

高糖高脂微环境中 NFKB1 基因缺失突变调控线粒体分裂增加内皮细胞凋亡

金思妤^{1,2}, 罗俊一^{1,2}, 王钧^{1,2}, 刘芬², 李晓梅^{1,2}, 杨毅宁^{1,2}

(新疆医科大学第一附属医院 1. 心脏中心, 2. 心血管重点实验室, 新疆乌鲁木齐市 830000)

[关键词] B 细胞 κ 轻链基因增强子核因子 1; 高糖高脂; 人脐静脉内皮细胞; 线粒体融合与分裂

[摘要] **目的** 探讨 B 细胞 κ 轻链基因增强子核因子 1 (NFKB1) 基因启动子区-94 位点 ATTG 插入/缺失突变对高糖高脂微环境诱导人脐静脉内皮细胞(HUVEC)损伤的影响及其潜在机制。**方法** 建立 NFKB1 不同基因型原代 HUVEC 细胞的高糖高脂模型, 采用 Annexin-V-FLUOS 染色检测细胞凋亡, Mito Tracker 染色后通过激光共聚焦显微镜观察线粒体形态, Western blot 检测核因子 κ B (NF- κ B) 信号通路中 p50、p65 蛋白, 线粒体分裂相关蛋白 Drp1、Drp1-s637、Drp1-s616 和 Fis1, 线粒体融合相关蛋白 Mfn1、Mfn2 和 Opa1, 以及凋亡相关蛋白细胞色素 C (CytC)。**结果** 高糖高脂诱导原代 HUVEC 凋亡显著增加, 与 II 型细胞相比, DD 型细胞凋亡指数更高; 线粒体过度分裂成碎片状; DD 型细胞中 NF- κ B 通路中关键蛋白 p50 表达明显降低, 线粒体融合相关蛋白 Mfn2 表达降低, 线粒体分裂动力相关蛋白 Drp1-s616 磷酸化增加, CytC 表达增加。**结论** NFKB1 基因缺失突变可能是 DD 型 HUVEC 更容易受到高糖高脂微环境损伤的重要原因, 其潜在的机制可能与线粒体过度分裂相关。

[中图分类号] R392-33; R541.4

[文献标识码] A

NFKB1 gene deletion mutation regulates mitochondria fission and increases endothelial cell apoptosis in high glucose and high fat microenvironment

JIN Siyu^{1,2}, LUO Junyi^{1,2}, WANG Jun^{1,2}, LIU Fen², LI Xiaomei^{1,2}, YANG Yining^{1,2}

(1. Department of Cardiology, 2. Xinjiang Key Laboratory of Cardiovascular Research, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830000, China)

[KEY WORDS] nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cell 1; high glucose and high fat; human umbilical vein endothelial cell; mitochondrial fusion and fission

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of-94 ATTG insertion/deletion mutation at the promoter region of nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cell 1 (NFKB1) gene on injury of human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) induced by high glucose and high fat microenvironment and its potential mechanism. **Methods** High glucose and high fat model of primary HUVEC cells with different genotypes of NFKB1 was established. Cellular apoptosis was detected by Annexin-V-FLUOS staining. Morphology of mitochondria was observed by laser confocal microscopy after Mito Tracker staining. Western blot was used to detect p50 and p65 proteins in nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway, mitochondrial fission related proteins Drp1, Drp1-s637, Drp1-s616 and Fis1, mitochondrial fusion related proteins Mfn1, Mfn2 and Opa1, and apoptosis related protein cytochrome C (CytC). **Results** The apoptotic rate of primary HUVEC induced by high glucose and high fat was higher than control group, and the apoptotic rate of mutant type cells (DD genotype) was more than that of wild type cells (II genotype). Mitochondria was over-fission into fragments. The expression of p50, a key protein in NF- κ B pathway, was significantly decreased in DD genotype cells. Expression of mitochondrial fusion related protein Mfn2 was decreased. The phosphorylation of mitochondrial fission dynamic related protein Drp1-s616 was increased, and the expression of CytC was increased. **Conclusion** NFKB1 gene deletion mutation may be an important reason for the vulnerable damage of DD genotype HUVEC during high glucose and high fat micro-

[收稿日期] 2019-10-17

[修回日期] 2019-12-21

[基金项目] 国家自然科学基金(U150322, 81800320, 81770363)

[作者简介] 金思妤, 硕士, 研究方向为冠心病基础, E-mail 为 whisper118@sina.com。通信作者杨毅宁, 博士, 博士研究生导师, 主任医师, 教授, 研究方向为冠心病、先天性心脏病及瓣膜病临床诊治及相关基础研究, E-mail 为 yangyn5126@163.com。

environment, and its potential mechanism may be related to mitochondrial over-fission.

冠状动脉粥样硬化性心脏病 (coronary artery disease, CAD) 是危害人类健康造成死亡的常见的疾病之一^[1]。动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是 CAD 发生的重要病理基础^[2]。糖脂代谢紊乱使内皮细胞处于应激状态, 高糖高脂微环境引起的内皮细胞功能障碍、凋亡甚至坏死是 As 发生的始动环节^[3]。核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 是调控糖脂代谢的重要转录因子, 在糖脂代谢稳态、能量平衡、炎症及凋亡中发挥重要的调控作用^[4]。B 细胞 κ 轻链基因增强子核因子 1 (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cell 1, NFKB1) 基因位于人类 4q24 染色体上, 编码 NF- κ B 信号通路中重要亚基 p50, 本课题组前期研究提示 NFKB1 基因启动子区 -94ATTG 缺失突变 (DD 基因型) 是 CAD 发病的重要遗传易感因素, 但机制尚不明确^[5]。本实验使用不同 NFKB1 基因型原代人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC), 通过建立高糖高脂损伤模型, 探讨高糖高脂微环境与 NFKB1 基因启动子区 -94ATTG 位点插入/缺失突变对 HUVEC 损伤的作用, 从遗传学角度探索 CAD 发生的可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

NFKB1 不同基因型 HUVEC (II 型、DD 型) 来源于新生儿脐带, 由新疆医科大学第一附属医院妇产科产妇自愿捐赠, 并签署知情同意书。内皮细胞分离培养方法参照课题组前期研究^[6]。过程简单描述如下: 收集脐带后用预冷的 D-Hanks 溶液将新生儿脐带冲洗干净; 用止血钳夹住一端, 向脐静脉中加入适量 0.1% II 型胶原蛋白酶后再将另一端夹住, 放入 37 °C 细胞培养箱 3 ~ 5 min; 取出脐带收集脐静脉中所有液体, 并用预热的 D-Hanks 溶液 2 mL 冲洗 2 遍, 将收集的所有液体置于 15 mL 离心管中, 1 000 r/min 离心 8 min, 弃上清, 用内皮细胞培养基 (endothelial cell medium, ECM) 重悬细胞后将所有液体加入细胞培养皿中进行培养。

实验中用到的试剂如下: ECM (Science Cell); II 型胶原蛋白酶、软质酸钠、牛血清白蛋白 (Sigma); D-Hanks (博士德生物公司); BCA 蛋白定量分析试剂盒 (Pierce); 兔抗人 Drp1 抗体、兔抗人 Drp1-s616 抗体、兔抗人细胞色素 C (cytochrome C, CytC) 抗体、兔

抗人 β -actin 抗体、兔抗人 p65 抗体、兔抗人 p105/p50 抗体 (Cell Signaling Technology); 兔抗人 Drp1-s637 抗体、鼠抗人 Mfn2 抗体、兔抗人 Mfn1 抗体、兔抗人 Fis1 抗体 (Abcam); 鼠抗人 Opa1 抗体 (BD); 辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 山羊抗兔二抗或 HRP 山羊抗鼠二抗 (北京中杉金桥); Mito Tracker Green (Invitrogen); RIPA 裂解液、苯甲基磺酰氟 (碧云天)。Annexin-V-FLUOS 凋亡试剂盒 (Roche)。

1.2 原代 HUVEC 高糖高脂模型建立和实验分组

实验中使用的细胞均在 8 代以内, 正常传代培养期间采用 ECM 培养基培养, 建立高糖高脂诱导的细胞损伤模型时采用 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖 (25 mmol/L) 培养基。具体方法如下: 向含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖 (25 mmol/L) 培养基中加入适量的棕榈酸 (palmitic acid, PA) 使其终浓度为 250 μ mol/L, 进而对不同 NFKB1 基因型细胞培养 3 h, 建立高糖高脂内皮细胞损伤模型。实验分为 4 组: 野生型 (II 型) 细胞组、突变型 (DD 型) 细胞组、II 型细胞+高糖高脂组、DD 型细胞+高糖高脂组。

1.3 Annexin-V-FLUOS 检测不同基因型 HUVEC 凋亡

凋亡测定试剂配制: 孵育缓冲液 1 mL 中分别加入 Annexin-V-FLUOS 20 μ L、碘化丙啶 20 μ L。待细胞生长至 90% 融合时, 采用高糖高脂培养基培养 3 h 后, 收集各组细胞, 200 g 离心力离心 5 min, 弃上清, 用预冷的 PBS 重悬细胞, 200 g 离心力离心 5 min, 弃上清, 重复 1 遍。将配置好的凋亡检测试剂 100 μ L 加入各组细胞中, 室温孵育 15 min 后采用流式细胞仪分析各组细胞凋亡指数。

1.4 Mito Tracker 染色检测线粒体形态

采用共聚焦小皿接种细胞, 待细胞生长至 90% 融合时, 采用高糖高脂培养基培养 3 h, 弃去培养基, 加入含 200 nmol/L Mito-Tracker (Invitrogen, Mito Tracker[®] Green FM, M7514) 的培养基, 37 °C 避光孵育 30 min, 孵育结束后用 PBS 洗 3 遍, 加入适量 PBS, 采用共聚焦显微镜 (Leica TCS SP8) 观察各组细胞线粒体形态, 拍照并保存。线粒体形态分析采用 FIJI-ImageJ 软件的自定义宏程序 MiNA, 将原始 Mito Tracker 染色后激光共聚焦线粒体图像转换为二进制图像, 程序自动计算线粒体各项参数^[7]。

1.5 Western blot 法检测相关蛋白

待细胞生长至 90% 融合时, 采用高糖高脂培养

基培养 3 h 后,收集各组细胞并提取蛋白,BCA 法进行蛋白定量。采用 Western blot 法检测线粒体分裂蛋白 Drp1、Drp1-s637、Drp1-s616 和 Fis1 水平,线粒体融合蛋白 Mfn1、Mfn2 和 Opa1 水平,NF- κ B 信号转导通路中 p65、p50 蛋白水平及凋亡相关蛋白 CytC 水平。每泳道上样体系包含样本蛋白 40 μ g。上样后电泳 90 min,湿转至二氟化树脂膜,配制封闭液(5% 脱脂奶粉),室温封闭 1 h;分别加入兔抗人 p105/p50 抗体(1:500)、兔抗人 p65 抗体(1:500)、兔抗人 β -actin 抗体(1:500)、兔抗人 Drp1 抗体(1:500)、兔抗人 Drp1-s616 抗体(1:500)、兔抗人 Drp1-s637 抗体(1:500)、鼠抗人 Mfn1 抗体(1:500)、兔抗人 Mfn2 抗体(1:500)、兔抗人 Fis1 抗体(1:500)、鼠抗人 Opa1(1:500) 抗体、兔抗人 CytC 抗体(1:500),4 $^{\circ}$ C 过夜;PBST 洗膜 3 次,相应加入 HRP 山羊抗兔二抗或 HRP 山羊抗鼠二抗(1:5000),室温孵育 1 h;PBST 洗膜 3 次,加入发光液

显色后,照相保存。采用 ImageJ 计算目标蛋白/内参的吸光度值进行分析。

1.6 统计学方法

统计学分析采用 Graph Pad Prism 7。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,计数资料采用例表示,各组间数据比较采用 Two-way ANOVA 检验分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高糖高脂诱导 DD 型细胞凋亡指数显著高于 II 型细胞

流式细胞仪分析结果显示:高糖高脂微环境均可诱导 II 型细胞和 DD 型细胞凋亡($P < 0.05$),DD 型细胞(14.7%)的早期凋亡率显著高于 II 型细胞(9.6%),差异有统计学意义($P < 0.01$;图 1)。

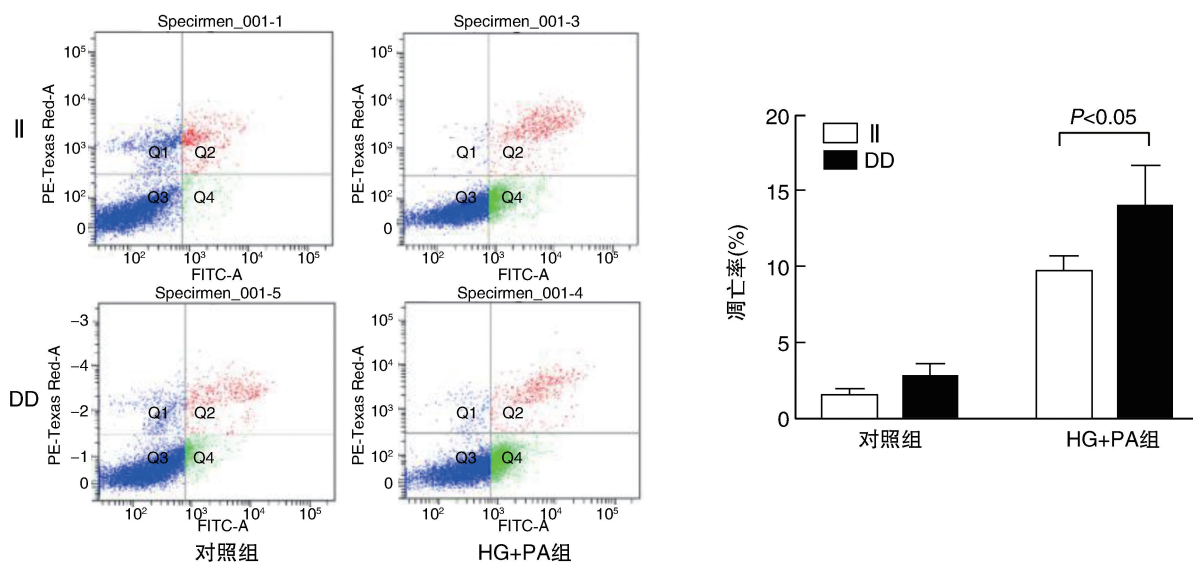


图 1. 高糖高脂诱导不同 NFKB1 基因型细胞凋亡

Figure 1. High glucose and high palmitic acid induced apoptosis in different NFKB1 genotypes

2.2 高糖高脂诱导 DD 型细胞线粒体过度分裂成碎片状

Mito Tracker 线粒体探针染色结果显示:高糖高脂诱导原代 HUVEC 点状及棒状线粒体数量显著增加,与 II 型细胞相比,DD 型细胞的线粒体总面积增加 0.28 μm^2 ($P < 0.05$),棒状线粒体长度增加 0.006 μm ($P < 0.01$)、中位数增加 0.004 μm ($P < 0.01$)。此外,高糖高脂诱导 DD 型细胞中网状线粒体分支个数的平均数较 II 型细胞增加 2.2 个 ($P < 0.05$)、中位数增加 0.24 个 ($P < 0.05$;图 2)。

2.3 高糖高脂对不同 NFKB1 基因型细胞中 NF- κ B 信号通路、线粒体融合与分裂及凋亡相关蛋白表达的影响

Western blot 实验结果显示:DD 型细胞 p50 蛋白表达水平平均低于 II 型细胞 ($P < 0.05$)。经高糖高脂诱导后,DD 型细胞 CytC 蛋白、线粒体分裂蛋白 Drp1-s616 磷酸化表达显著高于 II 型细胞,而线粒体融合蛋白 Mfn2 表达低于 II 型细胞 ($P < 0.05$;图 3、图 4)。

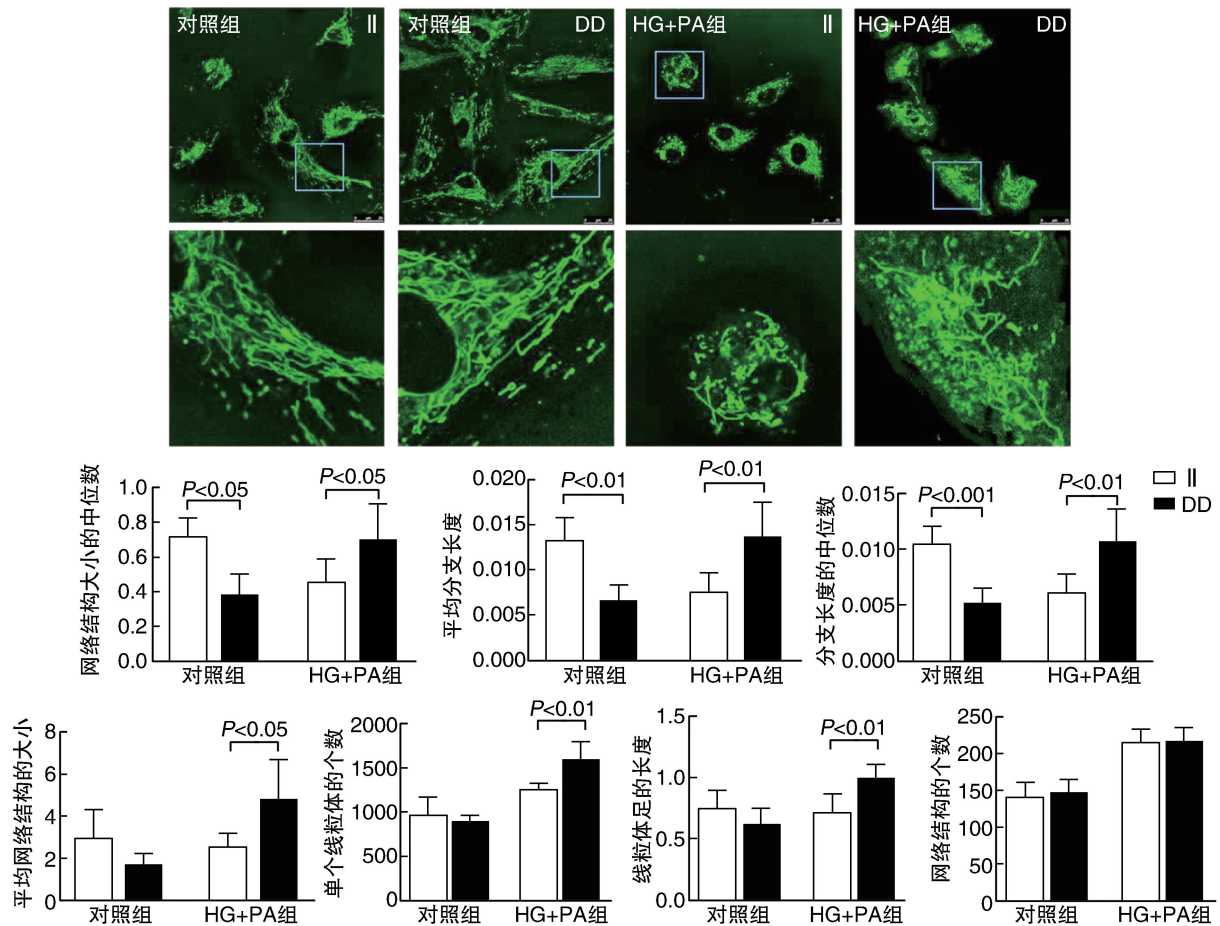


图 2. 高糖高脂诱导不同 NFKB1 基因型细胞线粒体的形态变化 显微镜图的放大倍数, 第 1 排为 630 倍, 第 2 排为第 1 排方框部分的放大图。

Figure 2. High glucose and high palmitic acid induced morphological changes of mitochondria in different NFKB1 genotypes

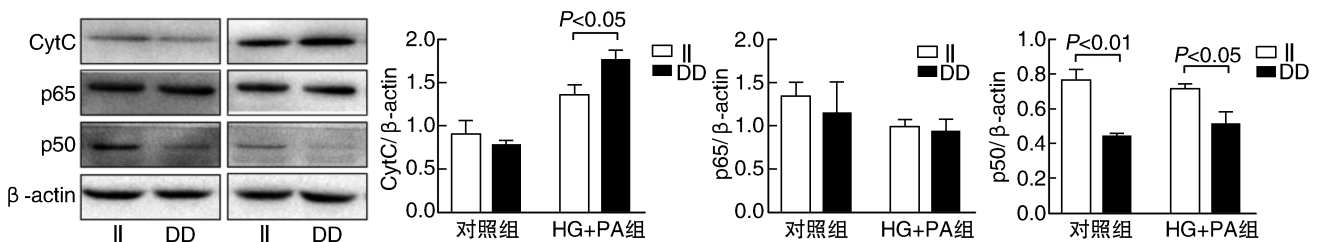


图 3. 高糖高脂对 NF-κB 信号通路关键分子及 CytC 蛋白的影响

Figure 3. Effects of high glucose and high palmitic acid on key molecules of NF-κB signaling pathway and CytC

3 讨论

本研究通过体外模拟高糖高脂微环境, 建立高糖高脂血管内皮细胞损伤模型, 发现高糖高脂诱导 NFKB1 基因突变 DD 型细胞凋亡指数显著高于 II 型细胞, p50 蛋白表达较 II 型细胞明显降低; DD 型细胞线粒体分裂蛋白 Drp1-s616 磷酸化水平显著增加, 线粒体融合蛋白 Mfn2 表达水平显著降低, 线粒体过度分裂成碎片状, CytC 蛋白表达增加。

高糖高脂诱导 HUVEC 线粒体过度分裂、功能

障碍和细胞凋亡, 显著增加内皮细胞的损伤与凋亡^[8-10]。Jheng 等^[11]报道 200 μmol/L 软脂酸可显著上调小鼠成肌细胞 Drp1 和 Fis1 表达, 导致线粒体碎片化, 造成细胞功能障碍, 增加细胞凋亡。我们研究发现, 经高糖高脂诱导 3 h 后, 原代 HUVEC 凋亡指数显著高于正常培养的细胞, 表明高糖高脂诱导的人血管内皮细胞模型建立成功。其次, 我们还发现, 高糖高脂诱导后, DD 型细胞早期凋亡率约为 II 型细胞的 2 倍, 表明 NFKB1 基因突变的 DD 型细胞更容易受到高糖高脂导致的损伤。我们还发现

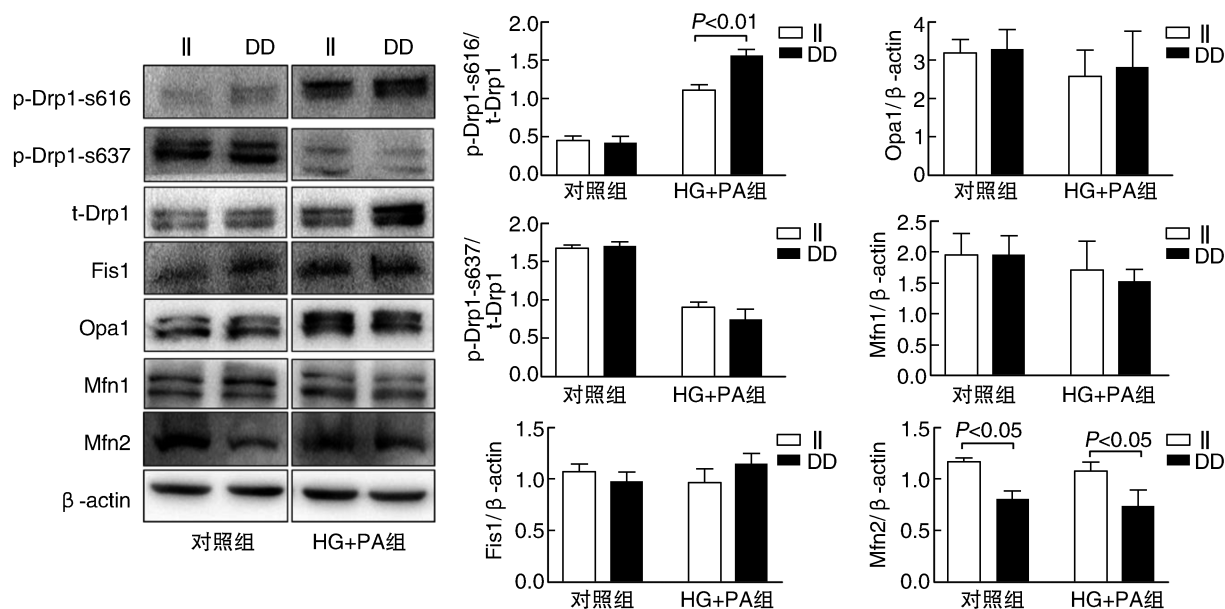


图 4. 高糖高脂对线粒体动力学相关蛋白的影响

Figure 4. Effects of high glucose and high palmitic acid on the expression of mitochondria dynamic related proteins

DD 型细胞中 p50 表达显著低于 II 型细胞。p50 是 NF- κ B 信号通路中重要的亚基,由 NFKB1 基因编码,是机体重要的转录因子,既往研究表明其通常作为 NF- κ B 信号通路中抗炎的亚基,抑制下游促炎性因子的转录。我们前期研究中发现,NFKB1 基因突变与冠心病的易感性存在显著的相关性,并且在氧化应激状态下 DD 型细胞凋亡也更加明显^[12]。由此表明 NFKB1 基因启动子区-94ATTG 插入缺失突变可能是有功能的突变,是 DD 型细胞更容易受到损伤的重要原因。

动物研究表明,长期高糖高脂能够导致小鼠血管内皮细胞线粒体结构和功能紊乱、细胞功能障碍,是启动 As 发生的重要原因之一^[13]。高糖可诱导大鼠主动脉血管内皮细胞线粒体分裂增加,活性氧(reactive oxygen species, ROS)生成增多,膜电位 $\Delta\Psi_m$ 降低,氧耗量减少,导致线粒体功能障碍和细胞凋亡增加^[14]。Shi 等^[15]及 Yu 等^[16]分别发现高糖能够诱导 Drp1 过表达,导致线粒体分裂和 ROS 产生增加,造成线粒体功能障碍。既往研究表明线粒体过度分裂可能是线粒体功能障碍的表现形式,其还与线粒体膜电位降低有关,通过观察形态学变化可评估线粒体的功能^[17-18]。我们的研究表明高糖高脂诱导原代 HUVEC 线粒体过度分裂成碎片状,并且 DD 型细胞碎片化程度显著高于 II 型细胞,DD 型细胞线粒体分裂相关 Drp1 蛋白 s616 磷酸化水平显著增加。线粒体分裂蛋白 Drp1 蛋白 s616 磷酸化使其具有活性,促进线粒体分裂,而 s637 位点

磷酸化使 Drp1 蛋白活性降低从而抑制其介导的线粒体分裂^[19-20]。我们还发现经高糖高脂诱导后 DD 型细胞中 CytoC 水平显著高于 II 型细胞。CytoC 是一种可促进细胞凋亡的分子,线粒体分裂时会将其释放入细胞质中,促进细胞凋亡,这可能是高糖高脂导致 DD 型细胞凋亡显著高于 II 型细胞的重要原因。

综上所述,NFKB1 基因启动子区-94ATTG 缺失突变造成 NF- κ B 信号通路中关键亚基 p50 表达降低,在高糖高脂微环境下线粒体分裂蛋白 Drp1-s616 磷酸化水平显著增加,线粒体融合蛋白 Mfn2 表达显著降低,线粒体过度分裂成碎片状,大量的凋亡相关蛋白 CytC 在线粒体分裂过程中从线粒体释放到胞质中,从而导致内皮细胞凋亡,启动 As 发生,其作用机制示意图如图 5。本研究明确了 NFKB1 基因突变在高糖高脂微环境下导致内皮细胞更容易受到损伤的潜在分子机制,为 As 的早期干预和个体化防治提供了科学依据。

[参考文献]

- [1] Dai X, Wiernek S, Evans JP, et al. Genetics of coronary artery disease and myocardial infarction[J]. World J Cardiol, 2016, 8(1): 1-23.
- [2] Hedin U, Matic LP. Recent advances in therapeutic targeting of inflammation in atherosclerosis[J]. J Vasc Surg, 2019, 69(3): 944-951.
- [3] Theodorou K, Boon RA. Endothelial cell metabolism in atherosclerosis[J]. Front Cell Dev Biol, 2018, 6: 82.
- [4] Sepuri NBV, Tammineni P, Mohammed F, et al. Nuclear

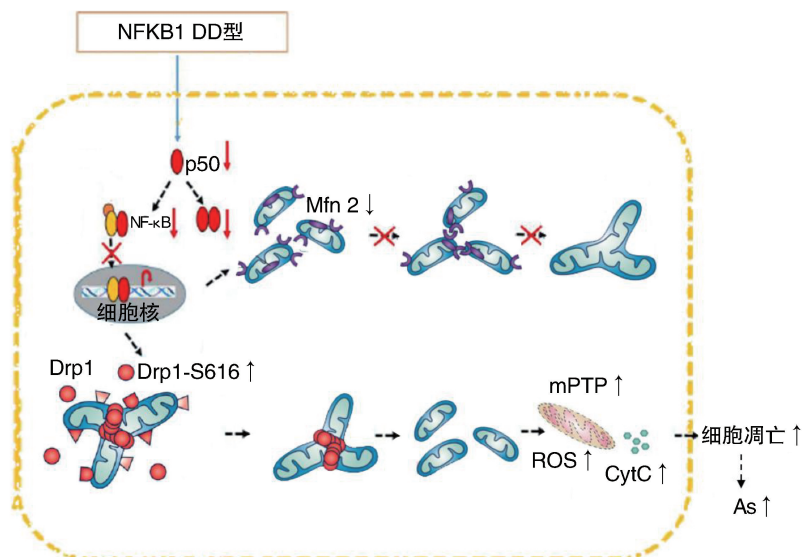


图 5. NFKB1 基因突变致 As 作用机制示意图

Figure 5. Schematic diagram of the action mechanism of NFKB1 gene mutation leading to As

transcription factors in the mitochondria: A new paradigm in fine-tuning mitochondrial metabolism [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2017, 240: 3-20.

[5] Lai HM, Li XM, Yang YN, et al. Genetic variation in NFKB1 and NFKBIA and susceptibility to coronary artery disease in a Chinese Uygur population [J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0129144.

[6] 周韵, 杜冬梅, 罗俊一, 等. 原代脐静脉内皮细胞 NFKB1 基因启动子区缺失型较插入型 P50 蛋白表达降低 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2016, 32(3): 352-355.

[7] Valente AJ, Maddalena LA, Robb EL, et al. A simple ImageJ macro tool for analyzing mitochondrial network morphology in mammalian cell culture [J]. *Acta Histochem*, 2017, 119(3): 315-326.

[8] 刘婷, 佟晓哲. 巴西苏木素调控自噬对高糖诱导血管内皮细胞损伤的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2017, 25(4): 343-346.

[9] 饶璇, 李元建. 内皮细胞损伤与修复的研究进展 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2017, 25(5): 531-535.

[10] Kang H, Ma X, Liu J, et al. High glucose-induced endothelial progenitor cell dysfunction [J]. *Diab Vasc Dis Res*, 2017, 14(5): 381-394.

[11] Jheng HF, Tsai PJ, Guo SM, et al. Mitochondrial fission contributes to mitochondrial dysfunction and insulin resistance in skeletal muscle [J]. *Mol Cell Biol*, 2012, 32(2): 309-319.

[12] Luo JY, Li XM, Zhou Y, et al. Mutant DD genotype of NFKB1 gene is associated with the susceptibility and severity of coronary artery disease [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2017, 103: 56-64.

[13] Liu H, Xiang H, Zhao S, et al. Vildagliptin improves high

glucose-induced endothelial mitochondrial dysfunction via inhibiting mitochondrial fission [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(2): 798-810.

[14] Chen L, Huang J, Li XC, et al. High-glucose induced mitochondrial dynamics disorder of spinal cord neurons in diabetic rats and its effect on mitochondrial spatial distribution [J]. *Spine*, 2019, 44(12): E715-E722.

[15] Shi Y, Fan S, Wang D, et al. FOXO1 inhibition potentiates endothelial angiogenic functions in diabetes via suppression of ROCK1/Drp1-mediated mitochondrial fission [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(7): 2481-2494.

[16] Yu J, Maimaitili Y, Xie P, et al. High glucose concentration abrogates sevoflurane post-conditioning cardioprotection by advancing mitochondrial fission but dynamin-related protein 1 inhibitor restores these effects [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2017, 220(1): 83-98.

[17] Brand CS, Tan VP, Brown JH, et al. RhoA regulates Drp1 mediated mitochondrial fission through ROCK to protect cardiomyocytes [J]. *Cell Signal*, 2018, 50: 48-57.

[18] Jhun BS, O-Uchi J, Adaniya SM, et al. Adrenergic regulation of Drp1-driven mitochondrial fission in cardiac physio-pathology [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2018, 7(12): E195.

[19] Yu F, Xu T, Wang M, et al. Function and regulation of mitofusin 2 in cardiovascular physiology and pathology [J]. *Eur J Cell Biol*, 2018, 97(7): 474-482.

[20] Filadi R, Pendin D, Pizzo P. Mitofusin 2: from functions to disease [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(3): 330.

(此文编辑 曾学清)