China Medical University, Shenyang 110001, China; 3. Department of Nephrology, Kidney Center and Key Lab, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China)

[KEY WORDS] Vascular Aging; Cell Apoptosis; Arteriosclerosis; B-cell Lymphoma/Leukemia 2; Cysteine Lysine Specific Proteinase 3; Valsartan

[ABSTRACT] Aim To explore the effect of valsartan on arterial compliance and indexes associated with apoptosis in aging rat and its possible action mechanism. Methods The healthy Wistar rat were divided into young group, aging group and valsartan group to detect malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) level aorta plasma, and measure the compliance of rat carotid segment by constant liquid injection. Immunohistochemistry, RT-PCR and Western Blot were used to analyze the expression of apoptosis association genes B-cell lymphoma/leukemia 2 (Bcl-2), Cysteine lysine specific proteinase 3 (Caspase 3).

Results Compared with the aging group, malondialdehyde concentration in valsartan group evidently declined ($P < 0.05$), but superoxide dismutase markedly ascended ($P < 0.05$). The carotid flexibility increased, especially flexibility area were significantly different ($P < 0.05$). The percentage of Bcl-2 positive cell increased ($P < 0.05$), but the percentage of Caspase 3 positive cell decreased ($P < 0.05$). Bcl-2 mRNA and protein expression increased markedly ($P < 0.05$), but Caspase 3 protein expression decreased evidently ($P < 0.01$).

Conclusions Vascular aging has its special physiologic function changes. One of its molecular mechanism might be associated with decreasing the expression level of Bcl-2 and increasing Caspase 3 protein. Valsartan may protect vascular from aging through up-regulating Bcl-2 gene expression and inhibiting Caspase 3 activation.

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程度, 衰老

血管特征性结构和功能改变主要表现为动脉硬化。大量研究指出衰老是导致动脉硬化的最主要独立危险因素, 可引起大动脉血管结构和功能改变, 如血管壁增厚, 弹性僵硬和内皮功能失调^[1]。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, 衰老相关疾病的发生发展密切相关^[2], 但细胞凋亡引起血管衰老的机制尚不清楚。因此, 本文通过对衰老大鼠动脉血管顺应性与凋亡相关基因 Bcl-2、半胱氨酸天门冬氨酸

[收稿日期] 2007-03-09

[修回日期] 2007-08-20

[基金项目] 国家 973 重点基础研究发展规划项目 (G2007CB507405), 辽宁省教育厅高等学校科学研究项目 (05L470)

[作者简介] 单海燕, 博士研究生, 主要从事冠心病与心血管衰老的研究, 联系电话为 13842005339, E-mail 为 shanyh024@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, 联系电话为 024-83282687, E-mail 为 xjuanbai@yahoo.com.cn。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。

蛋白酶 3 (cysteinylaspartate specific proteinase-3, Caspase-3) 变化, 以及缬沙坦对其影响的研究, 旨在从分子及蛋白水平阐明动脉衰老的机制, 为防治动脉硬化开辟新途径。

1 材料与方法

1.1 实验动物

Wistar 雄性大鼠 3~4 月龄 (20 只) 和 18~20 月龄 (40 只), 由中国医科大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂及仪器

缬沙坦 (北京诺华公司); 丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 及超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 兔抗大鼠 Caspase-3 抗体、Bcl-2 抗体由中山生物技术公司提供; Trizol (Gibco, BRL 公司); 无 RNAase 的 DNase iv, 反转录酶 AMV RTase XL, TaqDNA 聚合酶, DEPC (大连宝生物工程有限公司)。

1.3 分组及给药方法

Wistar 大鼠 60 只分成 3 组: 青年组 ($n=20$ 只); 衰老组 ($n=20$ 只)、缬沙坦组 ($n=20$ 只)。衰老组正常饮水, 缬沙坦组 (饮用水予以缬沙坦每天 30 mg/kg), 相同条件下饲养至 22~24 月龄。大鼠用 2% 戊巴比妥腹腔麻醉, 开胸心腔取血及胸主动脉组织, 检测相关指标。

1.4 血浆丙二醛、超氧化物歧化酶检测

分别采用 TBA 法、黄嘌呤氧化酶法。

1.5 颈动脉顺应性测定

选长度为 1 cm 的血管段, 一端套在比颈动脉管径略粗的硬塑料管上, 并手术缝合线扎紧。硬塑料管与生理记录仪的血压换能器连接。整个系统用生理盐水充满并排除气泡。血压换能器和塑料管通过三通阀门与恒速注射器连通, 用 1 mL 注射器配合恒速注射器以 3.67 mL/s 为单位, 拉力/升斜率以 mmHg/s 为单位, 曲线下面积 mmHg/s 为单位。这两个指标均以压力从基线上升至 3 s 这段曲线为计算依据。斜率与曲线下面积升高表示血管顺应性下降。

1.6 主动脉内皮细胞 Bcl-2、Caspase-3 免疫组织化学染色检测

采用 SP 法进行免疫组织化学染色, DAB 显色, 常规脱水、透明、封固。在 40×10 倍的光镜视野下, 分别对相邻切片的 Bcl-2、Caspase-3 染色阳性细胞进行统计, 显微镜下 Bcl-2、Caspase-3 定位于胞浆中, 胞浆有棕色颗粒者为阳性细胞, 仅显示细胞轮廓者为阴性细胞。计数每个高倍视野中 Bcl-2、Caspase-3

阳性细胞数占细胞总数的百分率, 每张切片中采集 5 个视野, 求出均值用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 得出阳性细胞百分率。

1.7 逆转录-多聚酶链式反应 (RT-PCR) 法检测 Bcl-2 mRNA 表达

依据文献 [3] 方法检测 Bcl-2 mRNA 表达。引物序列如下: Bcl-2: 上游 5'-CCG GGA GAT CGT GAT GAA GT-3', 下游 5'-ATC CCA GCC TCC GTT ATC CT-3', 扩增片段 547 bp; β -actin: 上游 5'-GCC AAC CGT GAA AAG ATG-3', 下游 5'-CCA GGA TAG AGC CAC CAA T-3', 扩增片段 701 bp。以 β -actin 的吸光度作为内参照, 进行半定量分析。

1.8 Western Blot 检测 Bcl-2、Caspase-3 蛋白水平

依据文献 [3] 方法检测 Bcl-2、Caspase-3 蛋白水平。 β -actin 为内参照, 计算相对含量。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 11.5 软件包对数据进行统计处理, 各项观察指标以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计量资料比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠的一般状况

各组大鼠生活状况良好, 体重正常, 衰老组收缩压较青年组升高 (152.6 ± 5.5 mmHg 比 134.1 ± 6.4 mmHg; $P < 0.05$), 缬沙坦组收缩压无明显下降 (149.0 ± 4.3 mmHg 比 152.6 ± 5.5 mmHg; $P > 0.05$)。

2.2 血浆丙二醛、超氧化物歧化酶含量及动脉顺应性

衰老组血浆 MDA、SOD 与青年组比较显著增高 ($P < 0.01$), 缬沙坦组 MDA 低于衰老组 ($P < 0.05$), 但高于青年组 ($P < 0.01$), SOD 高于衰老组 ($P < 0.01$), 但低于青年组 ($P < 0.05$)。衰老组弹性速率和弹性面积升高, 其中弹性面积差异有显著性 ($P < 0.01$), 缬沙坦组弹性速率和弹性面积降低 ($P < 0.05$), 但高于青年组 ($P < 0.01$), 表明衰老组动脉顺应性下降, 而缬沙坦组动脉顺应性升高 (表 1)。

2.3 主动脉内皮细胞 Bcl-2、Caspase-3 表达

青年组主动脉内皮表面光滑, 内皮细胞 Bcl-2、Caspase-3 表达均较低, 与青年组比较, 衰老组主动脉内皮表面粗糙, 主动脉 Bcl-2 表达显著降低 ($P < 0.01$), Caspase-3 表达显著增高 ($P < 0.01$); 与衰老组比较, 缬沙坦组主动脉内皮表面较光滑, Bcl-2 表达增高 ($P < 0.05$), Caspase-3 表达降低 ($P < 0.05$; 表 2, 图 1)。

表 1. 各组大鼠主动脉血浆丙二醛、超氧化物歧化酶浓度的比较 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	MDA (ku/L)	SOD (mmol/L)	弹性速率 (mmHg/s)	弹性面积 (mmHg/s)
青年组	19.68 $\pm$ 2.46	168.2 $\pm$ 15.60	33.2 $\pm$ 3.2	163.7 $\pm$ 17.1
衰老组	36.42 $\pm$ 3.61 ^b	124.6 $\pm$ 10.21 ^b	40.3 $\pm$ 3.8 ^b	201.2 $\pm$ 15.3 ^b
Valsartan 组	29.64 $\pm$ 2.52 ^{bc}	142.5 $\pm$ 13.46 ^{ad}	36.2 $\pm$ 3.2 ^{bc}	188.6 $\pm$ 18.1 ^{ac}

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与青年组比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与衰老组比较。

表 2. 各组大鼠主动脉 Bcl-2、Caspase-3 阳性内皮细胞百分率比较 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	Bcl-2 阳性细胞率	Caspase-3 阳性细胞率
青年组	43.12% $\pm$ 5.83%	21.36% $\pm$ 8.24%
衰老组	25.32% $\pm$ 2.65% ^a	59.31% $\pm$ 4.62% ^a
缬沙坦组	30.46% $\pm$ 3.12% ^{ab}	35.62% $\pm$ 3.42% ^{ab}

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与衰老组比较。

2.4 主动脉 Bcl-2 mRNA 表达

RT-PCR 显示, 与青年组比较, 衰老组 Bcl-2 mRNA 表达降低 (1.04 $\pm$ 0.23) 比 (1.39 $\pm$ 0.18), $P < 0.01$; 与衰老组比较, 缬沙坦组 Bcl-2 mRNA 表达升高 (1.21 $\pm$ 0.32) 比 (1.04 $\pm$ 0.23) ($P < 0.05$; 图 2)。

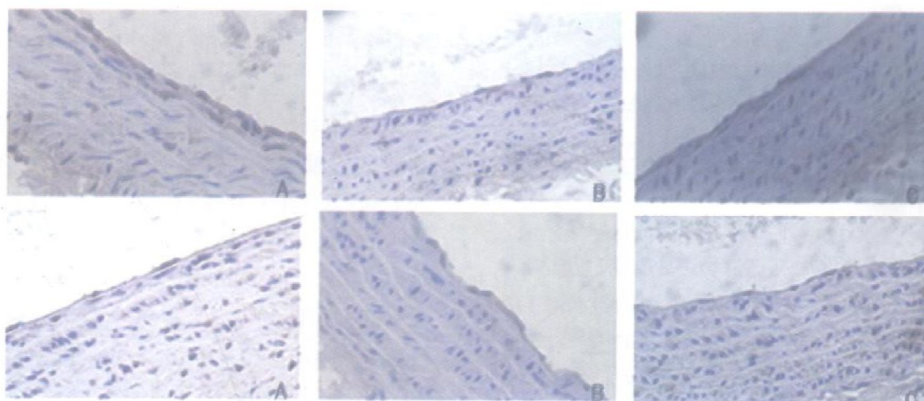


图 1. 各组大鼠主动脉内皮细胞 Bcl-2 免疫组织化学染色表达 (SP $\times$ 40)

上图 Bcl-2 免疫组织化学染色表达, 下图 Caspase-3 免疫组织化学染色表达; A 为青年组, B 为衰老组, C 为缬沙坦组。

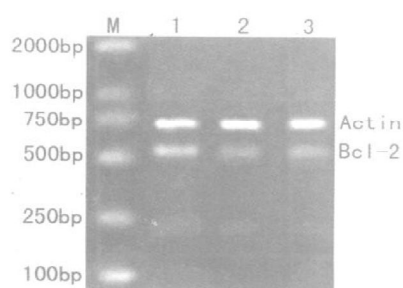


图 2. 各组大鼠主动脉组织 Bcl-2 mRNA RT-PCR 产物琼脂糖电泳 A 为青年组, B 为衰老组, C 为缬沙坦组。

2.5 主动脉 Bcl-2、Caspase-3 的蛋白质表达

Western Blot 显示, 与青年组相比, 衰老组 Bcl-2 蛋白质表达下调 ($P < 0.01$), Caspase-3 蛋白质表达上调 ($P < 0.01$); 与衰老组比较, 缬沙坦组 Bcl-2 蛋白质表达上调 ($P < 0.05$), Caspase-3 蛋白质表达下调 ($P < 0.01$) (表 3, 图 3)。

表 3. 各组大鼠主动脉组织 Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	Bcl-2	Caspase-3
青年组	0.86 $\pm$ 0.21	0.78 $\pm$ 0.11
衰老组	0.54 $\pm$ 0.15 ^a	1.10 $\pm$ 0.16 ^a
缬沙坦组	0.70 $\pm$ 0.18 ^b	0.89 $\pm$ 0.15 ^c

a 为 $P < 0.01$, 与青年组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.05$, 与衰老组比较。

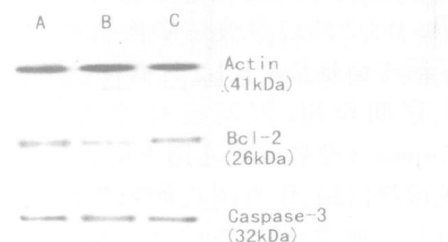


图 3. 各组大鼠主动脉组织 Bcl-2、Caspase-3 Western Blot 蛋白表达 A 为青年组, B 为衰老组, C 为缬沙坦组。

3 讨论

大量临床研究证实,随增龄各种心血管疾病发生率急剧上升,如高血压病、冠心病、心功能不全、脑卒中等,老年人心血管疾病风险的增加是增龄与疾病相互作用的结果^[4,5]。研究显示,细胞凋亡与衰老过程中组织器官功能的退化、衰老相关疾病的发生发展密切相关,细胞凋亡是衰老的一个成因之一。随着年龄增长,各组织器官衰老及功能退化,势必影响细胞凋亡基因表达,因而上调增强组织、细胞生长分裂的基因和下调抑制组织、细胞生长分裂的基因均有助于延缓衰老^[6]。细胞凋亡参与了整个衰老的过程,并在其中各个环节发挥了重要的作用。

动脉衰老的生理改变主要是血管顺应性降低,主动血管顺应性降低是造成老年收缩压升高的主要原因。本实验血管顺应性测定发现,衰老组弹性速率和弹性面积升高,其中弹性面积差异有显著性;而缬沙坦组在一定程度上抑制血管顺应性降低。氧化应激是衰老的重要诱发原因之一,通过刺激细胞凋亡,进而引起机体的衰老,而脂褐素是机体氧化应激的产物,其是衰老的重要标志产物之一,MDA 是脂褐素形成过程的中间产物,它能间接反映机体内氧化应激过程中脂质过氧化水平,MDA 升高和 SOD 下降是衰老的重要表现。大量研究证实,衰老时 MDA 水平显著升高而 SOD 明显下降,这与本研究结果相一致。

近年来,国内外关于细胞衰老的研究主要集中在细胞衰老与基因调控方面的研究,随着衰老及其相关领域的进一步发展,逐渐认识到细胞凋亡在衰老方面的重要性。在凋亡及其调控机制研究中,最主要的机制是 Bcl-2 和 Caspase 家族成员的参与。Bcl-2 是细胞凋亡的关键基因,其通过抑制凋亡,参与细胞衰老^[7]。研究表明,将 Bcl-2 基因置入表达载体,转入细胞株中过度表达 Bcl-2 蛋白,结果发现 Bcl-2 转基因细胞株在各种逆境下的生存时间明显延长。O'Reilly 等用前 B 细胞及多种造血细胞均表明, Bcl-2 的过量表达能使这些细胞在除去生长因子后寿命延长。Bcl-2 具有抑制细胞凋亡、延长细胞生存期作用,因而被称之为“长寿基因”^[8]。而 Caspase-3 是各凋亡通路下游进行底物酶解的共同的蛋白酶,作为凋亡的效应因子被称为凋亡的执行者。通常认为 Bcl-2 作用在 Caspase-3 激活的下游,

通过抑制其激活而抑制细胞凋亡, Caspase-3 在细胞凋亡中起着不可替代的作用。

目前血管紧张素系统在血管衰老机理研究中逐渐被重视。研究显示,增龄相关的局部血管紧张素系统的改变在心血管衰老中有重要作用^[3]。衰老机体组织中血管紧张素 Ⅱ含量上升,给予 ARB 或 ACEI 后可逆转血管的增龄改变^[3,9]。本实验通过对凋亡相关基因 Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白免疫组织化学染色检测发现,衰老组主动血管内皮细胞 Bcl-2 表达抑制, Caspase-3 表达增强,而缬沙坦组内皮细胞 Bcl-2 表达增强, Caspase-3 表达抑制,其可能是通过血管内皮细胞表达 Bcl-2 时,依赖 Caspase-3 介导的细胞凋亡受阻。RT-PCR 及 Western Blot 显示衰老组主动血管组织 Bcl-2 表达下降,而 Caspase-3 表达增高,提示可能通过抑制 Bcl-2 表达,促进 Caspase-3 活性,致使存活和凋亡信息失调,从而导致主动血管衰老,这可能是调节血管内皮细胞增殖与凋亡、衰老的关键;而缬沙坦可能是通过上调凋亡抑制基因 Bcl-2 的表达,使线粒体内膜跨膜电位升高,导致抑制细胞凋亡启动因子细胞色素 c 从线粒体内释放,进而降低 Caspase-3 的水解活性,抑制内皮细胞凋亡,逆转血管衰老,故缬沙坦对血管衰老有一定保护作用,这为延缓血管衰老以及防治动脉硬化开辟新途径,但其确切机制有待于进一步研究证实。

[参考文献]

- [1] Najjar SS, Scuterie A, Lakatta EG. Arterial aging: Is it an immutable cardiovascular risk factor [J]? *Hypertension*, 2005, **46** (8): 454-457.
- [2] 单海燕, 白小涓, 刘强, 陈香美. 血管紧张素 Ⅱ诱导血管内皮细胞衰老的形态学研究[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, **15** (3): 161-164.
- [3] 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.
- [4] 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** (1): 139-146.
- [5] 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** (3): 212-215.
- [6] 王跃, 付玉荣. 双歧杆菌脂磷酰免疫衰老的实验研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2006, **22** (3): 200-202.
- [7] 韩晓琳, 张宗玉, 童坦君. 衰老过程中原癌基因及抑癌基因的表达谱[J]. *生理科学进展*, 2002, **33** (2): 126-129.
- [8] 谭敦勇, 李楚杰. 衰老分子机制研究的某些进展[J]. *中国病理生理杂志*, 2002, **16** (1): 79-83.
- [9] 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** (6): 1541-544.

(此文编辑 李玲玲)