

Valsartan 延缓血管内皮细胞衰老及 p16^{INK4a} 表达变化的研究

单海燕¹, 白小涓¹, 王鹤智¹, 陈香美²

(1. 中国医科大学第一附属医院老年病科, 辽宁省沈阳市 110001;

2. 解放军总院肾内科 全军肾病中心暨重点实验室, 北京市 100853)

[关键词] 血管紧张素 II; 内皮细胞; 血管衰老; 细胞周期; p16^{INK4a}

[摘要] **目的** 探讨 Valsartan 对血管内皮细胞衰老与 p16^{INK4a} 表达变化的影响, 为寻求延缓内皮细胞衰老途径提供理论和实验依据。**方法** 体外培养人脐静脉内皮细胞, 予血管紧张素 II 及 Valsartan 干预, 实验分为空白对照组、血管紧张素 II 诱导组及 Valsartan 组, 采用 β-半乳糖苷酶(β-gal) 染色鉴定细胞衰老; 流式细胞术分析细胞周期变化; 免疫细胞化学染色法、Western blot 分析各组细胞 p16^{INK4a} 蛋白的表达。**结果** 与对照组比较, 血管紧张素 II 诱导组 β-半乳糖苷酶阳性染色率显著增多 81.24% ± 6.46%, 细胞周期停滞于 G₀-G₁ (88.36% ± 6.45%), p16^{INK4a} 蛋白表达水平上调 (P < 0.05); 予以 Valsartan 干预后, β-半乳糖苷酶阳性细胞染色率减少, G₀-G₁ 细胞减少, p16^{INK4a} 蛋白表达水平下调 (P < 0.05)。**结论** 血管内皮细胞衰老分子机制可能通过下调 p16^{INK4a} 的表达, 使细胞周期停滞于 G₁ 期有关, Valsartan 对血管内皮细胞衰老有一定保护作用, 可能通过调控 p16^{INK4a} 的表达发挥其延缓 3 血管内皮细胞衰老的作用。

[中图分类号] R339.3

[文献标识码] A

Study on Valsartan Delaying Endothelial Cell Senescence and Gene Expression of p16^{INK4a}

SHAN Hai-Yan¹, BAI Xiao-Juan¹, Wang He-Zhi¹, and CHEN Xiang-Mei²

(1. Department of Gerontology, 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] Valsartan; Angiotensin II; Endothelial Cell; Vascular Aging; Cell Cycle; p16^{INK4a}

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the role of Valsartan on Angiotensin II (Ang II)-induced senescence of human umbilical endothelial cell senescence and gene expression of p16^{INK4a}. **Methods** HUVEC were cultured in vitro and intervened by Ang II (10⁻⁶ mol/L) and Valsartan (Ang II type 1 receptor blocker). HUVEC were divided into 3 groups, the control group, Ang II group, Valsartan group. β-gal staining was used to identify cell aging status. Flow cytometry was used for analyzing the cell cycle changes; The positive cell rate of p16^{INK4a} was detected by immunocytochemical staining, and the expressions of p16^{INK4a} protein were determined by Western blot. **Results** Compared with the control cells, the positive cell number of β-gal staining was significantly higher in Ang II-induced cells 81.24% ± 6.46%; the cell cycle was at G₀-G₁ 88.36% ± 6.45%. In Valsartan group, p16^{INK4a} protein expression decreased evidently (P < 0.05) compared to that in the Ang II group, which suggests that p16^{INK4a} activity plays an important role in regulating vascular endothelial cell senescence lifespan in vitro. **Conclusion** Cell Endothelial cell senescence is induced by Ang II. One of its molecular mechanisms might be associated with increasing the expression level of p16^{INK4a} in aging cell, and then up-regulating the amount of cells blocking in G₁ phase of cell cycle. Valsartan could antagonize the process effectively and delay endothelial cell aging significantly.

增龄是动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 发生 与发展的独立危险因素。血管衰老与 As 共享着某

[收稿日期] 2011-10-10

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81200245); 中华医学会临床医学科研专项资金-动脉粥样硬化研究资金资助 (09010530208); 辽宁省科学技术研究项目 (201202263); 沈阳市科学技术计划项目 (F10-205-1-44)

[作者简介] 单海燕, 副教授, 博士, 主要从事冠心病与心血管衰老的研究, E-mail 为 shanhy024@163.com。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。

些生化通路,带来相似的血管改变,而血管内皮细胞进行性衰老是 As 的病理生理机制之一,它在 As 形成之前就已经出现,并参与 As 形成的全过程是 As 始动因素^[1,2]。本研究拟利用血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 诱导人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) 衰老为模型,通过 Valsartan 处理 Ang II 诱导 HUVEC,观察 Valsartan 是否具有延缓内皮细胞衰老的作用,为探寻保护内皮细胞,防治血管衰老及 As 提供理论及实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

RPMI1640 培养基、胰蛋白酶、HEPES、L-谷氨酰胺 (Gibco 公司),人脐静脉内皮细胞株 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) (ATCC 公司),Valsartan、Ang II、兔抗人 p16^{INK4a} 单克隆抗体非免疫血清试剂 (Santa Cruz 公司)。

1.2 HUVEC 培养及实验分组

将 HUVEC 贴壁生长于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中,置于 5% CO₂、37℃ 培养箱中培养,2~3 天换液以维持良好生长状态。用 0.25% 胰蛋白酶进行消化、传代。待细胞长至亚融合时无血清培养 12 h,使细胞达到同步化。加入 Ang II (终浓度为 10⁻⁶ mol/L),持续刺激 48 h,第 12 小时、24 小时各补充 Ang II 一次即为 Ang II 诱导的 HUVEC 衰老模型。实验分组:对照组为不含 Ang II 的上述培养液培养 48 h;Ang II 组为 Ang II 诱导的 HUVEC 衰老模型组;Valsartan 组为加入 Valsartan 后 1 h 再加入 Ang II,第 12 小时、24 小时各补充 Ang II 一次,第 23 小时补充 Valsartan 一次,Valsartan 及 Ang II 的终浓度为 10⁻⁶ mol/L,持续刺激 48 h。

1.3 衰老细胞鉴定

β -半乳糖苷酶 (β -gal) 是一种可鉴定衰老细胞生物学标志物,按照 β -gal 染色试剂盒 (Sigma 公司) 说明书进行操作及相关试剂配置:用 PBS (pH 为 7.2) 清洗各组细胞,加入适量细胞固定工作液,用 PBS 清洗细胞 3 次,加入适量细胞固定工作液,在 37℃ 孵育 16 h,普通光学显微镜下观察,待出现细胞蓝染时,去除染色液,加入 PBS 后观察计数。每组标本随机选取视野,观察 1 000 个细胞,细胞质蓝染者为衰老细胞,计数衰老细胞占观察细胞总数的百分比。

1.4 细胞周期变化

每组细胞以 0.25% 胰蛋白酶消化,收集细胞,用预冷的磷酸盐缓冲液洗涤 2 次,调整细胞数至 1×10^9 个/L,逐滴加入预冷的 70% 乙醇固定,1 kr/min 离心,磷酸盐缓冲液洗 2 次后悬浮于 0.5 mL PBS 中,缓慢加入 5 mL 冷乙醇,4℃ 固定过夜。4℃ 过夜。次日,1 kr/min 离心,磷酸盐缓冲液洗涤,加入 0.5 mL 的碘化丙啶 (propidium iodide, PI 终浓度 50 mg/L),4℃ 避光反应 30 min。流式细胞仪分析检测;数据用 BD 公司提供的 Moldifit2.0 分析。

1.5 p16^{INK4a} 免疫细胞化学染色检测

将各组细胞分组干预后,细胞爬片,PBS 洗细胞,采用 SP 法进行免疫组化染色,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 p16^{INK4a} 染色阳性细胞进行统计,每张切片随机数 3 个视野,求出均值用表示,得出阳性细胞百分率。

1.6 Western blot 检测 p16^{INK4a} 蛋白水平

收集各组细胞,用冷 PBS 洗 2 次,加入预冷的含 1% 蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液充分裂解细胞,4℃,14 kr/min 离心 10 min,取上清分装,-20℃ 保存待用。根据 BCA 蛋白浓度定量试剂盒操作说明测定蛋白样品浓度,每个样品上样量为 20 μ L,蛋白经过 SDS-PAGE 凝胶电泳分离后至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉的 TBST 室温下缓慢摇动封闭 60 min,加入一抗 (兔抗人 p16^{INK4a}, 1:100) 在 4℃ 摇床孵育过夜, TBST 洗涤后,与二抗 (1:1000) 室温摇床孵育 0.5 h,常规洗膜化学发光试剂显色,AlphaImager 图象处理系统扫描测定感光区带平均积分吸光度。

1.7 统计学处理

计量结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,数据资料比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 衰老相关的 β -半乳糖苷酶 (β -gal) 染色

β -gal 是一种鉴别细胞衰老的生物学标志,在 Ph 值 6.0 条件下,随细胞老化,胞内产生的蓝色沉淀物也越多即染色阳性,产物也增多, β -gal 染色结果显示:对照组细胞几乎不表达 β -gal 蓝染细胞;Ang II 诱导组 β -gal 蓝染阳性细胞数明显增加,为 81.24% \pm 6.46%;Valsartan 组细胞 β -gal 染色阳性率明显低于 Ang II 诱导组,有统计学意义 ($P < 0.05$; 表 1)。

2.3 细胞周期分析

流式细胞仪分析显示对照组 HUVEC 的各期比例正常;Ang II 诱导组大部分 HUVEC 停滞于 G_0/G_1

期,S 期及 G_2/M 期趋于消失;Valsartan 组 S 期及 G_2/M 期细胞明显增多(表 1)。

表 1. 各组 HUVEC 的衰老指标比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Comparison of indices identifying cell aging status of HUVEC in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分 组	$G_0 \sim G_1$ Phase	$G_2 \sim M$ Phase	S Phase	β -gal staining
对照组	48.25% \pm 5.10%	20.46% \pm 2.24%	30.29% \pm 2.66%	0.16% \pm 0.02%
Ang II 诱导组 (10^{-6} mol/L)	88.36% \pm 6.45% ^b	3.18% \pm 0.33% ^b	7.56% \pm 0.42% ^b	81.24% \pm 6.46% ^b
Valsartan 组 (10^{-6} mol/L)	60.10% \pm 5.26% ^c	16.34% \pm 2.20% ^{bd}	24.46% \pm 3.10% ^{bd}	52.30% \pm 4.28% ^{ac}

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与 Ang II 组比较。

2.4 p16^{INK4a} 蛋白表达

与对照组比较,Ang II 诱导组 p16^{INK4a} 表达明显升高($P < 0.01$);与 Ang II 诱导组相比,Valsartan 组

p16^{INK4a} 表达降低 ($P < 0.05$),表明 Valsartan 可能通过下调 p16^{INK4a} 蛋白的表达延缓血管内皮细胞衰老(图 1 和图 2)。

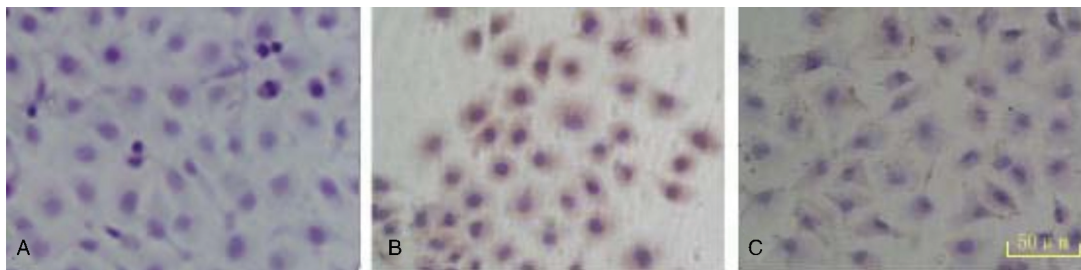


图 1. 各组 HUVEC 的 p16^{INK4a} 免疫细胞化学染色 (SP \times 40) A 为对照组, B 为 Ang II 诱导组, C 为 Valsartan 组。

Figure 1. p16^{INK4a} expression by immunocytochemical staining of HUVEC in each group (SP \times 40)

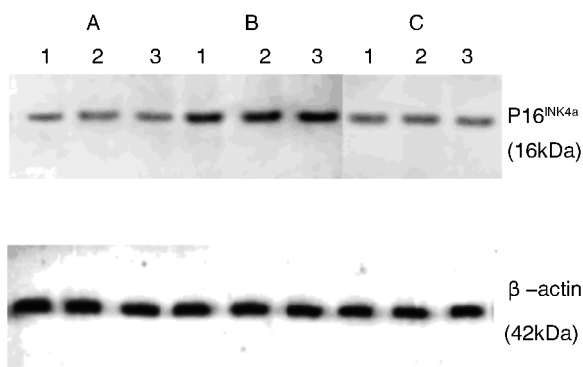


图 2. Western blot 分析各组 HUVEC p16^{INK4a} 蛋白表达 A 为对照组, B 为 Ang II 诱导组, C 为 Valsartan 组。

Figure 2 Western blot analysis of p16^{INK4a} protein expression of HUVEC in each group

3 讨论

人类迈入老年期后,随增龄与衰老相关的各种疾病如 As 的发生率也随之上升,而内皮细胞生物学改变是人类衰老和疾病的基础。血管内皮细胞衰

老与血管结构和功能改变密切相关^[2,5],目前认为血管内皮细胞的进行性衰老是 As 发生的始动阶段,其在 As 疾病的发病机制发挥重要作用^[6,7],因此,研究血管内皮细胞衰老的病理生理机制对动脉硬化等血管疾病的防治意义重大。

目前,肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS) 在血管衰老机制研究中逐渐被重视,体内外有关实验显示:衰老时心肌、血管等组织 Ang II 合成增加,受体密度上调,提示 Ang II 的作用与衰老可能有关^[8,9]。Ang II 信号级联反应随衰老增加,最终促进 As 的进展。本研究利用已建立 Ang II 诱导血管内皮细胞衰老模型^[4,6,8],探讨体外细胞复制衰老过程中 β -gal 染色、细胞周期、p16^{INK4a} 的变化及 Valsartan 对上述指标的影响。

细胞周期是细胞生命的活动中的基本过程,细胞衰老是细胞周期调控下多基因参与的复杂生理病理过程,具有一定的可控性。当培养细胞到它的寿命末期时,由于端粒长度不可避免地缩短,复制性衰老自然而然地发生。细胞衰老最显著的特征

是细胞在很长一段时间内仍维持代谢活性,但因阻滞于 G_1 期,失去了对有丝分裂原的反应和合成 DNA 的能力,不能进入 S 期,这与本研究结果相一致。在衰老内皮细胞中,其细胞周期蛋白、p16^{INK4a}、CDK 等发生量与活性的变化^[10]。而 Valsartan 可延缓血管内皮细胞衰老的改变,促进细胞进入增殖周期发生增殖,与 Ang II 诱导组比较,给予 Valsartan 处理后内皮细胞 β -gal 染色阳性率下降, $G_0 \sim G_1$ 期细胞的比例明显下降,而处于 S 期的细胞比例上升,细胞存活率增高,改善了内皮细胞衰老状态、促进内皮细胞增殖,提示 Valsartan 具有抗衰老作用,但其作用机制尚未明确。

抑癌基因 p16^{INK4a} 能在抑制细胞生长、促进细胞衰老方面发挥着重要的生物学作用^[10,11]。p16^{INK4a} 基因主要通过 p16^{INK4a}-cyclin/CKD-Rb 信号转导途径调控细胞周期,其是细胞周期调控的关键因子,一旦收到来自 p16^{INK4a} 途径的衰老信号后,p16^{INK4a} 蛋白就成为调控衰老过程的中心环节,停止增殖且发生一系列衰老形态和功能上的变化^[9-11]。本研究发现在对照组中,HUVECs 仅少量表达衰老相关基因 p16^{INK4a} 蛋白,而 Ang II 诱导组明显上调 p16^{INK4a} 蛋白表达含量;经 Valsartan 处理后,p16^{INK4a} 蛋白表达较 Ang II 诱导组明显下调。有研究显示,当细胞老化时,p16^{INK4a} 表达增高,屏蔽了 Cyclin-D1 与细胞周期蛋白依赖激酶 CKD4 结合,阻止 CDK4 激活,使靶蛋白 RB 保持非磷酸化,未磷酸化或低磷酸化的 RB 与转录因子 E2F-DP1 杂二聚体结合,抑制 E2F 启动 DNA 合成的作用,当 E2F 与 RB 结合时,屏蔽转录激活结构域,抑制了从 G_1 期进入 S 期所需的下游基因的表达,不能发挥其转录因子的作用,活性处于被抑制状态,造成生长停滞^[11,12]。本实验结果显示:予以 Valsartan 干预后,p16^{INK4a} 蛋白表达显著下降,延缓了细胞衰老进程,本研究提示:Valsartan 有可能通过抑制 p16^{INK4a} 信号途径延缓 HUVEC 衰老,但其延缓血管内皮细胞衰老作用是否与抑制 p16^{INK4a} 负调控元件相关,还有待于进一步的研究。

综上所述,p16^{INK4a} 信号途径在血管内皮细胞衰老中可能发挥着至关重要的作用,经 Valsartan 干预后可能通过降低 p16^{INK4a} 蛋白的表达延缓血管内皮细胞衰老,从而发挥抗 As 作用,这将为动脉硬化等内皮衰老相关疾病的诊治提供新的实验依据。

[参考文献]

- [1] 单海燕,刘姝,白小涓.血管紧张素 II 对血管内皮细胞凋亡及 p38 丝裂素活化蛋白激酶表达的影响[J].中国动脉硬化杂志,2011,19(1):13-17.
- [2] Najjar SS, Scuteric A, Lakatta EG. Arterial aging: Is it an immutable cardiovascular risk factor [J]? Hypertension, 2005, 46: 454-457.
- [3] Fukuyo Y, Takahashi A, Hara E, et al. E2FBP1 antagonizes the p16 (INK4A)-Rb tumor suppressor machinery for growth suppression and cellular senescence by regulating promyelocytic leukemia protein stability [J]. Int J Oral Sci, 2011, 3(4): 200-208.
- [4] Xia L, Wang XX, Hu XS, et al. Resveratrol reduces endothelial progenitor cells senescence through augmentation of telomerase activity by Akt-dependent mechanisms[J]. Br J Pharmacol, 2008, 155: 387-394.
- [5] 单海燕,白小涓,李效丽. ERK1/2 在 Ang II 诱导的血管内皮细胞凋亡中的表达及意义[J]. 中国医科大学学报, 2011, 40: 605-607.
- [6] Csiszar A, Wang M, Lakatta EG, et al. Inflammation and endothelial dysfunction during aging: role of NF-kappaB [J]. J Appl Physiol, 2008, 105: 1 333-341.
- [7] Wang XD, Chen XM, Wang JZ, et al. Signal transducers and activators of transcription 3 mediates up-regulation of angiotensin II-induced tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in cultured human senescent fibroblasts [J]. Chinese Med J, 2006, 119 (13): 1 094-102.
- [8] Zhu JH, Chen JZ, Wang XX, et al. Homocysteine accelerates senescence and reduces proliferation of endothelial progenitor cells[J]. J Mol Cell Cardiol, 2006, 40: 648-652.
- [9] Guney I, Wu S, Sedivy JM. Reduced c-Myc signaling triggers telomere-independent senescence by regulating Bmi-1 and p16 (INK4a) [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103 (10): 3 645-650.
- [10] Kong Y, Cui H, Zhang H. Smurf2-mediated ubiquitination and degradation of Id1 regulates p16 expression during senescence[J]. Aging Cell, 2011, 10(6): 1 038-046.
- [11] Prieur A, Besnard E, Babled A, et al. p53 and p16 (INK4A) independent induction of senescence by chromatin-dependent alteration of S-phase progression [J]. Nat Commun, 2011, 13 (2): 473.
- [12] Gong YH, Yue JP, Wu XD, et al. NSPc1 is a cell growth regulator that acts as a transcriptional repressor of p21Waf1/Cip1 via the RACE element [J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34(21): 6 158-169.

(此文编辑 李小玲)