

氧化型低密度脂蛋白通过下调 TET2 抑制人脐静脉内皮细胞增殖和迁移

张建新, 姚平波, 罗平, 包铮

(南华大学附属南华医院胸心外科, 湖南省衡阳市 421002)

[关键词] 氧化型低密度脂蛋白; TET2; 人脐静脉内皮细胞; 细胞增殖; 迁移; Rac1 蛋白

[摘要] **目的** 探讨 TET2 在氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)抑制人脐静脉内皮细胞(HUVEC)增殖和迁移中的作用及其机制。**方法** 分别以 0、25、50、75 mg/L ox-LDL 孵育 HUVEC 24 h, Western blot 检测 ox-LDL 对 HUVEC TET2 表达的影响。噻唑蓝法检测 TET2 对 ox-LDL 处理的 HUVEC 增殖的影响; Transwell 实验和划痕实验检测 TET2 干预对 HUVEC 迁移的影响; 免疫荧光法检测 TET2 干预对 HUVEC 细胞骨架的影响; Western blot 检测 HUVEC 总 Rac1 及磷酸化 Rac1 的表达。**结果** ox-LDL 呈浓度依赖性地下调 TET2 的表达。过表达 TET2 改善 ox-LDL 对 HUVEC 增殖和迁移的抑制, 低表达 TET2 进一步抑制 HUVEC 增殖和迁移。免疫荧光结果表明, ox-LDL 促进 HUVEC 周边致密带的形成, 过表达 TET2 抑制致密带的形成, 低表达 TET2 进一步加强致密带的形成。Western blot 结果表明, ox-LDL 抑制 HUVEC Rac1 蛋白的表达, 过表达 TET2 上调 HUVEC 总 Rac1 及磷酸化 Rac1 的水平, 低表达 TET2 进一步降低总 Rac1 及磷酸化 Rac1 的水平。**结论** ox-LDL 通过下调 TET2 的表达影响细胞骨架, 从而抑制 HUVEC 的增殖和迁移。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Oxidized Low Density Lipoprotein Inhibits Human Umbilical Vein Endothelial Cell Proliferation and Migration via Downregulation of TET2

ZHANG Jian-Xin, YAO Ping-Bo, LUO Ping, and BAO Zheng

(Department of Cardiothoracic Surgery, Affiliated Nanhua Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421002, China)

[KEY WORDS] Oxidized Low Density Lipoprotein; TET2; Human Umbilical Vein Endothelial Cell; Cell Proliferation; Migration; Rac1 Protein

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of ten-eleven translocation oncogene family member 2 (TET2) on oxidized low density lipoprotein (ox-LDL)-treated human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) proliferation and migration. **Methods** HUVEC was incubated with 0, 25, 50, 75 ox-LDL mg/L respectively for 24 h, and Western blot was used to detect HUVEC TET2 protein expression. Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method was used to detect the effect of TET2 on ox-LDL-treated HUVEC proliferation. Transwell experiment and scratch experiment were used to detect the effect of TET2 intervention on ox-LDL-treated HUVEC migration. Immunofluorescence was used to detect the effect of TET2 intervention on HUVEC cytoskeleton, and Western blot was used to detect the expressions of total Rac1 (tRac1) and phosphorylated Rac1 (pRac1) in HUVEC. **Results** Oxidized low density lipoprotein inhibited HUVEC TET2 expression with a dose-dependent manner. TET2 overexpression improved the ox-LDL-induced HUVEC proliferation and migration inhibition, while TET2 low expression (TET2 shRNA) further inhibited HUVEC proliferation and migration. Immunofluorescence showed that ox-LDL induced the formation of HUVEC peripheral compact zone. TET2 overexpression inhibited the formation of compact zone induced by ox-LDL, while TET2 shRNA strengthened the compact zone formation. Western blot showed that ox-LDL inhibited the expression of Rac1 protein in HUVEC. TET2 overexpression increased the

[收稿日期] 2015-05-18

[修回日期] 2015-08-29

[作者简介] 张建新, 硕士, 主治医师, 研究方向为胸心血管疾病的防治, E-mail 为 zhangjianxin1980@163.com。通讯作者姚平波, 硕士, 主治医师, 研究方向为心血管疾病病理生理, E-mail 为 yaopingbo752300@163.com。罗平, 硕士, 主治医师, 主要从事胸心血管疾病的防治, E-mail 为 luopingcqu@163.com。

levels of tRac1 and pRac1 in HUVEC, while TET2 shRNA further decreased the levels of tRac1 and pRac1. **Conclusion** Oxidized low density lipoprotein can inhibit the expression of TET2, which regulate HUVEC cytoskeleton, so as to inhibit the proliferation and migration of HUVEC.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)性心脑血管疾病严重危害人类健康,其中氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)是诱导 As 发生、发展的独立危险因子^[1]。血管内皮细胞功能损伤是 As 发生发展的始动环节^[2]。研究发现,ox-LDL 损伤人冠状动脉内皮细胞的功能,抑制其增殖和迁移,但其作用机制尚不明确。TET2(ten-eleven translocation oncogene family member 2)蛋白是 TET 家族成员之一,是一种 α -酮戊二酸和 Fe^{2+} 依赖的双加氧酶,催化 5-甲基胞嘧啶转化为 5-羟甲基胞嘧啶,介导 DNA 的主动去甲基化过程。近来的研究表明,TET2 对细胞的表型转化以及生物学功能的维持起着重要的调节作用^[3-4]。本实验通过观察 ox-LDL 对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) TET2 表达的影响以及 TET2 干预对 HUVEC Ras 相关的 C3 肉毒素底物 1(Ras-related C3 botulinum toxin subsuate 1, Rac1)蛋白表达、细胞骨架改变、增殖及迁移的影响,探讨 ox-LDL 抑制血管内皮细胞增殖与迁移的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

人脐静脉内皮细胞购自中国科学院上海细胞库,DMEM 高糖细胞培养基购自 Gibco 公司,胎牛血清购自美国 HyClone 公司,Transwell 系统购自美国 Corning 公司,0.25% 胰酶溶液购自美国 Gibco 公司,TET2 过表达质粒和 TET2 shRNA 质粒(TET2 低表达质粒)购自美国 Orange 公司,Rac1、F-actin 一抗及其相关二抗购自美国 Proteintech Group 公司,Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司,ox-LDL 购自广州中山大学。

1.2 细胞培养

采用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基,在饱和湿度条件下 37°C 、5% CO_2 的培养箱中培养 HUVEC。待细胞长至 60%~70% 融合时,进行后续处理。

1.3 质粒转染

TET2 过表达质粒之载体为 PS100010 质粒,TET2 shRNA 质粒的 shRNA 序列为 GGCAACAGAC-TAAGTCCATTCCTGATACC,其载体为 pGFP-V-RS 质粒。按照 DNA-Lipofectamine 2000 的使用说明书

制备 DNA-Lipofectamine 2000 复合物,用无血清培养基 OPTI-MEM 来稀释 DNA 质粒,轻轻混匀,室温孵育 10 min。再取 100 μL 的 DNA-Lipofectamine 2000 复合物加入单层细胞培养基中,混匀,置于细胞培养箱中继续培养 24 h,再以 ox-LDL 处理 24 h。

1.4 Western blot 分析

收集细胞并加入细胞裂解液裂解细胞,以 10000 g 离心力离心 10 min,收集蛋白,BCA 法进行蛋白质定量。12% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质,转膜。 4°C 封闭过夜,TET2(1:200)、Rac1(1:100)、 β -actin(1:500)一抗室温孵育 2 h,TBST(tris-buffered saline and tween 20)洗 3 次,相应二抗室温孵育 2 h,TBST 洗膜,显色试剂盒显色。Labwork 凝胶图像分析系统保存并分析结果。

1.5 噻唑蓝法检测细胞增殖

将 200 μL 细胞密度为 $2.0 \times 10^7/\text{L}$ 的 HUVEC 接种于 96 孔培养板,置于 37°C 、5% CO_2 温箱中培养。待细胞融合度为 60% 左右时,实验分为 4 组:(1)对照组;(2)50 mg/L ox-LDL 组;(3)TET2 过表达质粒 + 50 mg/L ox-LDL 组;(4)TET2 shRNA 质粒 + 50 mg/L ox-LDL 组。每组各设 6 个复孔,在培养结束前,每孔加入 5 g/L 噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)20 μL ,继续培养 4 h。吸弃上清液,每孔加入 150 μL 二甲基亚砷,用酶标仪在 490 nm 波长下检测吸光度值。

1.6 Transwell 实验

消化细胞,调整细胞密度至 $5 \times 10^8/\text{L}$,将 100 μL 经不同处理的细胞悬液加入 Transwell 小室,下室加入 600 μL 含 10% 血清的培养基, 37°C 、5% CO_2 孵育 8 h。取出 Transwell 小室,弃去小室中的细胞培养液,用无菌的 PBS 洗 2 遍,甲醇固定 30 min,风干。0.1% 结晶紫染色 20 min,用棉签轻轻擦掉上层未迁移细胞,PBS 洗 3 遍。显微镜下随机观察 5 个视野细胞,计数。

1.7 划痕实验

将 HUVEC 接种于 35 mm 培养皿内,接种细胞密度为 1.0×10^4 个/皿, 37°C 、5% CO_2 培养箱内培养 48 h,使用 200 μL 无菌吸头将完全融合的 HUVEC 单细胞层划出损伤区,并用 PBS 冲洗干净刮掉的细胞,换用新鲜培养基培养,24 h 后拍照并分析 HUVEC 的迁移能力。细胞迁移能力以迁移距离来表示。

1.8 细胞免疫荧光实验

弃去 Transwell 小室中的细胞培养液,PBS 液冲洗,4% 多聚甲醛固定 20 min,晾干;PBS 液漂洗;0.5% Triton 孵育 30 min,PBS 漂洗;10% 的封闭液封闭 2 h,F-actin 一抗4℃孵育过夜;PBS 洗 3 次,每次 5 min;相应异硫氰酸荧光素标记的二抗室温孵育 2 h,PBS 漂洗;采用抗荧光淬灭封片剂封片,Olympus 荧光显微镜下拍照并保存结果。

1.9 统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 11.0 统计软件进行单因素方差分析,两两均数间的多重比较采用 Student's t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ox-LDL 对 HUVEC TET2 表达的影响

在本实验中,我们采用 0、25、50、75 mg/L ox-LDL 分别处理 HUVEC 24 h,用 Western blot 检测 ox-LDL 对 TET2 表达的影响。结果表明,HUVEC 中存在 TET2 的基础水平表达,ox-LDL 明显抑制 HUVEC TET2 的表达,并呈浓度依赖性(图 1)。采用 50 mg/L ox-LDL 进行后续实验。

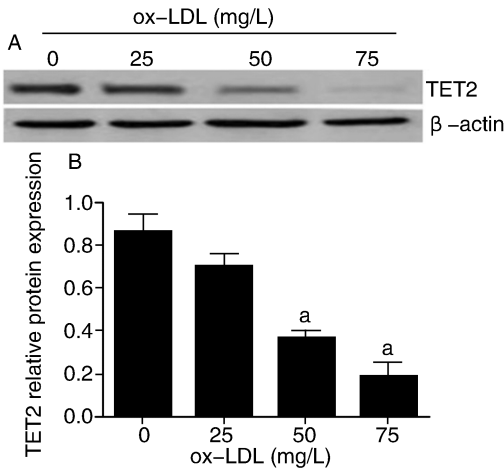


图 1. ox-LDL 对 HUVEC TET2 表达的影响 ($n = 3$) A 为 Western blot 检测 TET2 蛋白表达;B 为 TET2 蛋白表达的统计图。a 为 $P < 0.05$,与 0 mg/L ox-LDL 组比较。

Figure 1. Effects of ox-LDL on the expression of TET2 in HUVEC ($n = 3$)

2.2 TET2 对 ox-LDL 处理的 HUVEC 增殖的影响

我们采用 MTT 法检测 TET2 对 ox-LDL 处理的 HUVEC 增殖的影响,结果显示,50 mg/L ox-LDL 明显抑制 HUVEC 增殖,TET2 过表达质粒预处理明显改善 ox-LDL 对 HUVEC 增殖的抑制,而 TET2 shR-

NA 质粒预处理进一步抑制 HUVEC 的增殖(图 2)。

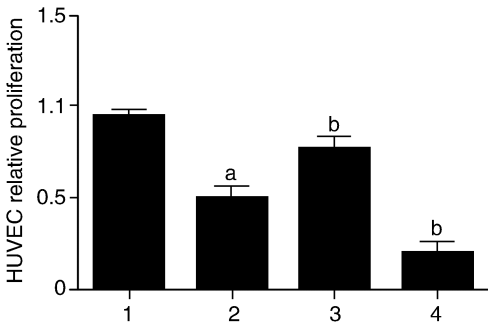


图 2. TET2 对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 增殖的影响 ($n = 6$) 1 为对照组,2 为 50 mg/L ox-LDL 组,3 为 TET2 过表达质粒 + 50 mg/L ox-LDL 组,4 为 TET2 shRNA 质粒 + 50 mg/L ox-LDL 组。a 为 $P < 0.05$,与对照组比较;b 为 $P < 0.05$,与 50 mg/L ox-LDL 组比较。

Figure 2. Effects of TET2 on the proliferation of HUVEC induced by ox-LDL ($n = 6$)

2.3 TET2 对 ox-LDL 处理的 HUVEC 迁移的影响

为了探讨 TET2 在 ox-LDL 诱导的 HUVEC 迁移抑制中的作用,采用 TET2 过表达质粒以及 TET2 shRNA 质粒观察 TET2 过表达以及 TET2 低表达对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 迁移抑制的影响。我们首先检测了 TET2 过表达质粒以及 TET2 shRNA 质粒对 HUVEC TET2 表达的影响,结果表明 TET2 过表达质粒明显上调 TET2 的表达,而 TET2 shRNA 质粒明显抑制 TET2 的表达($P < 0.05$;图 3)。

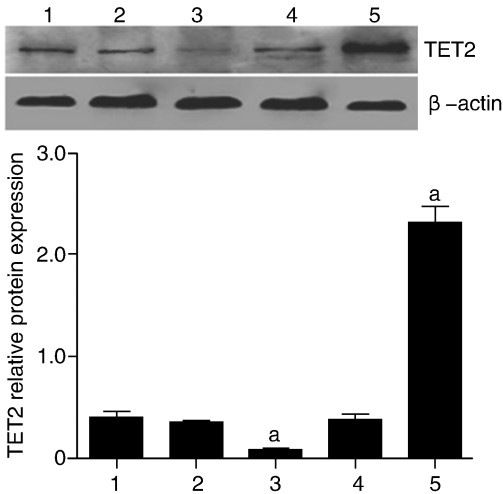


图 3. TET2 过表达质粒和 TET2 shRNA 质粒对 HUVEC TET2 表达的影响 ($n = 3$) 1 为对照组,2 为 pGFP-V-RS 质粒组,3 为 TET2 shRNA 质粒组,4 为 PS100010 质粒组,5 为 TET2 过表达质粒组。a 为 $P < 0.05$,与对照组比较。

Figure 3. Effects of TET2 overexpression plasmid and TET2 shRNA plasmid on the expression of TET2 in HUVEC ($n = 3$)

Transwell 实验(图 4)和划痕实验(图 5)结果表明,ox-LDL 明显抑制 HUVEC 迁移,TET2 过表达质粒预处理明显上调 ox-LDL 处理的 HUVEC 迁移数

量及迁移距离,而 TET2 shRNA 预处理进一步抑制其迁移数量及迁移距离。

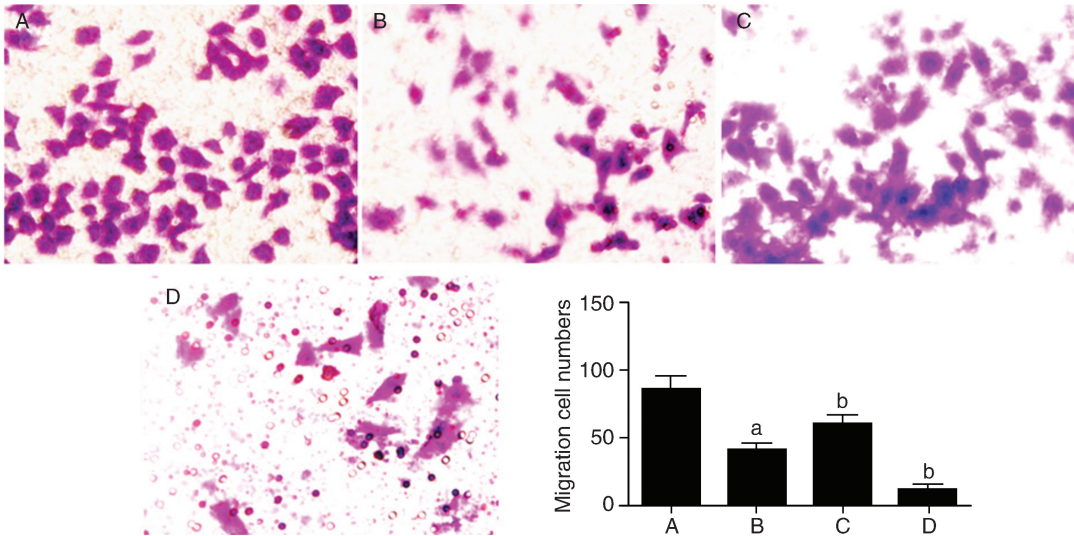


图 4. Transwell 实验结果(× 20, n = 3) A 为对照组, B 为 50 mg/L ox-LDL 组, C 为 TET2 过表达质粒 + 50 mg/L ox-LDL 组, D 为 TET2 shRNA 质粒 + 50 mg/L ox-LDL 组。a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 50 mg/L ox-LDL 组比较。

Figure 4. The results of Transwell experiment (× 20, n = 3)

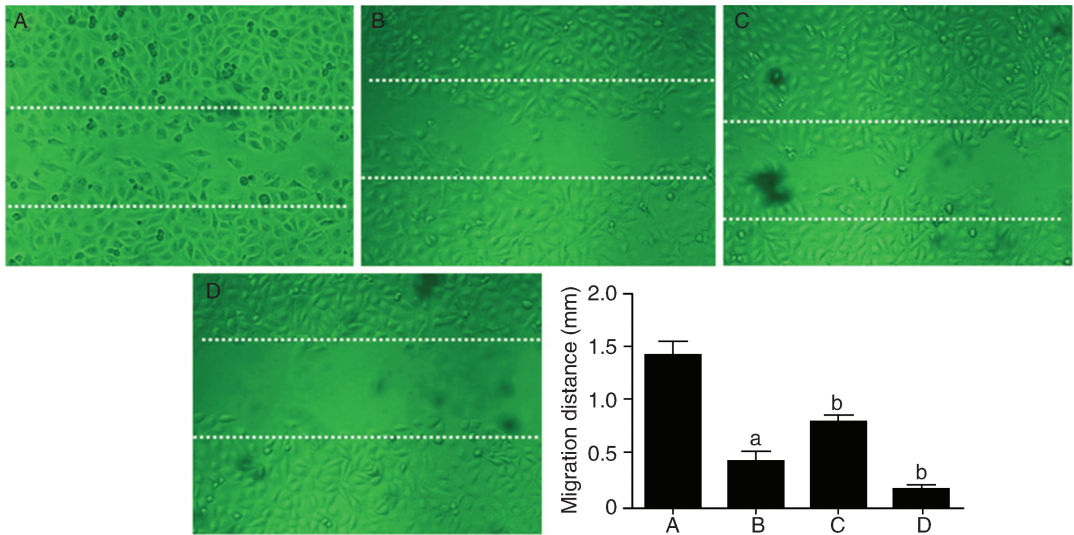


图 5. 划痕实验结果(× 4, n = 3) A 为对照组, B 为 50 mg/L ox-LDL 组, C 为 TET2 过表达质粒 + 50 mg/L ox-LDL 组, D 为 TET2 shRNA 质粒 + 50 mg/L ox-LDL 组。a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 50 mg/L ox-LDL 组比较。

Figure 5. The results of scratch experiment (× 4, n = 3)

2.4 TET2 对 HUVEC F-actin 的影响

研究表明,微丝对细胞形态的维持以及细胞的迁移起着重要的调节作用。在本实验中,我们观察 TET2 干预(TET2 过表达质粒和 TET2 shRNA 质粒)对 ox-LDL 处理的 HUVEC F-actin 的影响。免疫荧光结果表明,在 50 mg/L ox-LDL 处理的 HUVEC 周边存在明显的致密微丝束,形成致密周围带;TET2

过表达质粒预处理抑制 HUVEC 致密周围带的形成,而 TET2 shRNA 质粒预处理则进一步增强致密周围带的形成(图 6)。

2.5 TET2 对 ox-LDL 孵育的 HUVEC Rac1 表达的影响

Western blot 结果表明,ox-LDL 明显抑制 HUVEC 总 Rac1 (total Rac1, tRac1) 及磷酸化 Rac1

(phosphorylated Rac1, pRac1) 的表达。TET2 过表达质粒预处理明显上调 ox-LDL 孵育的 HUVEC tRac1 的表达及其磷酸化, 而 TET2 shRNA 质粒预处理则

进一步抑制 ox-LDL 孵育的 HUVEC Rac1 的表达及其磷酸化(图 7)。

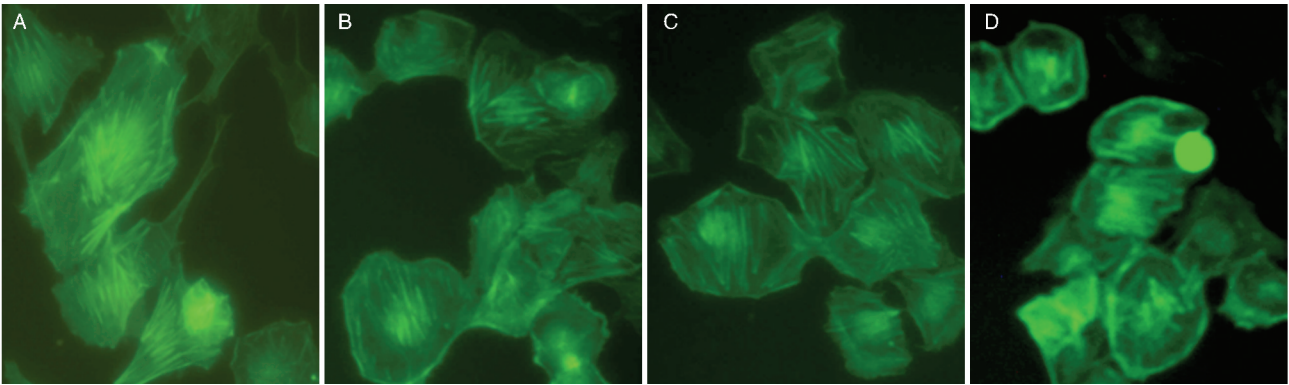


图 6. TET2 对 HUVEC F-actin 的影响 (×40) A 为对照组, B 为 50 mg/L ox-LDL 组, C 为 TET2 过表达质粒 + 50 mg/L ox-LDL 组, D 为 TET2 shRNA 质粒 + 50 mg/L ox-LDL 组。

Figure 6. Effects of TET2 on F-actin in HUVEC (×40)

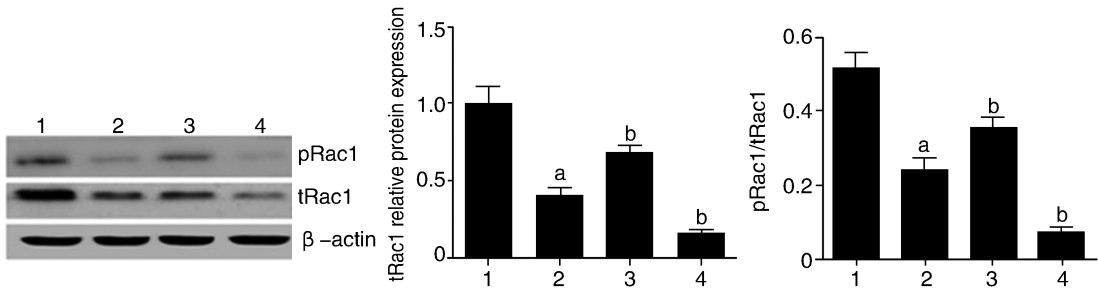


图 7. TET2 对 ox-LDL 孵育的 HUVEC Rac1 表达的影响 (n = 3) 1 为对照组, 2 为 50 mg/L ox-LDL 组, 3 为 TET2 过表达质粒 + 50 mg/L ox-LDL 组, 4 为 TET2 shRNA 质粒 + 50 mg/L ox-LDL 组。a 为 P < 0.05, 与对照组比较; b 为 P < 0.05, 与 50 mg/L ox-LDL 组比较。

Figure 7. Effects of TET2 on the expression of Rac1 in HUVEC incubated by ox-LDL (n = 3)

3 讨论

内皮细胞功能障碍是动脉粥样硬化形成、发展的始动环节。已有的研究表明 ox-LDL 是诱导血管内皮功能障碍的重要因素, 一方面可直接损伤内皮细胞, 引起内皮细胞凋亡及坏死增加, 导致血管内膜的通透性增加以及炎症因子、趋化因子、黏附分子表达增加, 促进单核细胞的黏附和跨内膜迁移; 另一方面, ox-LDL 通过抑制血管内皮细胞的增殖和迁移, 从而抑制受损血管的再内皮化, 导致受损血管修复障碍。

Chaudhuri 等^[5]研究表明, 血管内皮细胞瞬时受体电势通道 6 (transient receptor potential canonical 6, TRPC6) 以及 TRPC5 调控 Ca²⁺ 内流, 从而调节血管内皮细胞的增殖和迁移。Qiu 等^[6]研究表明, ox-LDL 通过上调分化和 DNA 结合抑制因子 1 的表达从而抑制血管内皮细胞的增殖与迁移。Chavakis

等^[7]研究认为 ox-LDL 通过抑制 Akt/eNOS 途径抑制血管内皮细胞的迁移。在本研究中, 我们发现, ox-LDL 下调 HUVEC TET2 的表达。TET2 为骨髓恶性肿瘤患者 4q24 上的肿瘤抑制基因。Liu 等^[8]研究表明, 在血管内膜增生过程中, TET2 敲除后抑制球囊损伤血管内膜修复过程, 提示 TET2 可促进血管内膜增生, 可能参与调节血管内膜修复、血管内皮细胞增殖与迁移等过程。我们的实验结果表明, TET2 过表达增强 ox-LDL 处理的 HUVEC 增殖与迁移, 而 TET2 低表达则进一步抑制 ox-LDL 处理的 HUVEC 增殖与迁移, 证实 TET2 能调节 HUVEC 的增殖与迁移。

研究表明, 在细胞的增殖与迁移过程中, 细胞骨架的变化特别是微丝和微管的动态变化在其中起着非常重要的作用^[9]。在本实验中, 我们发现 ox-LDL 促进 HUVEC 周边致密带的形成, TET2 高表达抑制 ox-LDL 诱导的致密周围带的形成, 细胞中央微

丝增加,而 TET2 低表达加剧 ox-LDL 诱导的致密周围带的形成,细胞中央微丝减少,提示 TET2 可能通过影响 F-actin 的重组装和分布,进而影响血管内皮细胞的增殖与迁移行为。

Rac1 在细胞运动与黏附、细胞的增殖分化与凋亡、肿瘤的侵袭与转移以及免疫调节等方面都发挥了重要的作用。Rac1 通过促进细胞骨架重构,调节细胞间的黏附以及加强细胞间的信号转导,从而促进细胞的增殖和迁移^[10-11]。Rac1 的激活刺激板状伪足或丝状伪足前端的肌动蛋白聚合,从而推动细胞的迁移^[12-13]。在本实验中,ox-LDL 下调 HUVEC Rac1 蛋白的表达,TET2 高表达上调 tRac1 及 pRac1 的水平,而 TET2 低表达则进一步下调 tRac1 及 pRac1 的水平,提示 TET2 可能通过调节血管内皮细胞 Rac1 的表达及其磷酸化修饰,从而调节肌动蛋白聚合的过程,进而调节血管内皮细胞的迁移行为。

综上所述,我们认为 ox-LDL 通过下调血管内皮细胞 TET2 的表达,影响 Rac1 的表达及磷酸化修饰,从而抑制血管内皮细胞的增殖和迁移。深入探讨 TET2 调节 Rac1 的表达及其磷酸化修饰的分子机制,将为阐明 ox-LDL 损伤血管内皮细胞功能以及有效防治动脉粥样硬化提供新的参考和实验依据。

[参考文献]

- [1] Gómez M, Vila J, Elosua R, et al. Relationship of lipid oxidation with subclinical atherosclerosis and 10-year coronary events in general population [J]. *Atherosclerosis*, 2014, 232(1): 134-140.
- [2] Frueh J, Maimari N, Homma T, et al. Systems biology of the functional and dysfunctional endothelium [J]. *Cardiovasc Res*, 2013, 99(2): 334-341.
- [3] 陈晓颖,叶华丹,洪青晓,等. DNA 甲基化修饰对血管疾病稳态失衡的影响 [J]. *遗传*, 2015, 37(3): 221-232.
- [4] 危当恒,贾小英,刘艳辉,等. 氧化型低密度脂蛋白对人脐静脉内皮细胞 TET2 表达及自噬的影响 [J]. *中国*

动脉硬化杂志, 2012, 20(11): 972-975.

- [5] Chaudhuri P, Colles SM, Bhat M, et al. Elucidation of a TRPC6-TRPC5 channel cascade that restricts endothelial cell movement [J]. *Mol Biol Cell*, 2008, 19(8): 3203-2211.
- [6] Qiu J, Wang G, Zheng Y, et al. Coordination of Id1 and p53 activation by oxidized LDL regulates endothelial cell proliferation and migration [J]. *Ann Biomed Eng*, 2011, 39(12): 2869-878.
- [7] Chavakis E, Dernbach E, Hermann C, et al. Oxidized LDL inhibits vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration by an inhibitory effect on the Akt/endothelial nitric oxide synthase pathway [J]. *Circulation*, 2001, 103(16): 2102-107.
- [8] Liu R, Jin Y, Tang WH, et al. Ten-eleven translocation-2 (TET2) is a master regulator of smooth muscle cell plasticity [J]. *Circulation*, 2013, 128(18): 2047-057.
- [9] Vitorino P, Yeung S, Crow A, et al. MAP4K4 regulates integrin-FERM binding to control endothelial cell motility [J]. *Nature*, 2015, 519(7544): 425-430.
- [10] Yoon S, Han E, Choi YC, et al. Inhibition of cell proliferation and migration by miR-509-3p that targets CDK2, Rac1, and PIK3C2A [J]. *Mol Cells*, 2014, 37(4): 314-321.
- [11] Hofbauer SW, Krenn PW, Ganghammer S, et al. Tiam1/Rac1 signals contribute to the proliferation and chemoresistance, but not motility, of chronic lymphocytic leukemia cells [J]. *Blood*, 2014, 123(14): 2181-188.
- [12] Braun A, Dang K, Buslig F, et al. Rac1 and Aurora A regulate MCAK to polarize microtubule growth in migrating endothelial cells [J]. *J Cell Biol*, 2014, 206(1): 97-112.
- [13] Pasapera AM, Plotnikov SV, Fischer RS, et al. Rac1-dependent phosphorylation and focal adhesion recruitment of myosin IIA regulates migration and mechanosensing [J]. *Curr Biol*, 2015, 25(2): 175-186.

(此文编辑 曾学清)