

• 论著 •

促红细胞生成素预防人脐静脉内皮细胞凋亡的作用

杨小芳 熊建文 王志禄 李伊 许哲通 崔丽君 王锋 谈丽丽 张丽

【摘要】 目的 建立氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导培养人脐静脉内皮细胞(HUVECs)凋亡模型,探讨促红细胞生成素(EPO)对 ox-LDL 诱导 HUVECs 凋亡的影响。方法 取体外培养 3~6 代的 HUVECs 用于实验。实验分为两组:一组细胞予以不同浓度(6.25、50、100 kU/L)重组人促红细胞生成素(rhEPO)预处理 24 h,再加入 100 mg/L ox-LDL 孵育 48 h;另一组细胞加入反式或顺式 LOX-1 mRNA 预处理 24 h,再加入 100 mg/L 的 ox-LDL 孵育 12 h。采用存活率、凋亡率和 Bcl-2/Bax 比值评价细胞凋亡情况。结果 与 ox-LDL 组比较,随 rhEPO 浓度的递增,细胞存活率增高,细胞凋亡率降低,凋亡蛋白 Bcl-2/Bax 比值增高($P < 0.05$),呈剂量依赖性。反式 LOX-1 mRNA(0.5 $\mu\text{mol/L}$)预处理组凋亡蛋白 Bcl-2/Bax 比值较 ox-LDL 组明显增高($P < 0.05$);顺式 LOX-1 mRNA(0.5 $\mu\text{mol/L}$)预处理组 Bcl-2/Bax 比值与 ox-LDL 组则无明显差异。结论 ox-LDL 可以诱导 HUVECs 凋亡,并且通过 LOX-1 mRNA 来调节,rhEPO 可增高 Bcl-2/Bax 比值,抑制 ox-LDL 诱导的 HUVECs 凋亡。

【关键词】 促红细胞生成素; 内皮细胞; 凋亡; 氧化低密度脂蛋白

Mechanism of inhibition of apoptosis of human umbilical vein endothelial cells induced by oxidized-low density lipoprotein by erythropoietin YANG Xiao-fang, XIONG Jian-wen, WANG Zhi-lu, LI Yan, XU Zhe-tong, CUI Li-jun, WANG Feng, TAN Li-li, ZHANG Li. Department of Cardiology, First Hospital of Lanzhou University, Key Lab of Preclinical Study for New Drugs of Gansu Province, Lanzhou 730000, Gansu, China

Corresponding author: WANG Zhi-lu, Email: wangzhilu@medmail.com.cn

【Abstract】 **Objective** To explore the protective effect of erythropoietin (EPO) against oxidized-low density lipoprotein (ox-LDL)-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) in an ox-LDL induced apoptosis model. **Methods** Third - sixth passage of cultured HUVECs were used, and they were divided into two groups. The cells were pretreated with different concentrations (6.25, 50, 100 kU/L) of recombinant human erythropoietin (rhEPO) for 24 hours, then they were exposed to ox-LDL (100 mg/L) for 48 hours; another group of cells were pretreated with antisense to 0.5 $\mu\text{mol/L}$ LOX-1 mRNA or 0.5 $\mu\text{mol/L}$ sense for 24 hours, and then HUVECs were exposed to ox-LDL (100 mg/L) for 12 hours. Apoptosis was assessed by the apoptosis ratio, cell viability, and Bcl-2/Bax ratio. **Results** As compared to untreated controls, pretreatment with rhEPO led to increased cell survival of HUVECs and decreased cell apoptosis in a dose-dependent manner (all $P < 0.05$). Consistently, the Bcl-2/Bax ratios were also increased in a similar fashion. The ratio of apoptosis protein Bcl-2/Bax was increased in the antisense LOX-1 mRNA group than that of ox-LDL group ($P < 0.05$), but the one in the sense LOX-1 mRNA group was not significantly different from that of ox-LDL group. **Conclusion** The ox-LDL can induce apoptosis in HUVECs by regulating LOX-1 mRNA, and rhEPO can increase Bcl-2/Bax ratio and inhibit ox-LDL-induced apoptosis of HUVECs.

【Key words】 erythropoietin; endothelial cell; apoptosis; oxidized-low density lipoprotein

当机体处于缺氧状态时,促红细胞生成素(EPO)可以由低氧诱导因子(HIF)家族诱导产生,EPO 是一种多功能细胞因子超家族成员,不仅存在于血液系统,还存在于人体的其他组织。低氧可促进 EPO 在海马 CA1 和 CA3 区的表达^[1]。急性低氧能刺激肝、肾组织内 EPO 基因表达;而间断低氧习服

的大鼠耐受低氧能力明显增强,肝、肾组织内 EPO 基因表达水平可恢复到常氧对照组水平^[2]。低密度脂蛋白(LDL)在动脉壁内皮下层被氧化为氧化低密度脂蛋白(ox-LDL),成为主要的损伤性产物,它可引起很多组织和细胞的凋亡,包括人类冠状动脉内皮细胞(HCAECs)、平滑肌细胞和巨噬细胞。ox-LDL被认为参与了动脉粥样硬化(AS)的发生发展。EPO 与促红细胞生成素受体(EPO-R)结合后通过一系列信号转导途径减少细胞凋亡,提高细胞的生存率。本研究中将对 EPO 抗 ox-LDL 诱导人脐静脉内皮细胞(HUVECs)凋亡的作用机制进行深入

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2009.11.006

基金项目:甘肃省新药临床前研究重点实验室开放基金项目(GSKFCT-0707);兰州大学医学科研基金项目(820726)

作者单位:730000 甘肃,兰州大学第一医院心内科,甘肃省新药临床前研究重点实验室

通信作者:王志禄,Email: wangzhilu@medmail.com.cn

研究,为 AS 的预防及治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 HUVECs 的培养及鉴定:取分娩即刻的新生儿脐带,CO₂ 孵育箱中孵育,吸出含大量内皮细胞的液体,离心弃上清,调整细胞密度至 $2 \times 10^5/\text{ml}$ 后再培养,约 80% 融合时传代,进入对数生长期的细胞可用于研究。

1.2 细胞分组:第一部分实验分为空白对照组(细胞悬液);ox-LDL 对照组(细菌悬液 + 100 ml ox-LDL 处理 48 h);低、中、高浓度 rhEPO 处理组(细胞悬液 + 6.25、25 或 100 kU/L rhEPO 孵育 24 h + 100 mg/L ox-LDL 处理 48 h)。第二部分实验分为空白对照组(细胞悬液);ox-LDL 对照组(细胞悬液 + 100 mg/L ox-LDL 处理 48 h);顺式 LOX-1 mRNA 组(细胞悬液 + 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 顺式 LOX-mRNA 孵育 24 h + 100 mg/L ox-LDL 处理 12 h);反式 LOX-1 mRNA 处理组(细胞悬液 + 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 反式 LOX-1 mRNA 孵育 24 h + 100 mg/L ox-LDL 处理 12 h)。

1.3 四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法检测细胞活性:取对数生长期的 HUVECs,用 HUVECs 完全培养液调整细胞密度至 $6 \times 10^4/\text{ml}$,按实验一分组,在 96 孔培养板中培养,每组细胞设 5 个复孔。于实验终止前 4 h 加入 MTT(每孔 10 μl),实验终止时加入十二烷基硫酸钠(SDS,每孔 100 μl),放置 12 h 后震荡 10 min,于波长 570 nm 处测定吸光度(A)值。根据公式计算细胞存活率。细胞存活率(%) = (处理组 A 值 - 空白对照组 A 值) / (ox-LDL 组 A 值 - 空白对照组 A 值) $\times 100\%$ 。

1.4 流式细胞术检测细胞凋亡:取对数生长期的 HUVECs,用 HUVECs 完全培养液调整细胞浓度至 $6 \times 10^4/\text{ml}$ 按实验一分组后,在 CO₂ 培养箱中培养,用膜联蛋白 V/碘化丙啶(Annexin V/PI)双染法染色,流式细胞术检测分析细胞凋亡情况。

1.5 蛋白质免疫印迹法(Western blotting)分析凋亡相关蛋白 Bcl-2/Bax:按实验一和实验二分组,细胞培养及细胞沉淀的收集参考流式细胞术 Annexin V/PI 双染法,且将第一组加入 100 mg/L ox-LDL 培养的时间改为 12 h。将收集的细胞沉淀、裂解后经 BCA 检测法进行蛋白定量。12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE),将蛋白质转移到硝酸纤维素膜上,用脱脂奶粉封闭,加入抗体孵育、显色后,用凝胶成像分析系统定量分析特异性蛋白条带的灰度值。反式 LOX-1 mRNA 序列 5'-CGGGCTCATTT

AACTG-3' 及顺式 LOX-1 mRNA 序列 5'-ACCTA CGTGACTACGT-3' 由上海赛百盛公司合成。

1.6 统计学方法:实验数据以均数士标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 12.0 进行统计分析。各组总体均数比较用 ANOVA 分析,两两均数比较采用 SNK-q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 法检测 HUVECs 细胞活性鉴定结果(表 1):ox-LDL 组细胞存活率较空白对照组明显降低($P < 0.05$)。不同浓度 rhEPO 预处理组细胞存活率较 ox-LDL 组明显增高,且与 rhEPO 呈浓度依赖性(P 均 < 0.05)。

表 1 ox-LDL 毒性作用下 rhEPO 对 HUVECs 生长及凋亡的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	细胞活性 (A 值)	细胞存活率 (%)	细胞凋亡率 (%)
空白对照组	5	0.65 $\pm$ 0.06	100.00 $\pm$ 2.31	0.63 $\pm$ 0.07
ox-LDL 组	5	0.40 $\pm$ 0.01 ^a	57.24 $\pm$ 1.32 ^a	35.40 $\pm$ 1.30 ^a
低 rhEPO 组	5	0.42 $\pm$ 0.01 ^b	61.23 $\pm$ 3.04 ^b	22.10 $\pm$ 2.10 ^b
中 rhEPO 组	5	0.43 $\pm$ 0.01 ^b	63.09 $\pm$ 2.67 ^b	13.30 $\pm$ 2.30 ^b
高 rhEPO 组	5	0.50 $\pm$ 0.01 ^b	74.08 $\pm$ 3.84 ^b	5.70 $\pm$ 1.10 ^b

注:与空白对照组比较,^a P 均 < 0.05 ;与 ox-LDL 组比较,

^b $P < 0.05$;低、中、高 rhEPO 组组间比较, P 均 < 0.05

2.2 Annexin V-FITC/PI 双染法检测 rhEPO 预处理与细胞凋亡的剂量-效应关系:用流式细胞仪检测可将每组测试细胞区分为机械性损伤细胞、早期凋亡细胞、中晚期凋亡细胞及正常活细胞 4 个细胞亚群,分别为凋亡早期细胞 FITC+PI- (右下象限)、机械性损伤或坏死细胞 FITC-/PI+ (左上象限)、凋亡中晚期和发生继发坏死的细胞 FITC+/PI+ (右上象限)、活细胞 FITC-/PI- (左下象限)。低、中、高 rhEPO 组细胞凋亡率均较 ox-LDL 组降低(P 均 < 0.05),且与 rhEPO 呈浓度依赖性(P 均 < 0.05 ,表 1;图 1)。

2.3 Western blotting 检测 HUVECs 凋亡蛋白表达结果:ox-LDL 组 HUVECs 凋亡蛋白 Bcl-2/Bax 比值较空白对照组显著降低($P < 0.05$);rhEPO 预处理各浓度组凋亡蛋白 Bcl-2/Bax 比值均较 ox-LDL 组增高(P 均 < 0.05),而且与 rhEPO 呈剂量依赖性(表 2;图 2)。反式 LOX-1 mRNA 预处理组 HUVECs 凋亡蛋白 Bcl-2/Bax 比值显著高于 ox-LDL 组($P < 0.05$),顺式 LOX-1 mRNA 预处理 HUVECs 凋亡蛋白 Bcl-2/Bax 比值与 ox-LDL 组比较则差异无统计学意义($P > 0.05$,表 3;图 3)。

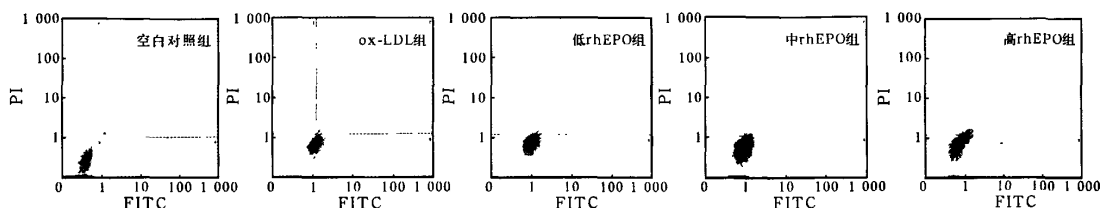
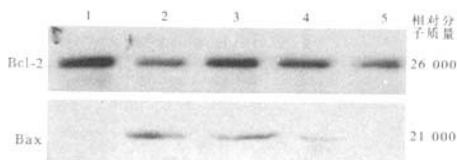


图1 ox-LDL 毒性作用下 rhEPO 对 HUVECs 凋亡率的影响

表2 ox-LDL 毒性作用下 rhEPO 对 HUVECs 凋亡蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	Bcl-2(灰度值)	Bax(灰度值)	Bcl-2/Bax 比值
空白对照组	5	436.70 $\pm$ 13.18	6.30 $\pm$ 0.96	70.87 $\pm$ 12.89
ox-LDL 组	5	254.50 $\pm$ 15.72 ^a	256.30 $\pm$ 18.05 ^a	1.00 $\pm$ 0.11 ^a
低 rhEPO 组	5	310.20 $\pm$ 9.09 ^b	202.60 $\pm$ 10.89 ^b	1.53 $\pm$ 0.05 ^b
中 rhEPO 组	5	343.20 $\pm$ 15.09 ^b	120.50 $\pm$ 9.04 ^b	2.86 $\pm$ 0.12 ^b
高 rhEPO 组	5	385.60 $\pm$ 17.07 ^b	2.40 $\pm$ 0.23 ^b	161.45 $\pm$ 10.56 ^b

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.05$;与 ox-LDL 组比较,^b $P < 0.05$;低、中、高 rhEPO 组间比较, P 均 < 0.05



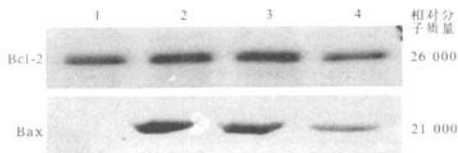
1:空白对照组;2:ox-LDL 组;3:低 rhEPO 组;
4:中 rhEPO 组;5:高 rhEPO 组

图2 第一部分实验中 HUVECs Bcl-2 及 Bax 蛋白表达

表3 ox-LDL 毒性作用下 HUVECs 凋亡蛋白的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	Bcl-2(灰度值)	Bax(灰度值)	Bcl-2/Bax 比值
空白对照组	5	432.30 $\pm$ 16.59	3.50 $\pm$ 0.32	118.29 $\pm$ 6.54
ox-LDL 组	5	232.30 $\pm$ 14.57 ^a	424.40 $\pm$ 11.36 ^a	0.55 $\pm$ 0.02 ^a
顺式 LOX-1 mRNA 组	5	245.60 $\pm$ 15.94	416.50 $\pm$ 12.44	0.59 $\pm$ 0.02
反式 LOX-1 mRNA 组	5	242.40 $\pm$ 12.78 ^b	198.60 $\pm$ 8.46 ^b	1.72 $\pm$ 0.04 ^b

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.05$;与 ox-LDL 组比较,^b $P < 0.05$



1:空白对照组;2:ox-LDL 组;3:顺式 LOX-1 mRNA 组;
4:反式 LOX-1 mRNA 组

图3 第二部分实验中 HUVECs Bcl-2 及 Bax 蛋白表达

3 讨论

细胞凋亡是血管内皮细胞损伤的主要方式之一,内皮细胞凋亡参与了 AS 的形成和粥样斑块的

破裂过程,越来越多的证据表明 ox-LDL 在 AS 和内皮细胞损伤中起到主要作用^[3-4]。本实验结果显示:LOX-1 可调节 ox-LDL 对内皮细胞的损伤,且 ox-LDL 和受体 LOX-1 在 AS 及其并发症的发生发展中起重要作用;同时还发现,ox-LDL 具有诱导 HUVECs 凋亡的作用,并且反式 LOX-1 mRNA 预处理的 HUVECs 凋亡蛋白 Bcl-2/Bax 比值增高,说明有抑制凋亡的作用,但是顺式 LOX-1 mRNA 预处理的细胞无这一作用。Chen 等^[5]的实验表明,ox-LDL 可导致 HCAECs 凋亡,且这一作用是通过 LOX-1 来实现的,与本研究结果一致。Nishio 和 Watanabe^[6]发现 ox-LDL 导致的血管平滑肌细胞(VSMCs)凋亡是通过下调 Bcl-2 和激活天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3)来实现的,ox-LDL 下调 Bax 的表达和上调 Bcl-2 的表达是依赖 LOX-1 的调节。国内沈洪等^[7]的研究也发现 ox-LDL 有诱导 VSMCs 凋亡的作用。本研究结果显示,反式 LOX-1 mRNA 预处理后,HUVECs 的凋亡抑制蛋白 Bcl-2/Bax 比值增高,但 EPO 是否是通过 LOX-1 调节起抗凋亡作用的,其机制并不清楚,有待进一步探索。

另外,本实验结果还表明 rhEPO 具有抑制由 ox-LDL 诱导 HUVECs 凋亡的作用,并呈剂量依赖性,高浓度的 rhEPO 可明显降低内皮细胞的凋亡率,并可通过上调凋亡抑制蛋白 Bcl-2 及下调凋亡蛋白 Bax 起到抗凋亡作用。Li 等^[8]研究发现,在阿霉素诱导的小鼠心肌病模型中给予 rhEPO 治疗后可显著减少心肌细胞的凋亡和心肌损伤。Wang 等^[9]的研究结果表明 EPO 有诱导红系祖细胞增殖和分化的作用,且可抑制细胞凋亡。Chen 等^[5]发现 ox-LDL 有降低 Bcl-2 的表达和提高 caspase-3、caspase-9 活性的作用。Sirén 等^[10]的研究发现,EPO 可通过上调凋亡抑制基因 Bcl-2 以对抗经缺血、缺氧等因素影响下的神经细胞凋亡。Sekiguchi 等^[11]的研究发现,EPO 可通过磷脂酰肌醇 3(PI-3)激酶途径抑制高血糖诱导的内皮细胞凋亡。

综上所述,本研究结果表明,rhEPO 可降低细胞凋亡率,提高 Bcl-2/Bax 比值,具有抑制 ox-LDL 诱导 HUVECs 凋亡的作用,这一作用是通过其受体 LOX-1 来调节。提示 EPO 可能会用于替代治疗 AS 患者。但 EPO 可能导致的高血压和血栓并发症使其用于心血管疾病又受到一定程度的限制。同时,EPO 的心脏保护作用尚缺乏大量临床资料的验证,就目前的体外试验与动物实验来看,临床应用 EPO 来抑制细胞凋亡、延缓 AS 的发生还需进一步研究。近来有研究表明 EPO 衍生物可有效避免上述一些不良反应的发生^[12]。因此,研究 EPO 衍生物在心血管疾病中的作用有可能是今后的研究方向之一。

参考文献

[1] 王震虹,王祥瑞.低氧预处理诱导促红细胞生成素对脑缺血后损伤及认知功能的保护作用.中国中西医结合急救杂志,2008,15(6):365-369.

[2] 陈伟,陈家佩,葛世丽,等.低氧对大鼠肝肾组织内红细胞生成素和低氧诱导因子-1 α 基因表达的影响.中国危重病急救医学,2004,16(1):9-12.

[3] Li D, Williams V, Liu L, et al. Expression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptors during ischemia-reperfusion and its role in determination of apoptosis and left ventricular dysfunction. J Am Coll Cardiol, 2003, 41(6): 1048-1055.

[4] Li D, Williams V, Liu L, et al. LOX-1 inhibition in myocardial ischemia-reperfusion injury; modulation of MMP-1 and inflammation. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002, 283(5): H1795-H1801.

[5] Chen J, Mehta JL, Haider N, et al. Role of caspases in ox-LDL induced apoptotic cascade in human coronary artery endothelial cells. Circ Res, 2004, 94(3): 370-376.

[6] Nishio E, Watanabe Y. Oxysterols induced apoptosis in cultured smooth muscle cells through CPP32 protease activation and bcl-2 protein downregulation. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 226(3): 928-934.

[7] 沈洪,尹明,郭继鸿,等.氧化低密度脂蛋白对血管平滑肌细胞早期凋亡的影响.中国危重病急救医学,2003,15(5):295-298.

[8] Li L, Takemura G, Li Y, et al. Preventive effect of erythropoietin on cardiac dysfunction in doxorubicin-induced cardiomyopathy. Circulation, 2006, 113(4): 535-543.

[9] Wang J, Tang ZY, Ka W, et al. Synergistic effect of cytokines EPO, IL-3 and SCF on the proliferation, differentiation and apoptosis of erythroid progenitor cells. Clin Hemorheol Microcirc, 2007, 37(4): 291-299.

[10] Sirén AL, Fratelli M, Brines M, et al. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(7): 4044-4049.

[11] Sekiguchi N, Inoguchi T, Kobayashi K, et al. Erythropoietin attenuated high glucose-induced apoptosis in cultured human aortic endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 334(1): 218-222.

[12] Leist M, Ghezzi P, Grasso G, et al. Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. Science, 2004, 305(5681): 239-242.

(收稿日期:2009-03-23 修回日期:2009-04-24)
(本文编辑:李银平)

• 启事 •

科技部中国科技信息研究所万方数据 2009 年版《中国期刊引证报告》(扩刊版)
——基础医学类期刊影响因子和总被引频次前 20 位排序表

期刊名称	影响因子	排位	期刊名称	总被引频次	排位
中国疫苗和免疫	2.143	1	中华医院管理杂志	4 256	1
中国危重病急救医学	1.780	2	中国危重病急救医学	3 942	2
中华医院管理杂志	1.720	3	中华麻醉学杂志	3 723	3
中国医院管理	1.438	4	中国医院管理	3 261	4
中华高血压杂志	1.351	5	中国病理生理杂志	2 942	5
免疫学杂志	1.197	6	中国健康心理学杂志	2 207	6
中国健康心理学杂志	0.878	7	中华血液学杂志	2 163	7
中国病理生理杂志	0.792	8	解放军医学杂志	2 114	8
中国寄生虫学与寄生虫病杂志	0.777	9	中华高血压杂志	2 032	9
中华病理学杂志	0.760	10	医疗卫生装备	1 941	10
中华男科学杂志	0.759	11	中国疫苗和免疫	1 922	11
中华麻醉学杂志	0.758	12	解放军医院管理杂志	1 908	12
中国实验血液学杂志	0.736	13	中华病理学杂志	1 873	13
解放军医院管理杂志	0.726	14	中国人兽共患病学报	1 721	14
细胞与分子免疫学杂志	0.715	并列 15	免疫学杂志	1 672	15
医疗卫生装备	0.715	并列 15	中华微生物学和免疫学杂志	1 472	16
中华医学遗传学杂志	0.687	17	中华男科学杂志	1 423	17
解剖科学进展	0.682	18	生物医学工程学报	1 239	18
生理科学进展	0.663	19	中国免疫学杂志	1 238	19
解放军医学杂志	0.632	20	中国微生态学杂志	1 219	20