

主动脉夹层患者循环内皮祖细胞或许经由氧化应激机制加速细胞衰老

周滔¹, 杨德光¹, 陈小芳², 潜学勤¹, 肖孟²

(南方医科大学第三附属医院 1. 心血管内科, 2. 护理部, 广东省广州市 510630)

[关键词] 内皮祖细胞; 细胞衰老; 主动脉夹层; 氧化应激

[摘要] **目的** 探讨主动脉夹层患者循环内皮祖细胞是否经由氧化应激机制加速衰老。**方法** 临床选取疑似主动脉夹层患者并经主动脉 CTA 检查后分为对照组和主动脉夹层组, 抽取外周血分离单个核细胞群, 流式细胞分选术分离和计数内皮祖细胞, 应用层粘连蛋白粘附法、改良的 Boyden 小室及 MTT 法测定内皮祖细胞的粘附、迁移和增殖功能, 应用 Western blot 检测内皮祖细胞衰老相关的 p16INK4a 和 SIRT1 蛋白水平, 并测定细胞内反应氧类物质水平。**结果** 与对照组相比, 主动脉夹层组循环 CD34⁺CD133⁺KDR⁺ 内皮祖细胞数量明显减少 ($P < 0.01$), 且细胞粘附、迁移和增殖功能明显降低 ($P < 0.05$); Western blot 结果显示细胞衰老相关的 p16INK4a 蛋白水平明显升高, 而抗衰老蛋白 SIRT1 表达水平明显降低, 细胞内反应氧类物质水平明显增加 ($P < 0.05$)。**结论** 不断增加的细胞内反应氧类物质致主动脉夹层患者循环内皮祖细胞的粘附、增殖和迁移功能受损, 最终加速循环内皮祖细胞衰老。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Circulating Endothelial Progenitor Cell in Patients with Aortic Dissection May Accelerate Cell Senescence via Elevated Intracellular Oxidative Stress

ZHOU Tao¹, YANG De-Guang¹, CHEN Xiao-Fang², QIAN Xue-Qin¹, and XIAO Meng²

(1. Department of Cardiology, 2. Nursing Department, The Third Affiliated Hospital of Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510630, China)

[KEY WORDS] Endothelial Progenitor Cell; Cell Senescence; Aortic Dissection; Oxidative Stress

[ABSTRACT] **Aim** To determine if circulating endothelial progenitor cells in patients with aortic dissection accelerated cell senescence via oxidative stress mechanism. **Methods** All patients with a symptom of chest pain were divided into control group and aortic dissection group according to the result of CT angiography. Endothelial progenitor cells were isolated and identified by flow cytometry analysis. The adhesion, migration and proliferation functions of endothelial progenitor cells were separately measured by the methods fibronectin adhesion, modified Boyden chamber and MTT array. Western blot was used to detect the protein level of p16INK4a and SIRT1. The level of intracellular reactive oxygen species was analyzed by the labeled H2DCF-DA method. **Results** The number of circulating CD34CD133KDR-positive endothelial progenitor cells in patients with aortic dissection decreased sharply ($P < 0.01$) and cellular functions such as adhesion, migration and proliferation were damaged when compared with those in control group ($P < 0.05$). The protein level of the pro-senescent marker p16INK4a was found to upregulate significantly and meanwhile the expression of anti-senescent protein SIRT1 was decreased remarkably in the aortic dissection group ($P < 0.05$). The level of intracellular reactive oxygen species in patients with aortic dissection was increased severely ($P < 0.05$). **Conclusions** The accumulating intracellular reactive oxygen species were found to make those dysfunctions of circulating endothelial progenitor cells such as proliferation, adhesion and migration which probably accelerated endothelial progenitor cell senescence in patients with aortic dissection.

[收稿日期] 2014-11-03

[修回日期] 2014-12-23

[基金项目] 国家自然科学基金项目资助(81300119, 81350010)

[作者简介] 周滔, 博士, 副主任医师, 主要研究方向为介入心脏病学, E-mail 为 zhoutao6240@sina.com。通讯作者杨德光, 博士, 副主任医师, 主要研究方向为介入心脏病学, E-mail 为 yangguang98198@163.com。陈小芳, 博士, 主管护师, 主要研究方向为护理学。

主动脉夹层是一类严重危及人类生命的急危重症,血管内膜受损和撕裂是主动脉夹层发生的始动环节^[1]。高血压、血脂异常、糖尿病等动脉粥样硬化危险因素是主动脉夹层的主要预测因子^[2,3]。已知内皮祖细胞(endothelial progenitor cell,EPC)可以趋化至受损的内皮细胞处并转化为成熟的内皮细胞从而保护血管内膜内皮细胞层的完整性。与正常健康人相比,高血压和冠心病患者的循环内皮祖细胞数量明显减少,且表现为粘附、趋化及增殖功能明显受损,表明内皮祖细胞经历了细胞衰老^[4]。因此,有学者认为内皮祖细胞衰老加速了动脉粥样硬化的发生和发展。但迄今为止,尚未有主动脉夹层与内皮祖细胞衰老的相关性研究报道。因此,本研究拟观察主动脉夹层患者内皮祖细胞的数量及其功能,并验证内皮祖细胞是否经历了细胞衰老,初步探讨其致衰老的具体机制。

1 对象和方法

1.1 材料

APC 标记的抗 CD133 抗体购自德国 Miltenyi Biotec 公司,PE 标记的抗 KDR 抗体购自美国 Sigma 公司,FITC 标记的抗 CD34 抗体购自美国 Becton Dickinson 公司,FACS 裂解液购自美国 BD Biosciences 公司,p16INK4a 鼠抗人抗体购自美国 Abcam 公司,SIRT1 鼠抗人抗体购自美国 Santa Cruz 公司, β -actin 购自美国 Cell Signaling Technology 公司,反应氧类物质试剂盒(H2DCFDA)购自美国 Invitrogen 公司,细胞裂解液购自美国 Biochemical 公司。

1.2 样本获取与分组

选取我院 2012 年 3 月至 2014 年 3 月收治的主动脉夹层患者 32 例,均经胸腹主动脉 CTA 明确诊断为主动脉夹层 16 例及排除主动脉夹层 16 例分别为主动脉夹层组和对照组,且排除以下疾病:马凡综合征、既往明确诊断为冠心病或冠状动脉腔内成形术、先天性心脏病、脑中风、下肢动脉闭塞、感染性疾病急性发作期、自身免疫性疾病、血液系统疾病、妊娠、肿瘤等。本试验已通过南方医科大学第三附属医院医学伦理学委员会同意且所有入选对象试验前均签署知情同意书。

1.3 流式细胞分选术

主动脉夹层患者入院后即经由贵要静脉抽取静脉血 10 mL,注入含 EDTA 的抗凝管中,选取 1 mL 血样,分别应用 10 μ L 全血分别与以下抗人单克隆抗体在 4℃避光下共孵育 30 min:抗 APC-抗 CD133

孵育,抗 PE-KDR 抗体、抗 FITC-CD34 抗体;加入 FACS 细胞裂解液裂解红细胞并用 PBS 稀释 10 倍,加入高通量流式细胞仪(BD Bioscience FACSCanto II)进行检测。

1.4 内皮祖细胞的分离和培养

选取上述含 EDTA 的外周血 10 mL,应用密度梯度离心成功分离单个核细胞层,再次离心、PBS 洗脱及细胞重悬后种植于 6 孔板内,应用含成纤维生长因子、胰岛素样生长因子、内皮生长因子及 20% 胎牛血清的 EGM-2 培养基培养,每 3 天更换细胞培养基,第 8 天收获细胞。

1.5 细胞克隆形成分析

细胞培养至第 3 天,消化细胞并重悬于 EGM-2 培养液中再均匀铺在 6 孔板中,第 8 天时至少由两名独立观察者应用相差显微镜计数克隆样集落数量,初步评估外周血内皮祖细胞数量及生长情况。

1.6 内皮祖细胞迁移功能测定

取培养第 8 天细胞,消化离心后取 500 μ L EGM-2 培养液重悬,平铺在改良的 Boyden 小室上层,37℃孵育 24 h,轻柔吹打并拭去非迁移细胞,用 PBS 洗剂过滤网下层细胞,2.5% 戊二醛和甲醇固定,苏木精染色,至少由两名独立观察者进行计数细胞。

1.7 内皮祖细胞增殖活性测定

取培养第 8 天细胞,胰蛋白酶消化,500 μ L 培养液重悬后均匀平铺于 96 孔细胞培养板中培养 24 h,每孔加入 20 μ L MTT(15 g/L),37℃下共孵育 4 h,移除上清液并加入 150 μ L DMSO 共孵育 10 min,应用 ELISA 及分光光度计(492 nm 处)进行检测。

1.8 内皮祖细胞粘附功能检测

取培养第 8 天细胞,37℃下层粘连蛋白包被 24 孔细胞培养板 2 h,1% BSA 封闭 2 h 后将内皮祖细胞平铺于培养孔中孵育 30 min,PBS 冲洗并计数细胞数。

1.9 Western blot 检测

内皮祖细胞培养至第 3 天,洗去未贴附细胞,收获贴附细胞并洗涤、离心,细胞裂解液(25 mmol/L HEPES,pH 7.4,100 mmol/L NaCl,0.1% SDS,0.5% 脱氧胆酸钠,1% Triton X-100 和蛋白酶抑制物)裂解细胞,15000 g 超速离心 20 min,BCA 法测定裂解物的总蛋白浓度,取 30 μ g 上述样本置于 8%~12% SDS-PAGE 梯度凝胶中,并成功转移到 PVDF 膜上,5% BSA 封闭 PVDF 膜并与一抗在 4℃孵育过夜,ECL 法检测辣根过氧化物酶标记的二抗,并应用 UVP 成像分析系统进行灰度分析。

1.10 细胞内反应氧类物质测定

根据以往研究方法,应用氧化反应敏感的H2DCF-DA法测定细胞内反应氧类物质水平。培养至第3天的内皮祖细胞于37℃下与10 μmol/L H2DCF-DA共孵育30 min, PBS冲洗3次,流式细胞仪进行细胞检测。

1.11 统计学分析

所有样本均行3次重复试验。所有数据均采用SPSS 20统计软件进行分析,连续变量采用Kolmogorov-Smirnov检验正态分布并以 $\bar{x} \pm s$ 表示。对于连续变量的比较,正态分布变量用配对Student *t*检验或方差分析,偏态分布变量分布用Mann-Whitney检验或Kruskal-Wallis检验。*P* < 0.05为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 一般临床资料分析

与非主动脉夹层患者相比,主动脉夹层患者收缩压升高(*P* < 0.01),舒张压未见明显差异;此外,主动脉夹层患者多合并HDL C下降、LDLC和血糖升高(*P* < 0.05或*P* < 0.01),而主动脉夹层患者的炎症反应指标hs-CRP也明显高于非主动脉夹层患者(*P* < 0.01;表1)。

表 1. 主动脉夹层患者和对照者临床资料分析

Table 1. The clinical characteristics of patients with or without aortic dissection

项 目	对照组 (<i>n</i> = 16)	主动脉夹层组 (<i>n</i> = 16)	<i>P</i> 值
年龄(岁)	48.0 ± 12.4	52.0 ± 10.2	>0.10
男性(例)	16(57%)	8(50%)	
收缩压(mmHg)	142.0 ± 15.7	156.0 ± 18.6	<0.01
舒张压(mmHg)	78.0 ± 12.5	82.0 ± 10.4	>0.10
血糖(mmol/L)	6.2 ± 2.4	8.5 ± 3.6	<0.01
HDL C(mmol/L)	1.1 ± 0.2	0.9 ± 0.2	<0.01
LDLC(mmol/L)	2.9 ± 0.8	3.5 ± 1.4	<0.05
TG(mmol/L)	1.7 ± 0.3	1.8 ± 0.4	>0.10
hs-CRP(g/L)	6.0 ± 3.1	20.0 ± 8.1	<0.01

2.2 主动脉夹层患者循环内皮祖细胞数量及集落形成的变化

主动脉夹层患者外周血内皮祖细胞CD34⁺CD133⁺KDR⁺细胞数明显减少(表2),且细胞培养第3天集落形成减少,与对照组相比有显著性差异(*P* < 0.01;图1),表明主动脉夹层患者循环内皮祖

细胞或许经历了细胞衰老。

表 2. 主动脉夹层患者和对照者循环内皮祖细胞数量比较
Table 2. Comparison of the number of circulating endothelial progenitor cells in patients with or without aortic dissection

项 目	对照组 (<i>n</i> = 16)	主动脉夹层组 (<i>n</i> = 16)	<i>P</i> 值
CD34 ⁺ /10 ⁶ WBC	216.8 ± 95.7	183.0 ± 88.2	>0.1
CD133 ⁺ /10 ⁶ WBC	51.6 ± 16.8	28.0 ± 14.7	<0.01
CD34 ⁺ KDR ⁺ /10 ⁶ WBC	7.1 ± 2.6	2.4 ± 0.8	<0.01
CD133 ⁺ KDR ⁺ /10 ⁶ WBC	4.9 ± 1.8	2.1 ± 1.2	<0.01
CD34 ⁺ CD133 ⁺ KDR ⁺ /10 ⁶ WBC	2.5 ± 0.9	1.2 ± 0.5	<0.01

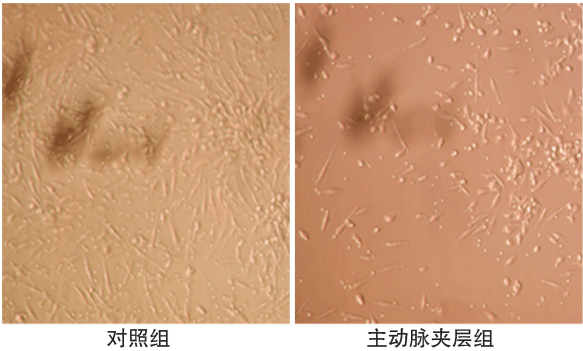


图 1. 主动脉夹层患者循环内皮祖细胞集落形成的变化(150 × 150)

Figure 1. Changes of colony-forming units of circulating endothelial progenitor cells in patients with aortic dissection

2.3 主动脉夹层患者循环内皮祖细胞粘附、迁移和增殖功能的变化

主动脉夹层患者外周血循环内皮祖细胞的粘附、迁移和增殖功能明显受损,与对照组相比有显著性差异(*P* < 0.05或*P* < 0.01;图2),结合其数量明显下降,进一步证实主动脉夹层患者内皮祖细胞或许经历细胞衰老。

2.4 主动脉夹层患者循环内皮祖细胞衰老相关的p16INK4a和SIRT1蛋白的表达

与对照组相比,主动脉夹层患者循环内皮祖细胞p16INK4a蛋白表达明显增加,SIRT1蛋白表达明显下降,表明内皮祖细胞经历了细胞衰老(*P* < 0.05;图3)。

2.5 主动脉夹层患者循环内皮祖细胞内反应氧类物质水平变化

与对照组相比,主动脉夹层患者H2DCF-DA标记的循环内皮祖细胞明显增多,表明内皮祖细胞内反应氧类物质及氧化水平明显增加(*P* < 0.05;图4)。

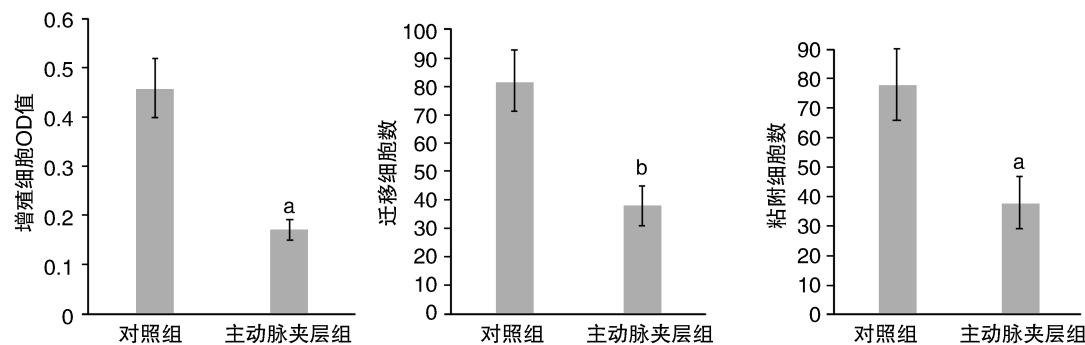


图 2. 主动脉夹层患者循环内皮祖细胞增殖、迁移及粘附功能的变化 a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。
Figure 2. Changes of adhesion, migration and proliferation of circulating endothelial progenitor cells in patients with aortic dissection

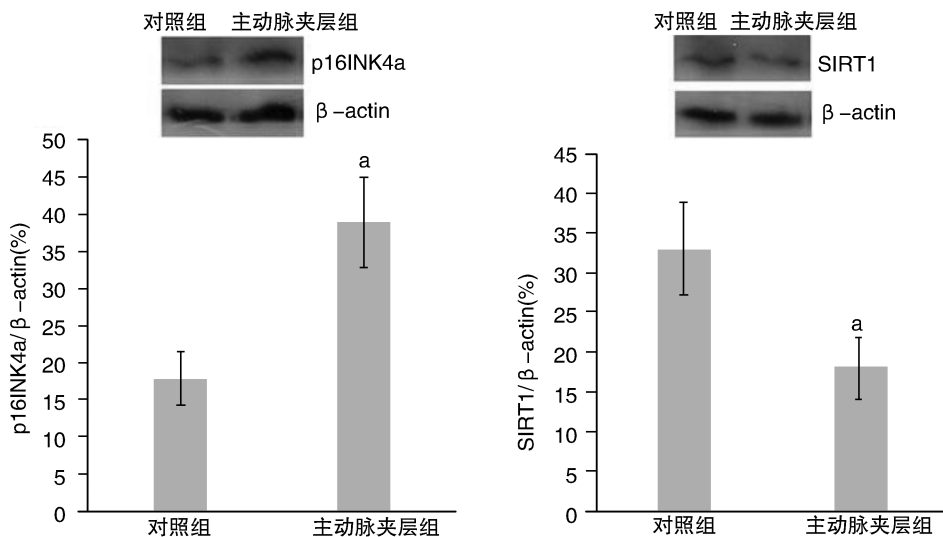


图 3. 主动脉夹层患者循环内皮祖细胞 p16INK4a 和 SIRT1 蛋白的表达 a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。
Figure 3. Expression of p16INK4a and SIRT1 protein of endothelial progenitor cells in patients with aortic dissection

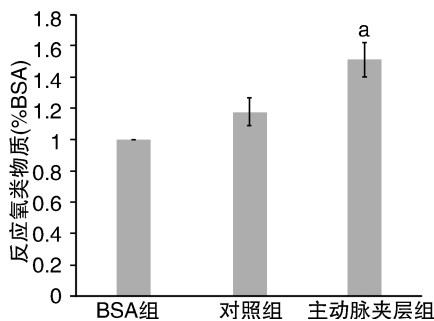


图 4. 主动脉夹层患者循环内皮祖细胞内反应氧类物质水平变化 a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。
Figure 4. Changes of reactive oxygen species levels of circulating endothelial progenitor cells in patients with aortic dissection

3 讨论

高血压、糖尿病、高 LDLC 等动脉粥样硬化危险

因素可致动脉内膜内皮细胞层受损或失功能,而受损的内皮细胞层未及时有效修复和血流剪切应力致血管内膜破损或撕裂是主动脉夹层发生发展的始动环节,因此高血压和动脉粥样硬化被认为是主动脉夹层的主要预测因素之一^[1]。已证实循环内皮祖细胞是内皮细胞的前体细胞,可分化为成熟内皮细胞并保持内皮细胞层的完整性,被认为是血管内皮受损的主要修复机制之一^[4]。而内皮祖细胞循环数量的减少及其迁移、粘附及增殖功能下降被认为是细胞衰老的重要特征,可使受损的内皮细胞或血管损伤修复明显延迟或受阻^[5]。新近研究发现循环内皮祖细胞减少与包括主动脉夹层在内的急性主动脉综合症密切相关^[6]。本研究发现,主动脉夹层患者多合并高血压、高血糖及高 LDLC 水平,且 hs-CRP 水平明显增加,以上均提示是动脉粥样硬化发生发展的高危因素,因此与以往研究一致,高

血压、动脉粥样硬化是主动脉夹层的重要预测因子。而本研究进一步发现主动脉夹层患者具有内皮细胞和祖细胞标记的 CD34⁺ CD133⁺ KDR⁺ 循环细胞数量明显减少,且细胞的迁移、粘附和增殖功能明显受损。已知细胞的迁移、粘附和增殖功能受损是内皮祖细胞发生衰老的重要特征,因此,我们推测各致动脉粥样硬化危险因子或许加速了循环内皮祖细胞衰老,而衰老的内皮祖细胞或许是致主动脉夹层发生发展的重要因素之一,但迄今为止,鲜见主动脉夹层与内皮祖细胞衰老的相关性研究。

为进一步验证主动脉夹层患者循环内皮祖细胞是否经历了细胞衰老,我们在蛋白水平对内皮祖细胞 p16INK4a 和 SIRT1 蛋白表达水平进行了检测,以进一步验证内皮祖细胞经历细胞衰老。已知细胞周期蛋白 p16INK4a 被认为是细胞未成熟衰老的重要标志^[7,8]。而新近研究发现衰老的内皮祖细胞 p16INK4a 表达明显增加,被认为是内皮祖细胞衰老的生化标志物之一^[9]。此外,SIRT1 蛋白低表达可加速内皮祖细胞衰老,而通过调控 SIRT1 过表达可加速内皮祖细胞新生血管形成^[10,11]。我们的结果发现主动脉夹层患者内皮祖细胞 p16INK4a 蛋白表达明显增加,而 SIRT1 蛋白表达显著下降,进一步证实内皮祖细胞或许经历了细胞衰老。但迄今为止,主动脉夹层患者内皮祖细胞衰老的具体机制尚未完全阐明。

氧化应激假说被认为是动脉粥样硬化发生发展的经典机制之一。由各种致动脉粥样硬化危险因子诸如高血压、糖尿病及高 LDLC 等所致的不断增加的细胞内外氧化应激水平可加速内皮祖细胞衰老,其机制或许与氧化应激相关的 DNA 损伤和端粒酶介导的衰老机制有关^[12-14]。我们应用氧化敏感的 H2DCF-DA 对内皮祖细胞内反应氧类物质水平进行了检测,结果显示主动脉夹层患者 H2DCF-DA 标记的内皮祖细胞明显增加,表明内皮祖细胞内反应氧类物质及氧化应激水平明显增加,或许是内皮祖细胞衰老的重要机制之一。

基于以上,我们有理由推论不断增加的反应氧类物质或氧化应激水平可致循环内皮祖细胞的迁移、粘附和增殖功能明显受损,或许加速了内皮祖细胞衰老,进而使血管内皮细胞层修复机制受损,内皮祖细胞衰老未能有效转化为成熟内皮细胞而保持内皮细胞层的完整性和修复受损血管,或许与主动脉夹层发生发展有关。由于本研究的样本量较少,且未能对内皮祖细胞与主动脉夹层内膜再生进行相关性研究,有必要在未来的研究中扩大样本

量并对其具体血管修复与新生机制进行深入系统的研究论证。

[参考文献]

- [1] Fan LM, Douglas G, Bendall JK, et al. Endothelial cell-specific reactive oxygen species production increases susceptibility to aortic dissection[J]. *Circulation*, 2014, 129 (25): 2 661-672.
- [2] Clouse WD, Hallett JW Jr, Schaff HV, et al. Acute aortic dissection: population-based incidence compared with degenerative aortic aneurysm rupture[J]. *Mayo Clin Proc*, 2004, 79: 176-180.
- [3] Boledovi ová M, Hendl J, Li ková L, et al. Blood pressure relation to body composition and age: analysis of a nurse-led investigation and consultation program[J]. *Med Sci Monit*, 2013, 19: 612-617.
- [4] Yang DG, Liu L, Zheng XY. Cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) and telomerase may co-modulate endothelial progenitor cells senescence[J]. *Ageing Res Rev*, 2008, 7 (2): 137-146.
- [5] Liu L, Wen T, Zheng XY, et al. Remnant-like particles accelerate endothelial progenitor cells senescence and induce cellular dysfunction via an oxidative mechanism[J]. *Atherosclerosis*, 2009, 202 (2): 405-414.
- [6] Parietti E, Pallandre JR, Deschaseaux F, et al. Presence of circulating endothelial progenitor cells and levels of stromal-derived factor-1 α are associated with ascending aorta aneurysm size[J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2011, 40 (1): e6-12.
- [7] Molofsky AV, Slutsky SG, Joseph NM, et al. Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing[J]. *Nature*, 2006, 443 (7110): 448-452.
- [8] Krishnamurthy J, Ramsey MR, Ligon KL, et al. p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential[J]. *Nature*, 2006, 443 (7110): 453-457.
- [9] Yang DG, Liu L, Zhou SH. MicroRNA alterations in senescent endothelial progenitor cells induced by remnant-like lipoproteins[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2012, 125 (19): 3 479-484.
- [10] Du G, Song Y, Zhang T, et al. Simvastatin attenuates TNF- α induced apoptosis in endothelial progenitor cells via the upregulation of SIRT1[J]. *Int J Mol Med*, 2014, 34 (1): 177-182.
- [11] Vassallo PF, Simoncini S, Ligi I, et al. Accelerated senescence of cord blood endothelial progenitor cells in premature neonates is driven by SIRT1 decreased expression[J]. *Blood*, 2014, 123 (13): 2 116-126.
- [12] Dai J, Zhu X, Yoder MC, et al. Cleaved high-molecular-weight kininogen accelerates the onset of endothelial progenitor cell senescence by induction of reactive oxygen species[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31 (4): 883-889.
- [13] Zhou Z, Peng J, Wang CJ, et al. Accelerated senescence of endothelial progenitor cells in hypertension is related to the reduction of calcitonin gene-related peptide[J]. *J Hypertens*, 2010, 28 (5): 931-939.
- [14] Chang J, Li Y, Huang Y, et al. Adiponectin prevents diabetic premature senescence of endothelial progenitor cells and promotes endothelial repair by suppressing the p38 MAP kinase/p16INK4A signaling pathway[J]. *Diabetes*, 2010, 59 (11): 2 949-959.

(此文编辑 文玉珊)