

# 醛固酮对人脐静脉内皮细胞血管内皮生长因子表达的影响

龙惠东<sup>1</sup>, 林云恩<sup>2</sup>, 曾昭华<sup>3</sup>

(广州医学院, 1. 附属肿瘤医院 ICU; 2. 第一附属医院病理科; 3. 第一附属医院心内科, 广东省广州市 510000)

[关键词] 血管内皮细胞; 脐静脉; 醛固酮; 细胞增殖; 血管内皮生长因子

[摘要] 目的 醛固酮对人脐静脉内皮细胞增殖的影响及其机制。方法 应用 MTT 法测试细胞的生长曲线, 检测不同浓度的醛固酮对人脐静脉内皮细胞的增殖, 流式细胞仪检测醛固酮对人脐静脉内皮细胞的凋亡, 半定量 RT-PCR 及 Western 印迹分别检测人脐静脉内皮细胞的血管内皮生长因子 mRNA 水平及蛋白水平的表达。结果

MTT 比色法显示, 醛固酮对人脐静脉内皮细胞增殖具有抑制作用且呈浓度依赖性; ④当醛固酮浓度增加到 800 μg/L 后, 其增殖抑制率不再升高, 而此浓度时人脐静脉内皮细胞的凋亡率达到峰值的 26.5% ± 3.3%; ④经过醛固酮处理, 人脐静脉内皮细胞的血管内皮生长因子 mRNA 及蛋白水平的表达量均显著下降。结论 醛固酮通过降低人脐静脉内皮细胞的血管内皮生长因子表达抑制人脐静脉内皮细胞增殖并促进人脐静脉内皮细胞凋亡。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## The Impact of Aldosterone on Expression of Umbilical Vein Endothelial Cells Vascular Endothelial Growth Factor

LONG Huidong<sup>1</sup>, LIN Yun-En<sup>2</sup>, and ZENG ZhaoHua<sup>3</sup>

(1. Intensive Care Unit, 2. Department of Pathology, 3. Department of Cardiology of Affiliated of Guangzhou Medical College, Guangzhou, Guangdong 510000 China)

[KEY WORDS] Vascular Endothelial Cell; Umbilical Veins; Aldosterone (ALD); Cell Proliferation; Vascular Endothelial Growth Factor

[ABSTRACT] **Aim** To explore the inhibition of aldosterone (ALD) on proliferation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and its mechanism. **Methods** MTT was used to measure the proliferation. Flow cytometry assay (FCM) was applied for the detection of the apoptosis. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) mRNA and VEGF protein were measured by semi-quantitative RT-PCR and Western blot respectively. **Results** Proliferation of HUVEC was inhibited by ALD in a dose-dependent manner, the cell viability of HUVEC decreased gradually. ④ However, when the concentration of ALD was above 800 μg/L, HUVEC were resistant to ALD. After the cells were incubated with ALD (800 μg/L) for 24 h, the rate of apoptosis in the HUVEC could reach 26.5% ± 3.3%. ④ The expression of VEGF mRNA and VEGF protein in HUVEC were decreased after it was incubated with ALD. **Conclusion** ALD can induce apoptosis and inhibit proliferation of HUVEC through changing the expression of VEGF.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是一多因素参与、多环节相互作用的慢性疾病, 发病机制复杂。近来研究表明, 内皮功能障碍是 As 的发病基础。越来越多的证据证实, 醛固酮参与 As 的发生过程<sup>[1, 2]</sup>, 作为肾素-血管紧张素-醛固酮轴的一环, 醛固酮的具体作用尚不明确。本课题组在先前的研究中已经证实醛固酮通过激活盐皮质激素受体抗体 (mineralocorticoid receptor antibody, MR) 诱导 HUVEC 细胞凋亡, 现进一步探讨其对 HUVEC 细胞增

殖的影响及其相关机制。而 HUVEC 源于新生儿脐带的内皮细胞, 具有血管内皮细胞的特性, 是人们用来进行人血管内皮细胞研究的最常用细胞<sup>[3]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人新生儿脐带: 广州医学院第一及第三附属医院妇产科。醛固酮 (上海华蓝公司), MTT (美国 Gibco), BCA (bicinchoninic acid) 蛋白含量检测试剂盒、内参, 发光 Marker (南京凯基), Ⅲ型胶原酶、胎牛血清、199 培养基、磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS), 内皮细胞生长添加剂 (endothelial cell growth supplement, ECGS)、牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA)、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (annexin V-FITC apoptosis detection

[收稿日期] 2010-08-02 [修回日期] 2010-10-07

[基金项目] 广东省科技计划项目 (2009B030801359) 和广东省自然科学基金 (9151018201000020)

[作者简介] 龙惠东, 硕士研究生, 医师, 主要从事心血管疾病基础与临床研究, Email 为 longhd1110@yahoo.com.cn。林云恩, 病理技师, 主要从事血管动脉硬化研究, Email 为 linyuner@126.com。曾昭华, 硕士研究生导师, 教授, 主任医师, 主要从事心血管疾病基础与临床研究, Email 为 zengzhao hua2000@yahoo.com.cn。

kit), 细胞培养瓶 (广州国奥公司), 细胞培养箱, 倒置相差显微镜 (日本 Nikon 公司)。兔抗人(Ⅱ)因子相关抗原多克隆抗体, FITC 标记的羊抗兔抗体, 均购自北京中衫金桥公司。Trizol (美国 GIBCO), 一步法 RT-PCR 试剂盒, 兔抗人血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 抗体、二抗 HRP 标记羊抗兔 IgG (Takara 公司)。

## 1.2 原代人脐静脉内皮细胞的培养

在无菌条件下于健康产妇分娩后立即取新生儿脐带, 用 0.20% Ⅱ型胶原酶和 0.25% 胰蛋白酶混合消化法分离内皮细胞, 用含 20% 胎牛血清、ECGS 的无血清人内皮细胞培养基于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养, 细胞长至近汇合, 0.25% 胰蛋白酶消化 1:2 传代, 取 3~5 代的 HUVEC 进行实验。

## 1.3 人脐静脉内皮细胞经免疫荧光鉴定

将 HUVEC 接种于 6 孔板内的盖玻片上, 细胞长满后, 将盖玻片取出进行免疫组织化学检测。具体步骤如下: PBS 液洗冲洗细胞爬片, 4% 的多聚甲醛固定 15 min, PBS 液洗 3 次, 5 min/次, 0.1% Triton-100 孵育 20 min 破膜, PBS 液洗 3 次, 5 min/次, 3% BSA 孵育 30 min, PBS 液洗 3 次, 5 min/次, 兔抗人(Ⅱ)因子相关抗原多克隆抗体 (1:50) 室温湿盒中孵育 60 min, PBS 液洗 3 次, 5 min/次, FITC 标记的羊抗兔抗体 (1:200) 室温湿盒中避光孵育 45 min, PBS 液洗 3 次, 5 min/次, API (1:1000) 染核 30 s, 流水冲洗, 80% 甘油封片, 置于免疫荧光显微镜下观察并拍片。

## 1.4 MTT 法检测醛固酮对人脐静脉内皮细胞增殖的影响

将处于对数生长期的 HUVEC 细胞制成细胞悬液, 在 96 孔板每孔接种  $1.0 \times 10^4$  个 HUVEC 细胞, 当细胞贴壁生长后, 换为含醛固酮的不同浓度 (200 400 600 800 1000 1200 μg/L) 的培养液。以 PBS 作为阴性对照。每组同时设 6 个复孔。分别检测 12、24、36 和 48 h 时细胞增殖抑制率。步骤如下: 在每孔加 MTT (5 g/L) 20 μL, 培养 4 h, 弃上清, 加二甲基亚砜 150 μL/孔, 振荡 10 min, 使紫色结晶充分溶解, 置酶联免疫检测仪上测定波长 570 nm 下的 A 值。计算细胞增殖抑制率。HUVEC 细胞增殖抑制率 (%) = (1 - 试验组 A 值 / 对照组 A 值) × 100%, 然后以细胞增殖抑制率 (%) 为纵轴, 醛固酮浓度 (μg/L) 为横轴, 绘制细胞增殖抑制曲线。

## 1.5 流式细胞仪检测醛固酮对人脐静脉内皮细胞凋亡的影响

将处于对数生长期的 HUVEC 细胞制成细胞悬

液, 在 12 孔板每孔接种  $5.0 \times 10^5$  个 HUVEC 细胞, 当细胞贴壁生长后, 换为含醛固酮的不同浓度 (200 400 600 800 1000 1200 μg/L) 的培养液, 以 PBS 作为阴性对照。每组同时设 3 个复孔。再培养 24 h, 胰酶消化, PBS 洗涤, 然后将细胞重新悬浮在结合缓冲液中并调整浓度为  $1 \times 10^6$  /L, 取 195 μL 细胞悬液加 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL PI 混匀室温孵育 15 min, 加 PBS 至 500 μL, 上机分析。

## 1.6 半定量 RT-PCR 检测转染的血管内皮生长因子 mRNA 表达

根据已知的 VEGF 基因序列, 使用 Primer primer5 引物设计软件设计引物。人 VEGF 的上下游引物: 正义链: 5'-TTG CTG CTC TAC CTC CAC-3'; 反义链: 5'-AAT GCT TTC TCC GCT CTG-3'; 扩增产物片段为 417 bp。内参照选用 β-actin, 正义链: 5'-ACA CTG TGC CCA TCT A-3'; 反义链: 5'-AGG GGC CGG ACT CGT C-3'; 扩增产物片段为 250 bp。将 HUVEC 细胞分两组, 加 800 μg/L 醛固酮组, PBS 对照组, 作用 24 h 后收集细胞。按 Trizol 说明书提取总 RNA, 以紫外分光光度法测定总 RNA 浓度。反应体系: RNase Free H<sub>2</sub>O 19 μL, 5 × Reaction Buffer 10 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 6 μL, 25 mmol/L Mn (Oac) 2 μL, Pr 1 2 μL, Pr 2 2 μL, β-actin-1 2 μL, β-actin-2 2 μL, 10 u/μL Rnase 抑制剂, 2.5 u/μL rTthDNA polymerase, 总 RNA 2 μL。反应条件: 60 °C, 30 min; 94 °C, 2 min; 94 °C, 10 min; 60 °C, 1.5 min。共 30 次循环; 最后, 60 °C 延伸 7 min。产物行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。并在激光密度扫描仪中扫描定量, 以 VEGF/β-actin 条带的吸光度比值表示目的基因的相对表达水平。

## 1.7 Western-blot 检测血管内皮生长因子蛋白表达

分两组, 加 800 μg/L 醛固酮组, PBS 对照组, 作用 24 h 后收集细胞, 用冷 PBS 洗涤细胞 2 次, 以细胞裂解液提取细胞蛋白质。用 BCA 法测定各组蛋白含量, 每孔上样 20 μL 蛋白, 经 5% 积层胶和 10% 分离胶电泳后, 湿转法将蛋白转移到 PVDF 膜上, 室温下用 5% 脱脂牛奶 + TBST 封闭 2 h, 分别加入 VEGF 为一抗, 鼠 GAPDH 内参, 过夜孵育, TBST 10 min × 3 次, 加入 HRP 标记的二抗, 室温孵育 1 h, TBST 洗 10 min × 3 次。化学发光法膜曝光显示目的条带和内参, 用 Quantity One 软件分析光密度值, 代表蛋白表达的相对水平。

## 1.8 统计学处理

采用 SPSS 12.0 统计软件分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 对数据进行正态检验和方差齐性检验, 符合

正态分布及方差齐,用单因素方差分析,组间比较采用 LSD 法,采用分析软件绘制细胞增殖曲线; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 原代人脐静脉内皮细胞鉴定

HUVEC 细胞贴壁生长,呈典型的铺路石样(图 1A、B);经免疫荧光实验验证,细胞胞浆内  $\alpha 1$  因子相关抗原阳性表达,证实经胶原酶消化法获得的原代

培养的细胞为人脐静脉内皮细胞(图 1C、D)。

### 2.2 醛固酮对人脐静脉内皮细胞增殖的影响

HUVEC 细胞的增殖抑制率随着醛固酮浓度的增加而上升,当醛固酮浓度达到  $800 \mu\text{g/L}$  时,24 h 后其作用效果达到其峰值为  $38.6\% \pm 3.2\%$ ,高于此浓度后随着醛固酮浓度的增加细胞增殖抑制率不再升高,与同期培养的对照组 HUVEC 细胞相比,其差异有统计学意义( $P < 0.01$ ;图 2)。

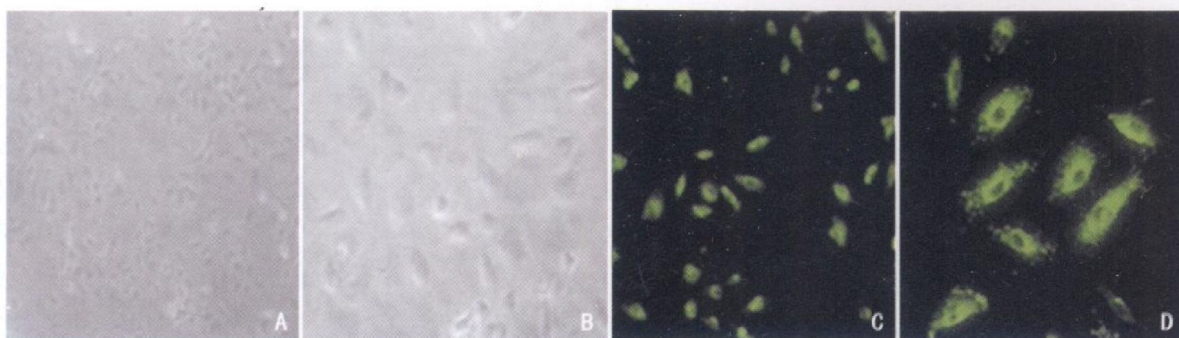


图 1 人脐静脉内皮细胞鉴定 A、B 为培养的 HUVEC 形态, A 为倒置显微镜  $\times 10\text{Q}$  B 为倒置显微镜  $\times 20\text{Q}$  C、D 为细胞胞浆的抗原与带绿色荧光的  $\alpha 1$  因子相关抗体结合,显示绿色荧光,  $\alpha 1$  因子相关抗原表达阳性。C 为荧光显微镜  $\times 20\text{Q}$  D 为荧光显微镜  $\times 40\text{Q}$ 。

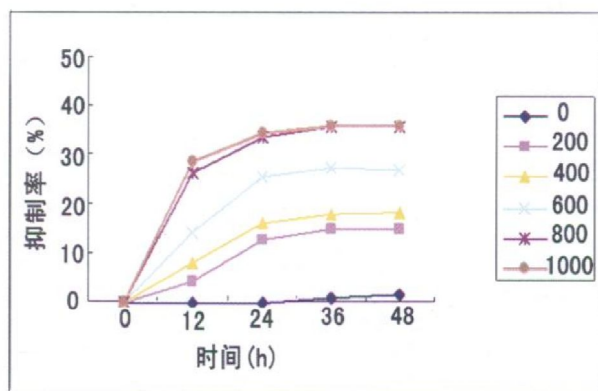


图 2 醛固酮对人脐静脉内皮细胞增殖的影响

### 2.3 醛固酮对人脐静脉内皮细胞凋亡的影响

HUVEC 细胞的凋亡率随着醛固酮浓度的增加而升高,当醛固酮浓度为  $800 \mu\text{g/L}$  时 24 h 后可见凋亡峰,凋亡率约  $26.5\% \pm 3.3\%$ ,显著高于对照组的  $1.5\% \pm 0.1\%$  ( $P < 0.01$ ),但再增加醛固酮浓度,其凋亡率无显著上升(表 1)。

### 2.4 醛固酮对人脐静脉内皮细胞血管内皮生长因子 mRNA 表达的影响

与对照组比较,经过醛固酮处理的 HUVEC 细胞 VEGF mRNA 表达显著下降( $P < 0.01$ ;图 3)。

表 1 醛固酮对人脐静脉内皮细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

醛固酮浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	12 h	24 h	36 h	48 h
0	1.5% $\pm$ 0.1%	1.5% $\pm$ 0.1%	2.3% $\pm$ 0.3%	2.6% $\pm$ 0.4%
200	5.5% $\pm$ 1.2%	6.2% $\pm$ 1.3%	7.3% $\pm$ 2.1%	10.4% $\pm$ 2.2%
400	9.8% $\pm$ 2.3%	16.5% $\pm$ 2.4%	16.9% $\pm$ 2.1%	17.8% $\pm$ 3.2%
600	13.4% $\pm$ 2.4%	17.5% $\pm$ 3.2%	18.3% $\pm$ 3.5%	18.5% $\pm$ 3.4%
800	15.7% $\pm$ 2.2%	26.5% $\pm$ 3.3% <sup>a</sup>	27.3% $\pm$ 2.2%	27.2% $\pm$ 2.3%
1000	15.8% $\pm$ 3.3%	27.2% $\pm$ 2.8%	27.1% $\pm$ 2.6%	28.2% $\pm$ 3.5%

a 为  $P < 0.01$ , 与同一时间对照组比较。

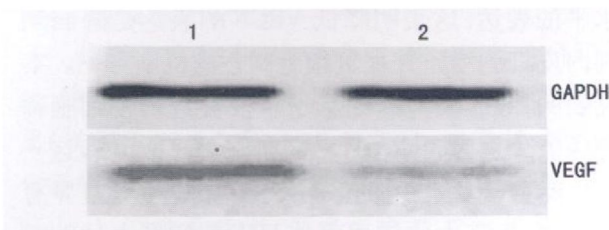


图 3 血管内皮生长因子 mRNA 在人脐静脉内皮细胞中的表达 M 为 Marker, 1 为对照组, 2 为醛固酮处理组 ( $800 \mu\text{g/L}$ , 24 h)。

## 2.5 醛固酮对人脐静脉内皮细胞血管内皮生长因子蛋白表达的影响

经过醛固酮处理的 HUVEC 细胞 VEGF 蛋白的表达显著下降 ( $P < 0.01$ ); GAPDH 为内参 (图 4)。

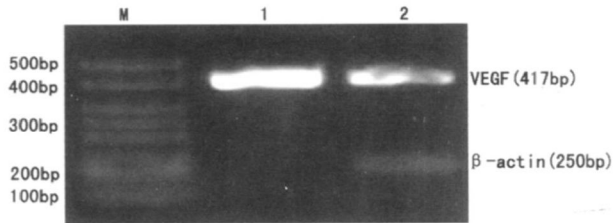


图 4 血管内皮生长因子蛋白在人脐静脉内皮细胞中的表达  
1 为对照组, 2 为醛固酮处理组 (800  $\mu\text{g/L}$ , 24 h)。

## 3 讨论

研究证实内皮细胞是醛固酮的靶细胞<sup>[4]</sup>, 内皮细胞与平滑肌细胞受损均参与 A s 早期血管内膜病变过程, 但内皮细胞受损更早于平滑肌细胞。动物实验证实醛固酮拮抗剂对血管壁有保护作用, 但对人是否一样? 本课题组在先前的研究中已经证实醛固酮通过激活 MR 诱导 HUVEC 细胞凋亡, 对 HUVEC 细胞增殖又是如何? 故本研究采用体外细胞培养的方法, 观察醛固酮对原代 HUVEC 的增殖的影响。结果表明, 醛固酮通过降低 HUVEC 细胞的 VEGF 表达抑制 HUVEC 细胞增殖并促进 HUVEC 细胞凋亡。

本研究证实, 醛固酮具有抑制内皮细胞增殖的作用, 在一定浓度范围内, 随着醛固酮浓度的增加, 它对内皮细胞增殖抑制率也升高, 但当醛固酮浓度升高到 800  $\mu\text{g/L}$  后其增殖抑制率不再增加。醛固酮能够促进内皮细胞凋亡, 而且也具有类似的浓度相关性。通过检测内皮细胞 VEGF 的表达, 我们发现醛固酮能降低 HUVEC 细胞 VEGF 在 mRNA 和蛋白水平的表达, 这表明降低 VEGF 的表达是醛固酮抑制内皮细胞增殖并促进细胞凋亡的机制之一。本研究表明, 醛固酮抑制细胞增殖及促进内皮细胞凋亡的峰值分别为 38.6% ± 3.2% 和 26.5% ± 3.3%, 这一峰值可能与药物作用的浓度及实验室环境差异有关, 对其在临床中的使用可能具有现实意义。Banfi 等<sup>[5]</sup>研究发现, 血管内皮细胞凋亡可引发血管调节功能失衡, 促进血管平滑肌细胞的增殖、迁移; 且认

为血管内皮细胞凋亡是 A s 发生的一个始动因素。而血管平滑肌细胞 (VSMC) 的凋亡是影响 A s 斑块稳定性的重要因素。研究表明醛固酮参与细胞凋亡与增殖可能通过诱导 Bax 和 caspases-3 表达增加而产生<sup>[6]</sup>。最近研究表明醛固酮参与细胞凋亡亦与 VEGF 密切相关<sup>[7]</sup>。

VEGF 作为一种内皮细胞有丝分裂作用的生长因子, 具有增加血管通透性的作用, 促进巨噬细胞, 单核细胞向斑块内迁移, 它们又分泌细胞因子如 VEGF, 肿瘤坏死因子 (TNF- $\alpha$ ) 等, 这些细胞因子反过来又可促成斑块形成, 进而促进 A s 发生与发展<sup>[8]</sup>。研究证实<sup>[9]</sup>在粥样斑块中平滑肌细胞及巨噬细胞中都有 VEGF 的强表达, VEGF 阳性细胞数目与内膜血管化程度呈正相关, 而本研究发现 VEGF 强表达对应着内皮细胞的增殖率的升高, 但此强表达可能比 VSMC 更早发生, 这为 A s 早期临床诊断治疗赢得时间。

本研究还存在不少局限性, 比如 HUVEC 毕竟不能最终代表全身血管内皮细胞; 但是本研究得出一个提示: 醛固酮通过降低 VEGF 的表达抑制血管内皮细胞的增殖并促进其凋亡。

## [参考文献]

- [1] Keidar S, Kaplan M, Pavlotzky E, et al. Aldosterone administration to mice stimulates macrophage NADPH oxidase and increases atherosclerosis development: a possible role for angiotensin-converting enzyme and the receptors for angiotensin II and aldosterone [J]. *Circulation*, 2004, 109 (18): 2213-2220.
- [2] Takai S, Jin D, Muramatsu M, et al. Eplerenone inhibits atherosclerosis in nonhuman primates [J]. *Hypertension*, 2005, 46 (5): 1135-1139.
- [3] Yamaguchi H, Ishii E, Tashiro K, et al. Role of umbilical vein endothelial cells in hematopoiesis [J]. *Leuk Lymphoma*, 1998, 31 (1-2): 61-69.
- [4] Oberleithner H, Ludwig T, Rietmüller C, et al. Human endothelium: target for aldosterone [J]. *Hypertension*, 2004, 43 (5): 952-956.
- [5] Banfi C, Bröschi M, Wait R, et al. Proteome of endothelial cell-derived procoagulant microparticles [J]. *Proteomics*, 2005, 5 (17): 4443-4455.
- [6] Lee SH, Yoo TH, Nam BY, et al. Activation of local aldosterone system within podocytes is involved in apoptosis under diabetic conditions [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009, 297 (5): F1381-390.
- [7] Nagata D, Hirata Y. Molecular mechanism of cardiovascular damage induced by aldosterone [J]. *Yakugaku Zasshi*, 2007, 127 (9): 1339-346.
- [8] Inoue M, Itoh H, Ueda M, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis [J]. *Circulation*, 1998, 98 (20): 2108-116.
- [9] Rudijanto A. The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Acta Med Indones*, 2007, 39 (2): 86-93.

(此文编辑 李玲玲)