

阿司匹林抗高糖诱导的内皮细胞衰老过程中对 DDAH-ADMA 系统及 Caveolin-1 蛋白的影响

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; 细胞衰老; 活性氧; 二甲基精氨酸二甲胺水解酶; 非对称性二甲基精氨酸; Caveolin-1

[摘要] **目的** 观察阿司匹对高糖诱导的内皮细胞衰老模型二甲基精氨酸二甲胺水解酶(DDAH)-非对称性二甲基精氨酸(ADMA)系统和 Caveolin-1 蛋白表达的影响,探讨阿司匹林抗高糖诱导内皮细胞衰老的机制。**方法** 人脐静脉内皮细胞(HUVEC)分别培养于正常糖浓度培养液(5.5 mmol/L)、高糖培养液(33 mmol/L)、高糖+阿司匹林(0.01~1 mmol/L)培养液以及含 L-NAME(300 μmol/L)培养液,48 h 后采用 β-半乳糖苷酶(β-gal)染色鉴定衰老细胞,流式细胞仪检测细胞内活性氧(ROS)水平,Western blot 分析 Caveolin-1 蛋白表达,液质联用仪检测细胞上清液中 ADMA 的含量并计算 DDAH 的活性。**结果** 高糖作用内皮细胞 48 h 后,细胞 β-gal 染色阳性细胞数明显增多,ROS、ADMA 水平以及 Caveolin-1 蛋白表达升高,DDAH 活性降低。0.01~1 mmol/L 阿司匹林剂量依赖性降低 β-gal 染色阳性细胞数、ROS 和 ADMA 水平以及 Caveolin-1 蛋白表达,同时升高细胞 DDAH 活性(P 均 <0.05)。L-NAME(NOS 的抑制剂)能完全抑制阿司匹林的上述作用($P<0.05$)。**结论** 高糖环境下阿司匹林(0.01~1 mmol/L)能抑制 Caveolin-1 表达,改善 DDAH-ADMA 系统的活性而进一步发挥抗氧化损伤、抗细胞衰老的作用。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effect of Aspirin on ADMA-DDAH System and Caveolin-1 Protein Expression in Endothelial Senescence Exposed to High Glucose

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

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

[KEY WORDS] Aspirin; Senescence; Reactive Oxygen Species; Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase; Asymmetric Dimethylarginine; Caveolin-1

[ABSTRACT] **Aim** To observe the anti-senescence effects of aspirin on activity of dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH)-asymmetric dimethylarginine (ADMA) system and caveolin-1 protein expression in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) exposed to high glucose condition and explore the mechanism of aspirin of anti-senescence. **Methods** The human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 5.5 mmol/L glucose as normal level, 33 mmol/L glucose as high glucose, aspirin (0.01~1 mmol/L) with high glucose and 300 μmol/L L-NAME was added to the culture medium when needed for 48 hours. The activity of DDAH were reflected by ADMA concentration determined by high-performance liquid chromatography. The level of intracellular reactive oxygen species (ROS) was monitored by flow cytometry. Caveolin-1 protein ex-

[收稿日期] 2016-01-21

[修回日期] 2016-03-27

[基金项目] 辽宁省博士启动基金资助项目(20121101)

[作者简介] 伊桐凝, 博士, 副主任医师, 主要从事糖尿病大血管并发症发生机制及防治的研究, E-mail 为 yitongning@163.com。通讯作者张锦, 硕士, 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发生机制及防治的研究, E-mail 为 jinzhangcmu@aliyun.com。于世家, 硕士, 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发生机制及防治的研究及甲状腺疾病的防治研究, E-mail 为 yushijia57@163.com。

pressions were analyzed by Western blot. **Results** After the endothelial cells were treated with high glucose concentration for 48 hours, the number of SA- β -gal positive cells, the level of ROS, ADMA and caveolin-1 protein were increased significantly. While, the activity of DDAH was decreased dramatically ($P < 0.05$). All these changes were reversed by aspirin (0.01~1 mmol/L) remarkably in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). However, all the effects of aspirin on senescence were completely inhibited by L-NAME, the NOS inhibitor ($P < 0.05$). **Conclusion** The anti-senescent effects of aspirin were fulfilled by inhibiting caveolin-1 protein expression and regulating the activity of DDAH-ADMA system.

糖尿病大血管病变的始动环节是内皮功能的紊乱,最近研究发现内皮功能障碍与高糖诱导内皮细胞衰老有关^[1]。内皮细胞在衰老的过程中分泌的多种生物活性物质发生改变,其中最具标志性并得到公认的是一氧化氮(nitric oxide, NO)合成障碍^[2]。研究证实阿司匹林因能促进内皮细胞释放NO,具有抗衰老的作用^[3]。非对称性二甲基精氨酸(asymmetric dimethylarginine, ADMA)是一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)的内源性竞争抑制物,竞争性抑制NO的合成,在动脉粥样硬化的形成中起重要作用,是心血管疾病独立危险因素之一,并可加速衰老的进程^[4-5]。Caveolin-1蛋白可与内皮型一氧化氮合酶(endothelial NOS, eNOS)相锚定而抑制其活性,因此,本实验观察阿司匹林在抗高糖诱导内皮细胞衰老的过程中对ADMA及其水解酶二甲基精氨酸二甲胺水解酶(dimethylarginine dimethylaminohydrolase, DDAH)系统和Caveolin-1蛋白表达的影响,探讨阿司匹林抗高糖诱导内皮细胞衰老可能的机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料

人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)株购自 Cascade Biologics, DMEM培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司,阿司匹林、L-NAME (NOS 的抑制剂)、D-(+)-葡萄糖、ADMA 购自 Sigma 公司, β -半乳糖苷酶(β -galactosidase, β -gal)染色试剂盒、活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒购自碧云天生物试剂公司,Caveolin-1 抗体购自 Santa Cruze 公司。相差显微镜(Olympas 公司,日本),液质联用仪(THERMO TSQ QUANTUM ACCESS, USA),流式细胞仪(FAC-SCaliber, BD)。

1.2 人脐静脉内皮细胞的培养及分组处理

HUVEC 细胞株贴壁生长于含 10% 胎牛血清、青霉素 10 万 U/L、链霉素 100 mg/L 的 DMEM 培养基中,置于 5% CO₂、37℃ 培养箱中培养。每 2~3

天换液 1 次,待细胞长至融合时用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。细胞以 1×10^8 个/L 密度接种于培养器皿中。将细胞随机分成 6 组:正常糖浓度(5.5 mmol/L 葡萄糖)组、高糖(33 mmol/L 葡萄糖)组、高糖+阿司匹林组(0.01/0.1/1 mmol/L 阿司匹林)以及抑制剂组(高糖+1 mmol/L 阿司匹林+300 μ mol/L L-NAME)培养 48 h。

1.3 β -半乳糖苷酶染色

内皮细胞接种于 6 孔板中,分组干预后,吸除细胞培养液,PBS 清洗细胞,0.5% 的戊二醛固定细胞 3~5 min, PBS 再次清洗细胞后吸除,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 5 个视野,并至少观察 1000 个细胞,胞浆蓝染者为阳性细胞即衰老细胞,计算阳性细胞占观察细胞总数的百分比。

1.4 细胞内活性氧检测

胰酶消化各组细胞,调整细胞浓度为 2×10^8 /L。按照 1:1000 用无血清培养液稀释对氧化敏感的荧光探针 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,计算检测细胞的平均荧光强度(the mean fluorescence intensity, MFI)。

1.5 ADMA 水平检测

取 ADMA 标准品做标准曲线,检测线性范围为 22.94~5600.00 μ g/L。细胞上清液 12000 g 离心 10 min 后取 10 μ L,用液质联用仪检测细胞上清液中 ADMA 的含量。

1.6 细胞内 DDAH 活性

通过测定被 DDAH 代谢的 ADMA 的量来反映细胞中 DDAH 的活性。具体操作如下:在冰浴下将细胞裂解液分成 2 组,然后分别加入终浓度为 500 μ mol 的 ADMA。一组裂解液立即加入 30% 的甲醇灭活 DDAH;另一组裂解液 37℃ 孵育 2 h 后再加入 30% 的甲醇灭活 DDAH。检测 ADMA 水平,以两组的差值反映 DDAH 活性,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

组的百分比来表示。

1.7 细胞内 Caveolin-1 蛋白表达

分组干预细胞后收集细胞,加入 150 μ L 细胞裂解液裂解细胞,超声破碎,离心提取蛋白,测定蛋白浓度后,SDS-PAGE 电泳分离蛋白,加入抗 Caveolin-1 抗体,洗 3 次后用辣根过氧化物酶标记的二抗结合,用 ECL 进行发光处理,X 光感光成像。

1.8 统计学处理方法

采用 SPSS 13.0 分析软件处理数据,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学分析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

高糖组 β -gal 染色阳性细胞数明显高于正常糖浓度组 ($P < 0.05$)。与高糖组相比,0.01~1 mmol/L 阿司匹林可降低 β -gal 染色阳性细胞数 (P 均 < 0.05);当加入 L-NAME 后 β -gal 染色阳性细胞数明显增加,与高糖组相比差异无显著性 ($P > 0.05$;图 1 和表 1)。

2.2 细胞内 ROS 水平

高糖作用内皮细胞 48 h 后细胞内 ROS 水平比正常糖浓度组升高约 2 倍 ($P < 0.05$),加入 0.01~1 mmol/L 阿司匹林后细胞内 ROS 水平与高糖组相比分别降低 34%、50% 和 58% (P 均 < 0.05),而当加入 L-NAME 后细胞内 ROS 水平与高糖组相比差异无显著性 ($P > 0.05$;表 1)。

2.3 细胞内 ADMA 的含量以及 DDAH 的活性

与正常糖浓度组相比,高糖组 ADMA 水平升高

1.54 倍,DDAH 活性下降 20%。加入 0.01~1 mmol/L 阿司匹林后,ADMA 水平与高糖组相比分别下降 14%、21% 和 36% (P 均 < 0.05),同时,DDAH 活性分别升高 1.17 倍、1.23 倍和 1.46 倍。加入 L-NAME 后 ADMA 水平和 DDAH 活性与高糖组相比差异无显著性 ($P > 0.05$;表 1)。

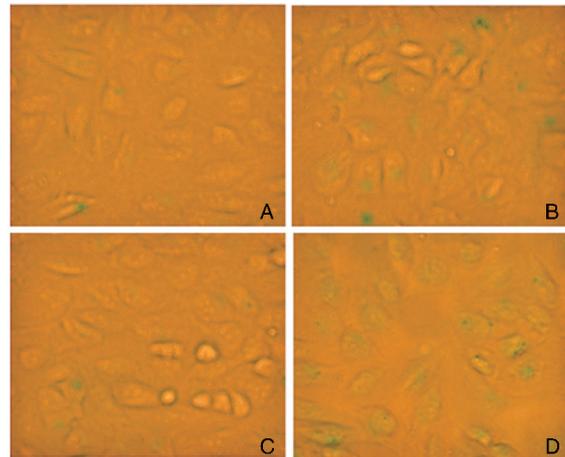


图 1. SA- β -gal 染色鉴定细胞衰老 (400 \times) A 为正常糖浓度组,B 为高糖组,C 为高糖+1 mmol/L 阿司匹林组,D 为高糖+1 mmol/L 阿司匹林+L-NAME 组。

Figure 1. SA- β -gal staining was used to detect the senescent cells(400 \times)

2.4 细胞内 Caveolin-1 蛋白表达

与正常糖浓度组相比,高糖组 Caveolin-1 蛋白表达升高 1.3 倍。加入 0.01~1 mmol/L 阿司匹林后,Caveolin-1 蛋白水平相比高糖组分别下降 37%、42% 和 56% (P 均 < 0.05)。加入 L-NAME 后 Caveolin-1 蛋白水平与高糖组相比差异无显著性 ($P > 0.05$;图 2)。

表 1. 阿司匹林对内皮细胞衰老及 ROS、ADMA 水平和 DDAH 活性的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Effect of aspirin on SA- β -gal-positive stained cells, ROS and ADMA levels, and DDAH activity($\bar{x} \pm s$)

分 组	SA- β -gal	ROS(MFI)	ADMA(μ mol/L)	DDAH 活性
正常糖浓度组	5.00% \pm 1.33%	117.11 \pm 10.83	0.73 \pm 0.07	100%
高糖组	16.79% \pm 2.26% ^a	244.56 \pm 12.10 ^a	1.08 \pm 0.06 ^a	80.48% \pm 8.24% ^a
高糖+0.01 mmol/L 阿司匹林组	12.33% \pm 1.20% ^{ab}	162.34 \pm 17.56	0.94 \pm 0.04 ^{ab}	94.64% \pm 7.50%
高糖+0.1 mmol/L 阿司匹林组	10.33% \pm 1.15% ^{ab}	121.09 \pm 10.73 ^{ab}	0.87 \pm 0.06 ^{ab}	99.15% \pm 6.78% ^b
高糖+1 mmol/L 阿司匹林组	7.30% \pm 1.23% ^b	102.62 \pm 7.73 ^b	0.69 \pm 0.06 ^b	117.43% \pm 8.76% ^{ab}
高糖+1 mmol/L 阿司匹林+L-NAME 组	16.33% \pm 1.53% ^c	256.37 \pm 14.47 ^c	1.05 \pm 0.05 ^c	81.03% \pm 4.62% ^c

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;c 为 $P < 0.05$,与高糖+1 mmol/L 阿司匹林组相比。

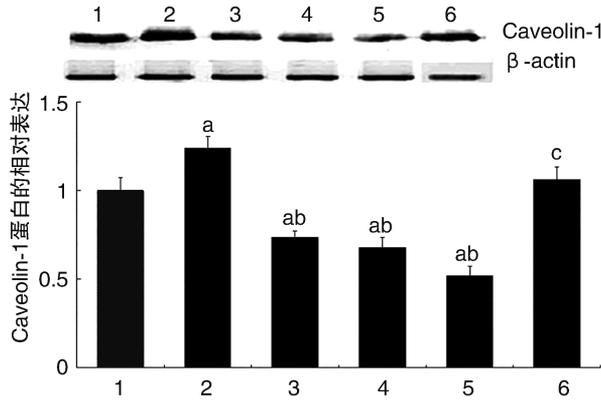


图 2. 阿司匹林对内皮细胞 Caveolin-1 蛋白表达的影响

1 为正常糖浓度组, 2 为高糖组, 3 为高糖+0.01 mmol/L 阿司匹林组, 4 为高糖+0.1 mmol/L 阿司匹林组, 5 为高糖+1 mmol/L 阿司匹林组, 6 为高糖+1 mmol/L 阿司匹林+L-NAME 组。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; c 为 $P < 0.05$, 与高糖+1 mmol/L 阿司匹林组相比。

Figure 2. Effect of aspirin on caveolin-1 protein expression

3 讨论

血管内皮细胞是血管壁的屏障及物质交换的通道, 其分裂能力有限, 在不断地分裂而发生衰老的过程中内皮细胞分泌的多种生物活性物质发生变化(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], 参与动脉粥样硬化的形成和发展。研究证实高糖可诱导血管内皮细胞衰老, 氧化应激损伤参与其中并伴有大量 ADMA 的堆积^[5], 这很有可能是糖尿病大血管病变的发生机制之一。因此, 抗氧化剂的应用有望防治糖尿病大血管病变。

阿司匹林作为解热镇痛抗炎药已有百年历史, 因其具有抗血小板聚集、抑制平滑肌细胞增殖及炎症因子的表达、改善内皮功能、增加斑块稳定性等作用已经成为糖尿病患者心脑血管事件的一、二级预防药物^[6]。随着研究的不断深入人们发现阿司匹林能减轻细胞内氧化应激水平, 并具有抗衰老的作用, 如抑制高糖环境下内皮细胞衰老、延长秀丽隐杆线虫的生命周期以及治疗阿尔海默茨病等^[3, 6-8]。本研究观察到高糖在加速内皮细胞衰老过程中细胞内 ROS 含量增加, 加入阿司匹林后可降低 ROS 水平并减轻细胞衰老的程度。

本研究中当阿司匹林组加入 L-NAME (NOS 的抑制剂) 后, 观察到阿司匹林的抗内皮细胞衰老作用消失, 细胞内活性氧水平升高, 再次证实了高糖环境下阿司匹林是通过升高细胞内 NO 的水平来发挥抗氧化应激和抗衰老作用^[9]。为进一步探究阿

司匹林的抗衰老机制, 我们检测了与 NO 水平和氧化应激水平密切相关的 Caveolin-1 蛋白表达和 ADMA-DDAH 系统的活性。

Caveolin 是分子量为 21~24 kDa 膜整合蛋白, 修饰于 Caveolae (小窝) 的内表面, 是 Caveolae 的主要结构和调节成分。在哺乳动物细胞, 根据 Caveolin 的免疫学特性, 可分为 1、2、3 三型, Caveolin-1 在脂肪细胞、内皮细胞、成纤维细胞中大量表达。Caveolin-1 在信号转导通路和对多种蛋白质功能的调节中发挥着重要作用^[10]。研究证实, Caveolin-1 的棕榈酰化、对信号蛋白的运输以及其本身 mRNA 的表达都受到细胞内氧化应激水平的影响^[10-11]。尤其是最近研究发现, 过度表达的 Caveolin-1 能够抑制生长因子受体的信号转导, 从而诱导细胞周期停滞于 G0/G1 期, 加速细胞衰老的进程, 因此在细胞衰老中发挥决定性作用^[12]。此外, 本研究检测 Caveolin-1 表达的另一原因是 Caveolin-1 与 eNOS 有密切的关系。静息状态下, 内皮细胞中 eNOS 与 Caveolin-1 结合于 Caveolae 内而活性受到抑制。在受到胞外信号刺激后, 细胞内 Ca^{2+} 浓度升高, 钙调蛋白与 eNOS 结合, eNOS 与 Caveolin-1 解离开, 使 eNOS 被激活, 并移至胞浆内, 促进 NO 合成。本实验中我们观察到阿司匹林能够抑制 Caveolin-1 的表达, 这似乎解释了我们前期实验观察到阿司匹林在高糖环境下抗衰老过程中是通过影响细胞内 eNOS 的活性而非 eNOS 总蛋白的表达, 从而提升细胞内 NO 的水平, 发挥抗氧化应激作用^[9]。

DDAH 以及由此酶代谢的 ADMA 组成的 DDAH-ADMA 系统是个对氧化应激反应敏感的系统。DDAH 有两种异构体, DDAH-1 和 DDAH-2, 在内皮细胞中 DDAH-2 的表达占优势。DDAH 在内皮细胞中的主要作用是清除 ADMA。多项研究证实, 多种危险因素, 如高血压、高血脂、高血糖、氧化应激等均可通过降低 DDAH 的活性, 升高血浆中 ADMA 水平^[4]。ADMA 是 NOS 的内源性抑制剂, 其含量的增加可减少 NO 的合成、削弱 NO 的舒血管反应、增加单核细胞黏附、抑制血管新生以及加速内膜增生和动脉粥样斑块的形成等^[4]。因此, ADMA 水平升高是内皮功能失调的标志之一, 并日益与传统的心血管疾病危险因素, 如血脂异常、高血压、吸烟、糖尿病、肥胖、高龄并驾齐驱, 成为心血管疾病独立危险因素之一^[13]。最近研究显示, ADMA 与衰老关系密切, 如大鼠在衰老过程中血中 ADMA 含量升高, 内皮细胞在高糖环境下或连续传

代后出现衰老迹象伴有 ADMA 的堆积^[6]。此外, ADMA 还可抑制端粒酶活性加速内皮细胞衰老的进程^[6]。

本研究显示,高糖环境下阿司匹林在抗内皮细胞衰老,降低细胞内 ROS 水平的过程中伴有 DDAH 活性的升高和 ADMA 水平的下降,而加入 L-NAME 后阿司匹林的以上作用消失,提示阿司匹林的抗氧化作用结果之一就是改善 DDAH-ADMA 系统的活性,eNOS 是阿司匹林的作用位点。同时,阿司匹林能够调节与 eNOS 活性密切相关的 Caveolin-1 蛋白的表达,从而上调细胞内 NO 的水平。更值得一提的是 NO 是由 NOS 催化 L-精氨酸(L-arg)转化而来的,而 ADMA 可与 L-精氨酸竞争 NOS 的结合位点,影响 NO 的合成。因而 ADMA 水平下降不但减少了心血管疾病发生的危险,同时也因减少对 NOS 的抑制而进一步加强了阿司匹林提升 NO 的作用,形成一个良性循环。

综上所述,高糖环境下阿司匹林(0.01~1 mmol/L)能抑制 Caveolin-1 表达,改善 DDAH-ADMA 系统的活性而进一步发挥抗氧化损伤、抗细胞衰老的作用,这无疑为阿司匹林在糖尿病大血管并发症的防治作用上又添上一笔。

[参考文献]

- [1] 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.
- [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] Yi TN, Zhao HY, Zhang JS, et al. Effect of aspirin on high glucose-induced senescence of endothelial cells[J]. Chin Med J, 2009, 122: 3 055-061.
- [4] Petrova JJ, Manolov VE, Vasilev VG, et al. ADMA: a possible marker for early therapeutic outcome in acute stroke[J]. Clin Lab, 2015, 61(11): 1 653-658.
- [5] 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.
- [6] 伊桐凝,张锦,于世家.阿司匹林抗高糖诱导的内皮细胞衰老的作用[J].中国动脉硬化杂志,2014,22(1):27-31.
- [7] Casoli T, Baliotti 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.
- [8] Wan QL, Zheng SQ, Wu GS, et al. Aspirin extends the lifespan of *Caenorhabditis elegans* via AMPK and DAF-16/FOXO in dietary restriction pathway [J]. Exp Gerontol, 2013, 48(5): 499-506.
- [9] 伊桐凝,张锦,于世家.阿司匹林抗高糖诱导内皮细胞衰老过程中对一氧化氮-一氧化氮合酶系统的影响[J].中国糖尿病杂志,2014,22(9):841-845.
- [10] Pavlides S, Gutierrez-Pajares JL, Iturrieta J, et al. Endothelial caveolin-1 plays a major role in the development of atherosclerosis [J]. Cell Tissue Res, 2014, 356(1): 147-157.
- [11] Karaa A, Kamoun WS, Clemens MG. Oxidative stress disrupts nitric oxide synthase activation in liver endothelial cells [J]. Free Radic Biol Med, 2005, 39: 1 320-331.
- [12] Galbiati F, Volonté D, Liu J, et al. Caveolin-1 expression negatively regulates cell cycle progression by inducing G(0)/G(1) arrest via a p53/p21(WAF1/Cip1)-dependent mechanism [J]. Mol Biol Cell, 2001, 12: 2 229-244.
- [13] Corina Serban, Amirhossein Sahebkar, Sorin Ursoniu, et al. A systematic review and meta-analysis of the effect of statins on plasma asymmetric dimethylarginine concentrations[J]. Sci Rep, 2015, 5: 9 902.

(此文编辑 许雪梅)