

血管内皮生长因子对过氧化氢诱导的内皮细胞凋亡的影响及其机制

廖德荣¹, 刘启功¹, 程燕子¹, 曾 艳¹, 张兹伟²

(1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院心内科, 湖北省武汉市 430030;

2. 湖北城市建设职业技术学院, 湖北省武汉市 430074)

[关键词] 病理学与病理生理学; 过氧化氢诱导内皮细胞凋亡; 逆转录聚合酶链反应; 内皮细胞; 血管内皮生长因子; 细胞凋亡; 过氧化氢

[摘要] 目的 研究血管内皮生长因子对过氧化氢诱导的血管内皮细胞凋亡的影响, 同时检测凋亡相关基因 Bcl-2 mRNA 与 Fas mRNA 表达的变化。方法 体外培养人脐静脉内皮细胞, 随机分成对照组、过氧化氢组和过氧化氢+ 血管内皮生长因子组, 12 h 后, 采用原位末端标记法和流式细胞仪分别观察各组细胞的凋亡数和凋亡率, 通过逆转录聚合酶链反应观察各组细胞中凋亡相关基因 Bcl-2 mRNA 与 Fas mRNA 表达的变化。结果 过氧化氢组凋亡细胞数(27.83±2.14)明显高于对照组(2.50±1.05) ($P < 0.01$) 和过氧化氢+ 血管内皮生长因子组(13.00±2.10) ($P < 0.01$)。过氧化氢组细胞凋亡率(14.17%±0.45%)明显高于对照组(1.55%±0.87%) ($P < 0.01$) 和过氧化氢+ 血管内皮生长因子组(5.69%±0.38%) ($P < 0.01$)。与过氧化氢组比较, 过氧化氢+ 血管内皮生长因子组 Fas mRNA 表达明显减少(40.67%±2.16%比 94.50%±3.45%, $P < 0.01$), 而 Bcl-2 mRNA 表达明显增加(60.33%±1.75%比 23.17%±1.17%, $P < 0.01$)。结论 血管内皮生长因子能拮抗过氧化氢诱导的内皮细胞凋亡, 其抗凋亡的机制可能与上调 Bcl-2 mRNA 表达与下调 Fas mRNA 表达有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Mechanisms of Vascular Endothelial Growth Factor on Apoptosis Induced by Hydrogen Peroxide in Vascular Endothelial Cell

LIAO De-Rong¹, LIU Qi-Gong¹, CHENG Yan-Zi¹, ZENG Yan¹, and ZHANG Zi-Wei²

(1. Department of Cardiology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030; 2. Hubei Urban Construction Vocational and Technology College, Wuhan 430074, China)

[KEY WORDS] Endothelial Cell; Vascular Endothelial Growth Factor; Apoptosis; Hydrogen Peroxide; Fas mRNA; Bcl-2 mRNA; RT-PCR

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) on the apoptosis and the expression of Fas mRNA and Bcl-2 mRNA in human umbilical vein endothelial cell (hUVEC). **Methods** hUVEC were randomly divided into three groups: control group, hydrogen peroxide group and hydrogen peroxide + VEGF group. After 12 hours, the apoptosis of hUVEC was determined by flow cytometry (FCM) and terminal deoxynucleotidyl transferase biotin dUTP nick end labeling (TUNEL), the expression of Bcl-2 mRNA and Fas mRNA were examined by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Apoptosis number in hydrogen peroxide group was higher than that in control group (27.83±2.14 vs 2.50±1.05, $P < 0.01$). However, in hydrogen peroxide+ VEGF group, apoptosis number was lower than that in hydrogen peroxide group (13.00±2.10 vs 27.83±2.14, $P < 0.01$). Apoptosis rate in hydrogen peroxide group was higher than that in control group (14.17%±0.45% vs 1.55%±0.87%, $P < 0.01$) and in hydrogen peroxide+ VEGF group (14.17%±0.45% vs 5.69%±0.38%, $P < 0.01$). Compared with control group, hydrogen peroxide markedly increased Fas mRNA expression (94.50%±3.45% vs 23.17%±1.17%, $P < 0.01$) and decreased Bcl-2 mRNA expression (23.17%±1.17% vs 60.33%±1.75%, $P < 0.01$). Compared with hydrogen peroxide group, VEGF significantly decreased Fas mRNA expression (40.67%±2.16% vs 94.50%±3.45%, $P < 0.01$) and increased Bcl-2 mRNA expression (60.33%±1.75% vs 23.17%±1.17%, $P < 0.01$). **Conclusions** VEGF can inhibit the apoptosis induced by hydrogen peroxide in HUVEC, which may correlated with upregulation Bcl-2 mRNA expression and inhibiting Fas mRNA expression.

[收稿日期] 2005-08-09 [修回日期] 2006-04-13

[基金项目] 湖北省自然科学基金项目(2003ABA135)

[作者简介] 廖德荣, 硕士研究生, 医师, 研究方向为冠心病防治及心电生理, 联系电话为 13554306853, E-mail 为 liaoderong123@163.com。程燕子, 硕士研究生, 研究方向为冠心病防治及心电生理, 联系电话为 13986105319, E-mail 为 xiaoyan306@sina.com。通讯作者刘启功, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病防治及心电生理, 联系电话为 027-62038885, E-mail 为 qgliu@tjh.gjmu.edu.cn。

血管内皮损伤是经皮冠状动脉介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI)术后再狭窄的始动因素,促进PCI术后损伤内皮的迅速修复可能是预防再狭窄的关键。研究证实,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)能预防实验性血管成形术后再狭窄,可能与其促进内皮细胞增殖和调节内皮功能有关,但其机制还不全面^[1-3]。近来初步研究发现 VEGF 对血管内皮细胞凋亡同样具有抑制作用^[4,5],但是其具体的作用机制及对凋亡基因的影响未见报道。本研究观察过氧化氢对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, hU-VEC)凋亡及凋亡相关基因 Fas 和 Bcl-2 mRNA 表达的影响,同时观察 VEGF 对以上结果的干预作用,为 VEGF 用于预防再狭窄进一步提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

胎牛血清购于杭州四季青公司, RPMI1640 培养基购于 Gibco 公司, TRIZOL 试剂购于 Invitrogen 公司, 逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒购于博泰公司, 血管内皮生长因子购于 Cytolab 公司, 胰蛋白酶购于 Sigma 公司, 100 bp DNA Marker 购于天为生物, 原位末端标记试剂盒(碱性磷酸酶法)购于 Boehringer Mannheim 公司, 所需引物由北京奥科公司设计合成。

1.2 人脐静脉内皮细胞的培养和鉴定

参照 Jaffe 等^[6]方法, 收集无菌胎儿脐带 20~30 cm, 剪去破损部分, 插入静脉插管并固定, PBS 冲洗至静脉内无血。夹闭一端, 从另一端向静脉腔内注入 0.25% 胰蛋白酶 8~10 mL 至充盈后夹闭插管, 放入盛有 100 mL PBS 液的无菌容器内, 37℃下消化 17~20 min。收集消化液, 用含 5% 胎牛血清的 1640 冲洗液冲洗静脉腔, 一并加入离心管中, 1 200 r/min, 8 min。弃上清, 用 5 mL 含 10% 胎牛血清的 1640 培养液重悬细胞, 调整细胞密度为 5×10^6 /L, 加入培养瓶, 转入 37℃ 5% CO₂ 培养箱培养。细胞贴壁后换液, 长满瓶底后传代。相差显微镜下细胞呈单层鹅卵石排列。免疫荧光检查因子(II)阳性。将第 2~4 代细胞用于实验。

1.3 分组及处理

将对数生长期的细胞消化后制成悬液, 接种于 6 孔培养板, 每孔放一约 1 cm × 1 cm 大小的盖玻片, 置培养箱培养, 待细胞完全汇合后随机分为对照组、

过氧化氢组和过氧化氢+ VEGF 组, 每组 6 孔, 过氧化氢终浓度为 200 μmol/L, VEGF 终浓度为 10 μg/L。用无血清 1640 液继续培养 12 h, 取出盖玻片行原位末端标记检查, 剩余细胞用于流式细胞仪及 RT-PCR 检测。

1.4 流式细胞仪分析细胞凋亡率

将细胞弃旧培养液, PBS 洗一次, 0.25% 胰酶消化后用含 10% FBS 的 1640 培养液制悬, 1 200 r/min, 6 min 离心后弃上清, PBS 洗一次, 用预冷的 80% 乙醇固定, -20℃可放置一月, 待标本收集齐后离心去掉固定液, 加 PBS 洗 2 次, 100 μL PBS 重悬细胞, 加 Rnase 10 μL(5 g/L), 37℃作用 30 min 后, 加入 20 μL PI 染色液(500 mg/L, 5 mg PI+ 0.1 mL Triton X 100+ 3.7 mg EDTA+ 10 mL PBS) 4℃避光染色 30 min, 上机前加 400 μL PBS, 每份样品计数 10 000 个细胞, 计算凋亡细胞的百分比。

1.5 原位末端标记法检测凋亡细胞数

按试剂盒说明进行操作。着色蓝色表示凋亡的细胞核, 镜下随机计数 5 个高倍视野(high power field, HPF, 400×)中的凋亡细胞数, 求其均值。

1.6 逆转录聚合酶链反应检测 Fas 和 Bcl-2 mRNA 的表达

用 TRIZOL 试剂一步法提取各组细胞中的 mRNA, 再按 RT-PCR 试剂盒说明操作。20 μL 逆转录反应体系包括 1 μL dNTPs、1 μL M-MLV 逆转录酶、4 μL 5× 逆转录反应缓冲液、1 μL Olig(dT) 16、0.4 μL Rnasin 和 1.5 μL RNA 样品, 余用 DEPC 处理的双蒸水补足。37℃水浴 2 h, 95℃灭活 MMLV 5 min。50 μL 的 PCR 反应体系包括 1 μL cDNA、1 μL dNTPs、0.4 μL Taq 酶、5 μL 10× PCR 反应缓冲液和 10 pmol/L 引物各 1 μL, 余用双蒸水补足。PCR 反应条件如下: 94℃预变性 5 min → 94℃变性 50 s → 60℃退火 50 s → 72℃延伸 1 min, 循环 32 圈, 最后 72℃再延伸 8 min。分别用 Bcl-2 或 Fas 与 β-actin cDNA 引物同时扩增。Fas 正反义引物分别为 5'-ATG CTG GGC ATC TGG ACC CTC CTA-3' 和 5'-TCT GCA CTT GGT ATT CTG GGT CCG-3' (长度 384 bp)。Bcl-2 正反义引物分别为 5'-CGA CGA CTT CTC CCG CCG CTA CCG C-3' 和 5'-CCG CAT GCT GGG GCC GTA CAG TTC C-3' (长度 319 bp)。β-actin 正反义引物分别为 5'-CAT CCT GCG TCT GGA CCT-3' 和 5'-TCA GGA GGA GCA ATG ATC TTG-3' (长度 480 bp)。扩增后的产物在 2% 琼脂糖凝胶电泳 20 min 后用凝胶成像系统对 DNA 条带扫描, 以目的基因扫描密度值/参照基因扫描密度值的百分数作为目的基因 mRNA 的相对表达量。

1.7 统计学处理

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 12.0 软件处理数据。组间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 细胞凋亡形态学观察

原位末端标记染色发现, 过氧化氢处理的细胞凋亡数增多, 凋亡细胞的细胞核固缩, 核致密浓染,

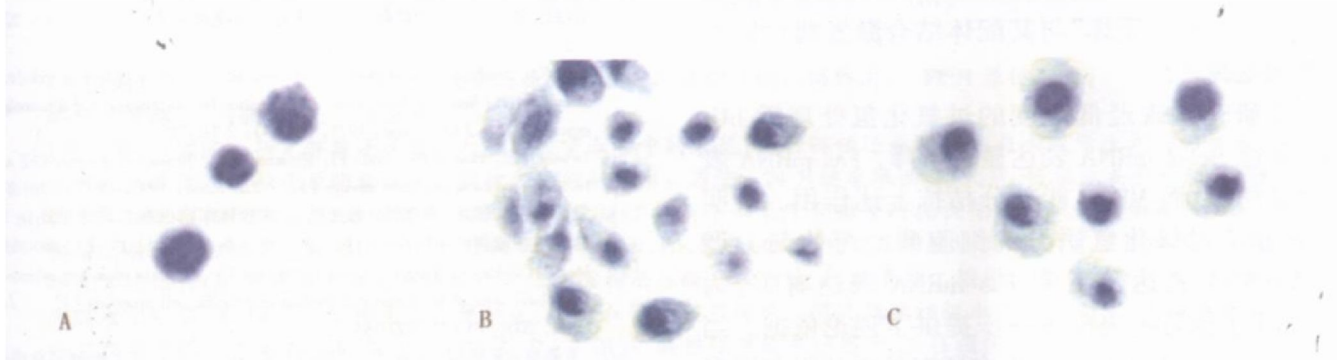


图 1. 原位末端标记染色图片(400×) A 为对照组, B 为过氧化氢组, C 为过氧化氢+ VEGF 组。

表 1. 过氧化氢及血管内皮生长因子对细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

分 组	凋亡细胞数	凋亡率
对照组	2.50 ± 1.05^a	$1.55\% \pm 0.87\%^a$
过氧化氢组	27.83 ± 2.14	$14.17\% \pm 0.45\%$
过氧化氢+ VEGF 组	13.00 ± 2.10^a	$5.69\% \pm 0.38\%^a$

a 为 $P < 0.01$, 与过氧化氢组比较。

2.3 细胞凋亡相关基因表达的变化

对照组和过氧化氢+ VEGF 组 Fas mRNA 相对表达量都显著低于过氧化氢组 ($P < 0.01$); 对照组和过氧化氢+ VEGF 组 Bcl-2 mRNA 相对表达量显著高于过氧化氢组 ($P < 0.01$) (表 2)。

表 2. 过氧化氢及血管内皮生长因子对 Fas 及 Bcl-2 mRNA 相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

分 组	Fas mRNA	Bcl-2 mRNA
对照组	$21.17\% \pm 1.17\%^a$	$85.17\% \pm 1.47\%^a$
过氧化氢组	$94.50\% \pm 3.45\%$	$23.17\% \pm 1.17\%$
过氧化氢+ VEGF 组	$40.67\% \pm 2.16\%^a$	$60.33\% \pm 1.75\%^a$

a 为 $P < 0.01$, 与过氧化氢组比较。

3 讨论

经皮冠状动脉介入治疗(PCI)术后再狭窄的机制十分复杂, 以往的预防研究大多针对血管平滑肌

呈蓝色, 胞浆着色较浅或不着色, 故有的仅见蓝色的圆形细胞核。给予 VEGF 干预后凋亡的细胞减少(图 1)。

2.2 各组细胞凋亡细胞数和凋亡率的比较

加入过氧化氢处理后, 细胞凋亡数和凋亡率比对照组明显增加($P < 0.01$), 而 VEGF 干预后凋亡数和凋亡率比过氧化氢组明显减少($P < 0.01$) (表 1)。

细胞过度增殖和局部凝血这两个环节, 但均未获得理想效果, 说明尚未扼制再狭窄形成的关键环节, 有必要寻求新的切入点或多管齐下。血管内皮损伤作为再狭窄的始动因素, 如能尽快修复 PCI 术后损伤的内皮, 可从病变的源头干预再狭窄的形成。而血管内皮的完整性依赖于血管内皮细胞增殖与凋亡、坏死的平衡, 因此, 有效促进内皮细胞增殖和抑制内皮细胞凋亡均有利于损伤内皮的修复。

血管内皮生长因子是近几年发现的血管内皮细胞特异性的促分裂剂, 它能高效迅速地促进内皮细胞分裂和增殖, 有利于血管损伤内皮的迅速恢复, 在预防再狭窄中有重要作用^[2]。而 VEGF 抑制内皮细胞凋亡的研究报道较少, 本文主要从内皮修复的另一关键环节研究 VEGF 拮抗内皮细胞凋亡的进一步作用机制, 为 VEGF 预防再狭窄提供理论依据。

在引起内皮细胞凋亡的诸多因素中, 过氧化物与冠心病及其介入治疗密切相关。过氧化氢可使内皮细胞脂质过氧化, 蛋白质变性、交联, DNA 断裂、变性, 并抑制损伤 DNA 的修复, 从而抑制内皮细胞增殖, 甚至促其死亡^[7]。研究发现, 当内皮细胞暴露于低浓度过氧化氢时, 细胞不立即出现溶解、死亡, 却表现为凋亡, 而且具有浓度和时间依赖性; 而高浓度的过氧化氢时细胞出现溶解和死亡即坏死^[8-10]。近来研究还发现 VEGF 能拮抗过氧化氢诱导的内皮细胞凋亡^[-4,5], 而进一步的机制尚不是很清楚。

细胞凋亡具有复杂的分子调控机制, 是多种基

因参与的生命过程。其中以 Bcl-2 家族在细胞凋亡中的作用备受人们关注,其家族成员具备双重功能,其中 Bcl-2 和 Bcl-XL 等抑制细胞凋亡,而 Bax 和 Bcl-XS 等促进细胞凋亡。Bcl-XL 和 Bcl-XS 分别为 Bcl-X 的两种型式。Bax 通过与自身组成同源二聚体或与 Bcl-2 和 Bcl-XL 组成异源二聚体抑制 Bcl-2 或 Bcl-XL 的活性而发挥促进细胞凋亡的功能。因此,细胞中 Bcl-XL 或 Bcl-2 与 Bax 的比例将决定细胞的生死命运^[11]。而 Fas 是一种介导细胞凋亡的细胞表面蛋白,它作为“死亡受体”与其配体结合激发凋亡信号引起细胞凋亡。

本研究发现经低浓度的过氧化氢处理后 hU-VEC 细胞 Bcl-2 mRNA 表达显著下降, Fas mRNA 表达明显增加,而 VEGF 能部分拮抗上述作用。表明 VEGF 拮抗过氧化氢诱导的细胞凋亡可能与上调 Bcl-2 mRNA 表达及下调 Fas mRNA 表达有关,为 VEGF 用于预防再狭窄进一步提供了理论依据。当然在 PCI 术后再狭窄的过程中还有其它基因和因素参与,哪些占主导作用还有待于进一步的探讨。

[参考文献]

[1] Asahara T, Chen D, Tsurumi Y, Kearney M, Rossow S, Passeri J, et al. Ac-

celerated restitution of endothelial integrity and endothelium-dependent function after hVEGF165 gene transfer [J]. *Circulation*, 1996, **94** (12): 3 291-302

- [2] Liu Qg, Lu ZY, Yue YK, Lin L, Zhang WD, Yan J. Experimental study of adenovirus vector mediated hVEGF165 gene on prevention of restenosis after angioplasty [J]. *J Huazhong University Science Technology (Med)*, 2004, **24** (2): 132-133, 137
- [3] Laitinen M, Hartikainen J, Hiltunen MO, Eranen J, Kiviniemi M, Narvanen O, et al. Catheter-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer to human coronary arteries after angioplasty [J]. *Hum Gene Ther*, 2000, **11** (1): 263-270
- [4] 刘启功, 陆再英, 颜进, 张卫东. 血管内皮生长因子拮抗 H₂O₂ 诱导的血管内皮细胞凋亡 [J]. *中国病理生理杂志*, 2002, **18** (3): 313-314
- [5] 刘启功, 陆再英, 周洪莲, 张卫东, 颜进. 血管内皮生长因子预防血管成形术后再狭窄的机制 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (3): 209-212
- [6] Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Richard MC. Culture of human endothelial cell derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria [J]. *J Clin Invest*, 1973, **152** (4): 2 745-756
- [7] Janssen YM, Houten BV, Borm PJ, Mossman BI. Biology of disease: Cell and tissue responses to oxidative damage [J]. *Lab Invest*, 1993, **69** (3): 261-271
- [8] 袁建成, 程君涛, 秦孝健, 肖光勇. 线粒体细胞色素 C 释放在 H₂O₂ 诱导内皮细胞凋亡中的作用 [J]. *中华烧伤杂志*, 2001, **17** (6): 360-363
- [9] Mogi M, Fukuo K, Yang J, Suhara T, Ogihara T. Hypoxia stimulates release of the soluble form of fas ligand that inhibits endothelial cell apoptosis [J]. *Lab Invest*, 2001, **81** (2): 177-184
- [10] 庞勤慧, 朱炳阳, 廖斯芳, 严鹏科, 雷小勇. 金粉藤素抑制氧化应激诱导的血管内皮细胞凋亡 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (3): 283-286
- [11] Lynch MP, Capparelli C, Stein JL, Stein GS, Lian JB. Apoptosis during bone-like tissue development in vitro [J]. *Cell Biochem*, 1998, **68** (1): 31-49

(此文编辑 朱雯霞)