

高压培养调节 E 选择素表达及核因子 κ B 信号通路

许灿新, 王 春, 朱炳阳, 颜 涛, 罗迪贤, 梁 磊, 李 凯, 罗其富, 廖端芳

(南华大学药物药理研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 高压培养; E 选择素; 核因子 κ B; 核因子 κ B 抑制因子 α

[摘要] 目的 观察高压培养对内皮细胞 E 选择素表达的影响及其可能的分子机制。方法 在自制的可调压力培养箱中, 用高于 1 个标准大气压的不同压力培养人脐静脉内皮细胞, 运用间接免疫荧光技术、流式细胞术检测血管内皮细胞粘附分子 E 选择素蛋白的表达, Western blot 检测核因子 κ B 抑制因子 α 的表达, 间接免疫荧光法观察核因子 κ B 的表达分布。结果 高压培养和大气压培养细胞形态无明显差异; 高压培养 E 选择素表达明显增加, 180 mmHg 培养 24 h E 选择素的表达升高 1.5 倍; 180 mmHg 培养 6 h 和 12 h 核因子 κ B 抑制因子 α 的表达降低 2 倍多; 180 mmHg 培养 24 h 激活核因子 κ B, 使其转位于细胞核。结论 高压培养促进 E 选择素表达, 核因子 κ B 信号通路参与调控。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

High Pressure Regulating the Expressions of E-Selectin and Nuclear Factor KappaB Signaling Pathway

XU Carr Xin, WANG Chun, ZHU Bing-Yang, YAN Tao, LUO Di-Xian, LIANG Lei, LI Kai, LUO Qi-Fu, and LIAO Duann-Fang
(Institute of Pharmacy and Pharmacology, University of South China, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] High Pressure; E-Selectin; Nuclear Factor KappaB; Inhibitor of Nuclear Factor KappaB Alpha

[ABSTRACT] Aim To investigate the effect and possible mechanisms of high pressure on the expression of E-selectin in vascular endothelial cells. Methods Human umbilical vein endothelial cells were cultured under 0, 120, 150, 180, 210 mmHg in a custom-made pressure incubator for 24 h or treated under 180 mmHg of static pressure for 0, 3, 6, 12, 24 h. Western blot, flow cytometry and immunofluorescence were used to detect the expression of E-selectin, inhibitor of nuclear factor kappaB alpha (IKB α) and nuclear factor kappaB (NF- κ B) respectively. Results High pressure significantly up-regulated the level of E-selectin. E-selectin level was increased about 1.5 times at 180 mmHg for 24 h, IKB α was down-regulated more than 2 times following 180 mmHg culturing for 6 h and 12 h, NF- κ B was transferred from cytoplasm to nuclear by 180 mmHg culture for 24 h.

Conclusion High pressure significantly upregulates E-selectin expression by activating the NF- κ B signaling pathway.

血管内皮细胞承受三种不同的机械力: 剪切应力、环形应力和静水压或压应力。静水压是指血液对单位面积血管壁的侧压力(即血压), 正常人主动脉内压达 120 mmHg, 而高血压时血管壁静水压明显增加^[1]。目前关于静水压对血管壁细胞影响的研究也有报道^[2-4], 有研究报道^[5], 高压培养可促进血管内皮细胞粘附分子的表达, 但其具体机制不清。本实验主要观察体外模拟不同压力对粘附分子 E 选择素表达的影响, 并研究其是否与核因子 κ B(nuclear factor kappaB, NF- κ B) 信号转导通路有关, 为进一步研究血流动力学的异常变化导致血管内皮细胞功能

紊乱的分子机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

自制可调压力培养箱, 核因子 κ B 抑制因子 α (inhibitor of nuclear factor kappa B alpha, IKB α)、核因子 κ B p65 多克隆抗体和 FITC 标记的 E 选择素购于美国 Santa Cruz 公司, 辣根过氧化物酶/FITC 标记羊抗兔 IgG 购于北京中杉金桥公司, DMEM 培养基购于美国 Gibco 公司, 胎牛血清购于中国杭州四季青公司, 二甲基亚砷(DMSO)购于美国 Sigma 公司, 5% CO₂ 混合气购于衡阳特种供气站, 其它试剂均为国产分析纯。

1.2 细胞培养

人脐静脉内皮细胞株(human umbilical vein endothelial cells, hUVEC-12)由中南大学湘雅药学院提供, 源于美国典型培养物保藏中心。37℃、5% CO₂

[收稿日期] 2007-05-11 [修回日期] 2008-02-03

[基金项目] 国家自然科学基金(30470719); 湖南省教委青年重点课题(99B11); 湖南省教育厅科研基金(06C710)

[作者简介] 许灿新, 硕士, 讲师, 研究方向为心血管药理学, E-mail 为 canxinu@yahoo.com.cn。通讯作者罗其富, 教授, 研究方向为心血管药理学, E-mail 为 luo.qifu@163.com。廖端芳, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管药理学, E-mail 为 dfliao66@yahoo.com.cn。

条件, hUVEC-12 细胞培养于含体积分数为 10% 胎牛血清、100 ku/L 青霉素和 100 ku/L 链霉素 DMEM 完全培养基, 待生长汇合后, 细胞用含 0.5% 胎牛血清的 DMEM 洗三次, 并用 0.5% 胎牛血清的 DMEM 培养 24 h, 使其同步化, 然后高压培养细胞。

1.3 实验分组及处理方法

根据文献[4], 实验选用不同压力[0(对照组或大气压组)、120、150、180 和 210 mmHg] 分别培养细胞 24 h, 以检测 E 选择素的表达。为探讨压力上调 E 选择素的分子机制, 选定最佳压力 180 mmHg 培养不同时间, 检测 IkB α 的表达, 确定抑制其表达的最佳时间为 6 h 和 12 h, 然后再用不同压力培养细胞 6 h, 检测其是否在 180 mmHg 压力条件下表达最低, 同时 180 mmHg 分别培养 6 h 和 12 h, 进一步检测核因子 κ B 活化情况。

1.4 流式细胞术检测 E 选择素的表达

不同因素处理后, 用 0.25% 胰蛋白酶消化贴壁的 hUVEC-12 细胞, 1 000 r/min 离心 10 min, 去上清, PBS 漂洗 2 次, 调整细胞浓度为 1×10^6 /L, 加入 FITC 标记的一抗 37℃避光孵育 45 min 后, PBS 重悬细胞, 离心去上清, 1 mL 0.5% 多聚甲醛固定, 上流式细胞仪检测平均荧光强度。测定数据按流式细胞仪所配置的软件进行数据处理。

1.5 间接免疫荧光检测 E 选择素和核因子 κ B 活化

取对数生长期细胞, 以 4×10^4 /孔的密度接种于 24 孔培养板, 在 37℃、5% CO₂ 条件下培养过夜后, 按分组要求给以不同处理因素, 每组设 2 个平行孔。用预冷的 PBS 洗涤 3 次, 每孔加固定液(甲醇: 冰乙酸为 3: 1) 200 μ L, 4℃固定 15 min, 用预冷的 PBS 洗涤 3 次, 膜蛋白 E 选择素不加或胞浆蛋白核因子 κ B 加穿透液(0.25% + 5% DMSO 混合液) 1 mL, 37℃放置 45 min, 用预冷的 PBS 洗涤 3 次, 加入一抗(1:

200) 200 μ L, 37℃孵育 1 h, 预冷的 PBS 洗涤 3 次, 加入 FITC 标记的二抗(1: 100) 50 μ L, 37℃孵育 1 h, 荧光倒置显微镜下观察并照相。

1.6 Western blot 检测核因子 κ B 抑制因子 α 的表达

处理细胞后, 弃培养液, PBS 洗涤 3 次, 加入细胞裂解液 70~100 μ L, 置冰上裂解 5~10 min, 用细胞刮匙刮取蛋白, 吸入 EP 管中, 超声 3 次, 4℃12 000 r 离心 90 min, BCA 比色法进行蛋白定量。每孔 50 μ g 总蛋白加入到上样缓冲液中, 在沸水中煮 5~10 min, 80 V 电泳 30 min, 待样品进入 10% 的分离胶后, 140 V 电泳至溴酚蓝指示剂离胶底线约 1 cm 时停止。10 V 半干式电转膜 25 min, 将蛋白质转移至 PVDF 膜上。5% 脱脂牛奶室温封闭 1~2 h 后加入一抗 1: 500, 37℃孵育 1 h 或 4℃过夜, 洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的二抗 1: 1 000, 37℃孵育 1 h, 洗膜后加发光剂显影, 定影, 洗片。用凝胶成像分析系统行灰度扫描, 结果以 IkB α / β -actin 灰度比值表示。

1.7 图象和统计学处理

所有图像均用 Pixera Camera 图像分析系统采集。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS11.0 行统计处理, 组间比较用单因素方差分析(one-way ANOVA), 后用 LSD-*t* 检验, 以 $P < 0.05$ 判定差异有无显著性。

2 结果

2.1 高压培养对细胞形态的影响

正常培养细胞呈现多种形态, 大部分细胞呈梭形, 少数细胞呈三角形、多边形、圆形, 折光性好, 贴壁能力强; 120~180 mmHg 培养 24 h 的细胞形态没有很明显变化, 但细胞生长速度较正常培养快; 210 mmHg 培养 24 h 部分细胞变圆, 出现凋亡(图 1)。

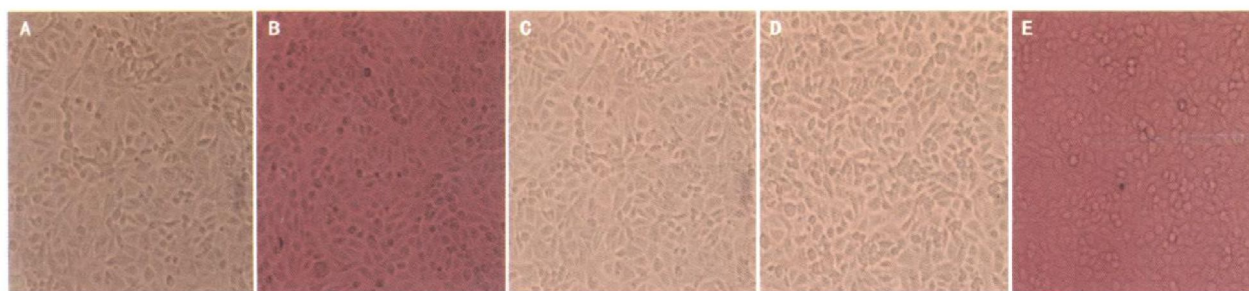


图 1. 高压培养对人脐静脉内皮细胞形态的影响(10×10)

A 为对照组, B 为 120 mmHg 组, C 为 150 mmHg 组, D 为 180 mmHg 组, E 为 210 mmHg 组。

2.2 高压培养促进 E 选择素蛋白的表达

正常细胞荧光较弱, E 选择素蛋白表达(荧光强度为 4.16 ± 0.84) 较少; 高压培养组细胞荧光明显增强, E 选择素蛋白表达明显增加, 在 150 和 180 mmHg

压力培养下最明显(荧光强度分别为 5.83 ± 0.94 和 6.74 ± 1.66), 较对照组(0 mmHg) 分别增加 1.4 和 1.5 倍($P < 0.01$); 但 210 mmHg 培养组却明显减少, 荧光减弱(图 2)。

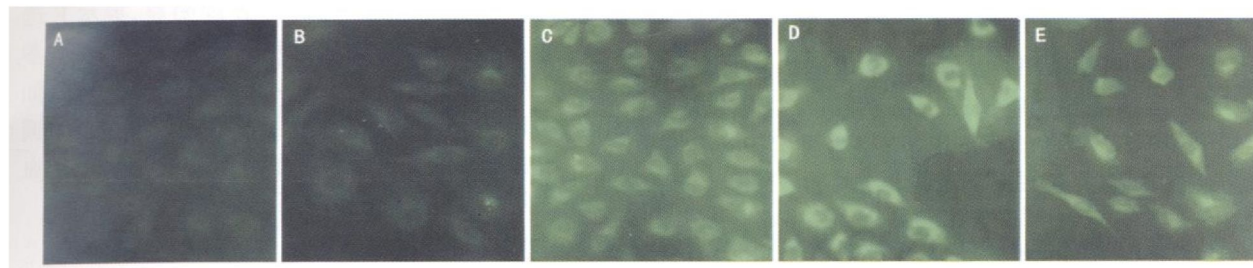


图 2. 不同压力培养细胞 24 h 对 E 选择素表达的影响(10×20)
A 为对照组, B 为 120 mmHg 组, C 为 150 mmHg 组, D 为 180 mmHg 组, E 为 210 mmHg 组。

2.3 高压培养抑制核因子 κ B 抑制因子 α 的表达

选用促进 E 选择素表达最强的压力 180 mmHg 培养细胞不同时间(0、3、6、12 和 24 h), I κ B α 蛋白表达相对灰度值分别为 1.51 ± 0.21 、 1.62 ± 0.20 、 0.69 ± 0.18 、 0.65 ± 0.22 和 1.09 ± 0.19 , 培养 6 h 和 12 h 时, I κ B α 蛋白表达比对照组降低 2 倍多(图 3, $P < 0.01$)。选择 I κ B α 蛋白表达明显降低的时间点 6 h, 不同压力(0、120、150、180 和 210 mmHg) 培养细胞, I κ B α 蛋白表达相对灰度值分别为 1.61 ± 0.03 、 1.63 ± 0.02 、 1.68 ± 0.04 、 0.79 ± 0.04 和 0.59 ± 0.03 , 180 和 210 mmHg 组 I κ B α 蛋白表达比对照组降低 2 倍多(图 4, $P < 0.01$)。

2.4 高压培养促进核因子 κ B 活化

选定诱导 I κ B α 蛋白表达降低的压力 180 mmHg 及合适的时间点 12 h 和 24 h 培养细胞, 发现对照组核因子 κ B p65 多分布在胞质, 胞核几乎没有表达, 而 180 mmHg 培养 12 h 组核因子 κ B p65 向胞核聚

积, 180 mmHg 培养 24 h 组核因子 κ B p65 主要集中在胞核(图 5)。

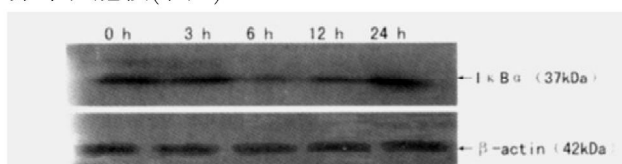


图 3. 180 mmHg 培养细胞不同时间对核因子 κ B 抑制因子 α 蛋白表达的影响

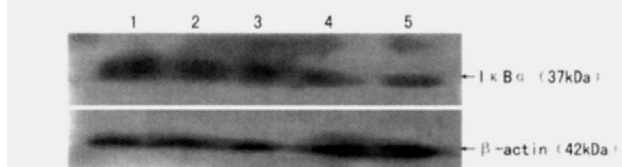


图 4. 不同压力培养细胞 6 h 对核因子 κ B 抑制因子 α 蛋白表达的影响
1、2、3、4 和 5 分别为 0、120、150、180 和 210 mmHg 组。

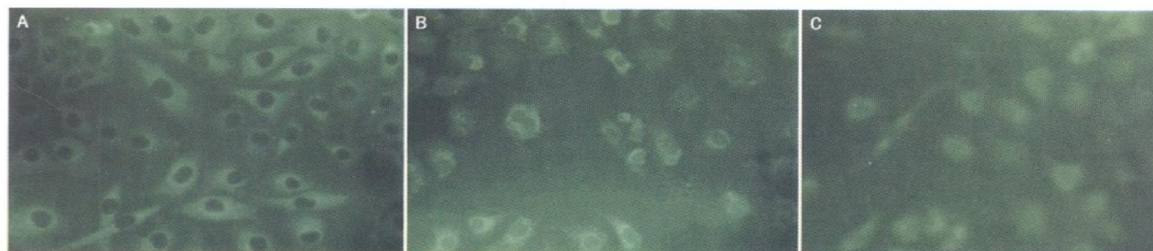


图 5. 高压培养对核因子 κ B p65 蛋白活化的影响(10×20)

A 为对照组, B 为 180 mmHg 12 h 组, C 为 180 mmHg 24 h 组。

3 讨论

近年研究表明,许多致动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的危险因素均可损伤血管内皮细胞,促进粘附分子的表达。E选择素是选择素家族中的一员,炎症的内皮细胞表达E选择素,其可促进白细胞与血管内皮细胞的牢固粘附。文献[5]报道,高压培养可促进P-选择素表达增加,但其具体机制不清。本实验体外模拟单纯高静水压培养人血管内皮细胞,发现高压(大于120 mmHg)培养明显增加E选择素蛋白的表达,180 mmHg培养24 h表达最高。

在人的As斑块中有活化的核因子 κ B存在,核因子 κ B信号转导途径能介导许多细胞因子引起基因表达,这些基因主要参与炎症和免疫等反应,包括不同的细胞因子(IL-1、IL-2、IL-6和肿瘤坏死因子)和粘附分子(血管细胞粘附分子、细胞间粘附分子1和E选择素)基因的转录^[6]。血管内皮细胞中核因子 κ B主要是由P50和P65二个亚单位构成的异源二聚体,静息的血管内皮细胞中P65、P50与其抑制物I κ B结合以非活性形式存在于细胞质,当血管内皮细胞被激活,I κ B磷酸化、裂解,P65和P50由胞质转入胞核中,与靶基因中相应位点结合,调节该基因的表达^[7]。血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 可刺激血管内皮细胞表达粘附分子及增加血管内皮细胞对单核细胞的粘附作用而加速As的发展,提示肾素-血管紧张素系统可能参与As的形成,至于Ang II 引起单核细胞趋化蛋白1及细胞间粘附分子升高的机制,目前认为是通过激活核因子 κ B而实现的^[8,9]。整合素等是剪切力的机械性刺激受体,也可能是压力受体。一种潜在的促炎症细胞因子骨桥蛋白与其受体整合素结合可激活I κ B α /I κ B激酶(I κ B kinase alpha, IKK α)通路活化核因子 κ B,使其核转位,促进转录^[10,11]。研究报道^[1,12,13],高压培养明显增加血管紧张素转化酶的活性和Ang II 的表达。

本实验观察到,高压培养可抑制I κ B α 蛋白表达,180 mmHg培养6 h和12 h I κ B α 蛋白表达明显降低,24 h表达开始恢复,可能与自身调节有关,同时促进核因子 κ B p65蛋白核转位,180 mmHg培养24 h组核因子 κ B p65核转位最明显,其中从I κ B α 蛋白表达降低到核因子 κ B p65核转位经过了一段时间,与

Philip等^[11,14]报道一致。由此表明,压力可能通过整合素激活I κ B α /IKK α 促进核因子 κ B p65核转位或通过增加Ang II 激活核因子 κ B,从而促进E选择素蛋白的表达。

E选择素的表达受压力的调节,但其高表达在相当于病理性高血压状态时才表现明显,提示E选择素可能是参与血管病理过程的基因而不是主要参与生理功能调节的基因,至少对压力的感受应是如此。因此,进一步研究生理性压力和病理性压力调节不同基因的表达过程,将有助于对高血压及高血压相关疾病如As等相互关系的认识。

[参考文献]

- [1] 杨永宗,阮长耿,唐朝枢,等. 动脉粥样硬化性心血管病基础与临床[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 537-546.
- [2] Hasel C, Durr S, Bauer A, et al. Pathologically elevated cyclic hydrostatic pressure induces CD95-mediated apoptotic cell death in vascular endothelial cells [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005, **289**: C312-C322.
- [3] 张峰,张炎,刘波,等. 高压力对体外培养动脉中膜平滑肌细胞增殖及增殖相关蛋白和生长因子的影响[J]. *生物物理学报*, 2004, **20** (5): 349-353.
- [4] 王云开,苏海,程晓曙. 高压培养对猪离体主动脉内皮细胞功能的影响[J]. *高血压杂志*, 2000, **8** (1): 81-85.
- [5] 钟宏,苏海,赖珩莉,等. 高压培养对血管内皮细胞P-选择素和一氧化氮合酶的影响[J]. *中华心血管病杂志*, 2001, **29** (7): 431.
- [6] Kempe S, Kestler H, Lasar A, et al. NF- κ B controls the global pro-inflammatory response in endothelial cells: evidence for the regulation of a pro-atherogenic program [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, **33**: 5308-319.
- [7] Bauele PA, Baltimore D. NF- κ B: ten years after [J]. *Cell*, 1996, **87** (1): 13-20.
- [8] Schieffer B, Schieffer E, Kleiner DH, et al. Expression of angiotensin II and interleukin-6 in human coronary atherosclerotic plaques: potential implications for inflammation and plaque instability [J]. *Circulation*, 2000, **101** (12): 1372-378.
- [9] Pueyo ME, Gonzalez W, Nicoletti A, et al. Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor- κ B activation induced by intracellular oxidative stress [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20**: 645.
- [10] Shyy JY, Chien S. Role of integrins in endothelial mechanosensing of shear stress [J]. *Circ Res*, 2002, **91** (9): 769-775.
- [11] Philip S, Kundu GC. Osteopontin induces nuclear factor- κ B-mediated pro-matrix metalloproteinase-2 activation through I κ B α /IKK signaling pathways and curcumin (diferuloylmethane) downregulates these pathways [J]. *J Biol Chem*, 2003, **278**: 14487-497.
- [12] 肖礼祖,罗伟,苏海,等. 葛根素对高压培养血管内皮细胞分泌NO和ACE活性的影响[J]. *新中医*, 2000, **32** (12): 31-33.
- [13] 冯俊朝,关丽,张政祥,等. 高压培养对血管平滑肌增殖的影响[J]. *实用心脑血管病杂志*, 2003, **11** (1): 5-7.
- [14] Philip S, Bulbule A, Kundu GC. Osteopontin stimulates tumor growth and activation of pro-matrix metalloproteinase-2 through nuclear factor- κ B-mediated induction of membrane type 1 matrix metalloproteinase in murine melanoma cells [J]. *J Biol Chem*, 2001, **276** (48): 44926-935.

(此文编辑 许雪梅)