

[文章编号] 1007-3949(2008)16-10-0809-04

• 实验研究 •

# 健康大鼠血管衰老性重塑与血管衰老相关基因的关系

单海燕<sup>1</sup>, 白小涓<sup>1</sup>, 韩璐璐<sup>1</sup>, 张伟光<sup>1</sup>, 陈香美<sup>2</sup>

(1. 中国医科大学附属第一医院老年心血管科, 辽宁省沈阳市 110001;

2. 中国人民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] 生理学; 血管衰老; 动脉硬化; 细胞周期; 基因调控; p16<sup>NK4a</sup>; p21<sup>cip1</sup>

[摘要] 目的 通过研究健康大鼠血管衰老性重塑形态学变化及衰老相关基因表达, 探讨血管衰老性重塑可能的分子调控机制, 为临床有效干预血管衰老提供分子靶点。方法 观察主动脉组织形态及内皮细胞显微结构变化, 应用 Western blotting 分析 4、10、16 月和 24 月龄大鼠血管重塑 p16<sup>NK4a</sup> 和 p21<sup>cip1</sup> 蛋白表达变化。结果 随增龄, 大鼠主动脉管壁增厚, 纤维化程度增高, 内皮细胞形态呈现衰老改变, p16<sup>NK4a</sup> 和 p21<sup>cip1</sup> 蛋白表达呈时间依赖性上调。结论 血管衰老性重塑的分子机制之一可能与上调细胞周期蛋白 p16<sup>NK4a</sup> 和 p21<sup>cip1</sup> 的表达有关。进一步阐明其调控机制可为延缓血管衰老, 防治动脉粥样硬化提供理论依据。

[中图分类号] Q4

[文献标识码] A

## Relationship Between Vascular Aging Related Remodeling and Senescence Associated Genes in Health Rats

SHAN Hai-Yan<sup>1</sup>, BAI Xiao-Juan<sup>1</sup>, HAN Lu-Lu<sup>1</sup>, ZHANG Wei-Gang<sup>1</sup>, and CHEN Xiang-Mei<sup>2</sup>

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

[KEY WORDS] Vascular Aging Atherosclerosis Cell Cycle Gene Regulation P16<sup>NK4a</sup>; P21<sup>cip1</sup>

[ABSTRACT] **Aim** To observe the morphological changes in vascular aging-related remodeling and p16<sup>NK4a</sup>, p21<sup>cip1</sup> gene expression associated with senescence in healthy rats during natural aging. **Methods** Aortic structure and microstructure changes of vascular endothelial cell in 4, 10, 16, 24 months old rats were observed respectively, and the expressions of p16<sup>NK4a</sup>, p21<sup>cip1</sup> protein were determined by Western-Blotting in the same periods. **Results** With aging, aorta wall thickened, fibrosis degree increased, endothelial cells appeared flattened and enlarged. The protein expressions of p16<sup>NK4a</sup>, p21<sup>cip1</sup> were increased in vascular aging-related remodeling, which suggests that p16<sup>NK4a</sup>, p21<sup>cip1</sup> activity may play an important role in regulating vascular senescence lifespan in vitro. **Conclusion** Vascular aging has its specific structural alterations, one of its molecular mechanisms might be associated with increasing the expression level of p16<sup>NK4a</sup>, p21<sup>cip1</sup> with aging. Further elucidating its underlying mechanism may provide theoretical basis for prevention and treatment of atherosclerosis.

21 世纪全球进入不可逆转的老龄化社会, 增龄将成为血管疾病的首位危险因素<sup>[1]</sup>。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。目前, 有学者认为衰老相关基因对血管衰老起主要作用并引起特征性形态改变, 其中 p16<sup>NK4a</sup> 和 p21<sup>cip1</sup> 是衰老过程中的两个关键产物, 被称为衰老相关基因<sup>[2-3]</sup>, 其表达量与衰老的表型及衰老进程密切相关, 作为检测衰老的分

子指标应用于衰老的相关研究。本研究在观察健康大鼠血管衰老性重塑形态学改变基础上, 通过动态检测健康大鼠血管重塑不同月龄时间 p16<sup>NK4a</sup> 和 p21<sup>cip1</sup> 蛋白表达, 为研究血管衰老的分子机制及衰老通路提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物、主要试剂及仪器

80 只健康雄性 Wistar 大鼠 (中国医科大学实验动物中心提供), 按月龄分为 4 组 (4、10、16 和 24 月龄组), 每组 20 只, 常规饲养 10 d。兔抗大鼠 p16<sup>NK4a</sup>、p21<sup>cip1</sup> 单克隆抗体非免疫血清、生物素二抗 (Biotin Conjugated 公司) 及辣根酶标记的链霉亲和素 (HRP-Streptavidin) 试剂 (Santa Cruz 公司), 透射电子显微镜 (H-600-TEM 公司), Biophotometer 分光

[收稿日期] 2008-09-01 [修回日期] 2008-10-15

[基金项目] 国家 973 重点基础研究发展规划项目 (G2007CB507405)

[作者简介] 单海燕, 博士, 副主任医师, 主要从事冠心病与心血管衰老的研究。Email 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。

光度仪 (Eppendorf 德国); 计算机及显微图像分析系统 (Meta Morph/DD10/BX51); UVP 凝胶成像及分析系统 (UVP 公司, 英国)。

## 1.2 主动脉取材

HX-2 型小动物血压计测量鼠尾收缩压, 称重后, 大鼠腹腔注射 2% 戊巴比妥钠 (45 mg/kg) 麻醉, 开胸, 分离胸主动脉段, 生理盐水清洗血液, 切取 0.5 cm 长主动脉段置于 4℃ 预冷的 10% 甲醛固定液中以制备石蜡切片; -80℃ 冰箱冻存以备用于 Western blotting 等检测。

## 1.3 主动脉形态学观察

主动脉常规石蜡包埋, 连续切片, 片厚 5 μm, HE 染色光镜下观察血管一般形态, HPLAS-1000 型图像分析系统检测内膜中膜厚度、血管内径、内膜中膜厚度/内径比; Masson 染色后分析平滑肌细胞 (smooth muscle cells SMC)、胶原纤维 (collagen fibrils CF) 在各血管壁中的相对含量。

## 1.4 透射电镜标本制备

取冻存的胸主动脉段约 1 mm<sup>3</sup>, 2.5% 戊二醛固定 2 h, PBS 冲洗 3 次, 1% 锇酸固定 2 h, PBS 冲洗后经系列酒精、丙酮脱水, Epon-812 环氧树脂包埋, 35℃、45℃ 和 60℃ 加热聚合。LKB-V (NOVA) 型超薄切片机切片, 醋酸双氧铀-柠檬酸铅重金属双染色, 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、形态, 并记录发生正常、衰老内皮细胞。

## 1.5 Western blotting 检测主动脉 p16<sup>NK4a</sup> 和 p21<sup>cip1</sup> 蛋白水平

取 100 mg 胸主动脉组织放入试管, 加入 600 μL RIPA 进行冰浴匀浆, 4℃、12 kr/min 离心 10 min 后, 上清液至新试管中, 再次离心一次, 取上清分装, -20℃ 保存待用。考马斯亮蓝法测定蛋白质样品浓度, 每个样品上样量为 20 μL, 常规蛋白质电泳分离胶浓度为 12% (pH 8.8), 浓缩胶浓度 4% (pH 6.8), 抽提纯化的蛋白质行 SDS-PAGE 电泳后转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉的 TBST 4℃ 封闭过夜, 加

入一抗 (兔抗大鼠 p16<sup>NK4a</sup> 和 p21<sup>cip1</sup>, 1: 100) 室温摇床孵育 3 h, TBST 洗涤后, 与二抗室温摇床孵育 0.5 h, 常规洗膜化学发光试剂显色, AlphaImager 图像处理系统扫描测定感光区带平均积分吸光度。β-actin 为内参照, 计算相对含量。

## 1.6 统计学处理

采用 SPSS 11.5 软件包对数据进行统计处理, 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 各组收缩压变化

校正体重影响后, 各组大鼠收缩压随增龄逐渐增高, 4、10 和 16 月龄收缩压组间比较差异有显著性 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 24 月龄组大鼠收缩压显著高于 4 月和 10 月龄组 ( $P < 0.01$ ), 但与 16 月龄组比较差异无统计学意义 (表 1)。

表 1 不同月龄组大鼠收缩压变化比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	n	体重 (g)	收缩压 (mmHg)
4 月组	20	327 ± 28	142 ± 4
10 月组	20	534 ± 26	146 ± 5 <sup>a</sup>
16 月组	20	676 ± 25	151 ± 5 <sup>bc</sup>
24 月组	20	694 ± 20	158 ± 5 <sup>bd</sup>

a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 与 4 月龄组比较; c 为  $P < 0.05$ , d 为  $P < 0.01$ , 与 10 月龄组比较。

### 2.2 主动脉形态结构变化

校正收缩压、体重影响后, 4、10 和 16 月龄组内膜中膜厚度、血管内径、内膜中膜厚度/内径比及胶原纤维、平滑肌细胞随增龄逐渐升高, 组间比较差异有显著性 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 但上述指标 24 月龄组与 16 月龄组比较差异无统计学意义 (表 2 和图 1)。

表 2 不同月龄组大鼠主动脉形态结构分析 ( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	n	内膜中膜厚度 (μm)	血管内径 (mm)	内膜中膜厚度/内径比	SMC	CF
4 月组	20	53.8 ± 6.2	1.29 ± 0.18	0.042 ± 0.001	25.9% ± 4.4%	11.9% ± 4.7%
10 月组	20	62.0 ± 13.1 <sup>a</sup>	1.35 ± 0.23 <sup>a</sup>	0.048 ± 0.002 <sup>a</sup>	30.6% ± 4.3% <sup>a</sup>	20.7% ± 4.2% <sup>a</sup>
16 月组	20	77.0 ± 10.8 <sup>ac</sup>	1.51 ± 0.15 <sup>ac</sup>	0.051 ± 0.005 <sup>ab</sup>	45.6% ± 5.5% <sup>ab</sup>	37.7% ± 4.7% <sup>ab</sup>
24 月组	20	81.0 ± 12.0 <sup>ac</sup>	1.58 ± 0.14 <sup>ac</sup>	0.053 ± 0.005 <sup>ab</sup>	51.4% ± 4.2% <sup>ac</sup>	40.6% ± 4.1% <sup>ab</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与 4 月龄组比较; b 为  $P < 0.05$ , c 为  $P < 0.01$ , 与 10 月龄组比较。

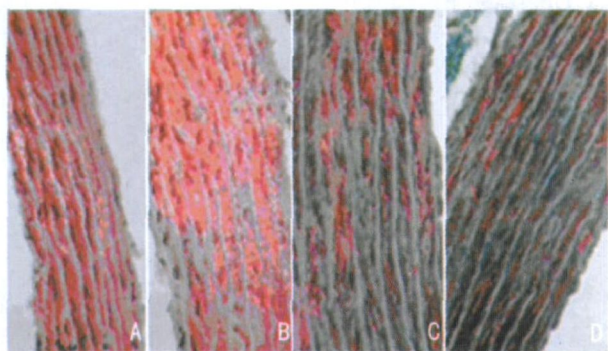


图 1 不同月龄组大鼠主动脉染色 ( $\times 400$ ) A 为 4 月龄, B 为 10 月龄, C 为 16 月龄, D 为 24 月龄。

### 2.3 主动脉内皮细胞超微结构

4 月和 10 月龄组主动脉内皮细胞呈长梭形, 核膜平整光滑, 染色质分布均匀; 16 月龄组细胞核有

的形状不规则, 核内异染色质凝聚, 沿核膜边集; 24 月龄组主动脉内皮细胞呈现细胞衰老状况, 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, 线粒体密度增高 (图 2)。

### 2.4 p16<sup>NK4a</sup>和 p21<sup>cip1</sup>蛋白表达

4 月龄组 p16<sup>NK4a</sup>和 p21<sup>cip1</sup>蛋白仅微量表达, 10 月龄组时 p21<sup>cip1</sup>蛋白表达逐渐增高, 随增龄呈时间依赖性上调 p21<sup>cip1</sup>蛋白表达, 16 月龄组时 p21<sup>cip1</sup>蛋白表达至高峰 ( $P < 0.01$ ); 虽随增龄呈时间依赖性地上调 p16<sup>NK4a</sup>蛋白表达, 但 16 月龄组时, p16<sup>NK4a</sup>蛋白表达逐渐增高, 24 月龄组时 p16<sup>NK4a</sup>蛋白表达至高峰 ( $P < 0.01$ , 图 3)。

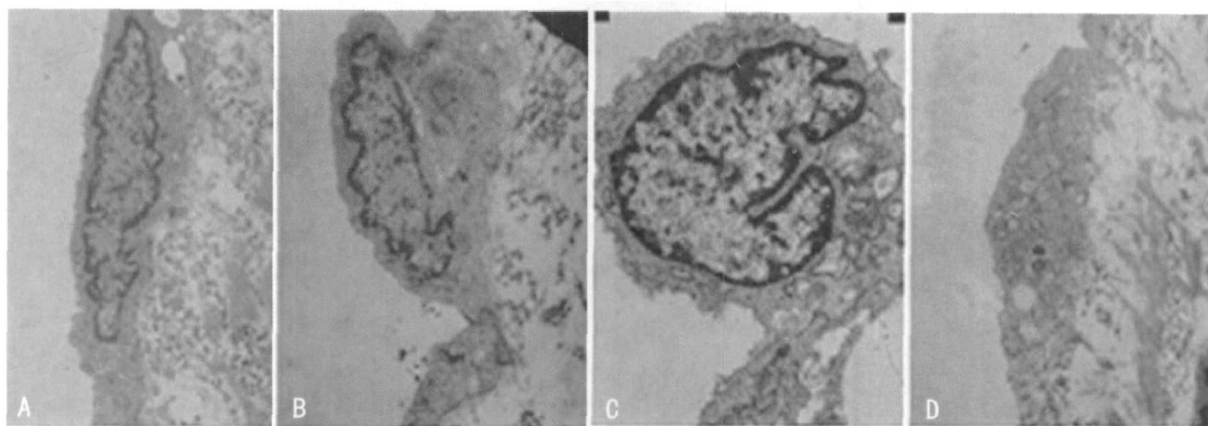


图 2 不同月龄组大鼠主动脉内皮细胞超微结构变化 ( $\times 8000$ ) A 为 4 月龄, B 为 10 月龄, C 为 16 月龄, D 为 24 月龄。

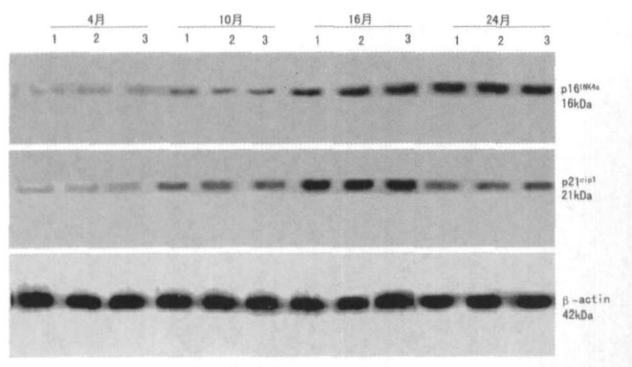


图 3 不同月龄大鼠主动脉 p16<sup>NK4a</sup>和 p21<sup>cip1</sup>蛋白表达的时间效应关系

## 3 讨论

大量临床研究证实, 随增龄许多心血管疾病发生率急剧上升, 如高血压病、冠心病、心功能不全和脑卒中等。Baltimore 衰老纵向研究证实年龄相关的

动脉特征性变化与增龄依赖的血管疾病的急剧增高密切相关。另有研究指出老年人群心血管疾病风险的增加是增龄与疾病相互作用的结果<sup>[1]</sup>。针对血管衰老复杂的发病机制, 国内外学者提出衰老相关基因在血管衰老的发生、发展中至关重要<sup>[4-6]</sup>。年龄增加引起的血管改变可能成为治疗和预防心血管疾病的靶目标。因此, 阐明血管衰老的分子机制对动脉硬化等血管疾病的诊治具有重要意义。

本研究发现了健康大鼠自然衰老进程中血管衰老性重塑的形态学变化, 大鼠收缩压随增龄而升高, 反映动脉弹性降低为血管衰老性重塑的重要表现。血管结构分析表明血管衰老性重塑形态学变化主要表现为: 内中膜增厚, 内中膜厚度/内径增大, 胶原纤维含量、平滑肌含量增高, 动脉纤维化程度增高<sup>[7]</sup>。在校正血压因素后, 上述变化仍有意义, 说明收缩压等血流动力学因素变化不能完全解释血管衰老性重塑。血管衰老性重塑存在独立于血流动力学因素外的调控机制, 血流动力学因素可能是对衰老性重塑

的适应,但其确切机制,有待于进一步研究证实。

本研究观察了随增龄主动脉内皮细胞超微结构变化,内皮细胞随增龄表现衰老形态的特征:细胞体积较大,细胞核变大、内有包含物,染色质聚集、固缩、碎裂、溶解,核膜内陷,细胞质内有空泡形成,线粒体的数目及形状改变,高尔基体碎裂,尼氏体消失,细胞膜的流动性也减低,上述结果都证实了衰老血管有其特征性结构和功能的改变。

p16<sup>NK4a</sup>蛋白在正常生长组织中表达水平较低,但随增龄其表达水平逐渐增高,有学者提出 p16<sup>NK4a</sup>能作为测定衰老的分子标记以区别于单从时间上对衰老的界定<sup>[3]</sup>。p21<sup>cip1</sup>则是细胞周期依赖激酶(CDK)的非特异性抑制剂,其具有抑制 Rb磷酸化,阻遏 E2F释放,使细胞周期停留 G<sub>1</sub>/S点不能进入 S 期的作用。已有大量研究表明,一旦收到来自 p16<sup>NK4a</sup>和 p21<sup>cip1</sup>途径的衰老信号后, p16<sup>NK4a</sup>和 p21<sup>cip1</sup>蛋白就成为控制衰老过程的中心环节,机体则进入衰老程序,停止增殖并且发生一系列形态和功能上的变化<sup>[8-10]</sup>。

本研究观察不同月龄大鼠主动脉衰老过程中细胞周期蛋白 p16<sup>NK4a</sup>表达的变化,发现随增龄, p16<sup>NK4a</sup>蛋白表达量逐渐增高,提示 p16<sup>NK4a</sup>可能通过抑制 CDK4-6/D激酶的活性,使 RB 蛋白保持非磷酸化,减少了转录因子 E2F的释放,使机体内不能表达 E2F依赖的 G<sub>1</sub>晚期蛋白,使细胞 DNA 增殖不能通过 G<sub>1</sub>/S调控点,阻滞在 G<sub>1</sub>期<sup>[9,10]</sup>。但 p16<sup>NK4a</sup>促进衰老作用是否与抑制其负调控元件有关还有待于进一步的研究。

另外,在 4 月和 10 月龄的大鼠主动脉中, p16<sup>NK4a</sup>蛋白表达量较 p21<sup>cip1</sup>蛋白表达要低,可能与已知的 p21<sup>cip1</sup>先于 p16<sup>NK4a</sup>表达有关,即 p21<sup>cip1</sup>先于

p16<sup>NK4a</sup>的增加是相继的,推测 p21<sup>cip1</sup>表达增加出现在主动脉逐渐丧失增殖潜力时,而 p16<sup>NK4a</sup>的表达增加出现在主动脉丧失增殖能力时的衰老终末期,提示 p21<sup>cip1</sup>先可能在主动脉衰老的晚期激活 p16<sup>NK4a</sup>, p21<sup>cip1</sup>启动主动脉衰老机制而 p16<sup>NK4a</sup>维持主动脉衰老的进程。

综上所述,细胞周期蛋白 p16<sup>NK4a</sup>和 p21<sup>cip1</sup>在血管衰老过程中可能起着重要作用,将为动脉硬化等衰老相关疾病的诊治提供新的研究思路。但具体 p16<sup>NK4a</sup>和 p21<sup>cip1</sup>通路在血管衰老中何者起关键作用以及是否两条途径共同起作用有待于进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] Lakatta EG, Levy D. Arterial and cardiac aging: major contributors to cardiovascular disease. *Circulation*. 2003; **107** (1): 139-146.
- [2] Janakiraman K, Chad T, Matthew R, et al. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest*. 2004; **114** (9): 1299-307.
- [3] 单海燕, 白小涓, 陈香美. 衰老生物学标志的研究进展 [J]. 中华老年医学杂志, 2008; **27** (3): 309-312.
- [4] 单海燕, 白小涓, 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): 164-167.
- [5] 单海燕, 白小涓, 陈香美. 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 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2007; **15** (9): 657-660.
- [6] Shan HY, Bai XJ, Chen XM. Angiotensin II induces endothelial cell senescence via the activation of mitogen-activated protein kinases [J]. *Cell Biochem Funct*. 2008; **26**: 459-466.
- [7] 尹力, 黄体钢, 李广平. 增龄对大鼠腹主动脉壁连接蛋白 mRNA 表达的影响 [J]. 中华老年医学杂志, 2006; **25** (5): 384-385.
- [8] Guney I, Wu S, Sedivy M. Reduced c-myc signaling triggers telomere-independent senescence by regulating Bmi-1 and p16 (INK4a) [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; **103** (10): 3645-3650.
- [9] Cammarano MS, Nekrasova T, Noel R, et al. Pak4 induces premature senescence via a pathway requiring p16<sup>INK4a</sup>/p19<sup>ARF</sup> and mitogen-activated protein kinase signaling [J]. *Mol Cell Biol*. 2005; **25** (21): 9532-542.
- [10] Gong YH, Yue JP, Wu XD, et al. NSPc1 is a cell growth regulator that acts as a transcriptional repressor of p21<sup>waf1/cip1</sup> via the RACE element [J]. *Nucleic Acids Res*. 2006; **34** (21): 6158-169.

(此文编辑 李小玲)