

[文章编号] 1007-3949(2004)12-04-0419-04

·实验研究·

## 过氧化体增殖物激活型受体抑制氧化型脂蛋白致血管内皮细胞凋亡

黄颖, 陈运贞

(重庆医科大学附属第一医院心内科, 重庆市 400016)

[关键词] 内科学; 过氧化体增殖物激活型受体对细胞凋亡的影响; TUNEL 法; 细胞凋亡; 血管内皮细胞; 过氧化体增殖物激活型受体; 核转录因子

[摘要] 为探讨氧化型低密度脂蛋白和氧化型脂蛋白(a)对内皮细胞的致凋亡作用,以及过氧化体增殖物激活型受体对细胞凋亡的影响。采用TUNEL法、DNA电泳检测氧化型脂蛋白所致内皮细胞的凋亡。过氧化体增殖物激活型受体的配体吉非罗齐和曲格列酮干预后细胞凋亡的变化及核因子 $\kappa$ B、白细胞介素6及其受体表达的变化。细胞免疫组织化学法检测过氧化体增殖物激活型受体 $\alpha$ 和 $\gamma$ 的核移位率,酶联免疫吸附测定法检测原代内皮细胞上清液白细胞介素6的分泌,胞浆抗原FITC标记流式细胞仪技术检测核因子 $\kappa$ B、白细胞介素6及其受体在内皮细胞中的表达。结果发现,氧化型低密度脂蛋白和氧化型脂蛋白(a)在6、12、18 h和24 h 4个时间点致内皮细胞凋亡作用逐渐增强。吉非罗齐和曲格列酮可通过活化过氧化体增殖物激活型受体减轻细胞凋亡,在氧化型低密度脂蛋白和氧化型脂蛋白(a)组分别使内皮细胞18 h作用点凋亡率降低为13%和16% ( $P < 0.05$ ) 伴白细胞介素6及其受体表达降低,核因子 $\kappa$ B表达无显著差异。结果提示,氧化型脂蛋白致内皮细胞的凋亡具有时间依赖性。过氧化体增殖物激活型受体可能通过抑制炎症因子表达从而抑制细胞凋亡。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

### The Roles of Peroxisome Proliferator Activated Receptors on the Apoptosis of Endothelial Cells Induced by Oxidized Lipoprotein

HUANG Ying, and CHENG Yurr-Zhen

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

[KEY WORDS] Apoptosis; Peroxisome Proliferator Activated Receptors; Vascular Endothelial Cell; Nuclear Transcription Factor

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the apoptotic function of the oxidized LDL and Lp(a) on the endothelial cells and the roles of PPAR during the process. **Methods** hUVEC were isolated from fresh umbilical cords obtained at normal deliveries.

The LDL and Lp(a) were obtained by density-gradient ultracentrifugation and were oxidized through incubation with 15  $\mu$ mol/L  $\text{CuSO}_4$ . The apoptosis of endothelial cells was observed with the oxidized lipoproteins at different time points by the measurements of TUNEL and electronical microscope. The changes among the apoptosis, inflammation factors and NF- $\kappa$ B with the pretreatments of gemfibrozil and troglitazone were observed. The activation of PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  were tested by immunohistology. The secretion of IL-6 was measured with ELISA. The expression of IL-6R, IL-6 and NF- $\kappa$ B were performed by FACS. **Results**

The oxidized LDL and Lp(a) induced the apoptosis of endothelial cells which was accentuated with 6, 12, 18 and 24 h points.

Gemfibrozil and troglitazone relieved the function of oxidized lipoproteins through the activation of PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  respectively accompanying the lower expression of IL-6 and IL-6R.

**Conclusions** Oxidized lipoprotein can induce the apoptosis of endothelial cells with a time-dependent style. PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  may relieve the apoptosis of vascular cells through the inhibition of inflammation factors.

血管壁细胞的凋亡在动脉粥样硬化形成过程中可能发挥触发、维持与加速作用,而氧化型脂蛋白可能是血管壁局部重要的致病原。过氧化体增殖物激活型受体(peroxisome proliferator-activated receptors, PPAR)是配体活化型的转录因子,属于核受体超家

族<sup>[1]</sup>。有三种基因型: $\alpha$ 、 $\beta/\delta$ 和 $\gamma$ 。它们在转录水平上调节目标基因表达,在代谢性疾病中发挥广泛的作用。文献[2]报道,PPAR具有抑制炎症因子表达作用,与动脉粥样硬化的形成关系密切<sup>[3-5]</sup>。然而它们在细胞凋亡中的作用各家报道不一。本文主要探讨氧化型脂蛋白对血管内皮细胞的致凋亡作用,PPAR $\alpha$ 配体吉非罗齐(gemfibrozil)和PPAR $\gamma$ 配体曲格列酮(troglitazone)干预后对内皮细胞凋亡的影响。

[收稿日期] 2003-01-20 [修回日期] 2004-03-03

[作者简介] 黄颖,博士,主治医师,讲师。陈运贞,主任医师,教授,博士研究生导师,研究方向为冠心病和高血压。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

过氧化体增植物激活型受体(PPAR) $\alpha$ 、PPAR $\gamma$ 、核因子 $\kappa$ B(nuclear factor  $\kappa$ B)、白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)及其受体(interleukin-6 receptor, IL-6R)多克隆抗体均为美国 Santa Cruz 产品,脂蛋白(a)为南京聚力生物医学工程研究所产品,吉非罗齐为湘江药业股份有限公司产品,曲格列酮为重庆医科大学药物化学与生物材料研究室产品,TUNEL 试剂盒为美国罗氏公司产品,白细胞介素6酶联免疫吸附检测法试剂盒为晶美生物技术有限公司产品,免疫组织化学 SP 试剂盒为北京中山生物技术有限公司产品,DNA 凝胶成像系统为美国 Pharminggen 产品,FACS Calibur 流式细胞仪为美国 Becton Dickinson 产品,透射电镜为日本生产,GM2000-B 真彩色图像分析系统为北京航空航天大学产品。

### 1.2 人脐静脉内皮细胞原代培养

取健康产妇分娩后 20 cm 以上脐带,冲洗脐静脉内血液,灌注 0.25% 胶原酶 10 mL,37 $^{\circ}$ C 孵育 15~20 min,获取血管内皮细胞,加入到含 10% FCS 的 DMEM/F12(1:1)完全培养基中,CO<sub>2</sub> 孵箱中孵育。用 SP 法检测(II)因子相关抗原进行鉴定。

### 1.3 血清脂蛋白的制备

参照文献报道将新鲜正常人血浆经超速密度梯度离心,获得低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)。体外 Cu<sup>2+</sup> 氧化获得氧化型低密度脂蛋白(oxidized LDL, ox-LDL):将 Cu<sup>2+</sup> 调节至 15  $\mu$ mol/L,脂蛋白调节至 0.5 g/L,CO<sub>2</sub> 培养箱内氧化 24 h,以 5 倍于 Cu<sup>2+</sup> 浓度的 EDTA 终止氧化。氧化效果鉴定用硫代巴比妥酸反应物质(TBARS)法检测氧化后丙二醛的含量。透析后用直径 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤保存。

### 1.4 细胞凋亡检测

原位细胞凋亡检测采用 TUNEL 法。将内皮细胞片用 4% 的多聚甲醛固定,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 min,0.2% TritonX-100 10 min。滴加末端脱氧核苷酸转移酶和荧光素标记的核苷酸混合物反应缓冲液 20  $\mu$ L 37 $^{\circ}$ C 1 h,辣根过氧化物酶标记的抗荧光素抗体 20  $\mu$ L 37 $^{\circ}$ C 30 min。加入二氨基联苯胺溶液 50  $\mu$ L。显色。光镜下观察细胞核染为棕黄色,胞浆不着色,即为阳性。计算凋亡指数(apoptotic index, AI)是指在光镜下随机 4 个高倍视野( $\times$ 400)中凋亡细胞数占总细胞数的百分比。细胞用戊二醛固定后行电镜观察凋亡细胞。提取细胞 DNA 行电泳检测“梯状图谱”(ladder)现象。

### 1.5 免疫细胞化学

用免疫组织化学法检测内皮细胞 PPAR $\alpha$  和 PPAR $\gamma$  的表达。4% 多聚甲醛固定细胞爬片,加入 PPAR $\alpha$  和 PPAR $\gamma$  的抗体,采用通用型 SP 试剂盒行细胞免疫染色。细胞未活化时细胞核内着色少,在吉非罗齐和曲格列酮干预后,细胞核内可见棕黄色颗粒,显示为“核移位”。活化程度用“核移位率”来表示:阳性指数(positive index, PI)为随机 4 个高倍视野( $\times$ 400)中发生“核移位”的细胞数占总细胞数的百分比。

### 1.6 胞浆抗原荧光标记抗体流式细胞仪检测

参照文献[6],加以改进后步骤如下:获取内皮细胞,Triton-PBS 及多聚甲醛固定处理。加入甲醇增加细胞膜通透性。将细胞转移到 2 个 EP 管内,分为对照管和阳性管。阳性管加入检测抗原的相应抗体(一抗)50  $\mu$ L 4 $^{\circ}$ C 5~12 h。洗涤后加入 FITC 标记的抗 IgG 抗体(二抗),50  $\mu$ L,4 $^{\circ}$ C,5 h,PBS 洗涤。对照管不加一抗,余步骤同阳性管。流式细胞仪检测采用 488 nm 的激发波长,Cell Quest 软件分析平均荧光强度(average fluorescence intensity, AFI)和相对荧光强度(relative fluorescence intensity, RFI)。RFI=测定管 AFI $\div$ 对照管 AFI。用于定量分析。

### 1.7 酶联免疫吸附法检测

双抗体夹心 ELISA 法检测细胞上清液 IL-6 的分泌。制备标准品的倍比稀释浓度(从 1 000~15.625 ng/L)。将标准品及样本加入 IL-6 包被的酶标板,100  $\mu$ L/孔,室温 2 h。加入生物素化的抗人 IL-6 抗体和 HRP 标记的亲合素,100  $\mu$ L/孔,室温 1 h。洗板后,加入显色剂,避光 10~30 min,加入终止液,混匀后即刻测 A450 值。采用 CurveExpert 软件绘制标准曲线,查出样本的浓度。

### 1.8 内皮细胞分组试验

1.8.1 氧化型脂蛋白(a)和 ox-LDL 致内皮细胞凋亡作用 hUVEC 细胞传 2~3 代后用于该试验。将生长期的细胞悬液接种与 24 孔板。2 $\times$ 10<sup>4</sup> 细胞/孔,每孔置一小玻片,待细胞融合后,行下列试验:氧化型脂蛋白(a)或 ox-LDL 终浓度为 250 mg/L,分别作用 6 h、12 h、18 h 和 24 h。每个时间重复 3 孔。观察内皮细胞的凋亡现象。

1.8.2 吉非罗齐和曲格列酮的干预作用 内皮细胞分组如下:对照组分别用终浓度为 250 mg/L ox-LDL 或氧化型脂蛋白(a)作用 18 h;吉非罗齐组在用 30  $\mu$ mol/L 吉非罗齐预作用 24 h 后再用终浓度为 250 mg/L ox-LDL 或氧化型脂蛋白(a)作用 18 h;曲格列酮组用 45  $\mu$ mol/L 曲格列酮预作用 24 h 后再用终

浓度为 250 mg/L ox-LDL 或氧化型脂蛋白(a)作用 18 h。比较 3 组内皮细胞凋亡程度以及 IL-6R、IL-6 和核因子  $\kappa$ B 表达的变化。

### 1.9 统计学分析

采用 *t* 检验, 计量资料以表示,  $P < 0.05$  为有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 氧化型低密度脂蛋白和氧化型脂蛋白(a)的致凋亡作用

随着 ox-LDL 和氧化型脂蛋白(a)作用时间延长, 内皮细胞凋亡数增加。作用 24 h 凋亡发生率分别为 35%  $\pm$  3% 和 36%  $\pm$  3% (表 1, Table 1)。电镜下可见凋亡细胞, 体积缩小, 胞膜完整, 细胞着色深, 胞浆胞核浓缩, 细胞器存在(图 1, Figure 1)。DNA 电泳可见“梯状图谱”(ladder)现象(图 2, Figure 2)。

表 1. 氧化型低密度脂蛋白与氧化型脂蛋白(a)作用不同时间的内皮细胞凋亡指数

Table 1. The influences of ox-LDL and ox-Lp(a) on the apoptosis of EC at different hour point

| 作用时间 | ox-LDL                    | 氧化型脂蛋白(a)                 |
|------|---------------------------|---------------------------|
| 6 h  | 8% $\pm$ 2%               | 10% $\pm$ 2%              |
| 12 h | 18% $\pm$ 3%              | 21% $\pm$ 2%              |
| 18 h | 25% $\pm$ 2%              | 28% $\pm$ 2%              |
| 24 h | 35% $\pm$ 3% <sup>a</sup> | 36% $\pm$ 3% <sup>a</sup> |

a:  $P < 0.05$ , 与其它作用时间相比。



图 1. 内皮细胞凋亡 箭头所指为凋亡细胞

Figure 1. The apoptosis of endothelial cell (EM  $\times$  5000)

### 2.2 吉非罗齐和曲格列酮干预对细胞凋亡的影响

吉非罗齐作用于内皮细胞 24 h 后, PPAR $\alpha$  活化明显, 出现“核移位”现象(图 3, Figure 3)。其核移

位率阳性指数为 26%  $\pm$  2%, 对照组为 5%  $\pm$  2% ( $P < 0.05$ )。曲格列酮作用于内皮细胞 24 h 后, PPAR $\gamma$  活化明显, 出现“核移位”现象。其核移位率阳性指数为 19%  $\pm$  1%, 对照组为 3%  $\pm$  1% ( $P < 0.05$ )。内皮细胞先经吉非罗齐和曲格列酮 24 h 预处理后均可以抑制 ox-LDL 和氧化型脂蛋白(a)作用 18 h 后所致内皮细胞的凋亡(表 2 和表 3, Table 2 and Table 3)。其中炎症因子 IL-6 和 IL-6R 的表达较对照组均降低, 核因子  $\kappa$ B 的表达未见明显差异。

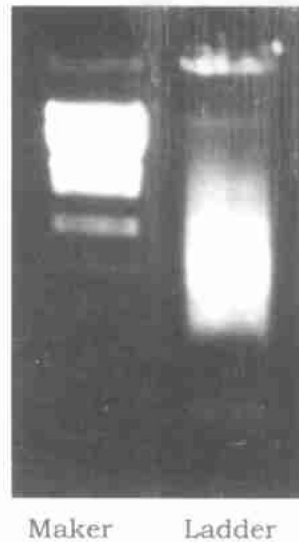


图 2. 内皮细胞凋亡“梯状”电泳图谱

Figure 2. The ladder electrophoresis picture in endothelial cells after apoptosis

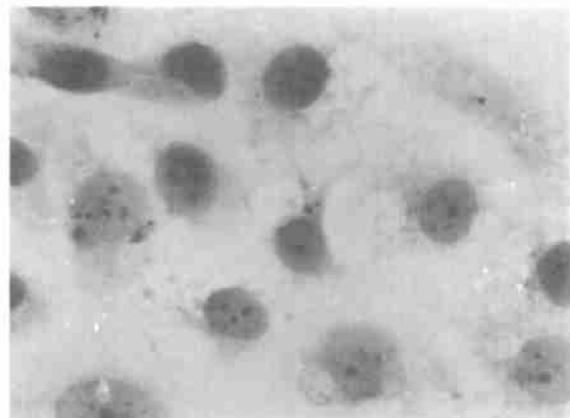


图 3. 内皮细胞过氧化物增殖物激活型受体  $\alpha$  的表达“核移位”现象

Figure 3. The nuclear translocation of PPAR $\alpha$  in endothelial cell (SP  $\times$  400)

## 3 讨论

过氧化物增殖物激活型受体(PPAR)可以通过

表 2. 吉非罗齐和曲格列酮对氧化型脂蛋白(a)致内皮细胞凋亡的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2. Influences of gemfibrozil and troglitazone on the apoptosis of EC incubated with ox-Lp(a)

| 指标                 | 对照组            | 吉非罗齐组                      | 曲格列酮组                       |
|--------------------|----------------|----------------------------|-----------------------------|
| 凋亡指数               | 29% $\pm$ 2%   | 16% $\pm$ 2% <sup>a</sup>  | 18% $\pm$ 2% <sup>a</sup>   |
| IL-6 (ng/L)        | 1 305 $\pm$ 55 | 945 $\pm$ 43 <sup>a</sup>  | 1 030 $\pm$ 30 <sup>a</sup> |
| IL-6 RFI           | 7.0 $\pm$ 1.0  | 5.5 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup> | 5.8 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>  |
| IL-6R RFI          | 8.0 $\pm$ 1.1  | 6.0 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup> | 6.3 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>  |
| 核因子 $\kappa$ B RFI | 14.0 $\pm$ 2.5 | 15.0 $\pm$ 1.6             | 14.0 $\pm$ 2.1              |

a:  $P < 0.05$ , 与对照组比较。

表 3. 吉非罗齐和曲格列酮对氧化型低密度脂蛋白致内皮细胞凋亡的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3. Influences of gemfibrozil and troglitazone on the apoptosis of EC incubated with ox-LDL

| 指标                 | 对照组            | 吉非罗齐组                      | 曲格列酮组                      |
|--------------------|----------------|----------------------------|----------------------------|
| 凋亡指数               | 27 $\pm$ 2     | 13 $\pm$ 2 <sup>a</sup>    | 16 $\pm$ 3 <sup>a</sup>    |
| IL-6 (ng/L)        | 1189 $\pm$ 25  | 920 $\pm$ 22 <sup>a</sup>  | 935 $\pm$ 19 <sup>a</sup>  |
| IL-6 RFI           | 6.3 $\pm$ 0.3  | 5.0 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup> | 5.1 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup> |
| IL-6R RFI          | 7.5 $\pm$ 1.1  | 5.7 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup> | 6.0 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup> |
| 核因子 $\kappa$ B RFI | 13.0 $\pm$ 1.5 | 13.0 $\pm$ 1.2             | 14.0 $\pm$ 1.3             |

a:  $P < 0.05$ , 与对照组比较。

与其 DNA 上的应答元件结合直接调节目的基因的表达,也可与活化蛋白 1(AP-1)、信号转导和转录活化因子(STAT)和核因子  $\kappa$ B 等在转录水平上相互作用,从而调节其相应目标基因的表达。核因子  $\kappa$ B 是 Rel 蛋白家族成员,以同源或异源二聚体形式存在,调控一系列基因的表达,尤其是对机体免疫和炎症分子表达的调控,如 IL-6、ICAM-1、MHC-Ⅱ和 COX-2 等。也可在肿瘤细胞中发挥抗细胞凋亡作用。

过氧化体增殖物激活型受体(PPAR)在细胞凋亡中的作用尚不一致。文献[7]报道,PPAR $\gamma$ 的配体 BRL49653 和 PG-J2 可以诱导未分化单核细胞的凋亡,其机制为抑制了核因子  $\kappa$ B 的抗凋亡作用。然而核因子  $\kappa$ B 在细胞凋亡中的作用尚取决于细胞类型、诱导凋亡因子的性质以及核因子  $\kappa$ B 的不同组成成分等因素。Grilli 等[8]报道阿司匹林或水杨酸钠可以缓解谷氨酸对小脑粒细胞的致凋亡或坏死作用。其机制是抑制了谷氨酸所致核因子  $\kappa$ B 的活化。核因子  $\kappa$ B 活化后,可以编码很多促炎性细胞因子、趋化因子、粘附分子的表达,参与到免疫、炎症、凋亡的

调控中。活性氧(ROS)所致的氧化应激是诱发细胞凋亡的重要触发机制,在 caspase 被抑制时仍可发生凋亡。

本文发现,氧化型脂蛋白(a)和 ox-LDL 可诱导内皮细胞的凋亡,随作用时间增加而增强。在 PPAR 配体的作用下,随着 PPAR 的活化,炎症因子 IL-6、IL-6R 表达减少,细胞凋亡减少。而核因子  $\kappa$ B 在该过程中均明显活化。既往研究[9]已提示氧化型脂蛋白相同作用条件下,核因子  $\kappa$ B 的活化要强于 PPAR。基于炎症因子在细胞凋亡中的重要作用,部分抑制核因子  $\kappa$ B 的功能可能会抑制细胞凋亡。PPAR 活化后是否通过与核因子  $\kappa$ B 在转录后水平相互作用从而抑制其抑制炎症因子表达、抑制细胞凋亡的作用有待进一步研究。

吉非罗齐和曲格列酮分别 PPAR $\alpha$  和 PPAR $\gamma$  的人工合成配体,然而它们的作用尚不是最强。增加其亲和力和作用强度则可能会加大其转录调控作用。脂蛋白(a)的结构类似 LDL,差别仅是 LDL 中没有载脂蛋白(a)的载脂蛋白。脂蛋白(a)氧化后促炎症因子分泌作用甚至较其他脂蛋白更强[9],致细胞凋亡,在动脉粥样硬化泡沫细胞形成中发挥作用。其深入机制均有待进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] Torra IP, Gervois P, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha in metabolic disease, inflammation, atherosclerosis and aging. *Curr Opin Lipidol*, 1999, 10 (1): 151-159
- [2] 袁祖贻, 刘艳, 刘豫, 张继军, 岸本千晴, 刘治全. PPAR $\gamma$  配体对小鼠急性心肌炎的影响及其机制. *中华医学杂志*, 2003, 83 (23): 2 067-072
- [3] 胡琴, 吴强, 耿昭华, 李隆贵. 心肌梗死后大鼠心肌脂肪酸氧化酶基因表达下调. *中国动脉硬化杂志*, 2003, 11 (2): 143-146
- [4] 易光辉, 杨永宗, 唐朝克, 米五平, 王燕, 危当恒. 过氧化体增殖物激活型受体  $\gamma$  和高密度脂蛋白介导细胞胆固醇流出中的作用. *中国动脉硬化杂志*, 2003, 11 (4): 325-329
- [5] 王兆君, 叶平, 张秀锦. 大鼠过氧化体增殖物激活型受体  $\alpha$  在衰老过程中表达差异及与脂质代谢的关系. *中国动脉硬化杂志*, 2003, 11 (5): 498-500
- [6] Su JL, Kilpatrick KE, Champion BR, Morris DC, Lehmann JM, Kost TA. Fluorescent microtiter screening assay for immunocytochemically reactive antibodies. *Biol Techniques*, 1997, 22 (2): 320-324
- [7] Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, Pineda TI, Delerive P, Majid Z, et al. Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte derived macrophages. *J Biol Chem*, 1998, 273 (40): 25 573-580
- [8] Grilli M, Pizzi M, Memo M. Neuroprotection by aspirin and sodium salicylate through blockade of NF- $\kappa$ B activation. *Science*, 1996, 274 (10): 1 383-385
- [9] 黄颖, 陈运贞, 王周碧. 不同类型氧化型脂蛋白对血管内皮细胞、单核细胞核因子  $\kappa$ B 和 PPAR 的作用. *重庆医科大学学报*, 2003, 28 (5): 576-579

(此文编辑 胡必利)