

X 盒结合蛋白 1 在高迁移率族蛋白 B1 诱导内皮细胞凋亡中的作用

王琼, 邵耀明, 耿先龙, 邵俊良

(南京医科大学附属无锡人民医院医学检验科, 江苏省无锡市 214023)

[关键词] X 盒结合蛋白 1; 高迁移率族蛋白 B1; 内皮细胞凋亡

[摘要] 目的 探讨活化的 X 盒结合蛋白 1(XBP1)在高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)诱导人脐静脉血管内皮细胞凋亡中的作用及机制。方法 体外培养人脐静脉血管内皮细胞,将其分为正常对照组、HMGB1 刺激组和慢病毒干扰 + HMGB1 刺激组(即 XBP1 基因被沉默后加入 HMGB1)。采用 RT-PCR 检测剪切型 XBP1(sXBP1)的基因表达水平,Western blot 检测 Caspase-3 的蛋白表达水平,细胞荧光染色检测内皮细胞凋亡。结果 与正常对照组比较, HMGB1 刺激组 sXBP1 的基因表达水平增加, Caspase-3 的蛋白表达水平明显升高, 细胞凋亡率明显增加($P < 0.05$); 与正常对照组比较, 慢病毒干扰 + HMGB1 刺激组 sXBP1 的基因表达水平无明显改变, Caspase-3 的蛋白表达水平、细胞凋亡率差异无统计学意义($P > 0.05$)。与 HMGB1 刺激组比较, 慢病毒干扰 + HMGB1 刺激组 sXBP1 的基因表达水平降低, Caspase-3 的蛋白表达水平降低, 细胞凋亡率降低($P < 0.05$)。结论 XBP1 对 HMGB1 诱导内皮细胞凋亡至关重要。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

X-box-binding Protein-1 Contributes to Endothelial Cell Apoptosis Induced by High Mobility Group Box-1 Protein

WANG Qiong, SHAO Yao-Ming, GENG Xian-Long, and SHAO Jun-Liang

(Department of Clinical Laboratory, Wuxi People's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Wuxi, Jiangsu 214023, China)

[KEY WORDS] X-box-binding Protein-1; High Mobility Group Box-1 Protein; Endothelial Cell Apoptosis

[ABSTRACT] **Aim** To explore the potential role of activated X-box-binding protein-1 (XBP-1) in apoptosis of endothelial cells induced by high mobility group box-1 protein (HMGB1). **Methods** The HUVEC12 were divided into three groups: control group, HMGB1 stimulating group, virus interference and HMGB1 stimulating group (XBP1 was silenced and then HMGB1 was added). The spliced XBP1 (sXBP1) gene expression was measured by RT-PCR, Caspase-3 protein expression was measured by Western blot, and the apoptosis was analyzed by fluorescence staining with Annexin-V and PI staining. **Results** Compared with control group, sXBP1 gene expression was up-regulated, Caspase-3 protein expression was up-regulated, cell apoptosis rate was increased (all $P < 0.05$) in HMGB1 stimulating group. While compared with control group, sXBP1 gene expression change was not significant, Caspase-3 protein expression variation was not significant, and the cell apoptosis rate was not increased in virus interference and HMGB1 stimulating group (all $P > 0.05$). Compared with HMGB1 stimulating group, sXBP1 gene expression and Caspase-3 protein expression was down-regulated ($P < 0.05$), and cell apoptosis rate was decreased ($P < 0.05$) in virus interference and HMGB1 stimulating group. **Conclusion** The XBP1 played an important role in endothelial cell apoptosis induced by high mobility group box-1 protein.

内皮细胞(endothelial cell, EC)凋亡是动脉粥样硬化的始动因素之一。许多促动脉粥样硬化因素,如

氧化型低密度脂蛋白、炎性细胞因子和氧化应激等均能诱导内皮细胞凋亡。内质网应激(endoplasmic re-

[收稿日期] 2014-06-09

[修回日期] 2014-09-06

[基金项目] 江苏省无锡市卫生局青年基金项目(Q201308)

[作者简介] 王琼, 博士研究生, 主治医师, 主要从事冠心病的发病机制研究, E-mail 为 wangqiong_john@163.com。邵耀明, 主管技师, 主要从事冠心病的发病机制研究。通讯作者邵俊良, 主管技师, 主要从事动脉粥样硬化的分子机制研究。

ticulum stress, ERS)/未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)是细胞内的重要应激机制,其中 X 盒结合蛋白 1(X-box-binding protein-1, XBP1)是 ERS 的关键调节分子,活化的剪切型 XBP1(spliced XBP1, sXBP1)能够激活多条信号通路。高迁移率族蛋白 B1(high mobility group box-1 protein, HMGB1)是一种存在于真核细胞核内的非组蛋白染色体结合蛋白,分子量约为 25 kDa,共有 215 个氨基酸残基^[1]。HMGB1 是一种炎症介质,能被免疫细胞主动分泌或损伤和坏死的细胞被动释放到细胞外环境,触发炎症反应。许多内皮损伤因子如同型半胱氨酸、低密度脂蛋白、氧化型低密度脂蛋白、氧化胆固醇均可上调内皮细胞中 HMGB1 表达,从而导致血管内皮损伤,最终诱导内皮细胞凋亡^[2,3]。这些结果均表明 HMGB1 在血管内皮损伤及凋亡中发挥着重要作用。本研究拟探讨外源性 HMGB1 能否诱导内皮细胞凋亡,以及活化的 sXBP1 是否是 HMGB1 诱导内皮细胞凋亡的关键分子。

1 材料和方法

1.1 主要仪器和试剂

人脐静脉血管内皮细胞株(HUVEC12)购自武汉大学细胞库, HMGB1 购自美国 Sigma 公司, DMEM 和 OMEM 培养基购自美国 Hyclone 公司,小牛血清购自杭州四季青生物工程材料研究所,兔抗大鼠 Caspase-3 一抗购自美国 Santa Cruz 公司, XBP1-shRNA 慢病毒干扰载体(XBPi)由上海吉凯基因化学技术有限公司提供,细胞凋亡检测试剂盒由南京凯基科技发展有限公司提供,多克隆抗体由武汉博士德生物工程有限公司提供。其余试剂均为国产分析纯化。

1.2 HUVEC12 的培养

取 HUVEC12 细胞株,解冻复苏后加入含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基制成细胞悬液,接种于培养瓶中置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,每隔 2~3 天换培养液 1 次,待细胞 80% 汇合时用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。将细胞密度分别调整为 1 × 10⁹/L,接种至细胞培养板中,待细胞 80% 汇合时换成无血清的 OMEM 培养基继续培养 24 h,使细胞达到同步化。然后分别加入不同的处理因素。

1.3 分组培养

实验分为三组:①正常对照组:正常培养 48 h 收集细胞;②HMGB1 刺激组:细胞培养液中加入 HMGB1,使终浓度达到 1 mg/L,继续培养 48 h 后收集细胞;③慢病毒干扰 + HMGB1 刺激组:按照后述

方法进行慢病毒干扰载体转染后,继续培养 3 天后细胞给予 HMGB1 刺激(1 mg/L,48 h)。

1.4 XBP1-shRNA 慢病毒干扰载体的构建及转染

将 HUVEC12 调整浓度为 1 × 10⁹/L,接种于细胞培养板,37℃、5% CO₂ 细胞培养箱培养 24 h 后,根据一定的感染复数(multiplicity of infection, MOI)值,加入合适量的慢病毒,12 h 后观察细胞状态,如果没有明显的细胞毒性作用,继续培养 48 h 后更换培养基;如果有明显的细胞毒性作用,马上更换培养基;3 天采用 Western blot 检测其干扰效率。MOI 值在 0~12 范围内,随 MOI 值的增大,慢病毒对细胞的感染效率逐步升高,其中 MOI 值在 6 以上时,慢病毒的感染效率均超过 75%;各慢病毒感染组细胞生长状态良好。实验结果说明 MOI 值 > 6 时,慢病毒对细胞的感染效率均可满足实验要求,并且对细胞活力无影响。明确该病毒可有效沉默细胞内 XBP1 基因表达后用于正式实验。XBPi 慢病毒感染 3 天后,XBP1 mRNA 表达水平即被显著下调,这种下调作用可维持至感染 5 天而无明显改变。说明 XBPi 慢病毒感染 3~5 天内,XBP1 mRNA 表达被显著抑制,其抑制率均超过 70%。

1.5 RT-PCR 检测活化的 sXBP1 基因表达水平

靶基因扩增引物见表 1。

表 1. 靶基因扩增引物序列及其扩增产物长度

靶基因	引物序列(5'→3')	基因长度
XBP1 ¹	Forward: TGGCCGGGTCTGCTGACTCCG	393 bp
	Reverse: GTCCATGGGAAGATGTCTCG	
sXBP1 ²	Forward: CTGAGTCCGAATCAGGTGCAG	367 bp
	Reverse: GTCCATGGGAAGATGTCTCG	
β-actin	Forward: TGAGACCTTCAACACCCAG	312 bp
	Reverse: GGCATGGACTGTGGTCATGA	

1 为扩增 XBP1 基因全长编码序列,2 为扩增 XBP1 基因剪切活化片段序列。

1.6 Western blot 检测 Caspase-3 蛋白表达

各组细胞孵育 48 h 后,弃培养基,用预冷的 PBS 漂洗 3 次,加入含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液,冰上充分裂解 30 min 后置于 4℃、13000 r/min 离心 30 min,取上清,即为细胞的总蛋白提取液,分装后 -70℃ 保存备用。以牛血清白蛋白作为标准蛋白,测定样品总蛋白含量(BCA 蛋白测定试剂盒)。取总蛋白 60 μg,100℃ 煮沸 5 min,12% SDS-聚丙烯酰胺

胺凝胶进行电泳分离蛋白。电泳结束后,蛋白转印到 PVDF 膜,1%脱脂牛奶封闭 60 min,加入一抗(抗 Caspase 抗体,稀释度为 1:1000)室温振荡孵育 2 h,HRP 标记的二抗孵育 1 h,TBST 漂洗 3 × 15 min。然后,显色,曝光,扫描分析。

1.7 细胞荧光染色检测细胞凋亡

严格按照 Annexin V-FITC-PI 细胞凋亡检测试剂盒说明书操作。细胞凋亡率 = (Annexin V 阳性细胞数 + PI 阳性细胞数 - 双阳性细胞数) / 总细胞数 × 100%。

1.8 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间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 内皮细胞 XBPI 的选择性剪接

正常对照组细胞主要表达 XBPI mRNA, HMGB1 刺激组细胞主要表达 sXBPI mRNA,而慢病毒干扰 + HMGB1 刺激组细胞 XBPI mRNA 和 sXBPI mRNA 的表达均受到抑制(图 1)。

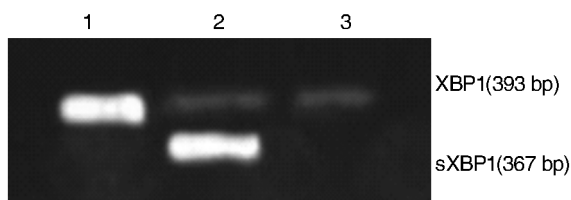


图 1. HUVEC 中 XBPI 和 sXBPI 基因水平的表达 1 为正常对照组,2 为 HMGB1 刺激组,3 为慢病毒干扰 + HMGB1 刺激组。

Figure 1. Gene expression of XBPI and sXBPI in HUVEC

2.2 内皮细胞 Caspase-3 蛋白的表达水平

HMGB1 刺激组 Caspase-3 蛋白表达与正常对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),而慢病毒干扰 + HMGB1 刺激组 Caspase-3 蛋白表达与正常对照组比较差异无统计学意义,慢病毒干扰 + HMGB1 刺激组 Caspase-3 蛋白表达与 HMGB1 刺激组比较差异有统计学意义($P < 0.05$;图 2)。

2.3 细胞凋亡情况

与正常对照组比较, HMGB1 刺激组细胞凋亡明显增加($P < 0.05$),慢病毒干扰 + HMGB1 刺激组细胞凋亡无明显增加;与 HMGB1 刺激组比较,慢病毒干扰 + HMGB1 刺激组细胞凋亡明显减少($P < 0.05$;图 3 和表 2)。

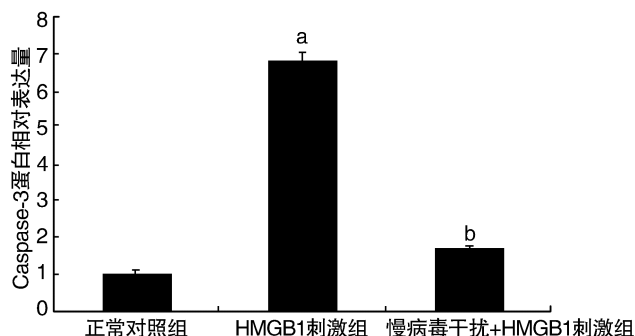
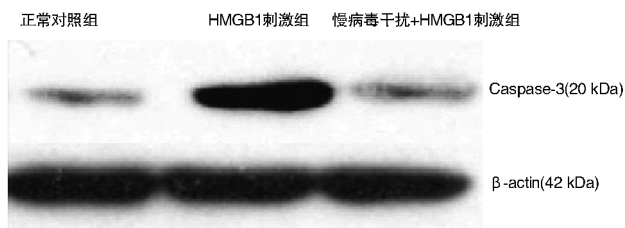


图 2. HUVEC 中 Caspase-3 的蛋白表达 a 为 $P < 0.05$,与正常对照组比较;b 为 $P < 0.05$,与 HMGB1 刺激组比较。

Figure 2. Protein expression of Caspase-3 in HUVEC

表 2. 各组细胞凋亡率

Table 2. Apoptosis rate of different groups

分 组	细胞凋亡率
正常对照组	1.5% ± 0.8%
HMGB1 刺激组	12.9% ± 1.4% ^a
慢病毒干扰 + HMGB1 刺激组	2.2% ± 1.1% ^b

a 为 $P < 0.05$,与正常对照组比较;b 为 $P < 0.05$,与 HMGB1 刺激组比较。

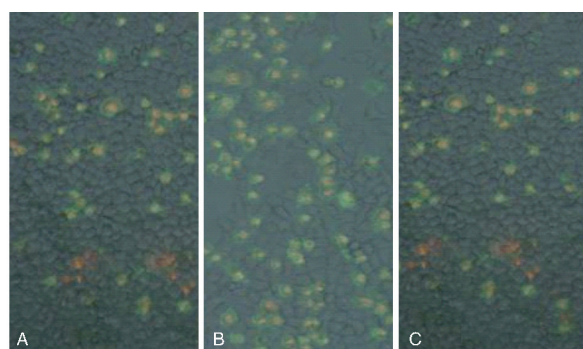


图 3. Annexin V-FITC-PI 荧光标记细胞染色检测细胞凋亡 ($\times 10$) A 为正常对照组,B 为 HMGB1 刺激组,C 为慢病毒干扰 + HMGB1 刺激组。

Figure 3. HUVEC apoptosis detected by Annexin V-FITC-PI fluorescent labeled cells staining ($\times 10$)

3 讨论

研究表明,在动脉粥样硬化斑块中内皮细胞凋亡增加,覆盖于血管病变处的内皮细胞促凋亡蛋白

如 Fas 和 Bax 表达增加,抗凋亡因子水平降低^[4]。内皮细胞凋亡会使内皮细胞更新加速,从而改变内皮细胞功能,导致血管舒张调节功能失常,平滑肌细胞增殖和迁移、血液凝固,诱发动脉粥样硬化的发生发展^[5-8]。同时,动脉粥样硬化发展过程中的危险因素又可以加速内皮细胞凋亡,从而形成恶性循环,增加心血管事件的发生。内皮细胞凋亡是动脉粥样硬化发生发展的独立危险因素。所以深入研究内皮细胞凋亡具体分子机制,将有助于理解和完善动脉粥样硬化的发病机制,为研发新药物提供理论基础。

内质网中,分泌性蛋白、跨膜蛋白和内质网驻留蛋白折叠成天然构象,经过修饰后,形成有活性的功能性蛋白质。如果蛋白质在内质网内的折叠受到抑制,造成未折叠蛋白聚集,将引起 ERS,激活 UPR 信号转导,使蛋白质的生物合成减少,内质网的降解功能增强,从而降低内质网负担,维持细胞内的稳态。UPR 由三条主要信号途径转导,分别由 PERK、IRE1 和 ATF6 3 个 ER 应激感应蛋白介导。转录因子 XBP1 是哺乳动物细胞 ERS 信号转导过程中的中枢性调节分子,细胞发生 ERS 时,内质网腔内重要跨膜蛋白分子 IRE1 与伴侣蛋白糖调节蛋白 78 分离而发生寡聚化、自身磷酸化而被激活,诱导 XBP1 mRNA 发生特异性地剪接,产生 sXBP1 mRNA,编码 sXBP1 蛋白,进入核内结合 ERS 反应元件,在转录水平上调控 ERS 相关基因的表达^[9-11]。在持续 ERS 状态下人为提高 IRE1 活性非常有利于细胞的存活^[12],提示 IRE1/XBP1 信号通路对细胞存活或凋亡具有重要影响。

凋亡蛋白酶为一类半胱氨酸蛋白酶,被认为是引起内皮细胞凋亡的关键酶。一旦被信号途径激活,能将细胞内的蛋白质降解,使细胞不可逆死亡^[13]。其中 Caspase-3 被认为是执行内皮细胞凋亡程序的下游关键因子,被称为“杀手”蛋白,Caspase-3 可直接降解细胞内的结构蛋白和功能蛋白,引起凋亡,但不能通过自催化或自剪接的方式激活。我们的研究表明外源性的 HMGB1 可诱导内皮细胞凋亡,伴随有 Caspase-3 的激活。本研究对 HMGB1 诱导内皮细胞凋亡过程中 sXBP1 的表达进行检测,结果显示,HMGB1 刺激可诱导 sXBP1 基因表达明显上调,Caspase-3 蛋白表达上调,凋亡细胞增加,而 XBP1 基因被沉默后,HMGB1 刺激则不能有效诱导 Caspase-3 表达上调,凋亡细胞也无明显增加,提示 XBP1 在 HMGB1 诱导内皮细胞凋亡过程中担当重要的作用。

作为多种应激过程中可能的共同通路,内质网应激与动脉粥样硬化发生发展中的脂质代谢、炎症反应、细胞凋亡都有着潜在的关系,并有可能广泛地参与动脉粥样硬化的形成过程,而 IRE1/XBP1 途径作为内质网应激的核心通路之一,有望成为防治冠心病的潜在药物靶点之一,其具体作用及机制有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Malarkry CS, Churchill ME. The high mobility group box: the ultimate utility player of a cell [J]. Trends Biochem Sci, 2012, 37 (12): 553-562.
- [2] Taguchi A, Bou DC, Tom G, et al. Blockade of RAGE-amphoterin signaling suppresses tumor growth and metastases [J]. Nature, 2000, 405 (6784): 354-360.
- [3] Zhang LT, Yao YM, Yao FH, et al. Association between high mobility group box-1 protein release and immune function of dendritic cells in thermal injury [J]. Interferon Cytokine Res, 2010, 30 (7): 487-495.
- [4] Choy JC, Grannville DJ, Hunt DW, et al. Endothelial cell apoptosis: Biochemical characteristics and potential implications for atherosclerosis [J]. J Mol Cell Cardiol, 2001 (33): 1 673-690.
- [5] Schiro A, Wilkinson FL, Weston R, et al. Endothelial microparticles as conveyors of information in atherosclerotic disease [J]. Atherosclerosis, 2014, 234 (2): 295-302.
- [6] Wang P, Xu TY, Guan YF, et al. Vascular smooth muscle cell apoptosis is an early trigger for hypothyroid atherosclerosis [J]. Cardiovasc Res, 2014, 102 (3): 448-459.
- [7] Choy JC, Granville DJ, Hunt DW, et al. Endothelial cell apoptosis: biochemical characteristics and potential implications for atherosclerosis [J]. J Mol Cell Cardiol, 2001, 33 (9): 124-128.
- [8] 崔淑华, 庾勤慧. 动脉粥样硬化中巨噬细胞凋亡与内质网应激机制 [J]. 国际病理科学与临床杂志, 2011, 31 (4): 315-318.
- [9] Margariti A, Li H, Chen T, et al. XBP1 mRNA splicing triggers an autophagic response in endothelial cells through BECLIN-1 transcriptional activation [J]. J Biol Chem, 2013, 288 (2): 859-872.
- [10] Calton M, Zeng H, Urano F, et al. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA [J]. Nature, 2002, 415 (6867): 92-96.
- [11] Yao ST, Sang H, Yang NN, et al. Oxidized low density lipoprotein induces macrophage endoplasmic reticulum stress via CD36 [J]. Sheng Li Xue Bao, 2010, 62 (5): 433-440.
- [12] Yao S, Yang N, Song G, et al. Minimally modified low-density lipoprotein induces macrophage endoplasmic reticulum stress via toll-like receptor 4 [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1821 (7): 954-963.
- [13] Pober JS, Min W, Bradley JR. Mechanisms of endothelial dysfunction, injury, and death [J]. Knuu Rev Pathol, 2009, 4 (1): 71-95.

(此文编辑 王玉珊)