

阿司匹林抗高糖诱导的内皮细胞衰老的作用

伊桐凝¹, 张锦², 于世家¹

(1. 辽宁中医药大学附属医院内分泌科, 辽宁省沈阳市 110031; 2. 中国医科大学附属第一医院内分泌科, 辽宁省沈阳市 110001)

[关键词] 阿司匹林; 内皮细胞衰老; 端粒酶; 细胞周期; 活性氧

[摘要] **目的** 探讨阿司匹林是否具有抗高糖诱导的内皮细胞衰老的作用及其机制。**方法** 人脐静脉内皮细胞(HUVEC)分别于正常糖浓度培养液(5.5 mmol/L)、高糖培养液和高糖(33 mmol/L) + 阿司匹林(0.01、0.1、1及3 mmol/L)培养液中培养48 h, 观察细胞形态、采用 β -半乳糖苷酶染色鉴定衰老细胞, PCR-ELISA检测端粒酶活性, 流式细胞仪检测细胞周期和细胞内活性氧水平。**结果** 高糖培养液作用HUVEC 48 h后, 细胞呈现衰老状态, β -半乳糖苷酶染色阳性细胞数明显增加, 端粒酶活性明显减低, 细胞周期停滞于G0/G1期, S期显著减少, 细胞内活性氧水平显著增加。0.01、0.1和1 mmol/L阿司匹林作用后细胞形态改善, β -半乳糖苷酶染色阳性细胞数显著减少, 端粒酶活性增强, S期细胞显著增加, 细胞内活性氧水平降低($P < 0.05$)。而3 mmol/L阿司匹林作用后与高糖组相比差异无显著性。**结论** 高糖环境下阿司匹林(0.01、0.1和1 mmol/L)具有抗内皮细胞衰老的作用, 其作用机制可能与氧化应激有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Aspirin Attenuates High Glucose-induced Senescence in Human Umbilical Vein Endothelial Cells

YI Tong-Ning¹, ZHANG Jin², and YU Shi-Jia¹

(1. Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Liaoning University of TCM, Shenyang, Liaoning 110031, China; 2. Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning 110001, China)

[KEY WORDS] Aspirin; Endothelial Cell Senescence; Telomerase; Cell Cycle; Reactive Oxygen Species

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect and mechanism of aspirin on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) senescence exposed to high glucose condition. **Methods** The cultured HUVEC were treated with concentrations of glucose at 5.5, 33 mmol/L and glucose at 33 mmol/L with aspirin at 0.01, 0.1, 1 and 3 mmol/L for 48 h. SA- β -gal staining was used to evaluate senescence. Telomerase activity was detected by PCR-ELISA. Cell cycle and the level of reactive oxygen species (ROS) were detected by flow cytometry. **Results** Endothelial cells exhibited the characteristic of senescence, increased the number of β -gal positive cells, decreased telomerase activity significantly, enhanced the proportion of HUVEC in the G0/G1 phase and reduced that in the S phase and increased the level of ROS after exposure to high glucose (33 mmol/L, $P < 0.05$). All these phenomena were reversed by 0.01, 0.1 and 1 mmol/L aspirin remarkably ($P < 0.05$). However, there was no significant difference between 3 mmol/L aspirin group and high glucose group. **Conclusions** 0.01, 0.1 and 1 mmol/L aspirin delay endothelial cell senescence exposed to high glucose. This positive effect may be associated with decreasing oxidative stress.

糖尿病并发症中心血管疾病是主要的表现形式和死亡原因, 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, 而内皮细胞受损发生功能

障碍是动脉粥样硬化的始动环节。近年研究发现, 血管内皮细胞衰老在动脉粥样硬化的发生发展中起到了重要作用^[1]。目前已有多项研究证实高糖

[收稿日期] 2013-09-17

[基金项目] 辽宁省博士启动基金(20121101)

[作者简介] 伊桐凝, 博士, 副主任医师, 副教授, 主要从事糖尿病大血管并发症的发生机制及其防治研究, E-mail 为 yitongning@163.com。通讯作者于世家, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事糖尿病大血管并发症的发生机制及其防治, E-mail 为 yushijia57@163.com。

有可能通过诱导内皮细胞衰老而触发糖尿病大血管并发症^[2,3]。阿司匹林是一历史悠久的非甾体类解热镇痛药,因其具有多种细胞保护作用,被认为是糖尿病人群心血管事件防治中最基本用药之一。近年来,研究发现阿司匹林具有抗衰老的作用^[4,5]。因此,本研究观察阿司匹林是否具有抗高糖诱导的内皮细胞衰老的作用,从而为探讨防治糖尿病大血管病变提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)株购自 Cascade Biologics, DMEM 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司,葡萄糖、碘化丙啶购自 Sigma 公司, β -半乳糖苷酶染色试剂盒、活性氧检测试剂盒购自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。流式细胞仪(FACSCaliber, BD),相差显微镜(Olympas 公司,日本)。

1.2 细胞培养

HUVEC 株生长于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,置于 5% CO₂、37℃ 培养箱中培养。每隔 2~3 天换培养液 1 次以维持良好的生长状态,待细胞 80% 汇合时用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。细胞接种密度调整为 1×10^8 cells/L,待细胞 80% 汇合时换成含 1% 胎牛血清的 DMEM 培养基继续培养 24 h,使细胞达到同步化用于实验。

1.3 实验分组

将贴壁细胞随机分成 6 组,正常糖浓度组(5.5 mmol/L)、高糖组(33 mmol/L)和高糖(33 mmol/L) + 0.01、0.1、1 及 3 mmol/L 阿司匹林组培养 48 h。每组设 3 个复孔,实验重复 3 次。

1.4 β -半乳糖苷酶染色

将细胞接种于 6 孔板中,分组干预后,吸除细胞培养液,PBS 清洗细胞,0.5% 戊二醛固定细胞 3~5 min,PBS 洗 3 次,吸除 PBS,各孔加入 1 mL 新配置的 X-gal 染液,37℃ 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 1000 个细胞,胞浆蓝染者为衰老细胞,计数阳性细胞占观察细胞总数的百分比。

1.5 细胞内端粒酶活性检测

应用 PCR-ELISA 检测,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,酶标仪读数并计算端粒酶的相对活性。

1.6 流式细胞仪分析细胞周期

消化、收集 1×10^6 个细胞,1000 r/min 离心 5 min,PBS 洗 2 次后充分吹散混匀,缓慢加入 70% 乙醇,4℃ 固定过夜。离心弃去乙醇,细胞用冷 PBS 洗 2 次,加入终浓度为 50 kg/L 碘化丙啶染液,4℃ 避光反应 30 min。流式细胞仪分析细胞周期,激发光波长 488 nm,发射光波长 570 nm,细胞流速不超过 60 cells/min,至少选取 10000 个细胞。数据用 BD 公司提供的 Moldifit 2.0 分析。

1.7 细胞内活性氧检测

细胞干预后胰酶消化,使细胞浓度为 2×10^8 cells/L。按照 1:1000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA,使终浓度为 10 μ mol/L。细胞收集后悬浮于稀释好的 DCFH-DA 中,37℃ 细胞培养箱内孵育 20 min。用无血清细胞培养液洗涤细胞 3 次,流式细胞仪检测至少 10000 个细胞,并计算平均荧光强度。

1.8 统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 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 细胞形态学改变

镜下可见,正常糖浓度组 HUVEC 呈单层铺路石样生长,细胞呈短梭状或鹅卵石状贴壁紧密。高糖组细胞失去铺路石样排列外观,贴壁细胞数量减少,悬浮细胞数量增加,贴壁细胞生长缓慢,细胞胞体胀大扁平,立体感差,胞浆内颗粒增多。高糖培养液加入 0.01、0.1 和 1 mmol/L 阿司匹林后,脱落的细胞减少,细胞形态趋于正常,而 3 mmol/L 阿司匹林作用后细胞形态与高糖组相比无显著性差异(高糖 + 阿司匹林组以 1 mmol/L 阿司匹林组为代表;图 1)。

2.2 细胞衰老情况

正常糖浓度组不见阳性细胞,高糖组阳性细胞数明显增加,0.01、0.1 和 1 mmol/L 阿司匹林作用后随着阿司匹林浓度的升高阳性细胞数减少,但 3 mmol/L 阿司匹林作用后阳性细胞数与高糖组相比差异无显著性(高糖 + 阿司匹林组以 1 mmol/L 阿司匹林组为代表;表 1 和图 2)。

2.3 端粒酶活性

与正常糖浓度组相比,高糖组细胞内端粒酶活性明显降低($P < 0.05$)。0.01、0.1 和 1 mmol/L 阿司匹林作用后细胞内端粒酶活性呈剂量依赖性地升高($P < 0.05$)。3 mmol/L 阿司匹林作用后细胞内端粒酶活性与高糖组相比差异无显著性($P > 0.05$;表 1)。

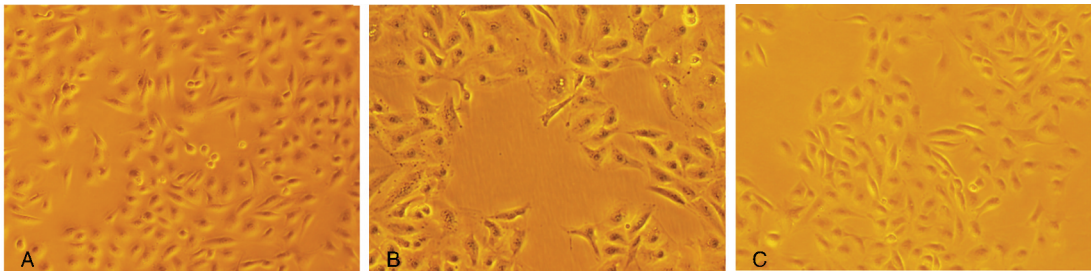


图 1. 阿司匹林对高糖环境下内皮细胞形态的影响 A 为正常糖浓度组,B 为高糖组,C 为高糖 + 1 mmol/L 阿司匹林组。

Figure 1. Effect of aspirin on morphological features of endothelial cells under high glucose condition

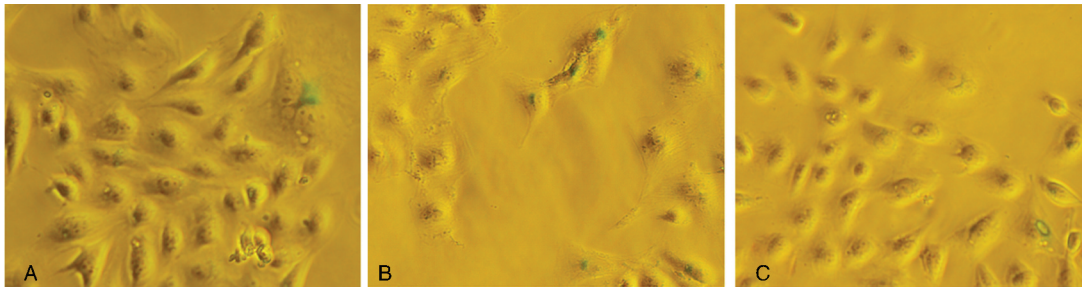


图 2. 阿司匹林对高糖环境下内皮细胞 SA β-gal 活性的影响 A 为正常糖浓度组,B 为高糖组,C 为高糖 + 1 mmol/L 阿司匹林组。

Figure 2. Effect of aspirin on the activity of SA β-gal of endothelial cells under high glucose condition

表 1. 阿司匹林对内皮细胞 SA β-gal 和端粒酶活性的影响
($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Effect of aspirin on SA β-gal and telomerase activities of endothelial cells under high glucose condition

分 组	SA β-gal 活性	端粒酶活性(%)
正常糖浓度组	5. 0 ± 1. 33	100
高糖组	16. 79 ± 2. 26 ^a	72. 26 ± 2. 25 ^a
高糖 + 0. 01 mmol/L 阿司匹林组	12. 33 ± 1. 2 ^{ab}	126. 44 ± 10. 04 ^{ab}
高糖 + 0. 1 mmol/L 阿司匹林组	10. 33 ± 1. 15 ^{ab}	144. 75 ± 5. 88 ^{ab}
高糖 + 1 mmol/L 阿司匹林组	7. 3 ± 1. 23 ^b	166. 6 ± 8. 80 ^{ab}
高糖 + 3 mmol/L 阿司匹林组	16. 67 ± 1. 40 ^a	82. 11 ± 7. 10 ^a

a 为 $P < 0. 05$, 与正常糖浓度组相比; b 为 $P < 0. 05$, 与高糖组相比。

2. 4 细胞周期分析

内皮细胞在正常糖浓度作用下各期比例正常;

表 2. 阿司匹林对高糖环境下内皮细胞细胞周期分布的影响($\bar{x} \pm s$, %)

Table 2. Effect of aspirin on the cell cycle of endothelial cells under high glucose condition

分 组	G0/G1	S	G2/M
正常糖浓度组	58. 81 ± 2. 54	33. 05 ± 1. 53	8. 25 ± 1. 22
高糖组	78. 77 ± 4. 26 ^a	14. 57 ± 1. 8 ^a	6. 90 ± 1. 09
高糖 + 0. 01 mmol/L 阿司匹林组	75. 17 ± 3. 46 ^a	16. 14 ± 3. 31 ^a	8. 69 ± 0. 78
高糖 + 0. 1 mmol/L 阿司匹林组	68. 17 ± 4. 59 ^{ab}	23. 61 ± 2. 12 ^{ab}	8. 22 ± 0. 34
高糖 + 1 mmol/L 阿司匹林组	62. 35 ± 5. 87 ^{ab}	29. 64 ± 4. 87 ^{ab}	8. 01 ± 1. 56
高糖 + 3 mmol/L 阿司匹林组	81. 42 ± 4. 02 ^a	10. 24 ± 3. 98 ^a	8. 34 ± 0. 91

a 为 $P < 0. 05$, 与正常糖浓度组相比; b 为 $P < 0. 05$, 与高糖组相比。

高糖作用细胞 48 h 后, G0/G1 期细胞增加, S 期和 G2/M 期细胞减少; 0. 01、0. 1 和 1 mmol/L 阿司匹林作用内皮细胞 48 h 后, G0/G1 期细胞减少, S 期和 G2/M 期细胞增加(表 2)。

2. 5 细胞内活性氧水平变化

与正常糖浓度组相比, 高糖作用后细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平明显升高($P < 0. 05$)。0. 01、0. 1 和 1 mmol/L 阿司匹林作用后细胞内 ROS 水平呈剂量依赖性地降低($P < 0. 05$), 3 mmol/L 阿司匹林作用后细胞内 ROS 水平与高糖组相比差异无显著性($P > 0. 05$; 表 3)。

表 3. 阿司匹林对高糖环境下内皮细胞活性氧水平的影响($\bar{x} \pm s$, %)

Table 3. Effect of aspirin on ROS level of endothelial cells under high glucose condition

分 组	ROS 水平
正常糖浓度组	117. 11 \pm 10. 83
高糖组	244. 56 \pm 12. 1 ^a
高糖 + 0. 01 mmol/L 阿司匹林组	162. 34 \pm 17. 56
高糖 + 0. 1 mmol/L 阿司匹林组	121. 09 \pm 10. 73 ^{ab}
高糖 + 1 mmol/L 阿司匹林组	102. 62 \pm 7. 73 ^b
高糖 + 3 mmol/L 阿司匹林组	256. 37 \pm 14. 47 ^a

a 为 $P < 0. 05$, 与正常糖浓度组相比; b 为 $P < 0. 05$, 与高糖组相比。

3 讨 论

细胞衰老是近年来研究的热点,很多研究相继证实高糖可诱导内皮细胞衰老^[2,3]。同时,研究显示动脉粥样硬化斑块处内皮细胞呈现出衰老细胞的特征,如 β -半乳糖苷酶染色阳性和端粒缩短等^[1-3]。值得深思的是,糖尿病大血管病变的基础是动脉粥样硬化性改变,而且血管内皮细胞在衰老过程中分泌的各种生物活性因子也在发生变化,如内皮依赖性血管舒张因子合成下降、炎症因子合成增加、黏附因子表达增多等^[6,7]。这些变化都将造成内皮功能障碍,最终导致动脉粥样硬化的发生。糖尿病患者与非糖尿病者相比大血管疾病发病早,而且病变更加弥漫和严重,因此,高糖有可能因加速内皮细胞衰老而导致糖尿病大血管病变。

本研究在评估阿司匹林是否具有抗高糖环境下内皮细胞衰老的作用时选择了细胞形态学观察和经典的 β -半乳糖苷酶染色以及端粒酶活性和细胞周期作为观察指标。高糖环境下内皮细胞呈现出典型的衰老细胞的形态学特征。同时,经典的 β -半乳糖苷酶染色呈阳性。而加入阿司匹林(0. 01、0. 1 和 1 mmol/L)干预细胞后,细胞形态趋近于正常细胞, β -半乳糖苷酶染色阳性细胞数也明显减少,为了更进一步地证实观察到的现象,本研究又选择检测细胞内端粒酶活性和细胞周期分布情况加以验证。

端粒是真核细胞染色体末端的 DNA 序列,由 250 ~ 1500 个 TTA GGG 6 碱基重复序列组成,细胞每分裂一次,其端粒 DNA 序列就丧失 5 ~ 25 bp,当端粒缩短到一定长度,便不能维持染色体的稳定,

使细胞失去了分裂增殖能力而衰老死亡。端粒酶可以维持端粒的稳定性,它是由端粒酶 RNA 和蛋白质组成的核糖核蛋白酶,以自身为模板,在缩短的端粒末端加上新的重复序列,保持端粒长度。当端粒酶缺乏或失活时,端粒 DNA 因不能得到及时的补充或修复而缩短进而走向衰老和死亡^[8,9]。衰老的细胞表现出的增殖能力下降可以通过细胞周期分布特点来反映。细胞在 G1 期完成必要的生长和物质准备;在 S 期完成染色体 DNA 的复制,因而增殖旺盛的细胞处于 S 期的比例较高;在 G2 期进行必要的检查及修复以保证 DNA 复制的准确性;然后在 M 期完成遗传物质到子细胞中的均等分配,并使细胞一分为二^[9]。本研究中,高糖环境下细胞内端粒酶活性明显被抑制,停滞在 G0/G1 期的内皮细胞数量增加,S 期及 M 期细胞数量减少。高糖引起的这些变化可被阿司匹林(0. 01、0. 1 和 1 mmol/L)有效地逆转。

氧化应激是指机体或细胞内氧自由基的产生与消除失衡,或外源性氧化物质的过量摄入,导致活性氧在细胞内蓄积而引起的细胞毒性作用^[6]。糖尿病患者体内氧化应激程度较重已经成为不争的事实。高糖可引起细胞内活性氧簇生成增多,并激活引发糖尿病并发症的 4 条传统途径造成多元醇通路活性增高、AGE 形成增加、蛋白激酶 C 激活和氨基己糖通路活性增高。衰老的自由基理论认为,细胞衰老是 ROS 大量堆积的结果^[2,3,7]。研究已经证实,高糖诱导的内皮细胞衰老可能与氧化应激反应和氧化损伤有关^[2,3,7]。本研究证实,0. 01、0. 1 和 1 mmol/L 阿司匹林能显著降低细胞内 ROS 水平,推测这可能是阿司匹林抗内皮细胞衰老的机制之一。

阿司匹林已应用百年,是医药史上三大经典药物之一,至今仍是世界上应用最广泛的解热、镇痛和抗炎药,也是作为比较和评价其他药物的标准制剂。此外,研究已经证实阿司匹林具有抗炎抗栓等多种细胞保护作用。众所周知,糖尿病患者血液处于高凝状态,阿司匹林因能使环加氧酶活性中心的丝氨酸乙酰化而失活,从而阻断血栓素合成以抑制血小板聚集,起到防止血栓形成的作用,因此,阿司匹林已被作为降低糖尿病与非糖尿病患者心血管事件发生的一级和二级预防的主要措施。目前,随着人们对阿司匹林作用机制及药理学深入地研究发现,阿司匹林的积极作用远不仅如此,其还具有抗衰老作用,如抑制人皮肤成纤维细胞的衰老,防治老年性中风和阿尔茨海默氏病,延缓内皮祖细胞

衰老的作用等^[4,5,10]。由此可见,阿斯匹林具有抗内皮细胞衰老的潜质。本研究根据以往相关研究筛选了 4 个不同浓度的阿司匹林作为研究对象,此 4 个浓度在其各自的实验中都证明具有良好的细胞保护作用,如可以通过调节 AMPK、ROS 和 Akt/eNOS 信号转导途径而改善抵抗素引起的内皮功能受损,抑制氧化型低密度脂蛋白诱导下内皮细胞炎症因子的表达,增加细胞内 NO 水平并减轻氧化应激损伤等^[11-13]。虽然本研究所选的 4 个浓度阿司匹林都在正常血药浓度范围内,但仅小剂量的阿司匹林(0.01、0.1 和 1 mmol/L)具有抗高糖环境下内皮细胞衰老的作用,而 3 mmol/L 阿司匹林不但对高糖作用下的内皮细胞没有保护性作用,而且还略显出加速内皮细胞衰老的迹象。因此,有必要在后续实验中作进一步地探讨。

综上所述,本研究证实高糖培养液作用内皮细胞 48 h 后,细胞显示出了衰老的特征,小剂量的阿司匹林(0.01、0.1 和 1 mmol/L)能有效地减少 β -半乳糖苷酶染色阳性细胞,维持细胞形态和端粒酶的活性,促进细胞增殖。由此可见,阿司匹林具有抗高糖环境下内皮细胞衰老的作用。此外,0.01、0.1 和 1 mmol/L 阿司匹林能显著降低细胞内 ROS 水平,推测阿司匹林的抗衰老作用与其降低氧化应激水平有关。此发现为阿司匹林在更好地应用于临床提供了更多的实验依据,当然关于阿司匹林的抗衰老作用及机制仍需更进一步的研究。

[参考文献]

- [1] 单海燕,白小涓,王鹤智,等. Valsartan 延缓血管内皮细胞衰老及 p16INK4a 表达变化的研究[J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20 (10): 881-884.
- [2] 伊桐凝,张 锦,单海燕. 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[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2009, 16 (5): 275-278.
- [3] 伊桐凝,张 锦,于世家. 高糖诱导人脐静脉内皮细胞衰老过程中活性氧与二甲基精氨酸二甲胺水解酶-非对

称性二甲基精氨酸系统的变化[J]. 中国危重病急救杂志, 2011, 23 (5): 275-278.

- [4] Kim SR, Park JH, Lee ME, et al. Selective COX-2 inhibitors modulate cellular senescence in human dermal fibroblasts in a catalytic activity-independent manner[J]. Mech Ageing Dev, 2008, 129 (12): 706-713.
- [5] Casoli T, Ballelli M, Giorgetti B, et al. Platelets in Alzheimer's disease-associated cellular senescence and inflammation[J]. Curr Pharm Des, 2013, 19 (9): 1 727-738.
- [6] 赵海梅,杨 彬,成 蓓. 肿瘤坏死因子诱导内皮细胞衰老中单核细胞趋化蛋白-1 的表达机制及意义[J]. 中国现代医学杂志, 2010, 20 (23): 3 549-551.
- [7] Yi TN, Zhao HY, Zhang JS, et al. Effect of aspirin on high glucose-induced senescence of endothelial cells[J]. Chin Med J (Engl), 2009, 122 (24): 3 055-061.
- [8] 伊桐凝,张 锦,赵宏宇. 高糖诱导人脐静脉内皮细胞衰老[J]. 山东医药, 2009, 49 (16): 51-52.
- [9] 何 晋,陈晓彬,郑昭芬,等. C 反应蛋白诱导外周血内皮祖细胞衰老及非诺贝特的保护作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20 (1): 42-46.
- [10] Hu Z, Zhang F, Yang Z, et al. Low-dose aspirin promotes endothelial progenitor cell migration and adhesion and prevents senescence[J]. Cell Biol Int, 2008, 32 (7): 761-768.
- [11] Ou HC, Lee WJ, Wu CM, et al. Aspirin prevents resitin-induced endothelial dysfunction by modulating AMPK, ROS, and Akt/eNOS signaling[J]. J Vasc Surg, 2012, 55 (4): 1 104-115.
- [12] Chen B, Zhao J, Zhang S, et al. Aspirin inhibits the production of reactive oxygen species by downregulating Nox4 and inducible nitric oxide synthase in human endothelial cells exposed to oxidized low-density lipoprotein[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2012, 59 (5): 405-412.
- [13] Chen JW, Zhou SB, Tan ZM. Aspirin and pravastatin reduce lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 expression, adhesion molecules and oxidative stress in human coronary artery endothelial cells[J]. Chin Med J (Engl), 2010, 123 (12): 1 553-556.

(此文编辑 文玉珊)