

[文章编号] 1007-3949(2011)19-01-0013-05

• 实验研究 •

血管紧张素Ⅱ对血管内皮细胞凋亡及 p38 丝裂素活化蛋白激酶表达的影响

单海燕¹, 刘 姝¹, 胡翠竹¹, 李效丽¹, 白小涓¹, 陈香美²

(1. 中国医科大学附属第一医院老年心血管科, 辽宁省沈阳市 110001; 2 中国人民解放军总医院肾病中心, 北京市 100853)

[关键词] 血管紧张素Ⅱ; 内皮细胞; 细胞凋亡; p38 丝裂素活化蛋白激酶

[摘要] 目的 探讨血管紧张素Ⅱ对人脐静脉内皮细胞凋亡的影响以及 p38 丝裂素活化蛋白激酶表达的变化。

方法 制备血管紧张素Ⅱ RPMI 1640 培养液培养人脐静脉内皮细胞, 通过吖啶橙荧光染色观察细胞形态学的变化、流式细胞仪检测细胞凋亡率, 利用逆转录聚合酶链反应和免疫印迹法分析凋亡调控基因 Bcl-2 mRNA 及蛋白表达水平, 通过特异性磷酸化 p38 丝裂素活化蛋白激酶抗体采用免疫印迹法检测 p38 丝裂素活化蛋白激酶活性。结果

血管紧张素Ⅱ能诱导内皮细胞凋亡, 荧光显微镜可见明显的细胞凋亡 (32.76% ± 2.98% 比 2.14% ± 0.36%, $P < 0.01$); 流式细胞仪检测 Annexin V-FITC/PI 双染色的血管紧张素Ⅱ诱导人脐静脉内皮细胞中, 早中期凋亡细胞明显增加, 其细胞凋亡率为 37.4% ± 1.6% (对照组为 10.2% ± 1.8%)。与对照组相比, 6 h、12 h、18 h 及 24 h Bcl-2 mRNA 及蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$), p38 丝裂素活化蛋白激酶磷酸化水平于 18 h 达到最高峰 ($P < 0.01$)。结论 血管紧张素Ⅱ诱导内皮细胞的凋亡可能与 p38 丝裂素活化蛋白激酶对 Bcl-2 mRNA 及蛋白表达影响有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of AngiotensinⅡ on Apoptosis and Expression of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Vascular Endothelial Cells

SHAN Hai-Yan¹, LIU Shu¹, HU Cui-Zhu¹, LI Xiao-Li¹, BAI Xiao-Juan¹, and CHEN Xiang-Mei²

(1. Department of Gerontology Cardiology, First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang, Liaoning 110001, China; 2. Department of Nephrology, General Hospital of People's Liberation Army, Beijing 100853, China)

[KEY WORDS] AngiotensinⅡ; Endothelial Cell; Cell Apoptosis; p38 Mitogen-Activated Protein Kinase

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of angiotensinⅡ (AngⅡ) on apoptosis and phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase in endothelial cell and its possible action mechanism. **Method** Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were cultured in vitro and intervened by AngⅡ. HUVEC were divided into control group and AngⅡ group (stimulated by AngⅡ 10^{-6} mol/L for 24 h), morphologic changes and percentage of apoptosis were assayed with acridine orange fluorescence staining. The early stage apoptosis was detected by flow cytometry with Annexin V-FITC/PI double staining. The expression of apoptosis-association gene Bcl-2 was detected by RT-PCR and Western blotting at different time points. By means of Western blotting the activation of p38MAPK was observed at different time points. **Results** 10^{-6} mol/L AngⅡ stimulated cell apoptosis. The percentage of apoptotic cells in AngⅡ-stimulated cells was significantly increased compared to that in the control cells (32.76% ± 2.98% vs 2.14% ± 0.36%, $P < 0.01$) by using acridine orange fluorescence staining. The early metaphase apoptotic rate was significantly increased in AngⅡ-stimulated cells compared to the control cells (37.4% ± 1.6% vs 10.2% ± 1.8%, $P < 0.01$) by Annexin V-FITC/PI double staining flow cytometry. Bcl-2 mRNA and protein expression decreased markedly ($P < 0.05$), the activation of p38MAPK began to increase and reach the peak at 18 h ($P < 0.01$). **Conclusions** Cell apoptosis is possibly an impor-

[收稿日期] 2010-11-24

[基金项目] 中华医学会临床医学科研专项资金 动脉粥样硬化研究资金资助 (09010530208); 辽宁省科学技术研究项目 (20091104); 沈阳市科学技术计划项目 (F10-205-1-44)

[作者简介] 单海燕, 副教授, 博士, 主要从事动脉粥样硬化与心血管衰老的研究, Email为 shanhy024@163.com。白小涓, 教授, 博士研究生导师, 主要从事冠心病与心血管衰老的研究。陈香美, 教授, 博士研究生导师, 主要从事肾病及器官衰老机制的研究。

tant factor for atherosclerosis. One of its molecular mechanisms might be associated with decreasing the expression level of Bcl-2. There is a probability that activated p38MAPK signal pathway is involved in the process of pathologic and physiologic reaction in the apoptosis of endothelial cell induced by Ang^②.

近年研究发现, 动脉粥样硬化的危险因素如低密度脂蛋白、升高的氧化应激和血管紧张素^②(Ang^②)均能诱导内皮细胞凋亡, Ang^②可促进内皮细胞分泌内皮素, 促进血栓形成, 增加细胞氧化应激水平, 诱导细胞炎症, 促进细胞凋亡, 从而引起内皮功能障碍, 参与动脉粥样硬化事件的发生发展^[1-3], 但其信号转导机制尚不十分明确。本研究通过 Ang^②诱导人脐静脉内皮细胞(HUVEC)凋亡, 观察 Ang^②作用下 HUVEC Bcl-2 及 p38 丝裂素活化蛋白激酶(p38MAPK)磷酸化的改变, 探讨 p38MAPK 信号转导通路在 Ang^②诱导内皮细胞凋亡中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

RP11640培养基、胰蛋白酶、HEPES及 L-谷氨酰胺(Gibco公司), HUVEC株(ATCC公司), Ang^②、二甲基亚砜(DMSO)及吖啶橙(Sigma公司), 兔抗人 Bcl-2 单克隆抗体非免疫血清、兔抗人 p38MAPK 单克隆抗体非免疫血清、生物素二抗及辣根酶标记的链酶亲和素试剂(Santa Cruz公司), 流式细胞仪 FACSscan(BD公司), 荧光显微镜(Olympus公司); Biophotometer分光光度计(Eppendorf公司), GeneAmpPCR System 9700扩增仪(PE公司); UVP凝胶成像及分析系统(UVP公司)。

1.2 HUVEC培养

将 HUVEC 贴壁生长于含 10% 胎牛血清的 RP11640 培养基中, 在 5% CO₂、37℃ 和完全饱和湿度的培养箱中培养, 2~3 天换液以维持良好生长状态。用 0.25% 胰蛋白酶进行消化、传代。内皮细胞呈多角形, 单层铺路石状紧密排列。2% 台盼蓝染色判断细胞活性, 活细胞数占细胞总数的 98% 以上用于实验。

1.3 实验分组

细胞长至亚融合后, 无血清同步 6 h 加入 Ang^②(终浓度为 10⁻⁶ mol/L), 持续刺激 24 h。对照组为不含 Ang^②的上述培养液培养 24 h。

1.4 荧光显微镜观察

将严格清洗、浸酸、消毒的洁净盖玻片放置于 6 孔培养板中, 细胞接种于盖玻片上, 分组干预后, PBS 液漂洗细胞 3 次, 每次 3 min 将吖啶橙溶液滴

于盖玻片上, 直接反转, 放于洁净载玻片上, 荧光显微镜观察, 摄片。

1.5 流式细胞术检测早期凋亡

收集 1 × 10⁶ 个细胞, 1000 r/min 离心, 细胞用 PBS 洗 2 次, 轻轻震荡使细胞重悬于 200 μL 1 × Binding Buffer 加入 10 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI 轻轻混匀, 室温避光 15 min。加入 300 μL 1 × 结合缓冲液, 1 h 内流式细胞仪检测早期凋亡细胞数, 用 CellQuest 软件对结果进行分析。

1.6 逆转录聚合酶链反应检测 Bcl-2 的表达

收集细胞, Trizol 法提取总 RNA, 紫外分光光度计准确定量其浓度和纯度, 所用 RNA 的 A₂₆₀/A₂₈₀ 均在 1.8~2.0 之间, 甲醛变性电泳进行 RNA 完整性鉴定。逆转录合成 cDNA, PCR 扩增引物序列: Bcl-2 正义链 5'-AGG GGC TAC GAG TGG GAT GC-3', 反义链 5'-CCC CAC CGA ACT CAA AGA AGG-3', 退火温度为 63℃, 扩增片段 391 bp; β-actin 正义链 5'-GGC ATG GGT CAG AAG GAT TCC-3', 反义链 5'-ATG TCA CGC ACG ATT TCC CGC-3', 退火温度为 62℃, 扩增片段 500 bp。然后以 PCR 扩增目的基因进行扩增, 94℃ 变性 2 min 后进行以下循环: 94℃ 变性 40 s 退火 40 s 72℃ 延长 1 min, 循环 34 次, 最后 72℃ 延长 5 min。取 PCR 产物 10 μL 行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 溴乙锭染色后 UVP 凝胶成像系统扫描观察摄影, 以 β-actin 的吸光度作为内参照, 根据目的基因与内参照电泳条带点密度的比值进行 Bcl-2 mRNA 表达水平的半定量分析。

1.7 免疫印迹法检测 Bcl-2 蛋白水平

收集细胞, 冷 PBS 洗 2 次, 加入预冷细胞裂解液裂解细胞, 超声破碎, 提取物冰上孵育 30 min, 4℃、12000 r/min 离心 10 min, 取上清液至新试管中, 再次离心, 取上清分装, -20℃ 保存待用。考马斯亮兰测定蛋白样品浓度, 每个样品上样量为 2 μg。常规蛋白电泳分离胶浓度为 12% (pH 8.8), 浓缩胶浓度 4% (pH 6.8), 抽提纯化的蛋白行 SDS-PAGE 电泳后转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉的 TBST 4℃ 封闭过夜, 加入一抗(兔抗人 Bcl-2 抗体, 1:100)室温摇床孵育 3 h, TBST 洗涤后, 与二抗室温摇床孵育 0.5 h 常规洗膜化学发光试剂显色。AlphaImager 图像处理系统扫描测定感光区带平均积分吸光度。β-actin 为内对照, 计算相对含量。

1.8 免疫印迹法检测 p38MAPK 蛋白水平

收集细胞,用冰冷的 PBS 洗 2 次,加入预冷细胞裂解液裂解细胞,超声破碎,提取物冰上孵育 30 min, 4℃、12000 r/min 离心 10 min,取上清液至新试管中,再次离心,取上清分装, - 20℃ 保存待用。考马斯亮兰法测定蛋白样品浓度,每个样品上样量为 20 μL,按文献 [4] 报道的方法,完成常规蛋白电泳分离胶浓度为 12% (pH 8.8),浓缩胶浓度 4% (pH 6.8),抽提纯化的蛋白行 SDS-PAGE 电泳后转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉的 TBST 4℃ 封闭过夜,加入一抗 (兔抗人 p38MAPK 抗体, 1:100) 室温摇床孵育 3 h, TBST 洗涤后,与二抗室温摇床孵育 0.5 h, 常规洗膜化学发光试剂显色。AlphaImager 图像处理系统进行定量分析,设对照组显影带灰度值为 1,不同时间组与其灰度值之比即为该组的相对蛋白表达水平。

1.9 统计学方法

各项观察指标以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 AngⅡ对细胞凋亡形态的影响

对照组 HUVEC 未发生凋亡时,细胞核呈均匀黄绿色荧光,细胞质和核仁 RNA 为桔红色荧光; AngⅡ诱导 HUVEC 则表现为细胞核致密浓染颗粒状、块状黄绿色荧光。HUVEC 正常培养时极少数发生凋亡,经 AngⅡ诱导 HUVEC 凋亡率明显上升,达到 $32.76\% \pm 2.98\%$, 对照组 HUVEC 凋亡率为 $2.14\% \pm 0.36\%$, 二者间比较有显著性差异 ($P < 0.01$; 图 1)。

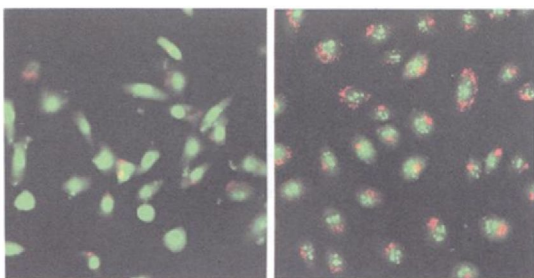


图 1. HUVEC 的吖啶橙染色形态学变化 ($\times 400$)

左为对照组,右为 AngⅡ组。

Figure 1. Morphological changes of HUVEC under acridine orange staining

2.2 AngⅡ对细胞凋亡率的影响

AngⅡ诱导 HUVEC 凋亡率为 $37.4\% \pm 1.6\%$,

对照组 HUVEC 凋亡率为 $10.2\% \pm 1.8\%$, 二者间比较有显著性差异 ($P < 0.01$), 但两组间的细胞坏死率无显著性差异 ($P > 0.05$; 图 2)。

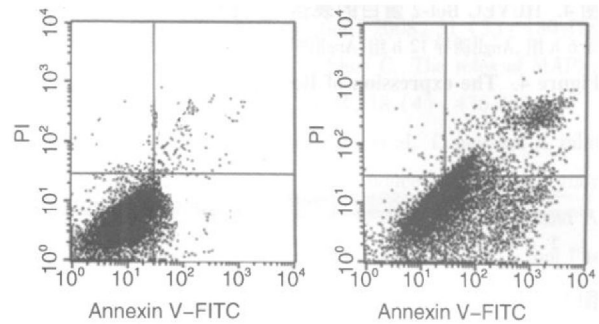


图 2. Annexin V-FITC 检测衰老 HUVEC 凋亡早期事件
左为对照组,右为 AngⅡ组。

Figure 2. Annexin V-FITC detected early event in aging HUVEC apoptosis

2.3 AngⅡ对 Bcl-2 mRNA 及其蛋白表达的影响

与对照组相比, HUVEC 在 AngⅡ作用 6 h、12 h、18 h 及 24 h 后 Bcl-2 mRNA 及其蛋白的表达随着时间的延长而减少 ($P < 0.01$; 图 3 和图 4)。

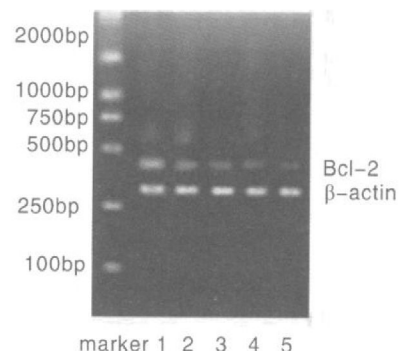


图 3. RT-PCR 检测 HUVEC Bcl-2 mRNA 的表达
1-5 分别为对照组、AngⅡ诱导 6 h 组、AngⅡ诱导 12 h 组、AngⅡ诱导 18 h 组及 AngⅡ诱导 24 h 组。

Figure 3. RT-PCR detected the expression of HUVEC Bcl-2 mRNA

2.4 AngⅡ对 p38MAPK 蛋白表达的影响

随着时间的延长, AngⅡ作用 HUVEC 后其磷酸化水平逐渐增加, 12 h 时为对照组的 1.54 倍 ($P < 0.05$), 18 h 时 p38MAPK 蛋白表达达到高峰, 其磷酸化水平为对照组的 4.16 倍 ($P < 0.01$); 之后逐渐下降, 24 h 为对照组的 0.98 倍 ($P > 0.05$), 基本回到对照组水平 (图 5)。

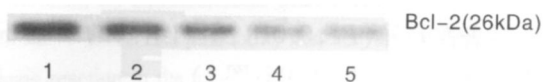


图4. HUVEC Bcl-2 蛋白的表达 1-5 分别为对照组、AngII诱导6 h组、AngII诱导12 h组、AngII诱导18 h组及AngII诱导24 h组。

Figure 4. The expression of Bcl-2 protein in HUVEC

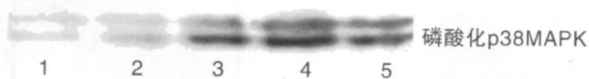


图5. HUVEC 磷酸化 p38MAPK 蛋白的表达 1-5 分别为对照组、Ang II 诱导6 h组、Ang II 诱导12 h组、Ang II 诱导18 h组及Ang II 诱导24 h组。

Figure 5. The expression of phosphorylated p38MAPK protein in HUVEC

3 讨 论

内皮细胞功能异常与动脉粥样硬化、高血压、糖尿病等有紧密的联系^[5,6]。AngⅡ可促进内皮细胞分泌内皮素,促进血栓形成,增加细胞氧化应激水平,诱导细胞炎症,促进细胞凋亡,从而引起内皮功能障碍,参与动脉粥样硬化事件的发生发展^[2,5,7-9],而细胞凋亡的信号转导研究是凋亡研究最关键的领域之一^[7,10,11]。通过不同基因的表达,对其调控需要通过信号转导系统的一系列反应步骤来实现^[4,12-15]。本研究通过 MAPK 信号转导通路调控血管内皮细胞凋亡机制的研究,从深层次揭示血管内皮细胞的分子调控机制,为延缓内皮细胞凋亡以及防治动脉粥样硬化开辟新途径。

本研究观察 AngⅡ诱导 HUVEC 过程中出现的凋亡现象,荧光显微镜及流式细胞术显示凋亡细胞较对照组明显增多,说明 AngⅡ诱导 HUVEC 易凋亡,这与以往的研究是一致的^[3,7]。本研究发现 AngⅡ诱导 HUVEC Bcl-2 mRNA 及其蛋白的表达随着时间的延长而减少,进一步证实 Bcl-2 是抑制凋亡的关键因子,从而发挥其抗动脉粥样硬化作用。

近年来,越来越多的证据表明 MAPK 信号转导通路在细胞凋亡中的生物学效应较为复杂^[16-18],该通路是细胞外信号引起细胞核反应,在机体的细胞生长、分化和增殖、凋亡过程中发挥重要的调控作用。其中 p38MAPK 信号转导通路是 MAPK 通路一个重要分支,它在炎症细胞应激、凋亡、细胞周期和生长等多种生理和病理过程中起重要作用^[19-21],已

证实在凋亡诱导因素作用下,多种细胞内 p38MAPK 通路可被激活,进而通过多种途径调控凋亡^[4,7,19,21,22]。AngⅡ在体内所介导的多种生物学作用与 p38MAPK 信号通路有关。本研究发现,AngⅡ能显著增加 HUVEC p38MAPK 磷酸化表达,提示 AngⅡ可以激活 HUVEC p38MAPK 通路,但 p38MAPK 信号途径通过哪些蛋白发挥抗凋亡作用知之甚少。我们研究发现 Bcl-2 减少与磷酸化 p38MAPK 增多平行,并且 Bcl-2 蛋白与磷酸化 p38MAPK 表达呈负相关,提示 p38MAPK 与 Bcl-2 之间可能存在相互调节关系。由此我们推测 AngⅡ诱导 HUVEC 早、中期(6 h、12 h),显著激活 p38MAPK 信号转导通路,并随时间增加,其表达逐步递增至高峰(18 h);随着磷酸化 p38MAPK 水平逐渐降低,表明持续的 AngⅡ对已发生表型改变 HUVEC 中 p38MAPK 信号通路的激活作用已开始减弱,p38MAPK 诱导作用减弱,当 AngⅡ作用 24 h 时,p38MAPK 表达下降至较低水平,提示 p38MAPK 信号途径参与全过程,磷酸化 p38MAPK 表达呈持续增加时,Bcl-2 呈显著下降趋势,Bcl-2 mRNA 及其蛋白的表达呈动态变化,表明 p38MAPK 信号途径通过调控 Bcl-2 途径参与 HUVEC 凋亡,由此可能为动脉粥样硬化提供新的干预靶点。

虽然发现 p38MAPK 可作为 Bcl-2 上游信号,参与调节 Bcl-2 作用,但是磷酸化 p38MAPK 是如何调节 Bcl-2 还不清楚,其作用环节有待进一步研究。至于 AngⅡ是否通过 ERK1/2、JNK 等其他通路诱导 HUVEC 的凋亡以及是否能通过干扰 AngⅡ代谢来降低机体内 AngⅡ浓度或给予 p38MAPK 抑制剂来防治动脉粥样硬化以及这样做是否会带来其他负面效应,尚需进一步研究探讨。

[参考文献]

- [1] Asija A, Peterson SJ, Stec DE, et al. Targeting endothelial cells with heme oxygenase-1 gene using VE-cadherin promoter attenuates hyperglycemia mediated cell injury and apoptosis[J]. *Antioxid Redox Signal* 2007, 9 (12): 2065-067.
- [2] Favaro E, Miceli I, Bussolati B, et al. Hyperglycemia induces apoptosis of human pancreatic islet endothelial cells: effects of pravastatin on the Akt survival pathway[J]. *Am J Pathol* 2008, 173 (2): 442-450.
- [3] Ide N, Hirase T, Nishimoto HA, et al. Angiotensin II increases expression of IP-10 and the renin-angiotensin system in endothelial cells[J]. *Hypertens Res* 2008, 31 (6): 1257-267.

- [4] Li M, Chiou KR, Kass DA. Shear stress inhibition of H_2O_2 induced p66(Shc) phosphorylation by ASK1-JNK inactivation in endothelium[J]. *Heart Vessels* 2007, 22 (6): 423-427.
- [5] Eriksson EE. Atherosclerosis cell biology and lipoproteins [J]. *Curr Opin Lipidol* 2007, 18 (4): 476-478.
- [6] Shan HY, Bai XJ, Chen XM. Apoptosis is involved in the senescence of endothelial cells induced by angiotensin[J]. *Cell Biol Int* 2008, 32: 264-270.
- [7] Zhang X, Parangi S. Quantification of vascular endothelial cell apoptosis in vivo[J]. *Methods Enzymol* 2008, 446: 287-292.
- [8] 单海燕, 白小涓, 陈香美. 衰老大鼠动脉顺应性与凋亡相关指标变化及缬沙坦对其影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, 15 (9): 657-660.
- [9] 单海燕, 白小涓, 陈香美. 缬沙坦对血管衰老中凋亡调控基因 Bcl-2, Bax表达的实验研究[J]. *中国老年医学杂志*, 2008, 28 (7): 222-225.
- [10] Antonova OA, Loktionova SA, Golubeva NV, et al. Damage and activation of endothelial cells during in vitro hypoxia[J]. *Bull Exp Biol Med* 2007, 144 (4): 504-506.
- [11] Mannarino E, Pirro M. Endothelial injury and repair a novel theory for atherosclerosis[J]. *Angiology* 2008, 59 (2 Suppl): 69S-72S.
- [12] Schweighofer B, Schultes J, Pomyje J, et al. Signals and genes induced by angiogenic growth factors in comparison to inflammatory cytokines in endothelial cells[J]. *Clin Hemorheol Microcirc* 2007, 37 (1-2): 57-62.
- [13] Merched AJ, Ko K, Gotlinger KH, et al. Atherosclerosis evidence for impairment of resolution of vascular inflammation governed by specific lipid mediators[J]. *J FASEB* 2008, 22 (10): 3595-606.
- [14] Liu J, Mao W, Ding B, et al. ERKs/p53 signal transduction pathways is involved in doxorubicin-induced apoptosis in H9C2 cells and cardiomyocytes[J]. *Am J physical Heart Circ physical* 2008, 295 (5): H1956-965.
- [15] Yan L, Tang Q, Shen Q, et al. SOCS inhibits TNF- α -phorbol-induced cardiomyocyte apoptosis via ERK1/2 pathway activation[J]. *Inflammation* 2008, 31 (3): 180-188.
- [16] Lawrence MC, Jivan A, Shao C. The roles of MAPKs in disease[J]. *Cell Res* 2008, 18 (4): 436-442.
- [17] Jeong A, Lee HJ, Jeong SJ, et al. Compound K inhibits basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis via regulation of p38 mitogen activated protein kinase and AKT in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Biol Pharm Bull* 2010, 33 (6): 945-950.
- [18] Chou CH, Chen SU, Cheng JC. Radiation-induced interleukin-6 expression through MAPK/p38/NF-kappaB signaling pathway and the resultant antiapoptotic effect on endothelial cells through Mcl-1 expression with sIL6-Ralpha[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009, 75 (5): 1553-561.
- [19] Bao XM, Wu CF, Lu GP. Atorvastatin attenuates homocysteine-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells via inhibiting NADPH oxidase-related oxidative stress-triggered p38MAPK signaling[J]. *Acta Pharmacol Sin* 2009, 30 (10): 1392-398.
- [20] Ho TC, Chen SL, Yang YC, et al. Cytosolic phospholipase A2- α is an early apoptotic activator in PEDF-induced endothelial cell apoptosis. [J]. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009, 296 (2): C273-284.
- [21] Wang XH, Xu B, Liu JJ, et al. Effect of beta-escin sodium on endothelial cells proliferation, migration and apoptosis[J]. *Vascul Pharmacol* 2008, 49 (4-6): 158-165.
- [22] Yang Z, Mo X, Gong Q, et al. Critical effect of VEGF in the process of endothelial cell apoptosis induced by high glucose[J]. *Apoptosis* 2008, 13 (11): 1331-343.

(此文编辑 文玉珊)