

DNA 双链损伤修复机制在糖尿病致动脉粥样硬化中的作用研究

曾理^{1,2}, 丁群芳^{1△}, 许婷媛³, 罗方¹, 葛宁¹, 李诗彤⁴

1. 四川大学华西医院老年科(成都 610041); 2. 四川省医学科学院·四川省人民医院干部科(成都 610072);
3. 成都军区总医院老年科(成都 610083); 4. 南充市中心医院老年科(南充 637000)

【摘要】 目的 探讨 DNA 双链损伤修复机制在糖尿病致动脉粥样硬化中的作用。方法 将 Wistar 雄性大鼠随机分为 3 组,即正常对照组(A 组),主动脉内膜球囊损伤组(B 组),糖尿病模型+主动脉内膜球囊损伤组(C 组)。C 组采用链脲霉素(STZ)一次性腹腔注射建立糖尿病模型,注射 STZ 72 h 后,B 组与 C 组大鼠均被施行主动脉球囊损伤术,术后分别予以高脂饲料饲养;A 组予以基础饲养,每周监测血糖水平及体质量变化。分别于术后 2 周、4 周、6 周、8 周,取大鼠主动脉进行老化 β -半乳糖苷酶(SA- β -gal)染色、HE 染色,并计算主动脉内膜面积、中膜面积、内中膜面积比,免疫组织化学染色检测磷酸化共济失调毛细血管扩张突变基因(ATM)、磷酸化细胞周期检测点激酶 2(CHK2)、磷酸化 P53、磷酸化组蛋白 2A 变异体(γ -H2AX)的表达。结果 术后 2 周,A 组大鼠主动脉内膜老化 SA- β -gal 染色呈阴性,B 组和 C 组大鼠老化 SA- β -gal 染色阳性区域较少且散在分布;HE 染色示 B 组和 C 组大鼠主动脉内膜开始出现少量增生。术后 4 周,B 组和 C 组大鼠主动脉内膜老化 SA- β -gal 染色呈阳性;HE 染色示 C 组大鼠主动脉内膜增厚明显,主动脉内膜面积较 A 组和 B 组增加($P < 0.05$)。术后 6 周,C 组大鼠主动脉内膜老化 SA- β -gal 染色呈阳性且面积较 B 组增加;HE 染色示 C 组大鼠主动脉壁形成典型动脉粥样硬化斑块,斑块内平滑肌细胞排列紊乱,泡沫细胞聚集,管腔狭窄,与 A 组、B 组相比,主动脉内中膜面积比增加($P < 0.05$)。术后 8 周,C 组大鼠主动脉内膜老化染色阳性面积较 B 组增加;HE 染色示 C 组大鼠主动脉腔明显狭窄,增生部分突入管腔,内膜面积、内中膜面积比较 A 组和 B 组增加($P < 0.05$);免疫组化染色示 C 组大鼠主动脉内膜中 γ -H2AX、磷酸化 ATM、磷酸化 CHK2、磷酸化 P53 表达均呈阳性,上述蛋白在 B 组大鼠主动脉内膜中表达均呈弱阳性。结论 糖尿病状态下,血管内皮细胞衰老激活,DNA 双链损伤加剧,双链损伤修复机制参与了糖尿病致动脉粥样硬化的发生发展。

【关键词】 DNA 双链损伤修复机制 细胞衰老 糖尿病 动脉粥样硬化

The Role of DNA Double-strain Damage Repairing Mechanisms in Diabetic Atherosclerosis ZENG Li^{1,2}, DING Qun-fang^{1△}, XU Ting-yuan³, LUO Fang¹, GE Ning¹, LI Shi-tong⁴. 1. Department of Gerontology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Gerontology, Sichuan Academy of Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China; 3. Department of Gerontology, Chengdu Military General Hospital, Chengdu 610083, China; 4. Department of Gerontology, Nanchong Central Hospital, Nanchong 637000, China

△ Corresponding author, E-mail: dingqf2006@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To identify the role of DNA double-strain damage repairing pathway in the development of diabetics atherosclerosis. **Methods** Wistar male rats were randomly divided into three groups: control group (group A), balloon injury group (group B) and diabetes + balloon injury group (group C). Streptozotocin (STZ) was injected into rat abdomen to induce diabetes. After stabilizing high glucose, rats in group B and group C were both under aortic balloon injury technique and fed high lipid forage post-operatively. Glucose levels and weight were observed weekly. Segments of aorta of three groups were taken at 2, 4, 6 and 8 weeks, staining of senescent β -galactosidase (SA- β -gal) staining, HE and changes of aorta under light microscope were observed. The area of tunica intima (I) and tunica media (M) in aorta was measured, and their ratio (I/M) were analyzed. Expressions of gamma-histone family 2A variant (γ -H2AX), phosphorylated ataxia telangiectasia mutated (ATM), phosphorylated checkpoint kinases 2 (CHK2) and phosphorylated P53 were detected by immunohistochemical staining. **Results** SA- β -gal staining positive areas were dotted around in group B and group C but not in group A at two weeks. At the same time, a slight hyperplasia of aortic neointima was observed in HE

staining of group B and group C. SA- β -gal staining was positive scattered within the tunica intima of aorta of group B and group C at four weeks, and HE staining prompted a significantly greater of aortic neointima in the group C than that in the other two group ($P < 0.05$). Positive regions of SA- β -gal staining were more in group C than group B at six weeks. Typical atherosclerotic plaques were formed, vascular smooth muscle cells were disordered arranged and foam cells were aggregated in the plaques of group C at six weeks post-operatively, and intimal membrane areas increased than group A and group B ($P < 0.05$). At 8 weeks, SA- β -gal positive areas in group C were greater than in group B. The arteriolar wall was markedly thickened and the lumen was narrowed. The area of intimal membrane and the I/M ratio were significantly greater in group C than those in group A and group B ($P < 0.05$). Positive expressed of γ -H2AX, phosphorylated ATM, phosphorylated CHK2 and phosphorylated P53 were observed in typical atherosclerotic foci of group C, and weaker expressed in group B. **Conclusion** Cellular senescence of vascular endothelium is triggered and DNA double-strain damage is increased in diabetes. The DNA double-strain damage repairing machines may participate in the development of diabetic atherosclerosis.

【Key words】 DNA double-strain damage repairing mechanisms Cellular senescence Diabetes Atherosclerosis

动脉粥样硬化是一种衰老相关的疾病^[1],在动脉粥样硬化斑块中已发现细胞分裂减慢、细胞周期停滞、DNA 损伤、端粒缩短及功能失调等细胞衰老的证据^[2-4]。研究发现细胞衰老的众多机制中,DNA 双链损伤修复机制可能参与了动脉粥样硬化的发生^[5]。

糖尿病患者动脉粥样硬化的发生率及由此造成的死亡率逐年增加^[6-10]。糖尿病状态下 DNA 损伤增加^[11]。LEE 等^[12]发现糖尿病模型组大鼠淋巴细胞及肝脏组织彗星尾长、尾矩及尾部 DNA 片段的百分比显著增加。本课题组前期研究发现,在不同糖浓度(5.5、11、22、33 mmol/L)条件下培养人脐静脉内皮细胞 72 h 后,随糖浓度的增加,细胞增大扁平,老化 β -半乳糖苷酶(SA- β -gal)染色阳性细胞比例增加,且磷酸化组蛋白 2A 变异体(γ -H2AX)和磷酸化 P53 表达增加^[5]。上述结果提示,高糖及糖尿病本身存在 DNA 损伤增加及 DNA 双链损伤修复机制下游的 P53 蛋白高表达的现象。但是在糖尿病动脉粥样硬化斑块中,该机制是否参与加速动脉粥样硬化斑块的发展尚不清楚。因此,本研究通过建立糖尿病大鼠模型,探讨 DNA 双链损伤修复机制是否加速糖尿病致动脉粥样硬化斑块的发生发展。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂和仪器

Wistar 雄性大鼠购自四川大学实验动物中心。球囊导管(Fogarty 12060 2F),链脲霉素(STZ, Sigma),SA- β -gal 试剂盒(碧云天), γ -H2AX 抗体(Abcam),磷酸化 P53 抗体、磷酸化共济失调毛细

血管扩张突变基因(ATM)抗体、磷酸化细胞周期检测点激酶 2(CHK2)抗体(Cell signaling),电子显微镜(Olympus CX41)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 选择周龄为 8~10 周的 Wistar 雄性大鼠,体质量为 200~300 g,随机分为 A 组、B 组、C 组,均予基础饲料饲养 1 周。B 组和 C 组大鼠行颈动脉球囊损伤术后予以高脂饲料饲养。大鼠基础饲料主要营养素比例(质量分数):玉米 73.5%,小麦 20%,鱼粉 5%,谷粉 1%,氯化钠 0.5%。高脂饲料配方(质量分数):83.25%基础饲料,15%猪油,1.25%胆固醇,0.5%胆酸钠。

A 组:正常对照组($n=25$),予以基础饲料饲养;B 组:主动脉内膜球囊损伤组($n=25$),行主动脉球囊损伤术,术后予以高脂饮食饲养;C 组:糖尿病模型+主动脉球内膜囊损伤组($n=50$),先建立糖尿病模型,模型成功者行主动脉球囊损伤术,术后予以高脂饮食饲养。

1.2.2 糖尿病模型的建立 基础饲料饲养 1 周后,先将 3 组大鼠禁食不禁水 12 h,注射前称量大鼠空腹体质量。然后配制 STZ,因 STZ 极易分解,该过程应保持避光和冰浴。将 STZ 粉末充分溶解于柠檬酸缓冲溶剂中(STZ 体积分数为 1%),将 C 组大鼠按空腹体质量以 65 mg/kg 的剂量一次性腹腔内注射 STZ,控制在 30 min 内注射完毕。A 组及 B 组大鼠按空腹体质量以 65 mg/kg 给予柠檬酸缓冲液一次性腹腔内注射。注射后 3 组大鼠立即恢复正常饮食及供水,72 h 后经尾静脉采血测血糖,血糖 ≥ 16.7 mmol/L 者定为糖尿病模型成功,此后每两周进行尾静脉采血检测大鼠血糖水平。

1.2.3 主动脉球囊损伤术 注射 STZ 后 72 h,对 C 组及 B 组大鼠进行主动脉球囊损伤术操作。10% 水合氯醛按 0.35 mL/100 g 的剂量腹腔内注射,待大鼠充分麻醉后,在解剖显微镜下切开约 2 cm 的颈正中切口,逐层钝性分离组织,充分暴露左侧颈总动脉,结扎左侧颈总动脉近端,并用止血钳夹闭颈动脉远端后,用显微剪剪开中间段的血管,自开口处插入 2F 球囊导管后,去掉止血钳,将导管缓慢进入主动脉约 20 cm。导管末端接微量注射器,排出空气后,在球囊中注入少量生理盐水,压力维持在 81.04~141.82 kPa 以导管在血管内回拉有明显阻力为准。最后用球囊反复摩擦自胸主动脉到髂总动脉的全段血管 3 次,完成后拔出导管,逐层缝合,术在大鼠腿部肌肉处注射青霉素 3 d,预防感染。

1.2.4 标本的获取 A 组、B 组和 C 组大鼠分别在手术后 2 周(各组分别处死 5 只)、4 周(A 组处死 7 只,B 组处死 5 只,C 组处死 4 只)、6 周(A 组处死 7 只,B 组处死 6 只,C 组处死 5 只)、8 周(A 组处死 6 只,B 组处死 5 只,C 组处死 6 只)处死。以水合氯醛充分麻醉大鼠后,先进行心脏取血,采血管中加入肝素抗凝,在 4 °C 以 3 500 r/min 离心 15 min 后,分离出血浆,保存于 -80 °C。将主动脉弓至髂总动脉全段取出,以生理盐水清洗,取中段血管,经液氮速冻后转入 -80 °C 长期保存,检测时取出。

1.2.5 SA- β -gal 染色 将血管标本取出解冻后,行老化 SA- β -gal 染色。染色时临时配制 SA- β -gal 染色液。加入适当体积的 SA- β -gal 染色固定液,充分盖住血管,室温固定 15 min 后用 PBS 浸泡洗涤血管 3 次,然后充分吸除 PBS,加入临时配好的 SA- β -gal 染色液 1 mL,充分覆盖血管,并用保鲜膜密封防止染色液蒸发,于 37 °C 恒温孵育过夜后,以 PBS 置换出染液,停止染色进行观察,照相。

1.2.6 HE 染色 完成 SA- β -gal 染色的血管,以体积分数为 4% 的中性甲醛固定 24 h,固定好后经流水冲洗过夜,常规脱水、固定、透明,石蜡浸泡,包埋。以切片机制成 5 μ m 厚的连续切片,盖片后,70 °C 温箱烤片 2 h,行 HE 染色,完成 HE 染色后在光学显微镜下观察血管形态改变并拍照。应用 DP2-BSW-E-V2.2 专业图像分析软件计算主动脉内膜面积(I)和中膜面积(M),并计算内中膜面积比(I/M)。

1.2.7 免疫组织化学染色 将石蜡切片予以过氧化氢处理。阻断非特异性的抗体结合部位后,将切片分别滴加磷酸化 ATM 抗体(1 : 1 000)、磷酸化

CHK2 抗体(1 : 200)、磷酸化 P53 抗体(1 : 150)、 γ -H2AX 抗体(1 : 5 000)后,于镜下观察。对术后 8 周各组大鼠的主动脉内膜组织采用半定量评分方法^[13],光学显微镜下观察结果(放大倍数为 400 倍),观察至少 5 个视野,根据染色阳性细胞比例分为 5 个等级:0 分,<5%;1 分,5%~25%;2 分,26%~50%;3 分,51%~75%;4 分,>75%;根据染色强度分为 3 个等级:1 分,弱;2 分,中;3 分,强。细胞染色阳性比例得分乘以染色强度得分为每张切片的加权得分,切片加权得分<1 为染色阴性, \geq 1 为染色阳性。

1.3 统计学方法

计量结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Student-Newman-Keuls 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

实验过程中,A 组大鼠无死亡,B 组大鼠死亡 4 只(手术操作死亡 2 只,麻醉死亡 2 只),由于 C 组大鼠是双造模,死亡率较高,共死亡 30 只(糖尿病模型未成功 2 只,手术操作失误 6 只,麻醉过量 4 只,饲养过程中感染死亡 18 只)。

2.1 3 组大鼠术后一般资料的比较

结果见表 1。术后 2 周,C 组大鼠平均体质量较 A 组和 B 组大鼠降低($P < 0.05$)。术后 4 周、6 周及 8 周 C 组大鼠体质量较 2 周时缓慢增加,但与同期 A、B 组大鼠体质量对比均降低($P < 0.01$)。C 组 4 个阶段平均血糖水平波动在 23~32 mmol/L,与同期 A、B 组大鼠对比均增高($P < 0.01$)。

2.2 SA- β -gal 染色结果

结果见图 1。A 组大鼠主动脉内膜老化 SA- β -gal 染色呈阴性。B 组大鼠主动脉内膜老化 SA- β -gal 染色呈阳性,其中 2 周和 4 周主动脉内膜老化 SA- β -gal 染色阳性区域较少且散在分布,而 6 周及 8 周主动脉内膜老化 SA- β -gal 染色阳性面积明显增加。C 组大鼠主动脉内膜老化 SA- β -gal 染色呈阳性,其中 6 周及 8 周主动脉内膜老化 SA- β -gal 染色阳性面积较 B 组明显增加,同时,8 周的主动脉内膜可见血栓的脂质条纹形成。

2.3 HE 染色结果

结果见图 2、表 2。A 组在各个不同时间段,主动脉壁各层结构清楚完整,内膜光滑连续,细胞排列整齐。B 组于手术 2 周后出现主动脉内皮不完整,

表 1 3 组大鼠体重及血糖水平比较
Table 1 Body mass and blood glucose levels of rats in three groups

Time	Group A (n=25)		Group B (n=21)		Group C (n=20)	
	Body mass/g	Glucose/(mmol/L)	Body mass/g	Glucose/(mmol/L)	Body mass/g	Glucose/(mmol/L)
2 weeks	245.00±20.36*	5.92±0.43*	245.80±13.43*	6.02±0.50*	213.00±26.34	23.43±5.49
4 weeks	283.60±12.52*	5.72±0.66*	276.00±23.58*	6.70±0.61*	227.50±21.12	27.43±7.22
6 weeks	387.75±14.52*	4.33±0.55*	380.20±37.23*	4.90±1.00*	239.00±31.29	31.83±1.50
8 weeks	414.00±12.77*	6.43±1.11*	401.00±18.82*	5.55±2.05*	250.00±10.00	25.50±8.22

* P<0.05, vs. group C at the same time point

内皮细胞部分消失,少量增生;术后 6 周,I/M 较 A 组增加(P<0.05),术后 8 周,主动脉腔明显狭窄,增生部分突入管腔,内膜面积、I/M 较 A 组增加(P<0.05)。C 组于术后 2 周少量内膜增生,4 周内膜开始出现显著增生,内膜面积、I/M 较 A 组增加(P<0.05);术后 6 周和 8 周,内膜面积、I/M 较 A、B 组均增加(P<0.05)。

2.4 DNA 双链损伤修复机制相关蛋白在大鼠主动脉内膜中的表达

术后 2 周、4 周 3 组大鼠动脉内膜未见明显蛋白表达。术后 6 周,C 组大鼠动脉内膜 γ -H2AX、磷酸化 ATM 和磷酸化 P53 呈弱阳性,A 组、B 组大鼠未见明显蛋白表达。术后 8 周 C 组大鼠动脉内膜 γ -H2AX、磷酸化 ATM 和磷酸化 P53 核表达呈强阳性,磷酸化 CHK2 表达呈弱阳性;B 组大鼠动脉内膜上述蛋白表达均呈弱阳性;A 组大鼠动脉内膜未见明显上述蛋白的表达。见图 3。半定量评分结果(表 3)显示,术后 8 周 C 组大鼠动脉

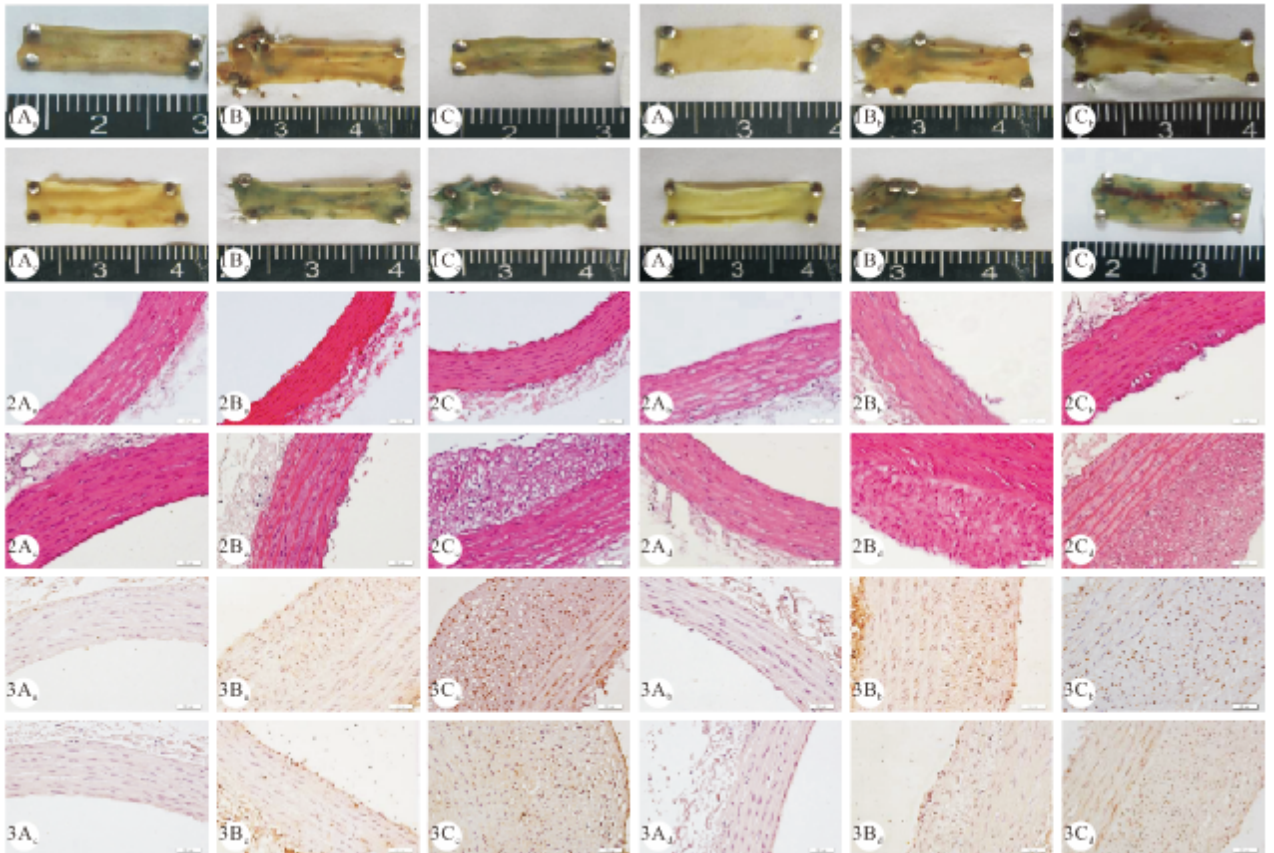


图 1 大鼠主动脉内膜老化 SA-β-gal 染色 图 2 大鼠主动脉内膜 HE 染色结果。×400 图 3 术后 8 周 3 组大鼠主动脉内膜免疫组织化学染色结果。SABC ×400

Fig 1 SA-β-gal staining in tunica intima of aorta in rats Fig 2 HE staining in tunica intima of aorta in rats. ×400 Fig 3 Immunohistochemical staining in tunica intima of aorta in rats 8 weeks after operation. SABC ×400

A: Group A (control); B: Group B; C: Group C; 1a,2a: 2 weeks; 1b,2b: 4 weeks; 1c,2c: 6 weeks; 1d,2d: 8 weeks; 3a: γ -H2AX; 3b: Phosphorylated ATM; 3c: Phosphorylated CHK2; 3d: Phosphorylated P53

表 2 3 组大鼠主动脉内膜面积和 I/M 的比较

Table 2 The area of tunica intima in aorta and I/M ratio in rats

Time	Group A (n=25)		Group B (n=21)		Group C (n=20)	
	I/mm ²	I/M	I/mm ²	I/M	I/mm ²	I/M
2 weeks	0.008±0.001	0.054±0.030	0.010±0.001	0.070±0.012	0.009±0.001	0.079±0.015
4 weeks	0.009±0.001	0.070±0.007	0.012±0.002	0.082±0.014	0.012±0.002 [#]	0.100±0.010 [*]
6 weeks	0.009±0.002	0.060±0.009	0.012±0.001	0.090±0.004 [*]	0.041±0.002 ^{#,▲}	0.290±0.014 ^{*,◇}
8 weeks	0.008±0.001	0.060±0.006	0.060±0.005 [#]	0.300±0.040 [*]	0.219±0.020 ^{#,▲}	0.950±0.030 ^{*,◇}

I: Intimal membrane area; I/M: Intimal area to media area ratio. [#]*P*<0.05, vs. I of group A at the same time point; ^{*}*P*<0.05, vs. I/M of group A at the same time point; [▲]*P*<0.05, vs. I of group B at the same time point; [◇]*P*<0.05, vs. I/M of group B at the same time point

表 3 术后 8 周 B 组和 C 组大鼠主动脉内膜免疫组化指标评分

Table 3 Scoring of immunohistochemistry indexes in group B and group C

Index	n	Score	<i>P</i>
Phosphorylated ATM			0.00
Group B	21	6.81±1.69	
Group C	20	10.82±1.52	
Phosphorylated P53			0.00
Group B	21	6.33±1.71	
Group C	20	10.40±2.23	
Phosphorylated CHK2			0.00
Group B	21	4.90±1.57	
Group C	20	8.47±1.85	
γ-H2AX			0.00
Group B	21	6.57±2.03	
Group C	20	9.73±2.43	

内膜 γ-H2AX、磷酸化 ATM、磷酸化 P53 和磷酸化 CHK2 蛋白表达高于 B 组 (*P*<0.05), A 组大鼠上述蛋白表达评分均为 0 分。

3 讨论

动脉粥样硬化被认为是与衰老相关的疾病。经球囊损伤术损伤的兔颈动脉粥样硬化斑块中, 老化 SA-β-gal 染色呈阳性^[14], 冠心病患者冠状动脉粥样硬化斑块老化 SA-β-gal 染色亦呈阳性^[15]。来源于动脉粥样硬化斑块中的细胞与自然衰老的细胞有着许多共同特征, 包括细胞衰老标志物的表达、细胞功能失调、端粒缩短等, 更进一步证实细胞衰老的存在^[16]。本研究中, 糖尿病导致细胞衰老加速, 并随动脉粥样硬化斑块的成熟细胞老化染色表达增加。在糖尿病状态下, 细胞衰老的加速, 可能是动脉粥样硬化加速发展的机制。

电离辐射、化疗药物、内源性活性氧及外界刺激可以导致各种不同类型的 DNA 损伤, 从而出现细胞周期停滞、细胞衰老的一系列表现, 这种由于 DNA 损伤所导致的细胞衰老称之为应激性早衰^[8]。一旦 DNA 发生损伤, 将激活一连串蛋白对其进行感知, 从而使细胞周期停滞以便进行 DNA 修复^[17]。ATM 主要对 DNA 双链损伤进行感知, 并发生 Ser1981 部位的自身磷酸化^[18-19]。ATM 作为 DNA 双链损伤修复机制的核心, 自身磷酸化后将活化其下游的多种蛋白, 其中包括 H2AX, 它是

H2A 组蛋白家族成员之一。DNA 双链损伤后, H2AX 发生 Ser139 部位的快速磷酸化形成 γ-H2AX。γ-H2AX 是反映 DNA 双链损伤的特殊标记物^[20]。ATM 继续激活远端的 CHK2, 进一步激活多种与 DNA 修复、转录和细胞周期循环进展相关的蛋白, 如 P53 蛋白等^[5]。CHK2 和下游的 P53 磷酸化后使细胞周期停顿, 以便于 DNA 修复, 一旦完成 DNA 修复, 细胞周期可以重新建立, 若不能修复 DNA 损伤则可导致细胞衰老或凋亡^[21-22]。本研究中糖尿病大鼠动脉粥样硬化斑块中 DNA 双链损伤修复路径相关信号分子 γ-H2AX、磷酸化 ATM、磷酸化 CHK2、磷酸化 P53 表达均较非糖尿病大鼠(正常对照组和主动脉内膜球囊损伤组)增加。本课题组前期研究^[5]发现, 在高糖下培养人脐静脉内皮细胞, 随着糖浓度的增加, 细胞衰老增加, γ-H2AX 和磷酸化 P53、磷酸化 CHK2 表达增加, 加入 ATM 抑制剂后, 磷酸化 P53 和磷酸化 CHK2 表达减少, 细胞衰老减轻。这说明高糖状态下 DNA 双链损伤修复机制 ATM-CHK2-P53 通路参与细胞衰老加速。根据上述结果可以推测, 持续不可修复的 DNA 双链损伤激发 DNA 双链损伤修复机制的 ATM-CHK2-P53 路径, 对细胞周期进行调节导致细胞衰老增加, 可能是糖尿病状态下, 动脉粥样硬化加速发展的原因。

糖尿病状态下加速 DNA 双链损伤及 DNA 双链损伤修复机制表达的原因目前尚未完全弄清。但是, 本课题组前期实验^[5]中发现, 与正常对照组相比, 随着糖浓度升高, 在衰老细胞增加的同时, 伴随着 NO 浓度水平下降及活性氧水平增加。说明高糖可能通过氧化应激加速 DNA 双链损伤, 激活 DNA 双链损伤修复机制相关蛋白表达。将大鼠视网膜毛细血管上皮细胞分别在低糖浓度(5.5 mmol/L)和高糖浓度(25 mmol/L)下培养 5 d, 高糖浓度下, DNA 损伤、细胞衰老及氧化应激显著增加^[23]。2 型糖尿病患者 DNA 损伤增加, 血糖控制不良的患者尤为明显, 且 DNA 损伤水平与 NO 水平及尿中蛋白水平相关^[24]。2 型糖尿病患者尿液中 8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)的量明显增加, 8-OHdG 是氧化

DNA 损伤的标记物,同时也是 DNA 单链损伤的重要标记物^[25-26]。2 型糖尿病患者中还原型谷胱甘肽水平下降,氧化 DNA 损伤水平也增加^[27]。说明糖尿病状态下,患者体内 DNA 损伤增加,往往伴有氧化应激水平升高。可以推测糖尿病状态下,动脉粥样硬化斑块中 DNA 双链损伤增加,引起细胞衰老的原因可能与代谢异常状态下氧化应激水平增加有关。本研究通过建立糖尿病大鼠动脉粥样硬化模型,在动脉粥样硬化斑块中找到细胞衰老和 DNA 双链损伤修复机制参与的直接证据。由于时间关系,对 DNA 双链损伤修复通路的干预实验尚未完成,对糖尿病状态下修复路径的干预,有可能为延缓糖尿病患者动脉粥样硬化的发生提供新的思路。

综上,糖尿病状态加速动脉粥样硬化的发生发展;细胞衰老参与了此过程,且早于动脉粥样硬化的出现;DNA 损伤修复机制是细胞衰老机制的重要组成部分,参与糖尿病状态下细胞衰老的加速;并由此推动动脉粥样硬化的发生发展。

参 考 文 献

[1] WANG IC, BENNETT M. Aging and atherosclerosis mechanisms, functional consequences, and potential therapeutics for cellular senescence. *Circ Res*,2012,111(2): 245-259.

[2] BOLTON E, RAJKUMAR C. The ageing cardiovascular system. *Rev Clinical Gerontol*,2010,21(2):99-109.

[3] MARTINET W, KNAAPEN MW, DE MEYER GR, *et al*. Elevated levels of oxidative DNA damage and DNA repair enzymes in human atherosclerotic plaques. *Circulation*,2002, 106(8):927-932.

[4] MATTHEWS C, GORENNE I, SCOTT S, *et al*. Vascular smooth muscle cells undergo telomere-based senescence in human atherosclerosis: effects of telomerase and oxidative stress. *Circ Res*,2006,99(2):156-164.

[5] 许婷媛,丁群芳,王朝辉,等. DNA 双链损伤修复机制在高糖诱导的内皮细胞衰老中的作用研究. *四川大学学报(医学版)*,2011,42(2):190-193.

[6] BECKMAN JA, LIBBY P, CREAGER MA. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology pathophysiology, and management. *JAMA*,2002,187(19):2570-2581.

[7] KIM JA, MONTAGNANI M, KOH KK, *et al*. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation*,2006,113(15):1888-1904.

[8] BAKKER W, ERINGA EC, SIPKEMA P, *et al*. Endothelial dysfunction and diabetes: roles of hyperglycemia, impaired insulin signaling and obesity. *Cell Tissue Res*,2009,335(1): 165-189.

[9] CALLES-ESCANDON J, CIPOLLA M. Diabetes and endothelial dysfunction: a clinical perspective. *Endocr Rev*, 2001,22(1):36-52.

[10] FAIENZA MF, ACQUAFREDDA A, TESSEI R, *et al*. Risk factors for subclinical atherosclerosis in diabetic and obese children. *Int J Med Sci*,2013,10(3):338-343.

[11] LEE SC, CHAN JC. Evidence for DNA damage as a biological link between diabetes and cancer. *Chin Med J*

(Engl),2015,28(11):1543-1548.

[12] LEE HJ, KANG MH. Effect of the magnetized water supplementation on blood glucose, lymphocyte DNA damage, antioxidant status, and lipid profiles in STZ-induced rats. *Nutr Res Pract*,2013,7(1):34-42.

[13] TANAKA K, IWAMOTO S, GON G, *et al*. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin Cancer Res*,2000,6(1):127-134.

[14] VASILE E, TOMITA Y, BROWN LF, *et al*. Differential expression of thymosin beta-10 by early passage and senescent vascular endothelium is modulated by VPF/VEGF: evidence for senescent endothelial cells *in vivo* at sites of atherosclerosis. *FASEB J*,2001,15(2):458-466.

[15] VOGHEL G, THORIN-TRESCASES N, FARHAT N, *et al*. Cellular senescence in endothelial cells from atherosclerotic patients is accelerated by oxidative stress associated with cardiovascular risk factors. *Mech Ageing Dev*,2007,128(11/12):662-671.

[16] WANG JC, BENNETT M. Aging and atherosclerosis mechanisms, functional consequences, and potential therapeutics for cellular senescence. *Circ Res*,2012,111(2): 245-259.

[17] MAHMOUDI M, GORENNE I, MERCER J, *et al*. Statins use a novel Nijmegen breakage syndrome-1-dependent pathway to accelerate DNA repair in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*,2008,103(7):717-725.

[18] LEE JH, PAULL TT. ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad 50-Nbs1 complex. *Science*,2005,308(5721):551-554.

[19] FALCK J, COATES J, JACKSON SP. Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature*,2005,434(7033):605-611.

[20] FERREIRA RF, SOUZA DR, SOUZA AS. Factors that Induce DNA Damage Involving Histone H2AX Phosphorylation. *Radiology*,2015,277(1):307-308.

[21] SHILOH Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer*,2003,3(3):155-168.

[22] STUCKI M, JACKSON SP. GammaH2AX and MDC1: anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes. *DNA Repair (Amst)*,2006,5(5):534-543.

[23] DEVI TS, HOSOYA K, TERASAKI T, *et al*. Critical role of TXNIP in oxidative stress, DNA damage and retinal pericyte apoptosis under high glucose: implications for diabetic retinopathy. *Exp Cell Res*,2013,319(7):1001-1012.

[24] TATSCH E, BOCHI GV, PIVA SJ, *et al*. Association between DNA strand breakage and oxidative, inflammatory and endothelial biomarkers in type 2 diabetes. *Mutat Res*, 2012,732(1/2):16-20.

[25] DONG QY, CUI Y, CHEN L, *et al*. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine levels in diabetic retinopathy patients. *Eur J Ophthalmol*,2008,18(1):94-98.

[26] VALAVANIDIS A, VLACHOGIANNI T, FIOTAKIS C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): a critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*,2009,27(2): 120-139.

[27] ROBERTSON P, HARMON J, TRAN PO, *et al*. Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes*,2003,52(3): 581-587.

(2016-01-31 收稿,2016-11-10 修回)

编辑 余琳