

[文章编号] 1007-3949(2011)19-09-0747-04

• 实验研究 •

## Ghrelin 对棕榈酸诱导的大鼠主动脉内皮细胞凋亡的影响

张丹<sup>1,2</sup>, 王玉霞<sup>2</sup>, 王威<sup>3</sup>, 韩玲玲<sup>2</sup>, 刘国良<sup>1</sup>

(1. 中国医科大学一院内分泌科, 辽宁省沈阳市 110001; 2. 中国医科大学四院内分泌科, 辽宁省沈阳市 110032; 3. 哈尔滨医科大学附属二院内分泌科, 黑龙江省哈尔滨市 150086)

[关键词] Ghrelin; 棕榈酸; 细胞凋亡; 内皮细胞

[摘要] 目的 探讨 Ghrelin 能否抑制棕榈酸诱导的大鼠主动脉内皮细胞凋亡。方法 大鼠主动脉内皮细胞分别在含 0.3 mmol/L 棕榈酸的脂性培养基中孵育 24 h, 培养基中加或不加 Ghrelin, 应用 MTT 法检测细胞活性, Hoechst 33258 及流式细胞仪 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡, 分光光度计检测 Caspase-3 活性, Western Blot 检测 Bcl-2 和 Bax 表达。结果 棕榈酸降低细胞活性, 使细胞凋亡增加至 30.03%, 与对照组 (5.01%) 相比差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 棕榈酸增加 Caspase-3 活性, 使 Bcl-2/Bax 比率下降。Ghrelin 能够浓度依赖性增加细胞活性, 10 nmol/L 是最低有效浓度, 100 nmol/L 时作用最显著。Ghrelin 能抑制棕榈酸诱导的内皮细胞凋亡, 使凋亡率降至 10.03% ( $P < 0.05$ )。同时 Ghrelin 降低 Caspase-3 活性并增加 Bcl-2/Bax 比率。结论 Ghrelin 可以抑制棕榈酸诱导的血管内皮细胞凋亡, 可能在棕榈酸诱导的内皮细胞损伤中发挥保护作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Effect of Ghrelin on Rat Aortic Endothelial Cells Apoptosis Induced by Palmitate

ZHANG Dan<sup>1,2</sup>, WANG Yu-Xia<sup>2</sup>, WANG Wei<sup>3</sup>, HAN Ling-Ling<sup>2</sup>, and LIU Guo-Liang<sup>1</sup>

(1. Department of Endocrinology, First Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning 110001; 2. Department of Endocrinology, Fourth Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning 110032; 3. Department of Endocrinology, Second Hospital of Haerbin Medical University, Haerbin, Heilongjiang 150086, China)

[KEY WORDS] Ghrelin; Palmitate; Apoptosis; Endothelial Cells

[ABSTRACT] **Aim** To investigate whether ghrelin could inhibit apoptosis induced by palmitate in rat aortic endothelial cells. **Methods** Rat aortic endothelial cells were cultured in 0.3 mmol/L palmitate for 24 h with or without ghrelin. Cell viability was assessed by MTT assay. Apoptosis was detected using hoechst 33258 and annexin V-FITC /PI double staining assay. Spectrofluorometer assay was used to detect caspase-3 activity. Western Blot analysis was used to examine the expression of Bcl-2 and Bax. **Results** Exposure of cells to palmitate decreased cell viability. Palmitate increased cells apoptosis to 30.03% ( $P < 0.01$ ) compared with the control group (5.01%). Palmitate increased caspase-3 activity and decreased the Bcl-2/Bax ratio. While ghrelin dose dependently increased cell viability. 10 nmol/L was the minimum effective level. 100 nmol/L was the most significant level. Ghrelin inhibited palmitate-induced apoptosis rate to 10.03% in endothelial cells ( $P < 0.05$ ) compared with the palmitate group. Ghrelin decreased caspase-3 activity and increased the Bcl-2/Bax ratio at the same time. **Conclusions** Ghrelin inhibits palmitate-induced apoptosis. Ghrelin may be a protective factor against palmitate-induced endothelial injury.

胃饥饿素(Ghrelin)是生长激素的内源性配体,能够刺激生长激素分泌并通过依赖生长激素增加摄食和减少脂肪利用,从而导致能量正平衡。Ghrelin通过抑制凋亡发挥对多种细胞的保护作用,如肺<sup>[1]</sup>、脂肪细胞、皮质神经细胞<sup>[2]</sup>、胰岛 $\beta$ 细胞<sup>[3]</sup>、

心肌细胞和内皮细胞<sup>[4,5]</sup>。内皮细胞受损是糖尿病相关的动脉粥样硬化和心血管并发症发生的关键事件。游离脂肪酸参与导致内皮细胞功能失调、动脉粥样硬化及炎症反应。棕榈酸是体内含量最多的游离脂肪酸,研究表明棕榈酸能够增加体外培养的人

[收稿日期] 2011-01-12

[作者简介] 张丹, 博士, 主治医师, 主要研究方向为糖尿病及其并发症, E-mail 为 zdadan@163.com。王玉霞, 博士, 副主任医师, 硕士研究生导师, 主要研究方向为糖尿病基础与临床。通讯作者刘国良, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为糖尿病基础与临床研究。

血管内皮细胞凋亡。Ghrelin 能够对多种外来刺激下的血管内皮细胞发挥保护作用,但是关于 Ghrelin 对棕榈酸环境中内皮细胞凋亡影响的研究较少。本文旨在研究 Ghrelin 对棕榈酸诱导的大鼠主动脉内皮细胞凋亡的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料

Wistar 大鼠购自中国医科大学动物中心; Dulbecco 改良 Eagle (DMEM) 培养基、胎牛血清购自美国 GIBCO 公司; 内皮细胞生长添加剂购自美国 Upstate 公司; 兔抗人 VIII 因子抗原相关抗体购自北京博奥森生物技术有限公司; 棕榈酸、牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA)、MTT 及 Hoechst 33258 染色液购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 胰酶购自北京索莱宝公司; Annexin-V-FITC/PI 双染试剂盒购自瑞士 ROCHE 公司; Caspase-3 活性测定试剂盒购自美国 R&D Systems 公司; 抗 Bcl-2 抗体及抗 Bax 抗体购自美国 Cell signaling 公司; 分光光度计为美国 UV310。

### 1.2 大鼠主动脉内皮细胞的原代、传代培养及鉴定

将雄性 Wistar 大鼠腹腔注射氨基甲酸乙酯麻醉, 75% 酒精消毒皮肤, 无菌条件下分离胸主动脉并将其浸入磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 中, 用镊子迅速剥离脂肪或周围组织。纵行剪开血管, 滴加 0.1% 胶原酶, 37℃ 消化 30 min, 将血管剪成 2 mm 见方小块, 内膜朝下贴于 6 孔板中, 37℃、5% CO<sub>2</sub> 温箱中培养, 每 3 天换液, 待组织贴块周围长出细胞后用 0.25% 胰蛋白酶消化传代培养, 每 2~3 天换液, 差速贴壁法纯化细胞。第 3~5 传代细胞用于实验。组织块及细胞培养过程中使用 DMEM 培养基, 其中添加 20% 胎牛血清、1% 青-链霉素、0.15 g/L 的内皮细胞生长添加剂。采用免疫细胞化学法检测 VIII 因子对内皮细胞进行鉴定。

### 1.3 MTT 比色法检测细胞活性

用含 0.5% BSA 的培养基作为对照组, 实验组中用含 0.5% BSA 及不同浓度 Ghrelin (1、10、100 nmol/L)、加或不加棕榈酸 (0.3 mmol/L) 的培养基在无血浆条件下孵育大鼠主动脉内皮细胞 24 h。细胞接种于 96 孔板中, 每孔含 100 μL 培养液, 加入 20 μL MTT 工作液 (5 g/L), 37℃ 避光孵育 4 h, 加入 150 μL 二甲基亚砷 (DMSO)。于 570 nm 波长下测定吸光度。

### 1.4 Hoechst 33258 法检测细胞凋亡

将各组处理后的细胞用 PBS 洗 2 次, 4% 多聚

甲醛固定 10 min, 加 100 μL Hoechst 33258 染色, 室温放置 10 min, PBS 洗 2 次后荧光显微镜下观察。

### 1.5 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡

用只含 0.5% BSA 的培养基作为对照组, 实验组中分别加入 100 nmol/L Ghrelin (Ghrelin 组)、0.3 mmol/L 棕榈酸 (棕榈酸组) 或 0.3 mmol/L 棕榈酸 + 100 nmol/L Ghrelin (棕榈酸 + Ghrelin 组) 在无血浆条件下孵育大鼠主动脉内皮细胞 24 h。将 6 孔板内培养液吸弃, PBS 洗 2 次, 0.25% 胰酶消化细胞。将消化下的细胞加入上一步中收集的细胞培养液, 混匀, 转移至离心管内, 1000 g 离心 5 min, 弃上清, 收集细胞, 用 PBS 重悬细胞并计数。各取  $1 \times 10^6$  重悬细胞, 1000 g 离心 5 min, 弃上清, 加入 195 μL Annexin V-FITC 结合液, 轻轻重悬细胞。加入 5 μL Annexin V-FITC, 轻轻混匀。室温避光孵育 10 min。1000 g 离心 5 min, 弃上清, 加入 190 μL Annexin V-FITC 结合液, 轻轻重悬细胞。加入 10 μL 碘化丙啶 (PI) 染色液, 轻轻混匀, 冰浴避光放置, 流式细胞仪检测。

### 1.6 分光光度计检测 Caspase-3 活性

分组处理同细胞凋亡率检测, 无血浆条件孵育大鼠主动脉内皮细胞 24 h。细胞用 PBS 洗 2 次, 2000 r/min 离心 5 min, 去除 PBS, 沉淀细胞中加入 50 μL 冰冷裂解液和 0.5 μL 二硫苏糖醇, 冰上裂解 60 min, 4℃ 10000 r/min 离心 1 min, 加 50 μL 2 × 2 × Reaction Buffer/DTTMix, 加 5 μL Caspase-3 substrate (Ac-DEVD-pNA), 37℃ 4 h。分光光度计在 400 nm 波长测定其吸光度值。

### 1.7 Western Blot 检测 Bcl-2 和 Bax 表达

用只含 0.5% BSA 的培养基作为对照组, 实验组中分别加入 0.3 mmol/L 棕榈酸 (棕榈酸组) 或 0.3 mmol/L 棕榈酸 + 100 nmol/L Ghrelin (棕榈酸 + Ghrelin 组) 在无血浆条件下孵育大鼠主动脉内皮细胞 24 h。用 RIPA 裂解液裂解细胞, 提取蛋白质, 进行 10% SDS-PAGE, 1 × 三羟甲基氨基甲烷缓冲液 (pH 7.6) 洗 3 次, 转膜后 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 加一抗 4℃ 孵育过夜, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗杂交 2 h, 洗膜后 ECL 超敏发光液进行显色, 结果用 Scion Image 分析软件对目的条带进行灰度值分析。

### 1.8 统计学处理

应用 SPSS13.0 统计软件进行分析, 结果用  $\bar{x} \pm s$  表示, 每组实验重复 3 次或 3 次以上, 组间比较采用单因素方差分析及 Dunnett's 检验,  $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 大鼠主动脉内皮细胞的鉴定

倒置显微镜下,培养的大鼠主动脉内皮细胞单层生长,呈铺路石样排列;免疫组织化学法检测内皮细胞Ⅷ因子结果阳性,细胞质呈棕黄色(图1)。

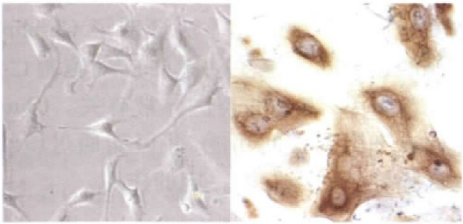


图1. 内皮细胞的鉴定 左为培养的大鼠主动脉内皮细胞倒置显微镜下观(×100),右为Ⅷ因子相关抗原染色照片(×400)。

Figure 1. Identification of endothelial cells

### 2.2 MTT 比色法检测细胞活性

在 0.5% BSA 培养条件下, Ghrelin 显著增加细胞活性, 100 nmol/L 的 Ghrelin 使细胞增殖率增加达对照组的 120% ( $P < 0.05$ )。在 0.5% BSA 及 0.3 mmol/L 棕榈酸培养条件下, Ghrelin 剂量依赖性地抑制棕榈酸产生的脂毒性, 10 nmol/L 为最低有效刺激浓度, 100 nmol/L 作用最显著(表1)。

表1. MTT 比色法检测 Ghrelin 对细胞活性的影响( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 1. Effect of ghrelin on cell proliferation measured by MTT

分组	OD 值
对照组	0.368 ± 0.042
1 nmol/L Ghrelin 组	0.390 ± 0.047
10 nmol/L Ghrelin 组	0.427 ± 0.032 <sup>a</sup>
100 nmol/L Ghrelin 组	0.442 ± 0.058 <sup>a</sup>
棕榈酸组	0.287 ± 0.369 <sup>b</sup>
棕榈酸 + 1 nmol/L Ghrelin 组	0.302 ± 0.032
棕榈酸 + 10 nmol/L Ghrelin 组	0.339 ± 0.037 <sup>c</sup>
棕榈酸 + 100 nmol/L Ghrelin 组	0.361 ± 0.047 <sup>c</sup>

a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; c 为  $P < 0.05$ , 与棕榈酸组比较。

### 2.3 Hoechst 33258 法检测细胞凋亡

正常细胞未发生凋亡时呈均匀蓝色荧光; 凋亡细胞呈现核碎裂、核致密深染, 细胞内可见致密的亮蓝色强荧光(图2)。

### 2.4 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率

与对照组比较, 0.3 mmol/L 棕榈酸作用于细胞 24 h 明显增加细胞凋亡率 ( $P < 0.01$ ); 而加入 Ghre-

lin (100 nmol/L) 后棕榈酸诱导的大鼠主动脉内皮细胞凋亡明显降低 ( $P < 0.01$ ); 单用 Ghrelin 作用于细胞 24 h 减少细胞凋亡 ( $P < 0.05$ ; 表2)。

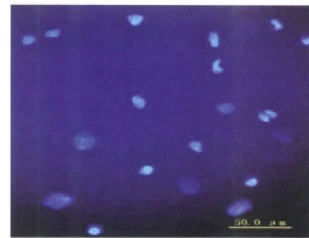


图2. Hoechst 33258 法检测细胞凋亡

Figure 2. Cell apoptosis assessed by Hoechst 33258 staining

### 2.5 分光光度法检测 Caspase-3 活性

与对照组比较, 0.3 mmol/L 棕榈酸作用于细胞 24 h 明显增加 Caspase-3 活性 ( $P < 0.01$ ); 加入 Ghrelin 能够显著降低棕榈酸作用下 Caspase-3 活性的增加 ( $P < 0.05$ ), 而单用 Ghrelin 作用于细胞 24 h Caspase-3 活性与对照组比无显著变化 ( $P > 0.05$ ; 表2)。

表2. Ghrelin 对棕榈酸诱导的大鼠主动脉内皮细胞凋亡和 Caspase-3 活性的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 2. Effect of ghrelin on apoptosis and caspase-3 activity in rat aortic endothelial cells induced by palmitate

分组	凋亡率	Caspase-3 活性
对照组	5.01% ± 0.52%	1.308 ± 0.021
Ghrelin 组	2.52% ± 0.21% <sup>a</sup>	1.177 ± 0.011
棕榈酸组	30.03% ± 1.98% <sup>b</sup>	2.354 ± 0.039 <sup>b</sup>
棕榈酸 + Ghrelin 组	10.03% ± 0.90% <sup>c</sup>	1.962 ± 0.026 <sup>c</sup>

a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; c 为  $P < 0.05$ , 与棕榈酸组比较。

### 2.6 Western Blot 法检测 Bcl-2 和 Bax 表达

与对照组比较, 棕榈酸作用于细胞 24 h 降低了 Bcl-2/Bax 比率 (0.30 ± 0.03 比 1.48 ± 0.10,  $P < 0.05$ ), 而 Ghrelin 减轻了棕榈酸诱导的内皮细胞 Bcl-2/Bax 比率下降 (1.02 ± 0.07,  $P < 0.01$ ; 图3)。

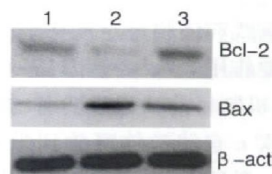


图3. Ghrelin 对 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响 1 为对照组, 2 为棕榈酸组, 3 为棕榈酸 + Ghrelin 组。

Figure 3. Effect of ghrelin on expression of Bcl-2 and Bax protein

### 3 讨 论

以动脉粥样硬化为主要病理改变的大血管并发症是糖尿病患者致死致残的主要原因,内皮功能失调被认为是动脉粥样硬化的始动因素之一。2型糖尿病、高血压病、肥胖患者的血浆游离脂肪酸是增高的,高浓度的游离脂肪酸可以导致血管内皮细胞功能失调,体外研究表明高浓度的游离脂肪酸可以诱导体外培养的血管内皮细胞凋亡<sup>[6]</sup>。内皮细胞凋亡可促进内皮细胞的更新从而增加血管壁对动脉粥样硬化的易感性,因此内皮损伤被认为是动脉粥样硬化发生的一个早期事件。

Ghrelin 是一种具有多种功能的多肽,具有除调节生长激素释放及食欲以外广泛的生物功能,近来 Ghrelin 在心血管方面的作用比较引人注目。Ghrelin 及其受体在心血管组织广泛分布,血浆低 Ghrelin 水平存在于多种心血管高危因素中。Ghrelin 在不同环境所导致的内皮细胞凋亡中均发挥了抗凋亡作用,如高糖。高糖作用下人脐静脉内皮细胞凋亡增加,而 Ghrelin 能够抑制高糖诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡<sup>[5]</sup>,但 Ghrelin 能否抑制脂毒性对内皮细胞损伤的报道较少。本研究结果发现,Ghrelin 在有或无棕榈酸环境下均能增加内皮细胞活性,促进内皮细胞增殖,Ghrelin 能够浓度依赖性增加细胞活性,10 nmol/L 是最低有效浓度,100 nmol/L 时作用最显著,与近来研究相一致<sup>[7]</sup>。

目前认为 Caspase-3 蛋白酶是细胞凋亡中最主要的终末剪切酶,在细胞凋亡中起不可替代的作用,是细胞凋亡关键的执行分子,Caspase-3 蛋白酶活化后通过剪切底物使凋亡得以进行。本研究通过 Annexin V-FITC/PI 法检测细胞凋亡及对 Caspase-3 活性的检测发现,Ghrelin 可以抑制高浓度棕榈酸引起的内皮细胞 Caspase-3 活性增加,进而抑制细胞凋亡。

细胞凋亡的调控包括一系列原癌基因和抑癌基因的产生,其中 Bcl-2 家族起决定性作用;Bcl-2 蛋白家族通过影响线粒体膜稳定性在细胞内凋亡信号传导中发挥重要作用。Bcl-2 基因是一种原癌基因,Bcl-2 抗凋亡的机制目前认为主要有:抑制促凋亡的蛋白质细胞色素 c 自线粒体释放到胞质,阻止胞质中的细胞色素 c 激活 Caspase;有抗氧化及维持细胞内钙稳态等作用。Bax 基因属于 Bcl-2 基因家族,编码的 Bax 蛋白通过诱导线粒体膜去极化和促进细胞

色素 c 释放发挥促凋亡作用,Bax 蛋白可与 Bcl-2 形成异二聚体,对 Bcl-2 产生阻抑作用。研究发现 Bcl-2、Bax 之间的比例关系是决定对细胞凋亡抑制作用强弱的关键因素<sup>[8]</sup>。有研究证实,Bcl-2/Bax 比率降低内皮细胞凋亡降低<sup>[9]</sup>。本实验中,棕榈酸作用下 Bcl-2/Bax 比率降低,Ghrelin 通过升高 Bcl-2/Bax 比率降低脂毒性对内皮细胞的损害作用。

本实验通过多种研究方法证明了 Ghrelin 可以抑制棕榈酸诱导的大鼠主动脉内皮细胞凋亡,这一过程可能与 Bcl-2、Bax 的表达异常有关。Ghrelin 具有抑制内皮细胞凋亡的功能,并可能通过该作用在防治动脉粥样硬化中发挥一定的作用。

#### [参考文献]

- [1] Chen J, Liu X, Shu Q, et al. Ghrelin attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury through NO pathway [J]. *Med Sci Monit*, 2008, 14(7): 141-146.
- [2] Hwang S, Moon M, Kim S, et al. Neuroprotective effect of ghrelin is associated with decreased expression of prostate apoptosis response-4 [J]. *Endocri J*, 2009, 56(4): 609-617.
- [3] Wei W, Dan Z, Hong Z, et al. Ghrelin inhibits cell apoptosis induced by lipotoxicity in pancreatic  $\beta$ -cell line [J]. *Regul Pept*, 2010, 161(1-3): 43-50.
- [4] Kui L, Weiwei Z, Ling L, et al. Ghrelin inhibits apoptosis induced by high glucose and sodium palmitate in adult rat cardiomyocytes through the PI3K-Akt signaling pathway [J]. *Regul Pept*, 2009, 155(1-3): 62-69.
- [5] 赵宏, 丁丽颖, 刘国良. 酰基化 ghrelin 抑制高糖诱导的人血管内皮细胞凋亡 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, 15(11): 831-833.
- [6] Chai W, Liu Z. P38 mitogen-activated protein kinase mediates palmitate-induced apoptosis but not inhibitor of nuclear factor- $\kappa$ B degradation in human coronary artery endothelial cells [J]. *Endocrinology*, 2007, 148(4): 1622-1628.
- [7] Rossi F, Castelli A, Bianco MJ, et al. Ghrelin induces proliferation in human aortic endothelial cells via ERK1/2 and PI3K/Akt activation [J]. *Peptides*, 2008, 29(11): 2046-051.
- [8] Korsmeyer SJ. Regulators of cell death [J]. *Trends Genet*, 1995, 11(3): 101-105.
- [9] 谢斌, 吕湛, 苟连平, 等. 阿托伐他汀通过调节 Bcl-2/Bax 蛋白表达抑制高糖诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2010, 18(12): 943-947.

(此文编辑 许雪梅)