

干扰 Sestrin2 表达对 ox-LDL 诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡的影响

刘锋^{1,3}, 胡红娟³, 范文静²

(1.南华大学研究生院, 2.南华大学附属第二医院, 3.南华大学护理学院, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] Sestrin2; 氧化型低密度脂蛋白; 人脐静脉内皮细胞; 细胞凋亡

[摘要] **目的** 观察干扰 Sestrin2 表达对氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)凋亡的影响。**方法** 用 ox-LDL 处理 HUVEC 复制内皮细胞损伤模型。Western blot 检测不同浓度 ox-LDL 处理 HUVEC 不同时间 Sestrin2 的蛋白表达水平及转染 Sestrin2 siRNA 后 Sestrin2 的蛋白表达水平;流式细胞术检测干扰 Sestrin2 表达后对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 凋亡率的影响;Western blot 检测干扰 Sestrin2 表达后对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 中 Caspase-3 表达的影响及 ox-LDL 对 HUVEC 中 JNK 通路的影响。**结果** 不同浓度(20、50 和 100 mg/L)的 ox-LDL 处理 HUVEC 24 h 均能明显上调 Sestrin2 表达;50 mg/L ox-LDL 处理 HUVEC 不同时间(24 h 和 48 h)均能明显上调 Sestrin2 表达,24 h 达高峰;转染 Sestrin2 siRNA 能明显抑制 Sestrin2 的表达;ox-LDL 能明显诱导 HUVEC 凋亡,转染 Sestrin2 siRNA 能明显促进由 ox-LDL 诱导的 HUVEC 凋亡;ox-LDL 能明显诱导 p-JNK 和 p-c-Jun 的表达,且 SP600125 能明显抑制由 ox-LDL 诱导的 Sestrin2 表达。**结论** ox-LDL 通过 JNK/c-Jun 信号通路诱导 Sestrin2 表达,干扰 Sestrin2 表达能明显促进 ox-LDL 诱导的 HUVEC 凋亡。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Sestrin2 Inhibition on Human Umbilical Vein Endothelial Cells Apoptosis Induced by ox-LDL

LIU Feng^{1,3}, HU Hong-Juan³, and FAN Wen-Jing²

(1.School of Postgraduate, 2.The Second Affiliated Hospital, 3.School of Nursing, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Sestrin2; Oxidized Low Density Lipoprotein; Human Umbilical Vein Endothelial Cell; Cell Apoptosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of Sestrin2 inhibition on apoptosis of human umbilical vein endothelial cells induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL). **Methods** The cell injury model was induced by ox-LDL.

Western blot was used to detect protein expression of Sestrin2 in human umbilical vein endothelial cells treated with different concentrations of ox-LDL at different time. Protein expression of Sestrin2 was observed by Western blot after transfection with Sestrin2 siRNA. Human umbilical vein endothelial cells were transfected with Sestrin2 siRNA, then treated with ox-LDL, cell apoptosis was detected by flow cytometry, Caspase-3 expression and JNK pathway were observed by Western blot. **Results** Sestrin2 expression was significantly induced after treatment at different concentrations (20, 50 and 100 mg/L) of ox-LDL for 24 h. Moreover, human umbilical vein endothelial cells were incubated with 50 mg/L ox-LDL for various periods of time ranging from 0 to 48 h. The results showed a significant increase of Sestrin2 at protein levels in 24 h and 48 h, and it was the highest level in 24 h. Transfection with Sestrin2 siRNA significantly inhibited Sestrin2 expression. ox-LDL significantly induced cell apoptosis, transfection with Sestrin2 siRNA increased the effect. Expression of p-JNK and p-c-Jun was induced by ox-LDL, and this effect could be inhibited by SP600125. **Conclusions**

Ox-LDL induces Sestrin2 expression through JNK/c-Jun pathway, inhibition of Sestrin2 expression significantly increases human umbilical vein endothelial cells apoptosis induced by ox-LDL.

[收稿日期] 2015-07-24

[修回日期] 2016-01-15

[基金项目] 湖南省自然科学基金项目(2015JJ2118);湖南省教育厅重点项目(15A166);湖南省卫计委科研项目(20160233);衡阳市科技局项目(2015KJ16);南华大学研究生科技创新项目(2015XCX38)

[作者简介] 刘锋,博士研究生,讲师,主要研究方向为心血管疾病的防治。胡红娟,博士,讲师,主要研究方向为心血管疾病的防治。通讯作者范文静,博士研究生,主治医师,主要研究方向为心血管疾病的防治,E-mail for fanwj2008168@126.com。

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 被认为是心血管疾病发病的基础。血管内皮细胞参与了很多血管生理功能,如血液屏障功能、血管新生以及血管收缩与舒张等功能^[1-3]。血管内皮功能失调被认为是导致 As 发生的起始环节,并与多种心血管疾病密切相关。氧化应激被认为是导致内皮细胞功能失调的最重要的因素之一^[4]。

Sestrin 是一类相对保守的应激诱导型蛋白。在哺乳动物中, Sestrin 家族主要包括三个成员: Sestrin1、Sestrin2 和 Sestrin3,在氧化应激和 DNA 损伤时均能诱导其表达。Sestrin2 是 Sestrin 家族中的重要成员,它可被转录因子 p53 活化^[5]。Sestrin2 在肝脏和脂肪组织中有广泛表达,同时也表达于内皮细胞和巨噬细胞中^[6]。Sestrin2 能通过抑制细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 生成而发挥抗氧化作用。然而, Sestrin2 在内皮细胞氧化应激损伤时的作用及机制尚不清楚。本研究旨在探讨 Sestrin2 在氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 诱导的内皮细胞凋亡中的作用及可能机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料和试剂

人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) 由中南大学湘雅医学院细胞中心提供。1640 培养基和胰酶购自美国 Hyclone 公司;胎牛血清购自杭州四季青公司; LipofectamineTM2000 购自 Invitrogen 公司; Caspase-3、裂解 Caspase-3、磷酸化 JNK、JNK、p-c-Jun (Ser63) 和 c-Jun 抗体购自 Cell Signaling Technology 公司; Sestrin2 抗体、GAPDH 抗体、Sestrin2 siRNA 和 Control siRNA 购自 Sigma 公司; Annexin-V/PI 细胞凋亡检测试剂盒购自 BD 生物公司; Caspase-3 活性检测检测试剂盒购自 Promega 公司; 山羊抗兔/鼠二抗购自北京中山金桥公司。

1.2 ox-LDL 的氧化及鉴定

健康人血浆购自湖南省衡阳市中心血站。先用超速离心机分离血浆制备低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL), 用 CuSO_4 (10 $\mu\text{mol/L}$) 对分离得到的 LDL 进行氧化修饰成为 ox-LDL。采用琼脂糖凝胶电泳鉴定,分装于 4℃ 保存。

1.3 细胞培养和实验分组

将 HUVEC 用 DMEM 培养基 (10% 新生牛血清)

置于含 5% CO_2 的 37℃ 孵箱中培养。然后用不同浓度 (0、20、50 和 100 mg/L) 的 ox-LDL 处理 24 h; 另用 50 mg/L ox-LDL 处理 HUVEC 0、12、24 和 48 h。然后将 HUVEC 分为四组: NS 组 (转染 Control siRNA)、Sestrin2 siRNA 组 (转染 Sestrin2 siRNA)、NS+ox-LDL 组 (转染 Control siRNA 后进行 ox-LDL 处理) 和 Sestrin2 siRNA + ox-LDL 组 (转染 Sestrin2 siRNA 后进行 ox-LDL 处理)。

1.4 脂质体转染

依据 Invitrogen 公司的试剂盒说明书进行操作。用无血清和无抗生素的 DMEM 培养基溶解 Sestrin2 siRNA 或 Control siRNA, 将适量 LipofectamineTM2000 与 DMEM 培养基混匀, 然后将脂质体和 siRNA 充分混匀, 并于室温下放置 20 min。HUVEC 先用 DMEM 培养基 (无血清) 洗涤 2 次, 然后加入 LipofectamineTM2000 和 siRNA 的混合物, 在孵箱中孵育 8 h 后, 更换新鲜 DMEM 培养基 (含 10% 小牛血清)。

1.5 细胞凋亡率的检测

将处理后的 HUVEC 用 PBS 洗 2 次, 用胰酶进行消化, 并进行细胞计数。取 $5 \sim 10 \times 10^4$ 个细胞以 1000 r/min 离心 10 min, 用 400 μL 缓冲液 (Binding buffer) 重悬细胞团, 在细胞悬液中加入 5 μL 荧光染料 PI 和 10 μL 荧光染料 AnnexinV-FITC 并混匀, 然后避光室温放置 20 min, 立即采用流式细胞仪检测各组的细胞凋亡率。

1.6 Caspase-3 活性检测

处理后的各组细胞用 PBS 缓冲液洗 2 次, 然后用 PLB 裂解液 (Promega 公司) 进行裂解, 将裂解液离心取上清进行活性检测。BCA 蛋白检测试剂盒检测蛋白浓度, Caspase-3 活性为相对值 (相对各组成细胞的蛋白浓度)。

1.7 Western blot 检测蛋白表达

用细胞裂解液收集各组处理后的细胞总蛋白, 采用 BCA 法检测蛋白含量。每个泳道取 30 μg 总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 然后进行转膜, 用含 5% 的无脂奶粉常温下封闭 1 h, 加入不同浓度稀释的抗 Sestrin2、Caspase-3、Cleaved Caspase-3、p-JNK、JNK、p-c-Jun、c-Jun 和 GAPDH 一抗, 在 4℃ 下孵育过夜, 洗膜, 以 1:5000 稀释的二抗 (HRP 标记) 在室温下孵育 1 h, 洗膜, 加入化学发光试剂显色, 胶片进行定影和显影, 胶片扫描。

1.8 统计学方法

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ox-LDL 处理对 Sestrin2 表达的影响

不同浓度(20、50 和 100 mg/L)的 ox-LDL 处理

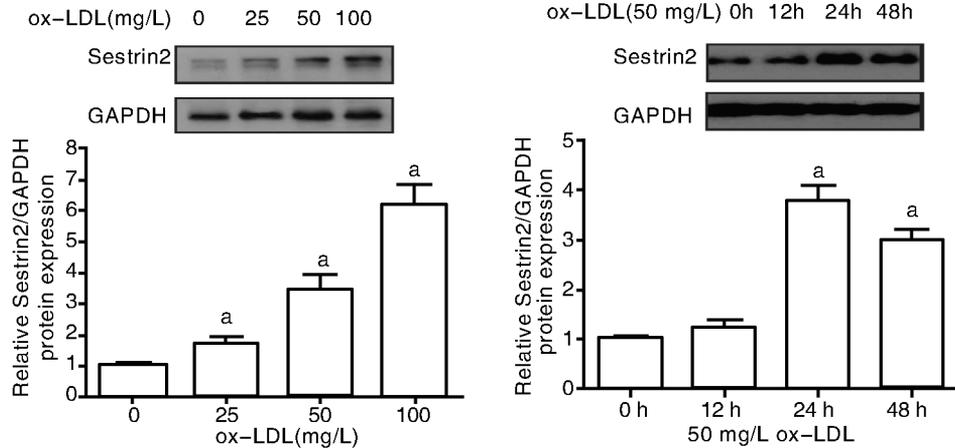


图 1. ox-LDL 处理对 Sestrin2 表达的影响($n=4$) a 为 $P<0.05$,与空白对照比较。

Figure 1. Effect of ox-LDL on Sestrin2 expression($n=4$)

2.2 转染 Sestrin2 siRNA 对 Sestrin2 表达的影响

无 ox-LDL 处理时,转染 Sestrin2 siRNA 能明显抑制 Sestrin2 的表达;ox-LDL 处理后,转染 Sestrin2 siRNA 同样能明显抑制 Sestrin2 的表达(图 2)。

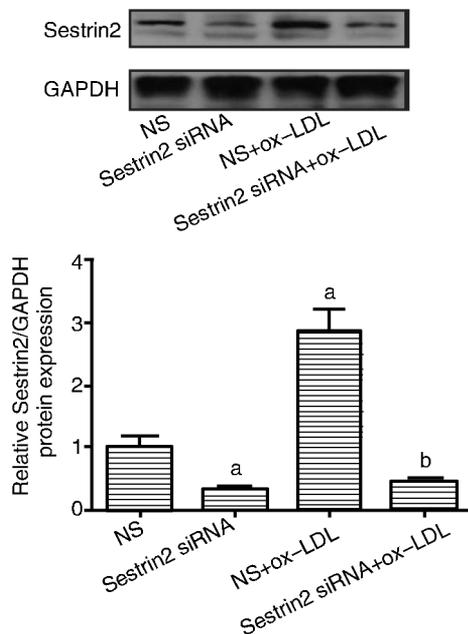


图 2. 转染 Sestrin2 siRNA 对 Sestrin2 表达的影响($n=4$)

a 为 $P<0.05$,与 NS 组比较;b 为 $P<0.05$,与 NS+ox-LDL 组比较。

Figure 2. Effect of Sestrin2 siRNA transfection on Sestrin2 expression($n=4$)

HUVEC 24 h 均能明显上调 Sestrin2 表达;50 mg/L ox-LDL 处理 HUVEC 不同时间(0、12、24 和 48 h),结果发现 50 mg/L ox-LDL 处理 24 h 和 48 h 均能明显上调 Sestrin2 表达,24 h 达高峰(图 1)。

2.3 转染 Sestrin2 siRNA 对 ox-LDL 诱导细胞凋亡的影响

ox-LDL 能明显诱导 HUVEC 凋亡,转染 Sestrin2 siRNA 能明显促进 ox-LDL 诱导的 HUVEC 凋亡。ox-LDL 能明显上调 HUVEC 中 Caspase-3 的表达和活性,转染 Sestrin2 siRNA 能明显促进 ox-LDL 诱导的 HUVEC 中 Caspase-3 的表达和活性的上调(图 3)。

2.4 JNK/c-Jun 介导 ox-LDL 诱导的 Sestrin2 上调

已有研究表明不同的应激均可以激活 JNK 通路。激活的 JNK 通路参与了细胞凋亡以及血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 诱导的 Sestrin2 表达^[7-9]。为探讨 JNK/c-Jun 是否介导 ox-LDL 诱导的 Sestrin2 表达,我们检测了 HUVEC 中 JNK 和 c-Jun 表达。结果发现 ox-LDL 能显著诱导磷酸化 c-Jun 和磷酸化 JNK 表达。随后将 JNK 抑制剂 SP600125 预处理 HUVEC,结果发现 ox-LDL 诱导的 Sestrin2 表达上调能被 SP600125 阻断(图 4)。提示 ox-LDL 通过 JNK/c-Jun 信号通路诱导 Sestrin2 表达,干扰 Sestrin2 表达能明显促进 ox-LDL 诱导的 HUVEC 凋亡。

3 讨论

Sestrin2 是 Sestrin 家族 PA26 相关蛋白成员,与

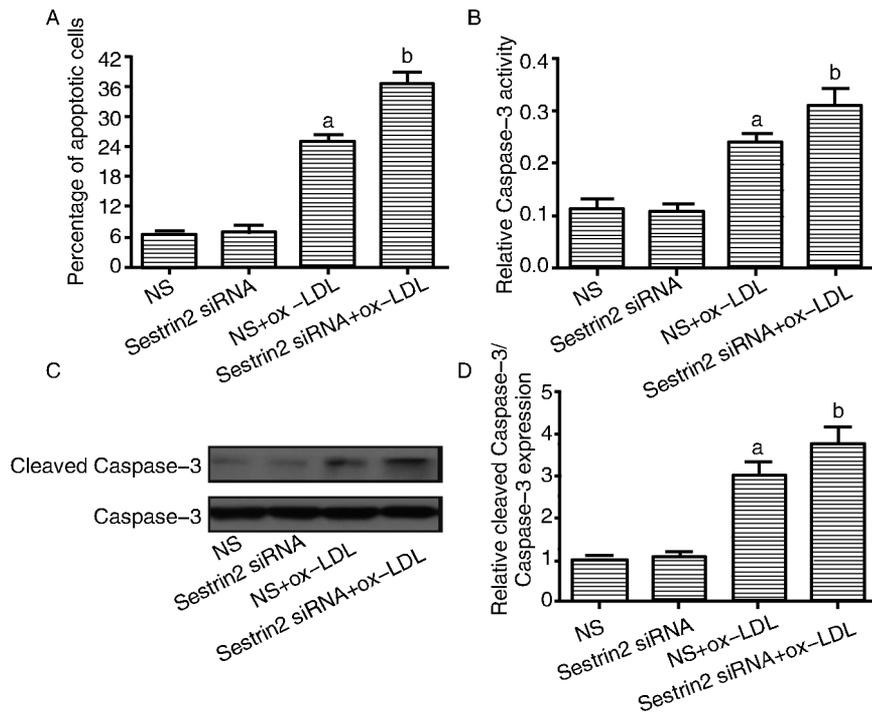


图 3. 转染 Sestrin2 siRNA 对 ox-LDL 诱导细胞凋亡的影响 (n=4) A 为细胞凋亡率, B 为 Caspase-3 活性, C 为 Caspase-3 蛋白表达, D 为 Caspase-3 蛋白表达的灰度扫描。a 为 P<0.05, 与 NS 组比较; b 为 P<0.05, 与 NS+ox-LDL 组比较。

Figure 3. Effect of Sestrin2 siRNA transfection on cell apoptosis induced by ox-LDL (n=4)

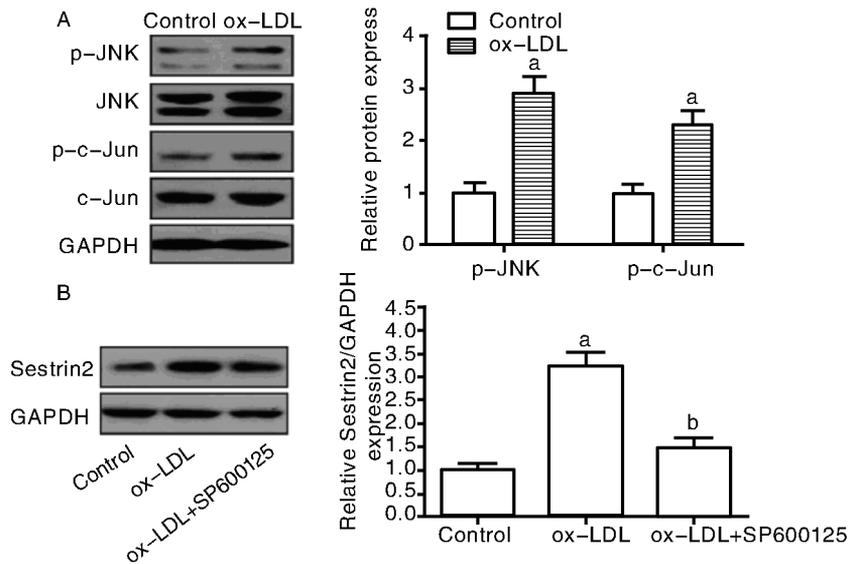


图 4. JNK/c-Jun 信号通路介导 ox-LDL 诱导的 Sestrin2 上调 (n=4) A 为 ox-LDL 对磷酸化 JNK 和磷酸化 c-Jun 表达的影响, B 为 JNK/c-Jun 信号通路在 ox-LDL 诱导的 Sestrin2 上调中的作用。a 为 P<0.05, 与 Control 组比较; b 为 P<0.05, 与 ox-LDL 组比较。

Figure 4. JNK/c-Jun mediated upregulation of Sestrin2 expression induced by ox-LDL (n=4)

细胞生长和存活相关^[10]。虽然 Sestrin 家族不是氧化还原酶类,但是它能够通过促进其它氧化还原酶的活性而发挥抗氧化作用,如可促进硫过氧化物还原因子(sulfiredoxin, Srx)的表达^[11]。而且, Sestrin 介导的 AMPK 活化和 TORC1 抑制可增加线粒体生物呼吸氧化效率从而降低 ROS 生成^[12]。Sestrin2 参

与细胞内的各种氧化应激,与维持氧化还原稳态有关。然而其机制尚不清楚。虽然正常生理条件下,内皮细胞中有 Sestrin2 表达,然而内皮功能失调时 Sestrin2 表达改变模式不清楚。本研究中,在 HUVEC 中有 Sestrin2 表达, ox-LDL 可上调 Sestrin2 表达, Sestrin2 表达上调可明显抑制内皮细胞凋亡。

这些结果与以往研究相吻合^[9,13]。用 siRNA 可明显沉默 Sestrin2 表达,沉默 Sestrin2 表达后可促进 ox-LDL 诱导的细胞凋亡。

在哺乳动物中 JNK 主要有 JNK1、JNK2 和 JNK3 共 3 个异构体,JNK1 和 JNK2 几乎在所有细胞均有表达,而 JNK3 主要在脑、心脏和睾丸细胞表达。肿瘤坏死因子 α 、转化生长因子 β 、ROS、病理和环境应激、毒素等均可活化 JNK 通路。c-Jun 的 N-末端激酶属于 MAPK 的家族成员之一,在多种组织细胞的损伤和应激中发挥重要的调节作用。研究表明,JNK 通路活化在心血管以及代谢性疾病中发挥重要作用。Yi 等^[9]研究发现 Ang II 可通过活化 JNK 通路诱导 Sestrin2 表达,过表达 c-Jun 可增加 Sestrin2 的启动子活性,这些表明 Ang II 诱导 Sestrin2 表达可能在转录水平。 H_2O_2 是细胞内一种重要的信号分子,在体内存在严格的调节。研究表明 Sestrin2 可增加过氧化物酶(peroxiredoxin, PRX) 的活性,PRX 可通过清除细胞内的 H_2O_2 从而维持细胞内的氧化还原稳态^[14]。同时,Sestrin2 也可通过其它一些抗氧化机制发挥抗氧化作用。Sestrin2 可活化 AMPK 通路抑制 mTORC1 和 mTORC1-S6K 活性。近来有研究发现,抑制 Sestrin2 可加速肥胖诱导的 mTORC1-S6K 活化、胰岛素抵抗、葡萄糖耐量减低以及肝脂变;同时,在无营养过剩以及肥胖的情况下,抑制 Sestrin2 和 Sestrin3 表达可促进肝 mTORC1-S6K 活化和胰岛素抵抗。这些结果表明,Sestrin2 可能在调节糖代谢和脂代谢中发挥重要作用^[15]。更为重要的是 Sestrin2 依赖的 AMPK 活化可通过阻断 NADPH 氧化酶 4 依赖的 ROS 生成减轻高糖所致的肾小球系膜细胞的纤维合成^[6]。本研究也发现 ox-LDL 刺激时可激活 JNK/C-Jun 通路,且 ox-LDL 诱导的 Sestrin2 表达上调能被 JNK 抑制剂 SP600125 阻断。这些结果提示,ox-LDL 诱导的 Sestrin2 表达上调由 JNK/c-Jun 信号通路调节。

总之,HUVEC 在 ox-LDL 刺激时,细胞凋亡和 Sestrin2 表达均明显增加,且 JNK/c-Jun 信号通路参与其中。但是否还有其它信号通路参与以及具体的机制还有待进一步阐明。

[参考文献]

- [1] Lee R, Channon KM, Antoniades C. Therapeutic strategies targeting endothelial function in humans: clinical implications [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2012, 10 (1):77-93.
- [2] 李鑫,李大勇,马贤德,等. 血管内皮细胞损伤和血清内

源性代谢物的变化与动脉硬化闭塞症发病的关系[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22 (6): 541-546.

- [3] 谭书伟,罗家明,余巨明. 多发性硬化与缺血性脑血管病关系的研究进展[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2014, 41 (2): 145-148.
- [4] Chen AF, Chen DD, Daiber A, et al. Free radical biology of the cardiovascular system[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2012, 123 (2): 73-91.
- [5] Budanov AV, Karin M. p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling[J]. *Cell*, 2008, 134 (3): 451-460.
- [6] Eid AA, Lee DY, Roman LJ, et al. Sestrin 2 and AMPK connect hyperglycemia to Nox4-dependent endothelial nitric oxide synthase uncoupling and matrix protein expression [J]. *Mol Cell Biol*, 2013, 33 (17): 3 439-460.
- [7] Aminuddin M, Ahmed S, Sheraz MA, et al. Fluorescent labeling of human albumin using the new aromatic dialdehyde labels and the study of innerfilter effect[J]. *J Pharm Bioallied Sci*, 2010, 2 (4): 369-371.
- [8] Hu B, Jarzynka MJ, Guo P, et al. Angiotensin 2 induces glioma cell invasion by stimulating matrix metalloprotease 2 expression through the alphavbeta1 integrin and focal adhesion kinase signaling pathway[J]. *Cancer Res*, 2006, 66 (2): 775-783.
- [9] Yi L, Li F, Yong Y, et al. Upregulation of sestrin-2 expression protects against endothelial toxicity of angiotensin II [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2014, 30 (3): 147-156.
- [10] Lee JH, Bodmer R, Bier E, et al. Sestrins at the crossroad between stress and aging[J]. *Aging (Albany NY)*, 2010, 2 (6): 369-374.
- [11] Budanov AV, Sablina AA, Feinstein E, et al. Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD[J]. *Science*, 2004, 304 (5670): 596-600.
- [12] Zid BM, Rogers AN, Katewa SD, et al. 4E-BP extends lifespan upon dietary restriction by enhancing mitochondrial activity in *Drosophila* [J]. *Cell*, 2009, 139 (1): 149-160.
- [13] Park HW, Park H, Ro SH, et al. Hepatoprotective role of Sestrin2 against chronic ER stress [J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 4 233.
- [14] Shin BY, Jin SH, Cho IJ, et al. Nrf2-ARE pathway regulates induction of Sestrin-2 expression [J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 53 (4): 834-841.
- [15] Lee JH, Budanov AV, Talukdar S, et al. Maintenance of metabolic homeostasis by Sestrin2 and Sestrin3 [J]. *Cell Metab*, 2012, 16 (3): 311-321.

(此文编辑 文玉珊)