

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2010)18-07-0532-07

ATP对人脐静脉内皮细胞增殖的抑制作用及其可能机制

肖智林¹, 杨梅¹, 陈美芳¹, 陈晓彬¹, 方立¹, 谢秀梅¹, 胡锦涛²

(1. 中南大学湘雅医院心内科, 湖南省长沙市 410008 2 武汉大学省人民医院中心实验室, 湖北省武汉市 430060)

[关键词] 三磷酸腺苷; 人脐静脉内皮细胞; 细胞增殖; P2Y₂ 11; cyclinB1

[摘要] 目的 观察胞外核苷酸 ATP 对人脐静脉内皮细胞增殖活性及其生物学功能的影响, 并初步探讨其可能机制。方法 通过 CCK-8 细胞增殖试验检测不同浓度的 ATP (0、1、5、10、50 和 100 $\mu\text{mol/L}$) 持续干预脐静脉内皮细胞 3 天及 ATP (50 $\mu\text{mol/L}$) 不同时间段干预 (1~6 天) 对脐静脉内皮细胞增殖的影响; 通过流式细胞术检测不同浓度的三磷酸腺苷诱导脐静脉内皮细胞凋亡情况及其对细胞生长周期的影响; 通过 RT-PCR 对脐静脉内皮细胞表达的 P2 受体亚型进行检测, 检测不同浓度的 ATP (0、5、10、50 和 100 $\mu\text{mol/L}$) 对脐静脉内皮细胞表达 P2Y₂、P2Y₁₁、细胞周期素 cyclinB1、cyclinD1 及细胞间粘附分子 1、血管细胞粘附分子 1 和内皮型一氧化氮合酶的影响。结果 与对照组比较, 三磷酸腺苷在高浓度 (50 和 100 $\mu\text{mol/L}$) 持续作用于脐静脉内皮细胞 3 天后显著抑制生长 ($P < 0.01$), 终浓度 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 ATP 呈时间依赖性抑制脐静脉内皮细胞生长。不同浓度的 ATP 对脐静脉内皮细胞凋亡均无明显影响, 但在高浓度时可显著增加 S 期的细胞比例和减少 G₂/M 期的细胞比例从而将细胞周期阻滞在 S 期; 静止状态下, 脐静脉内皮细胞表达 P2X₄ 5 和 P2Y₂ 4、11、13、14。三磷酸腺苷各浓度组均能明显上调脐静脉内皮细胞细胞间粘附分子 1 和血管细胞粘附分子 1 的表达, 仅在高浓度时上调 P2Y₂ 11、eNOS 的表达和下调 cyclinB1 表达, 而对表达 cyclinD1 的影响不明显。结论 胞外核苷酸三磷酸腺苷在高浓度 (50 和 100 $\mu\text{mol/L}$) 时可能通过受体 P2Y₂ 和 P2Y₁₁ 下调 cyclinB1 表达, 使细胞周期从 S 期向 G₂/M 期的转变受阻, 从而抑制脐静脉内皮细胞生长, 并且促进脐静脉内皮细胞表达动脉粥样硬化相关因子。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

ATP Inhibits the Proliferation of Human Umbilical Vein Endothelial Cell and Its Possible Mechanism

XIAO Zhi-Lin¹, YANG Mei¹, CHEN Mei-Fang¹, CHEN Xiao-Bin¹, FANG Li¹, XIE Xiu-Mei¹, and HU Jin-Yue²

(1. Department of Cardiology, Xiangya Hospital, Central South University Changsha 410008, China; 2. Central Laboratory of Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan, 430060, China)

[KEY WORDS] ATP; Human Umbilical Vein Endothelial Cell; Cell Proliferation; P2Y₂ 11; CyclinB1

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effect of extracellular nucleotide ATP on proliferation activity and biological function of human umbilical vein endothelial cell (HUVEC), and to explore its possible mechanism. **Methods** CCK-8 reagent kit was used to detect the effect of ATP intervening of different concentrations (0, 1, 5, 10, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$) and different time point (1~6 day) on proliferation of HUVEC; Flow cytometry was performed to detect apoptosis and cell cycle phase after treated with ATP as above. After treated with ATP of different concentrations (0, 5, 10, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h, RT-PCR was performed to detect firstly the expression of P2 subtypes in HUVEC, secondly the expression of P2Y₂, P2Y₁₁, cyclinB1 and cyclinD1 and finally the expression of intercellular adhesion molecule (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule (VCAM-1), endothelial nitric oxide synthase (eNOS). **Results** Compared with the control group, ATP groups (50 and 100 $\mu\text{mol/L}$) significantly inhibited the growth of HUVEC ($P < 0.01$) and the inhibition of ATP (50 $\mu\text{mol/L}$) on HUVEC growth was time-dependent. ATP had no significant effect on HUVEC apoptosis, but high concentrations significantly increased the proportion of cells in S phase and diminished the proportion of cells in G₂/M phase. ATP upregulated expression of ICAM-1, VCAM-1 in HUVEC in all concentration groups and upregulated expression of P2Y₂ 11, eNOS and down-regulated expression of cyclinB1 only at high concentrations while had no significant effect on cyclinD1 expression. **Conclusion** ATP at high concentrations (50, 100 $\mu\text{mol/L}$) significantly inhibited HUVEC growth by blocking cell cycle in S phase and promoted expression of atherosclerosis-related adhesion molecules in HUVEC, which may be relevant to its role of up-regulating the expression of P2Y₂ 11 and down-regulating the expression of cyclinB1.

[收稿日期] 2010-01-25

[修回日期] 2010-06-12

[作者简介] 肖智林, 博士研究生, 主要从事内皮细胞在心血管疾病中的基础研究与应用。Email为 xiaozl223@163.com。杨梅, 博士研究生, 主要从事内皮细胞在心血管疾病中的基础研究与应用。Email为 kyom0131@yahoo.com。陈美芳, 博士, 医师, 主要研究方向是内源性活性物质与心血管疾病的关系, Email为 chenmeifang16@hotmail.com。通讯作者谢秀梅, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心血管疾病的基础与临床研究, Email为 xyxiem@sina.com。

血管内皮作为多种心血管疾病危险因素作用的重要靶器官,不仅具有屏障作用,还能分泌多种因子,介导机体的凝血、免疫和平滑肌增殖等生命活动^[1,2]。血管内皮功能障碍和低水平的炎症是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)病理生理的两个主要特点^[3],内皮功能障碍和损伤启动的内皮细胞丢失被认为是As的始动环节。因此,深入探讨血管内皮细胞损伤的机制,促进内皮细胞的再生修复已成为治疗心血管疾病的重要目标之一^[4,5]。

嘌呤和嘧啶核苷酸作为一类强大的细胞外信号转导分子,在炎症、缺氧、剪切应力刺激及细胞死亡等情况下从细胞大量释放,通过结合到P2受体调节内皮细胞和平滑肌细胞的增殖、迁移,介导血小板聚集、白细胞粘附和调节血管张力,参与As和血管成形术后再狭窄的发生发展。有人提出,P2Y受体表达的上调可以作为As早期阶段的一个潜在诊断指标,而阐明心血管系统P2受体的表达情况及其生物学意义,将为As提供新的治疗策略^[6]。因此,本研究应用不同浓度的三磷酸腺苷(ATP)干预处理人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC),观察ATP对HUVEC增殖活性和表达As相关因子的影响,旨在揭示病理状态下释放的胞外核苷酸在As早期中的作用机制,从而为临床心血管疾病的防治提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

永生化的HUVEC购自于ATCC; ATP购于Sigma公司; DMEM培养基购于海克隆生物制品有限公司; 新生小牛血清(Gibco公司); 0.25% Trypsin-EDTA(Invitrogen); Cell Counting Kit-8购于日本同仁; PI-Annexin V凋亡试剂盒购于联科生物工程有限公司; PI(Sigma), PCR引物由上海英骏生物技术有限公司合成; Trizol(Invitrogen); 2×PCR Master Mix、逆转录试剂盒 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit均购于美国Fementas公司; 酶标仪(PerkinElmer 1420 Multilabel Counter); 流式细胞仪FACS Calibur(武汉大学生命科学院); GenePix Pro 4.0图像分析软件。

1.2 人脐静脉内皮细胞的培养

复苏冻存的经过永生化处理的HUVEC细胞株,加入适量DMEM培养基(含10%新生胎牛血清NBS、青霉素100 ku/L、链霉素100 ku/L)重悬细胞,置于饱和湿度的37℃, 5% CO₂细胞培养箱培养,每

两天换液并传代一次。加入不同干预后在倒置显微镜下观察细胞生长情况及死亡情况,根据实验目的,在不同时间点收集细胞以供实验使用。

1.3 实验分组

先通过CCK-8试验确定胞外核苷酸对HUVEC增殖作用的量效和时效关系,96孔板分组如下:

对照组:10% NBS的DMEM培养基+HUVEC; ④ATP各浓度组:10% NBS的DMEM培养基+HUVEC+1, 5, 10, 50, 100 μmol/L的ATP培养3天,因胞外核苷酸降解速度很快,作用持续时间很短暂,故每天加ATP予以持续刺激,根据量效关系的结果,选择作用最明显的剂量对HUVEC予以不同时间的干预:1, 2, 3, 4, 5和6天。再通过流式细胞术检测胞外核苷酸对HUVEC凋亡和细胞周期的影响,6孔板分组如下: 阴性对照组:10% NBS的DMEM培养基+HUVEC; ④ATP各浓度组:10% NBS的DMEM培养基+HUVEC+1, 10, 50, 100 μmol/L的ATP培养24 h; ④阳性对照组:10% NBS的DMEM培养基+HUVEC+Staurosporine 1 μmol/L培养24 h。

1.4 CCK-8细胞增殖试验

取生长状态良好的HUVEC细胞,0.25%胰酶消化,计数后调整细胞浓度至 2×10^7 个/L,按每孔100 μL接种于96孔培养板,每孔设3个复孔,按照实验分组加入不同的干预,干预前先用无血清DMEM培养基培养24 h,使细胞达到同步化,以后每天在同一时间点加入相同的干预予以持续刺激,剂量效应组于培养第3天、时间效应组分别于培养第1~6天运用酶联免疫检测仪测定450 nm吸光值(OD值),测定前1 h每孔均加入10 μL CCK-8置于37℃, 5% CO₂细胞培养箱避光孵育。设置一个只含DMEM培养基的空白对照孔。

1.5 细胞凋亡及细胞生长周期检测

PI-Annexin V凋亡试剂盒检测细胞凋亡:用不同浓度的ATP(0, 1, 10, 50, 100 μmol/L)干预处理HUVEC,并设立阳性对照组,24 h后消化、离心(2 kr/min, 3 min)收集细胞,并用500 μL的1×Binding Buffer重悬,调整细胞浓度为 1×10^6 个/L,再加入5 μL Annexin V和10 μL 20 mg/L的Propidium Iodide,室温避光孵育5 min后用流式细胞仪检测(Ex=488 nm; Em=530 nm)细胞凋亡的情况(绿色荧光通过FITC通道通常为FL2来检测;红色荧光通过PI通道通常为FL1来检测)。PI单染法检测细胞周期:6孔板培养的HUVEC先用无血清的DMEM培养基使细胞同步化,24 h后换用10% NBS的DMEM,同时加入不同浓度的ATP干预(0, 1, 5, 10,

50及 100 $\mu\text{mol/L}$), 24 h后消化离心 (2 kr/min, 3 min)收集细胞约 $(1\sim 5) \times 10^9/\text{L}$, 用 2 mL 4℃预冷的 PBS洗涤细胞两次, 离心 (2 kr/min, 3 min)后弃上清, 用 -20℃预冷的 70% 乙醇 2 mL重悬细胞, 4℃固定过夜, 12 kr/min短暂离心弃上清, PBS洗涤细胞两次, 离心后加入 939 μL PBS和 10 g/L的 RNase 10 μL (终浓度为 0.1 g/L), 室温孵育 30 min后加入 1%的 Triton-X 100和 50 μL 1g/L的 Propidium Iodide (终浓度为 50 mg/L), 4℃避光孵育 30 min后进行流式细胞仪检测。

1.6 总 RNA 抽提

当 6孔板 HUVEC生长达适当密度时, 按照 TRIzol操作程序提取 HUVEC总 RNA: 取生长状况良好的细胞, 弃去培养基, 用 $1 \times$ PBS洗涤细胞一遍, 加入 0.5 mL TRIzol液裂解细胞 ($1\text{ mL}/10^7$), 室温孵育 5 min, 吸入 1.5 mL无 RNA酶 EP管中, 按 TRIzol与氯仿 5: 1的比例加入 0.1 mL氯仿, 充分振荡 EP管 15 s, 12 kr/min, 4℃离心 15 min, 小心吸取上层水相转入另一 EP管中, 加入等体积的异丙醇,

混匀后室温放置 10 min, 12 kr/min, 4℃离心 10 min, 弃去上清, 75% 乙醇洗涤沉淀, 室温风干, 用 DEPC处理 ddH₂O溶解总 RNA; 用紫外分光光度计测定 OD₂₆₀值, 得出总 RNA的纯度和浓度, -70℃保存备用。

1.7 逆转录聚合酶链反应

用 M-MuLV 逆转录酶将以 Trizol法抽提的细胞总 RNA合成第一链 cDNA, 以 1 μg 的 cDNA为模板进行 PCR扩增反应。根据目的基因的 mRNA序列, 采用 Primer5.0引物分析软件设计相应引物, 引物序列如表 1。PCR反应条件: 95℃预变性 1 min, 95℃变性 30 s, 60℃退火 30 s, 68℃延伸 90 s, 68℃终末延伸 10 min, 扩增 25或者 30个循环, 均以 GAPDH作为内参照。PCR产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, VDS紫外凝胶摄影仪成像。

1.8 统计学分析

采用 SPSS12.0统计学软件进行数据分析处理: 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用 *t*检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

表 1 引物序列

Product	Forward primer	Reverse primer
GAPDH	AATCCCATCACCATCTTCCA	CCTGCTTCACCACTTCTTG
P2X1	ACCTGCCTCTTTCACAAGACC	CTGGCAAACCTGAAGTTGAA
P2X2	CCCAAAATTCACCATCCTCA	TGCTCCGGACCTGTGAGAT
P2X3	TGCTCCGGACCTGTGAGAT	AAACTTGACCAAGTCCCTTA
P2X4	TCCGTCAAAGCGTGTGAGGT	TGCGTTCTCCACTATTTTGC
P2X5	AAGAACCCTACTGCCCAT	TTTCATCAGGGTCCGGAAC
P2X6	TGTGTGGTGTTCATATGGGA	AATGCGGAACACGGGACAGTA
P2X7	CCCTGTGTGGTCAACGAATA	TCCTCTGGTTGTCCAGGAAT
P2Y1	ATGTGTGCTTTCAATGACAGGGTTT	TGTGGATGTGGGCATTCTACTTCT
P2Y2	GTGTGCATTGATGAGTGAGGAACC	ATCAGACACAGCCAGGTGGAACATA
P2Y4	CCAGTACAGAGTCTCCCTGTTGAG	CCAATAGAAAAGAAAGCCGACGAAC
P2Y6	GCTTATTTCCCATCAAGGATCAAGG	ATGGTTCTTCTGGCAGAGGTCTTG
P2Y11	CTACAGAGCGTATAGCCTGGTGCTG	CCATGTAGACTAGAGGTGGACACA
P2Y12	CATTCAAACCTCCAGAATCAACAG	CGATCGATAGTTATCAGTCCCAGGAA
P2Y13	GGTGTGTTGTTACATCCCCAG	CTTTAAGGAAGCACACTTTTTCAC
P2Y14	AGGAAAAGCTGACACCCAGA	CTTTCCCATTCGCCAGTAGA
ICAM-1	CTATAACC GCCAGCGGAAGAT	AGATCAGATGCGTGGCCT AGT
VCAM-1	ACGCT GACAATGAATCCTGTT	AAACTCTTGGTTTCCAGGGA
eNOS	TTCCGGGGATTCTGGCAGCAG	GCCATGCTAACATCGCCGCAG

2 结果

2.1 ATP对人脐静脉内皮细胞细胞增殖的抑制作用

与阴性对照组比较, 低浓度的 ATP (1、5、10

$\mu\text{mol/L}$)持续刺激细胞 72 h后对 HUVEC呈促进增殖作用, 但无统计学意义; 较高浓度的 ATP (50、100 $\mu\text{mol/L}$)持续刺激细胞 72 h后显著抑制 HUVEC的增殖, 抑制率分别为 54.8%和 60.4% (图 1); 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 ATP呈时间依赖性抑制 HUVEC增殖,

第 1~6 天的抑制率分别为 16.9%、37.9%、59.7%、68.6%、77.5%、82.0% (图 1)。

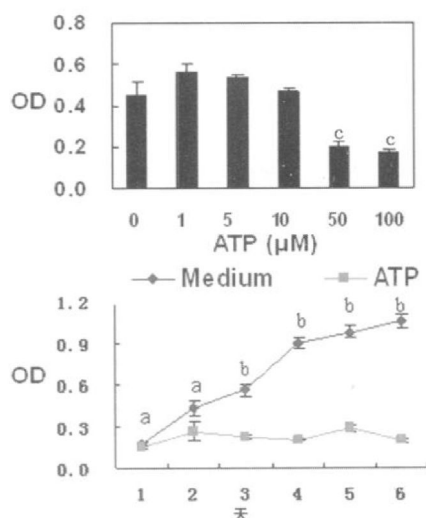


图 1 ATP 对人脐静脉内皮细胞增殖试验的剂量效应和时间效应

上图为不同浓度的 ATP 对 HUVEC 细胞增殖的影响 (72 h); 下图为 ATP 在 50 μmol/L 时干预处理不同时间对 HUVEC 细胞增殖的影响。a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, c 为 $P < 0.001$, $n = 3$ 与对照组比较。

2.2 ATP 对人脐静脉内皮细胞细胞凋亡和细胞周期的影响

与阳性对照组 (Staurosporine 1 μmol/L) 比较, 不同浓度的 ATP (0、1、10、50、100 μmol/L) 处理 HUVEC 24 h 对 HUVEC 细胞形态及凋亡均无明显影响 (图 2); 不同浓度的 ATP (1、5、10、50、100 μmol/L) 处理 HUVEC 24 h 后, 与阴性对照组比较, 50、100 μmol/L ATP 处理组的 G_0/G_1 期细胞比例没有明显改变, G_2/M 期细胞比例显著减少, 而 S 期细胞比例显著增加。上述结果显示, 1~100 μmol/L 的 ATP 对 HUVEC 的凋亡无明显影响, 50、100 μmol/L 的 ATP 通过阻滞细胞周期于 S 期而改变细胞的周期时相分布, 从而抑制 HUVEC 的增殖, 且该作用不涉及诱导 HUVEC 凋亡 (表 2)。

2.3 P2Y 受体亚型 mRNA 在人脐静脉内皮细胞的表达及 ATP 对其表达的影响

应用 RT-PCR 方法检测核苷酸各 P2 受体亚型 (P2X-1~7, P2Y-1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14) 的 mRNA 在人脐静脉内皮细胞株的表达。结果显示: HUVEC 表达 P2X-4、5 和 P2Y-2, 4, 11, 13, 14 的 mRNA (图 3)。不同浓度的 ATP (1、50 μmol/L) 干

预处理 HUVEC 24 h 后, 1 μmol/L 的 ATP 明显上调 P2X-4、5 的表达, 50 μmol/L 的 ATP 明显上调 P2Y-2, P2Y-4 和 P2Y-11 的表达, 且在该浓度范围内, ATP 呈浓度依赖性上调 P2Y-4 和 P2Y-11 的表达 (图 3 和表 3)。

表 2 不同浓度的 ATP 对人脐静脉内皮细胞周期时相分布的影响 ($\bar{x} \pm s$)

ATP (μmol/L)	细胞增殖率		
	G_0/G_1	S	G_2/M
0	41.7% ± 1.96%	25.8% ± 2.18%	32.5% ± 3.12%
1	46.3% ± 2.07%	24.6% ± 0.98%	29.0% ± 2.83%
5	45.1% ± 3.17%	24.6% ± 1.39%	30.3% ± 2.06%
10	43.9% ± 4.21%	26.5% ± 2.96%	29.6% ± 1.28%
50	46.6% ± 2.48%	52.5% ± 1.17% ^a	0.87% ± 1.82% ^a
100	46.9% ± 1.83%	49.5% ± 2.49% ^a	3.58% ± 3.35% ^a

a 为 $P < 0.01$ 与对照组比较。

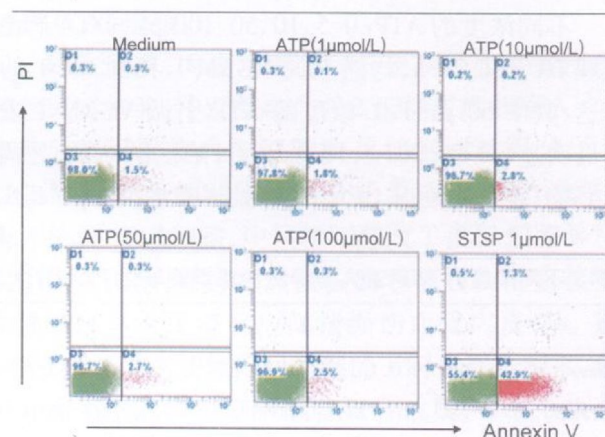


图 2 流式细胞术检测 ATP 对人脐静脉内皮细胞凋亡及细胞周期的影响

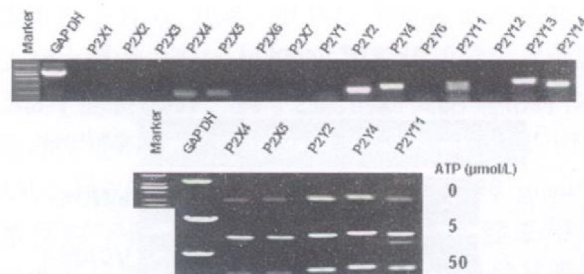


图 3 P2 受体在人脐静脉内皮细胞的表达情况 上图为入脐静脉内皮细胞表达 P2 受体亚型情况; 下图为不同浓度的 ATP 对人脐静脉内皮细胞主要表达的 P2 受体的影响。

表 3 不同浓度的 ATP 对人脐静脉内皮细胞表达 P2 受体 mRNA 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

分 组	P2X-4	P2X-5	P2Y-2	P2Y-4	P2Y-11
Control	0.1523 $\pm$ 0.0856	0.1635 $\pm$ 0.0970	0.5600 $\pm$ 0.1809	0.7525 $\pm$ 0.0576	0.5153 $\pm$ 0.0336
ATP (5)	0.5872 $\pm$ 0.0586 ^b	0.5007 $\pm$ 0.1556 ^b	0.6870 $\pm$ 0.1597	0.7782 $\pm$ 0.0318 ^a	0.7478 $\pm$ 0.3441 ^a
ATP (50)	0.1645 $\pm$ 0.0420	0.1826 $\pm$ 0.1651	0.8857 $\pm$ 0.0395 ^b	0.9632 $\pm$ 0.0512 ^b	0.8819 $\pm$ 0.2746 ^b

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.001$, 与对照组比较。

2.4 ATP 对人脐静脉内皮细胞表达 P2Y-2、P2Y-11 及 cyclinB1、cyclinD1 的影响

不同浓度的 ATP (0, 5, 10, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$) 干预处理 HUVEC 24 h, 高浓度组明显上调 HUVEC 细胞 P2Y-2、P2Y-11 的 mRNA 表达 (以 50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组作用最明显), 并且下调 cyclinB1 的 mRNA 表达 (P 均 < 0.001), 各 ATP 浓度组均能上调 P2Y-11 的 mRNA 表达, 而对 cyclinD1 的 mRNA 表达无明显影响 (图 4 和表 4)。

2.5 ATP 对人脐静脉内皮细胞表达 ICAM-1、VCAM-1 及 e-NOS 的影响

不同浓度的 ATP (0, 5, 10, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$) 干预处理 HUVEC 24 h 均能上调 VCAM-1 和 ICAM-1 的表达, 其中 50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 ATP 上调 VCAM-1 表达最明显 ($P < 0.001$), 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 ATP 上调 ICAM-1 表达最明显 ($P < 0.01$), ATP 在 10 $\mu\text{mol/L}$

浓度时下调 e-NOS 的表达 ($P < 0.05$, 图 5 和表 5)。

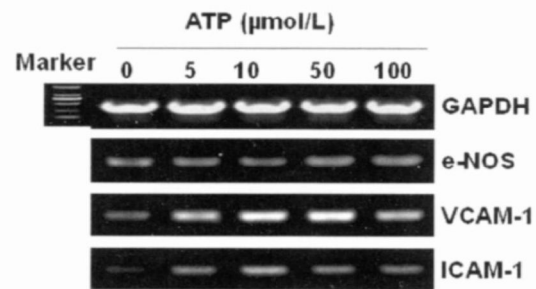


图 4 不同浓度的 ATP 对人脐静脉内皮细胞表达 P2Y-2、11 受体和 cyclins mRNA 的影响

表 4 不同浓度的 ATP 对人脐静脉内皮细胞表达 P2Y-2、11 受体和 cyclins mRNA 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

分 组	P2Y-2	P2Y-11	CyclinB1	CyclinD1
Control	0.1215 $\pm$ 0.0153	0.1114 $\pm$ 0.0009	0.5928 $\pm$ 0.1153	0.3275 $\pm$ 0.1365
ATP (5)	0.1204 $\pm$ 0.0058	0.1407 $\pm$ 0.0173 ^a	0.5640 $\pm$ 0.1102	0.2485 $\pm$ 0.0306
ATP (10)	0.1705 $\pm$ 0.0643	0.1816 $\pm$ 0.0058 ^b	0.5319 $\pm$ 0.1159	0.2432 $\pm$ 0.0751
ATP (50)	0.6621 $\pm$ 0.0656 ^b	0.6827 $\pm$ 0.0115 ^b	0.3817 $\pm$ 0.0321 ^a	0.3102 $\pm$ 0.1021
ATP (100)	0.6139 $\pm$ 0.0458 ^b	0.5832 $\pm$ 0.0577 ^b	0.3451 $\pm$ 0.0058 ^a	0.2712 $\pm$ 0.1015

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.001$, 与对照组比较。

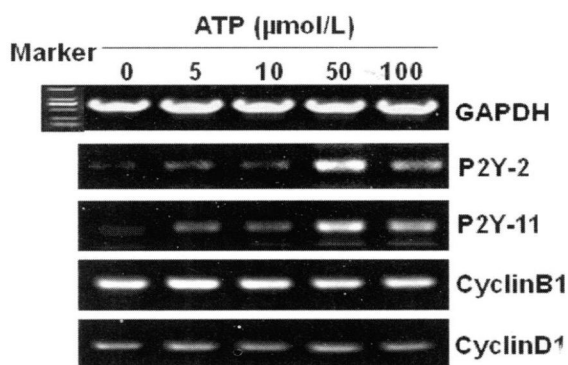


图 5 不同浓度的 ATP 对人脐静脉内皮细胞表达粘附分子和 e-NOS 的影响

表 5 不同浓度的 ATP 对人脐静脉内皮细胞表达粘附分子和 e-NOS 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

分 组	P2Y-2	P2Y-11	CyclinB1
Control	0.01512 $\pm$ 0.2033	0.0367 $\pm$ 0.0208	0.2767 $\pm$ 0.0379
ATP (5)	0.4102 $\pm$ 0.3967 ^b	0.1625 $\pm$ 0.0508 ^a	0.2033 $\pm$ 0.0577
ATP (10)	0.6018 $\pm$ 0.5667 ^b	0.3133 $\pm$ 0.0850 ^c	0.1833 $\pm$ 0.0404 ^a
ATP (50)	0.7535 $\pm$ 0.6533 ^b	0.1805 $\pm$ 0.0624 ^a	0.3267 $\pm$ 0.0643
ATP (100)	0.3948 $\pm$ 0.3502 ^a	0.1437 $\pm$ 0.0458 ^a	0.4261 $\pm$ 0.1480

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.001$, c 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

3 讨论

血管内皮细胞 (endothelial cell, EC) 再生是血

管内膜损伤后的主要修复方式。各种因素导致 EC 损伤或剥脱后,邻近内皮细胞出现再生修复以取代受损或剥脱的内皮,这个过程称为内皮再生 (endothelial regeneration)。内皮的再生过程包括几个阶段: (1)损伤周边邻近的正常细胞向损伤区扩展,但不足以覆盖损伤区和重建内膜; (2)邻近正常细胞发生迁移和增殖; (3)增殖停止时细胞表型发生改变,从增殖型又转向静止型。越来越多的证据表明,EC 再生障碍对 As 和再狭窄起着不可忽视的作用。血管内膜损伤后,内皮细胞凋亡增加,同时,内皮细胞的增殖也受到抑制,血管内皮的再生修复受阻,二者综合作用的结果使得内皮细胞数量减少和单层内皮通透性增加,从而诱导平滑肌细胞增殖、迁移和血栓形成,最终导致粥样病灶的形成和不稳定斑块的剥脱。

在炎症、局部缺血、剪切应力刺激、细胞凋亡及肿瘤等病理状态下,三磷酸腺苷 (ATP) 及其相关化合物从细胞内大量释放,与细胞膜上特异的嘌呤嘧啶受体 (P 受体) 结合,通过激活不同的信号级联通路发挥不同的生物学作用^[7]。P 受体可分为 P1 和 P2 两类, P2 受体又分为配体门控离子通道型受体 (P2X) 和 G 蛋白偶联型受体 (P2Y 受体), 其中 P2X 受体包括 P2X1~7 七种亚型, P2Y 受体包括 P2Y1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14 八种亚型。越来越多的证据显示了嘌呤系统在心血管疾病中的重要作用, 它刺激血管收缩和舒张、调节血管平滑肌细胞和内皮细胞增殖, 参与血管重塑和血小板聚集, 调节凝血、炎症过程和一些心脏功能如参与血压的调节、心肌梗死和心衰的发展^[8,9]。因此, 本实验先用不同浓度的 ATP 干预处理 HUVEC, 观察其对 HUVEC 细胞增殖活性的影响。实验结果表明较高浓度的 ATP (50~100 $\mu\text{mol/L}$) 持续刺激细胞 72 h 后明显抑制 HUVEC 增殖, 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 ATP 在 1~6 天内呈时间依赖性抑制 HUVEC 增殖, 同时流式细胞术证实各浓度的 ATP 对 HUVEC 并无诱导凋亡作用, 说明 ATP 的抑制增殖作用并不依赖于凋亡途径。为了进一步探讨 ATP 抑制 HUVEC 增殖的作用机制, 我们用 PI 单染法进行了细胞周期检测, 结果显示细胞比例在 G_0/G_1 期无明显改变, 而 S 期显著增加, G_2/M 期显著减少, 提示 ATP 通过将细胞周期阻滞于 S 期而抑制 HUVEC 增殖。

然而, ATP 具体通过何种调控机制抑制 HUVEC 增殖尚不是很清楚。众所周知, 细胞周期调控机制的核心是一组细胞周期依赖性蛋白激酶 (CDKs), 其时相性激活依赖于细胞周期素 (cyclins), 而 cy-

clinB1 与 CDK1 的结合是 M 期事件启动和进行的必要条件。大量研究表明, P2 受体活化后可发挥有丝分裂原效应, 诱导 VSMC 增殖和迁移^[10], 也能刺激内皮细胞 TNF- α 的表达并进一步活化 caspase 3 而显著增加其凋亡, 从而通过多种途径参与 As 的发生与发展^[11]: 如 P2Y11 受体活化后可以抑制中性粒细胞凋亡^[12], 扩大 As 中的炎症级联反应, 也可以使 C 反应蛋白的水平升高从而增加心肌梗死的风险^[13]。由于 P2 受体不同的生理学作用可能取决于胞外核苷酸的浓度、细胞表达的 P2 受体类型及它们的失敏程度和第二信使的种类, 我们先检测了静止状态下 HUVEC 表达的 P2 受体亚型: P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y11, P2Y13, P2Y14。结果显示 P2Y2 和 P2Y11 均有较高表达, 而且 ATP 在较高浓度 (50~100 $\mu\text{mol/L}$) 时能显著上调 P2Y2 和 P2Y11 的表达及下调 cyclinB1 的表达。因此, 我们大胆推论, ATP 可能通过 P2Y2 或 P2Y11 下调细胞周期素 cyclinB1 的表达, 使细胞周期从 S 期向 G_2/M 期的转变受阻, 从而抑制 HUVEC 增殖。

研究证实, 内皮功能障碍与更高的心血管疾病死亡风险相关, 特别是在合并 2 型糖尿病的病人^[3]。各种危险因素使内皮细胞表达细胞间粘附分子 1 (ICAM-1) 和血管细胞粘附分子 1 (VCAM-1) 增强, 诱导单核-巨噬细胞、中性粒细胞及 T 淋巴细胞等粘附于内皮细胞, 通过释放蛋白酶和氧自由基直接损伤或通过体液免疫反应间接损伤血管内皮^[14]。近年来, 对于内皮功能障碍机制的了解也逐步深入, 包括功能失调的内皮型一氧化氮合成酶 (eNOS) 概念的提出, eNOS 辅酶四氢生物蝶呤的缺乏可能在内皮功能障碍中起重要作用^[15]。Weisman 等发现活化血管细胞的 G 蛋白偶联受体 P2Y2 可以介导炎症反应^[16,17]; ATP、UTP 可通过 P2Y2 受体趋化树突状细胞和招募炎症细胞到血管病变部位^[18], 刺激内皮细胞促炎因子 IL-6, IL-8, MCP-1, TNF- α 的释放和增加人微血管内皮细胞 ICAM-1 和冠状动脉内皮细胞 VCAM-1 的表达^[19,20]。与之前的研究结果相符, 本实验亦发现不同浓度的 ATP 均能明显上调 HUVEC ICAM-1 和 VCAM-1 的表达, 而 ATP 仅在 10 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度时下调 eNOS 表达, 说明在本实验采用的 ATP 浓度范围内, 胞外核苷酸均有可能通过其受体介导炎症反应从而参与 As 的发生与发展。

综上, 本研究观察了 ATP 在较高浓度 (50~100 $\mu\text{mol/L}$) 时对 HUVEC 细胞增殖的抑制作用, 并初步证实了其作用机理, 同时亦发现 ATP 在低浓度时有促进 HUVEC 增殖的趋势, 但无统计学意义。如能

进一步阐明 ATP通过何种亚型的 P2受体促进或者抑制 HUVEC增殖及其下游信号通路, 则能更好地揭示胞外核苷酸在 As早期内皮受损中作用的分子机制, 为临床实施早期干预如促进内皮再生修复和保护内皮功能提供新的策略。

[参考文献]

- [1] You Huaizhou, Gu Yong. Effects Of HELP therapy on acute ischemic stroke and vascular endothelial cell function [J]. *Therapeutic Apheresis & Dialysis* 2007 **11** (3): 171-176
- [2] Zhang QH, She MP. Biological behaviour and role of endothelial progenitor cells in vascular diseases [J]. *Chinese Medical Journal* 2007 **120** (24): 2 297-303
- [3] Jager J, Dekker M, Kooy A, et al. Endothelial Dysfunction and Low-Grade Inflammation Explain Much of the Excess Cardiovascular Mortality in Individuals With Type 2 Diabetes [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006 **26** 001-009
- [4] You Huaizhou, Gu Yong. Effects of HELP therapy on acute ischemic stroke and vascular endothelial cell function [J]. *Ther Apher Dial* 2007 **11** (3): 171-176
- [5] Jordan SP, William CS. Evolving functions of endothelial cells in inflammation [J]. *Nature Reviews* 2007 **7** 803-815
- [6] Seye CI, Kong Q, Yu N, et al. P2 receptors in atherosclerosis and post-angioplasty restenosis [J]. *Purinergic Signal* 2007 **3** (1-2): 153-162
- [7] DiVirgilio F, Solini A. P2 receptors: new potential players in atherosclerosis [J]. *Br J Pharmacol* 2002 **135** (4): 831-842
- [8] Bumstock G. Purinergic signalling and vascular cell proliferation and death [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002 **22** 364-373
- [9] DiVirgilio F, Solini A. P2 receptors: new potential players in atherosclerosis [J]. *Br J Pharmacol* 2002 **135** 831-842
- [10] Erlinge D. Extracellular ATP: a central player in the regulation of vascular smooth muscle phenotype [J]. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004 **287** C260-C262
- [11] Mallat Z, Tedgui A. Apoptosis in the vasculature: mechanisms and functional importance [J]. *Br J Pharmacol* 2000 **130** 947-962
- [12] Vaughan KR, Stokes L, Prince LR, et al. Inhibition of Neutrophil Apoptosis by ATP Is Mediated by the P2Y11 Receptor [J]. *J Immunol* 2007 **179** 8 544-553
- [13] Amisten S, Melander O, Wihlborg AK, et al. Increased risk of acute myocardial infarction and elevated levels of C-reactive protein in carriers of the Thr87 variant of the ATP receptor P2Y11 [J]. *Eur Heart J* 2007 **28** (1): 13-18
- [14] Wei Jian Zhang, Hao Wei, Tony Hagen, et al. α -Lipoic acid attenuates LPS-induced inflammatory responses by activating the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway [J/OL]. *PNAS* 2007 **3** (10): 4 077-082
- [15] Landmesser H, Heutmann D. The clinical significance of endothelial dysfunction [J]. *Curr Opin Cardiol* 2005 **20** 547-551. Rudijanto A. The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Acta Med Indones* 2007 **39** (2): 86-93
- [16] Weisman G, Yu N, Agca C, et al. The P2Y2 Nucleotide Receptor Contributes To Intimal Lesion Growth And Regulates Lymphocyte Secretion [J]. *Circulation* 2008 **118** S571.
- [17] Stokes L, Surprenant A. Purinergic P2Y2 Receptors Induce Increased MCP-1/CCL2 Synthesis and Release from Rat Alveolar and Peritoneal Macrophages [J]. *J Immunol* 2007 **179** 6 016-023
- [18] Idzko M, Dichmann S, Ferrari D, et al. Nucleotides induce chemotaxis and actin polymerization in immature but not mature human dendritic cells via activation of pertussis toxin-sensitive P2y receptors [J]. *Blood* 2002 **100** 925-932
- [19] Seiffert K, Ding W, Wagner JA, et al. ATP γ S enhances the production of inflammatory mediators by a human dermal endothelial cell line via purinergic receptor signaling [J]. *J Invest Dermatol* 2006 **126** 1 017-027.
- [20] Seye CI, Yu N, Jain R, et al. The P2Y2 nucleotide receptor mediates UTP-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in coronary artery endothelial cells [J]. *J Biol Chem* 2003 **278** 24 960-965

(此文编辑 李小玲)