

bcl-2 在神经酰胺致人脐静脉内皮细胞凋亡中的作用

杨丽霞, 沈珠甫, 郭瑞威, 杨 栋, 齐 峰, 石燕昆

(中国人民解放军成都军区昆明总医院心内科, 云南省昆明市 650032)

[关键词] 病理学与病理生理学; bcl-2; 神经酰胺; 人脐静脉内皮细胞; 细胞凋亡

[摘要] 目的 研究 bcl-2 在神经酰胺诱导人脐静脉内皮细胞凋亡过程中的作用。方法 原代培养人脐静脉内皮细胞, 用不同浓度神经酰胺进行诱导并观察 bcl-2 的表达及细胞凋亡情况, 采用逆转录聚合酶链反应和免疫印迹法测定 bcl-2 mRNA 和蛋白的表达, TUNEL 法检测细胞凋亡。结果 神经酰胺以剂量依赖性诱导人脐静脉内皮细胞凋亡, 对照组和 5、12.5、25 及 50 $\mu\text{mol/L}$ 神经酰胺处理 24 h 后各组细胞凋亡率分别为 2.13% \pm 0.12%、13.24% \pm 1.32%、29.67% \pm 2.32%、34.43% \pm 3.36% 及 38.56% \pm 2.21%, 神经酰胺处理组 bcl-2 mRNA 及蛋白的表达较对照组显著降低 ($P < 0.05$)。结论 神经酰胺在诱导体外培养的人脐静脉内皮细胞时, bcl-2 表达减低, 从而引起细胞凋亡。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Role of bcl-2 in Human umbilical Vein Endothelial Cell Apoptosis Induced by Ceramide

YANG Li-Xia, SHEN Zhu-Fu, GUO Rui-Wei, YANG Dong, QI Feng, and SHI Yan-Kun

(Department of Cardiology, Kunming General Hospital, Chengdu Military Area Command, Kunming 650032, China)

[KEY WORDS] bcl-2; Ceramide; Human Umbilical Vein Endothelial Cell; Cell Apoptosis

[ABSTRACT] **Aim** To study the role of bcl-2 in endothelial cells apoptosis induced by ceramide. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells were cultured in vitro and treated with ceramide at various levels. TUNEL was employed to determine the apoptosis of the cultured endothelial cells. The bcl-2 mRNA and protein levels were evaluated by RT-PCR and Western blotting. **Results** Ceramide induced apoptosis of endothelial cells in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). The percentage of the apoptotic endothelial cells were 2.13% \pm 0.12%, 13.24% \pm 1.32%, 29.67% \pm 2.32%, 34.43% \pm 3.36% and 38.56% \pm 2.21% respectively after treatment with ceramide at various concentrations (5, 12.5, 25 and 50 $\mu\text{mol/L}$) for 24 hours.

The expression of bcl-2 mRNA and protein in endothelial cells treated with ceramide significantly depressed ($P < 0.05$).

Conclusion Ceramide may induce apoptosis of endothelial cells through down-regulating the bcl-2 mRNA and protein expression.

磷脂类物质是近十年来细胞信号转导研究的热点之一。鞘磷脂不仅是维持细胞膜结构的重要组成部分, 而且鞘磷脂途径是存在于从酵母菌到人等不同种属动物的信号转导系统, 在此途径中起核心作用的神经酰胺, 在多种细胞功能调节中起第二信使作用。C₂-神经酰胺为人工合成的短链神经酰胺化合物, 可透过细胞膜, 从而模拟细胞凋亡时神经酰胺在胞内的蓄积, 被广泛用于神经酰胺介导凋亡的研究^[1]。本研究采用体外细胞培养方法, 观察神经酰胺对细胞凋亡的产生及凋亡相关基因 bcl-2 的变化, 探讨神经酰胺在血管内皮细胞凋亡过程中可能的调节作用及可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料

参照 Madan 等^[2]方法分离人脐静脉内皮细胞, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 条件下培养于 DMEM 培养基 (含 10% 胎牛血清、100 ku/L 青-链霉素) 中。C₂-神经酰胺购自美国 Sigma 公司, 用无水乙醇配制成 50 mmol/L 储备液, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。TUNEL 检测试剂盒购自中杉公司。胎牛血清购自 Hyclone 公司。RNA PCR Kit (AMV) Ver3.0 购自大连宝生物工程有公司。

1.2 TUNEL 法检测内皮细胞凋亡

取对数生长期的血管内皮细胞, 稀释成 $1 \times 10^7/\text{L}$, 接种于含有无菌盖玻片的 6 孔培养板, 待细胞贴壁后, 加药组加入终浓度为 5、12.5、25 及 50 $\mu\text{mol/L}$ C₂-神经酰胺, 对照组加入无水乙醇, 浓度为 0.1% (体积比), 24 h 后 TUNEL 法检测细胞凋亡^[3]。

1.3 半定量逆转录聚合酶链反应测定 bcl-2 mRNA

不同浓度 C₂-神经酰胺处理细胞 24 h 后收集细

[收稿日期] 2007-08-13 [修回日期] 2008-01-04

[作者简介] 杨丽霞, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病的发病机制及介入诊治, E-mail 为 doctorylixia@yahoo.com.cn。沈珠甫, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向为冠心病发病机制的研究。郭瑞威, 博士研究生, 主治医师, 研究方向为心力衰竭发病学中炎症因子的变化。

胞。用 Trizol 裂解提取总 RNA, 测定其浓度和纯度。取 1 μ g 总 RNA 在 20 μ L 体系中逆转录合成 cDNA, 分别取 2 μ L cDNA 产物进行 bcl-2 和 β -actin 的聚合酶链反应。bcl-2 正反义序列分别为 5'-GAT TGT GGC CTT CTT TGA GTT C-3' 和 5'-ACT GAG CAG AGT CTT CAG AGA CA-3', 扩增片段长度 230 bp, 退火温度为 56 $^{\circ}$ C, 进行 33 个循环。 β -actin 正反义序列分别为 5'-ATC ATG AAG TGT GAC GTG GAC AT-3' 和 5'-AGG AGC AAT GAT CTT GAT CTT CA-3', 扩增片段长度 153 bp, 退火温度为 57 $^{\circ}$ C, 进行 30 个循环。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离, 紫外线下观察和照相, 数字成像系统进行面积和密度扫描。

1.4 Western blotting 法测定 bcl-2 蛋白

提取细胞总蛋白, 蛋白浓度用 Lowry 法定量。以 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 将分离的蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 封闭 1 h, 加入 β -actin 小鼠抗大鼠单克隆抗体 (1: 5000), 室温摇床孵育 1 h, 加入抗 bcl-2 单克隆抗体, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜后置于 700 nm 荧光抗小鼠 IgG 二抗 (1: 5000) 中, 在室温摇床避光孵育 30 min, 在 Odyssey 荧光扫描分析系统下扫描。

1.5 统计学方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析。应用 SPSS 10.0 统计软件进行统计分析。

2 结果

2.1 C₂-神经酰胺对内皮细胞凋亡的影响

5、12.5、25 及 50 μ mol/L C₂-神经酰胺干预内皮细胞 24 h 后, 细胞凋亡指数随干预剂量的加大逐渐上升, 且分别较对照组明显增高 ($P < 0.05$, 表 1)。

表 1. C₂-神经酰胺对内皮细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

分 组	细胞凋亡率
对照组	2.13% \pm 0.12%
C ₂ -神经酰胺	
5 μ mol/L	13.24% \pm 1.32% ^a
12.5 μ mol/L	29.67% \pm 2.32% ^b
25 μ mol/L	34.43% \pm 3.36% ^b
50 μ mol/L	38.56% \pm 2.21% ^b

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

2.2 bcl-2 mRNA 的表达

不同浓度 C₂-神经酰胺干预内皮细胞后, bcl-2 mRNA 表达逐渐降低, 与对照组比较差异显著 ($P <$

0.05; 图 1 和表 2)。

2.3 bcl-2 蛋白的表达

对照组和不同浓度 C₂-神经酰胺组都可见 bcl-2 蛋白的表达, bcl-2 蛋白的表达逐渐降低, 与对照组比较差异显著 ($P < 0.05$; 表 2 和图 2)。

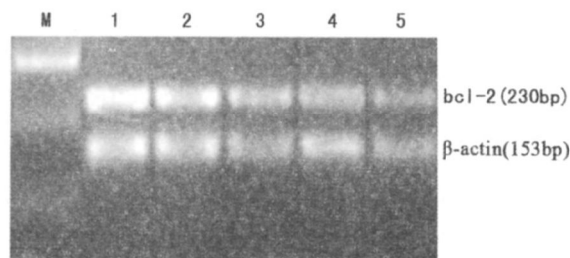


图 1. C₂-神经酰胺诱导细胞凋亡中 bcl-2 mRNA 的表达 M 为 Marker, 1~5 分别为 0、5、12.5、25 及 50 μ mol/L C₂-神经酰胺。

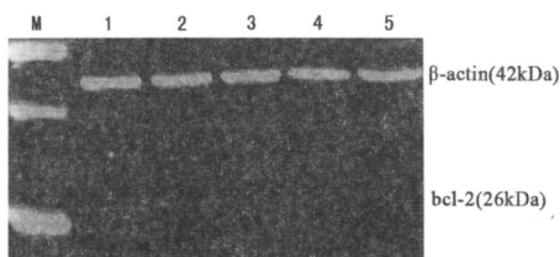


图 2. C₂-神经酰胺诱导细胞凋亡中 bcl-2 蛋白的表达 M 为 Marker, 1~5 分别为 0、5、12.5、25 及 50 μ mol/L C₂-神经酰胺。

表 2. C₂-神经酰胺诱导细胞凋亡中 bcl-2 mRNA 和蛋白的表达

分 组	mRNA	蛋白
对照组	1.231 \pm 0.144	0.077 \pm 0.007
C ₂ -神经酰胺		
5 μ mol/L	0.984 \pm 0.115 ^a	0.070 \pm 0.003 ^a
12.5 μ mol/L	0.964 \pm 0.143 ^a	0.058 \pm 0.010 ^b
25 μ mol/L	0.853 \pm 0.103 ^b	0.050 \pm 0.062 ^b
50 μ mol/L	0.795 \pm 0.137 ^b	0.040 \pm 0.102 ^b

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

3 讨论

神经鞘磷脂由鞘氨醇、脂肪酸及磷酸胆碱组成, 是生物膜的重要组成部分, 鞘氨醇的氨基通过酰胺键与脂肪酸相连, 生成 N-脂酰鞘氨醇-神经酰胺, 故神经酰胺属磷脂类信号分子, 在结构和功能上均为神经鞘脂类的核心分子并参与调节多种信号通路, 如应激活化蛋白激酶 (stress-activated protein kinase, SAPK)/JNK 链, 调节细胞的增殖、分化和凋亡等^[4,5]。

细胞凋亡是受 bcl-2 基因家族、Fas/FasL 系统、TRAIL 及其配体等多基因调控的复杂过程^[6], 其中 bcl-2 基因是与细胞凋亡关系最为密切的凋亡抑制基因, 其主要机制为: 在线粒体膜上通过抑制线粒体通透性的改变, 阻止线粒体膜转膜电位的下降, 抑制超氧阴离子产生过多和程序化死亡诱导因子的释放, 达到抑制细胞凋亡; 在内质网膜上, bcl-2 蛋白通过稳定内质网膜, 阻断 Ca^{2+} 从内质网释放, 使依赖 Ca^{2+} 的核酸内切酶活性降低等途径阻断 DNA 断裂及细胞凋亡^[7,8]。

本研究采用外源性 C_2 -神经酰胺作用于体外培养的血管内皮细胞, 结果发现神经酰胺能诱导内皮细胞凋亡, 且细胞凋亡率有浓度—效应关系。神经酰胺能降低内皮细胞 bcl-2 mRNA 和蛋白的表达, 说明神经酰胺诱导凋亡与 bcl-2 基因有明确关系, 为进一步研究神经酰胺信号途径在血管内皮细胞凋亡中的作用提供实验依据。

[参考文献]

- [1] Iwai K, Kondo T, Watanabe M, et al. Ceramide increase oxidative damage due to inhibition of catalase by caspase-3-dependent proteolysis in HL-60 cell apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 2003, **278** (11): 9 813-822.
- [2] Madan B, Singh I, Kumar A, et al. Xanthones as inhibitors of microsomal lipid peroxidation and TNF-alpha induced ICAM-1 expression on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) [J]. *Bioorg Med Chem*, 2002, **10** (11): 3 431-436.
- [3] 夏学锋, 冉丕鑫, 何旦莎, 等. 原位凋亡细胞末端标记测定 TUNEL 法 [J]. *中国现代医学杂志*, 1997, **7** (11): 30.
- [4] Sultan I, Senkal CE, Ponnusamy S, et al. Regulation of the sphingosine recycling pathway for ceramide generation by oxidative stress, and its role in controlling c-Myc/Max function [J]. *Biochem J*, 2006, **393** (2): 513-521.
- [5] Sawai H, Domae N, Okazaki T. Current status and perspectives in ceramide targeting molecular medicine [J]. *Curr Pharm Des*, 2005, **11**: 2 479-487.
- [6] Yang M H, Yoo KH, Yoo YJ, et al. The gene expression profiling in murine cortical cells undergoing programmed cell death (PCD) induced by serum deprivation [J]. *Biochem Mol Biol*, 2007, **40** (2): 277-285.
- [7] McConkey DJ, Nicotera P, Orrenius S. Signalling and chromatin fragmentation in thymocyte apoptosis [J]. *Immunol Rev*, 1994, **142**: 343-363.
- [8] Mertens HJ, Heineman MJ, Evers JL. The expression of apoptosis-related proteins Bcl-2 and Ki67 in endometrium of ovulatory menstrual cycles [J]. *Gynecol Obstet Invest*, 2002, **53** (4): 224-230.

(此文编辑 文玉珊)