

· 基础研究 ·

影响内皮细胞凋亡的因素及其机制探讨

刘 韧, 肖 南, 田昆仑, 刁有芳, 陈惠孙

【摘要】 目的:观察亚砷酸钠(Ars),内毒素(LPS)、肿瘤坏死因子(TNF)、烧伤血清、创伤血清对内皮细胞凋亡的影响及其机制。方法:体外培养内皮细胞 ECV-304,与上述物质孵育 24 小时后检测凋亡水平及 ICAM-1、bcl-2、p53 表达的变化。结果: Ars 可使内皮细胞发生剂量依赖的凋亡增加(与对照相比, $P < 0.01$),但是 LPS、TNF、烧伤血清和创伤血清对内皮细胞的作用有限,细胞凋亡率在 15% 以下。除 10% 烧伤血清外,所有处理因素都使内皮细胞 ICAM-1 表达降低。体外诱导内皮细胞凋亡与 bcl-2 表达降低、p53 表达增多有关。结论: Ars、LPS、TNF、烧伤血清和创伤血清通过下调 bcl-2 表达、上调 p53 表达来影响内皮细胞凋亡,并且抑制内皮细胞功能。

【关键词】 内皮细胞;凋亡;基因表达

【中图分类号】 Q25 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1001-0726 (2001)02-0065-05

Substances That Induced Endothelial Cell Apoptosis and the Mechanisms Involved Liu Ren, Xiao Nan, Tian Kun-lun, et al. Research institute of surgery, Daping Hospital, The 3rd Military Medical University, Chongqing, 400042

【Abstract】 Objective: To investigate the endothelial cell apoptosis inducing effect of substances, including sodium arsenite (Ars), lipopolysaccharide (LPS), tumor necrosis factor (TNF), burned serum and traumatic serum and the mechanisms involved. **Methods:** By comparing the changes of apoptosis rates and the expressions of ICAM-1, bcl-2, p53 after endothelial cells ECV-304 were incubated with these apoptosis inducing substances. **Results:** Ars increased the apoptosis rate of endothelial cells and this effect was dose-dependent (compared with control, $P < 0.01$). LPS, TNF, burned serum and traumatic serum had only limited effect on endothelial cell apoptosis, the apoptosis rate was below 15%. Except for 10% burned serum, all these substances decreased the expression of endothelial cell ICAM-1, in vitro endothelial cell apoptosis inducing effect were correlated to the decrease in the expression of bcl-2 and the increase in the expression of p53 and ICAM-1. **Conclusion:** Ars, LPS, TNF, burned serum and traumatic serum influenced endothelial cell apoptosis through down-regulation of bcl-2 and up-regulation of p53 and inhibited their functions.

【Key words】 Endothelial cell; Apoptosis; Gene expression

【CLC number】 Q25 **【Document code】** A **【Article ID】** 1001-0726(2001)02-0065-05

内皮细胞损伤是机体创伤、烧伤后常见的病理生理现象,亦是许多疾病发生、发展的重要环节,内皮细胞的凋亡可能导致血管内皮屏障功能的丧失,易于发生全身性炎症反应综合症中的血管渗漏及组织器官水肿。那么,疾病过程中哪些因素可以影响内皮细胞凋亡,其机制涉及哪些信号分子的变化,这些问题已成为目前的研究热点之一。我们已证明亚砷酸钠在体外可诱导内皮细胞发生凋亡,机制可能涉及细胞间粘附分子(ICAM-1)表达及细胞内氧化状态改变^[1,2],由此我们推测炎症介质和烧伤血清、创伤血清亦可诱导内皮细胞凋亡,涉及的机制与亚砷酸钠相比,可能相似亦可能不同。在本实验中,我们观察内毒素、肿瘤坏死因子、烧伤血清、创伤血清对内皮细胞凋亡的影响,并检测 ICAM-1、

bcl-2、p53 表达的变化,以期阐明与内皮细胞凋亡有关的信号分子的表达差异。

材料与方法

一、试剂:DMEM 培养基(Gibco),7-氨基放线菌素 D(7-AAD, Sigma), FITC-anti CD54(小鼠抗人, Serotec), FITC-anti IgG(小鼠抗人, Serotec), RNase A (B. M.), 蛋白酶 K(Sigma), ΦX174-DNA/Hae III (B. M.), 亚砷酸钠(Ars, Merck), 脂多糖(LPS, O55B5, Sigma), 重组人肿瘤坏死因子(TNF, Sigma), 烧伤血清(来自第三军医大学西南医院, 烧伤面积 $80 \pm 2\%$), 创伤血清(来自第三军医大学大坪医院食道癌患者, 手术历时 4~6 小时), 兔抗人 bcl-2 抗体(北京中山公司)、小鼠抗人 p53 抗体(北

京中山公司)。其余试剂均为国产分析纯。

二、内皮细胞的培养及分组：人脐静脉内皮细胞株 ECV-304 来源于 ATCC 细胞库，在 DMEM(含 100U/ml 青霉素, 100U/ml 链霉素, 10% 新生牛血清, 2mM 谷氨酰胺)培养基中于 37℃、5% CO₂ 培养。待铺满 80% 后以 0.25% 胰酶-0.02% EDTA 消化，一周传代 2~3 次。复苏后的细胞连续传代 4 次以后用于实验。悬浮培养，即 ECV-304 接种于硅化的细胞培养管中，密度 5×10^5 /ml, 2ml/管。加刺激因素后培养 24h。分为 6 组：对照, Ars 组 (40 μ M、80 μ M、160 μ M), LPS 组 (250ng/ml、500ng/ml), TNF 组 (25ng/ml、50ng/ml), 烧伤血清组 (10%、30%), 创伤血清组 (10%、30%)。

三、内皮细胞凋亡的定量^[3]： 1×10^6 细胞离心去上清，加 0.2ml 7-AAD(20 μ g/ml 溶于含 0.1% NaN₃ 的 PBS 中)。4℃ 孵育 20 分钟。流式细胞仪检测 5000 个细胞。不染色的为活细胞，弱染的为凋亡细胞，强染的为坏死细胞。激发波长 488nm，发射波长 650nm。

四、内皮细胞 ICAM-1 表达的测定^[4]：100 μ l 内皮细胞悬液 (1×10^6 /ml) 中加 10 μ l FITC-anti CD54，对照管加 10 μ l FITC-anti IgG。4℃ 孵育 30 分钟。流式细胞仪检测 5000 个细胞。激发波长 488nm，发射波长 525nm。以阳性细胞率表示 (%)。

五、内皮细胞凋亡的 DNA 电泳观察：细胞

250 \times g 离心 5 分钟，溶解于 30 μ l 裂解液 (pH8.0, 20mM EDTA, 100mM Tris, 0.8% N-十二烷酰肌氨酸) 和 15 μ l RNase A (pH4.8, 1mg/ml, 含 100mM 乙酸钠, 0.3 mM EDTA), 37℃ 水浴 6 小时后加 10 μ l 蛋白酶 K (20mg/ml), 50℃ 水浴过夜。取 5 μ l 用于琼脂糖电泳，胶浓度 1.8% (含 0.3 μ g/ml EB), 0.5 \times TBE 缓冲液， Φ X174-DNA/Nae III 作为 marker(1353, 1078, 872, 603, 310, 281/271, 234, 194, 118, 72bp)。

六、内皮细胞 bcl-2、p53 表达的免疫组织化学检测^[5,6]：在 6 孔细胞培养板中放入涂有多聚赖氨酸的盖玻片，接种浓度为 5×10^4 /ml, 2ml/孔。培养 4h 后换不含小牛血清的 DMEM 培养基。分别加入不同浓度的 Ars、LPS、TNF 及烧伤血清和创伤血清，24h 后进行免疫组化染色。bcl-2、p53 一抗稀释倍数均为 1:100。

结 果

一、Ars、LPS、TNF 及烧伤血清、创伤血清对内皮细胞凋亡的影响：Ars 可以使内皮细胞发生剂量依赖的凋亡增加 (与对照相比, $P < 0.01$)，160 μ M Ars 时内皮细胞凋亡达到 $51.10 \pm 10.05\%$ ，与 40 μ M 及 80 μ M Ars 组相比有显著差异 ($P < 0.01$, $P < 0.05$) (图 1A)。LPS 使内皮细胞凋亡增加 (与对照相比, P

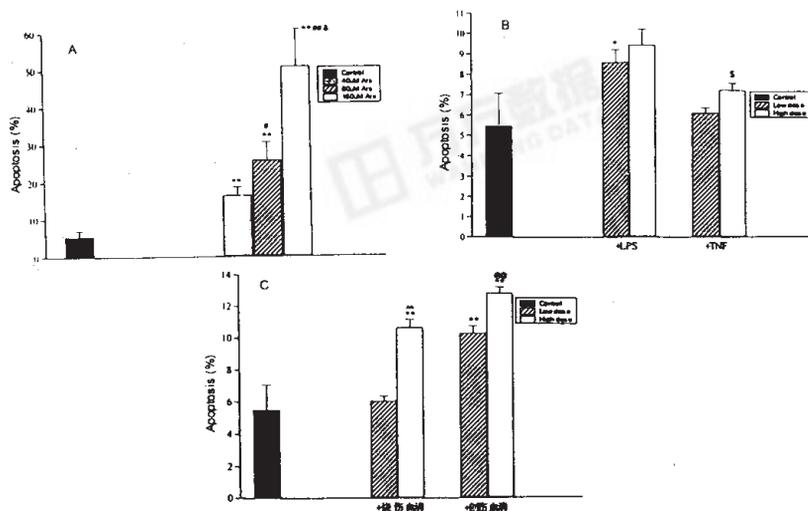


图 1. Ars、LPS、TNF、烧伤血清和创伤血清对内皮细胞凋亡的影响 (n = 4)
与对照相比, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。
与 40 μ M Ars 相比, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ 。与 80 μ M Ars 相比, ^ $p < 0.05$ 。
与 25ng/ml TNF 相比, ^ $p < 0.05$ 。
与 10% 烧伤血清相比, ^^ $p < 0.01$ 。
与 10% 创伤血清相比, ^^ $p < 0.01$ 。

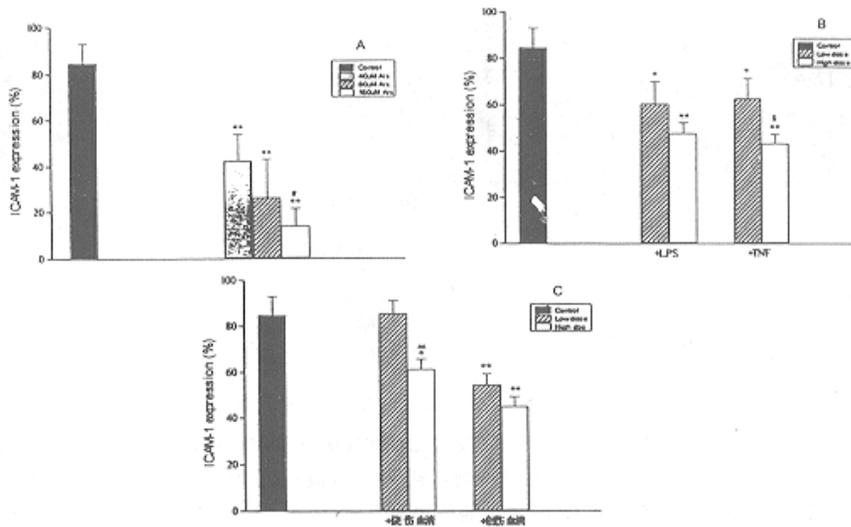


图 2. Ars、LPS、TNF、烧伤血清和创伤血清对内皮细胞 ICAM-1 表达的影响 (n = 4)

与对照相比, *p<0.05, **p<0.01。
与 40μM Ars 相比, #p<0.05。
与 25ng/ml TNF 相比, ^p<0.05。
与 10% 烧伤血清相比, ^^p<0.01。

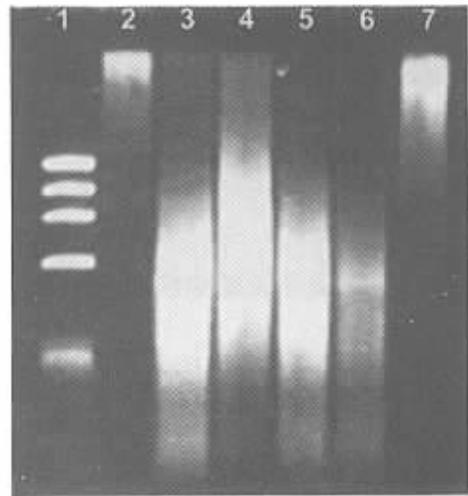
<0.05) ,而 50ng/ml 以内剂量的 TNF 对内皮细胞则没有作用 (图 1B) ;创伤血清及 30% 烧伤血清可显著增加内皮细胞凋亡 (与对照相比, P<0.01) (图 1C)。但是 LPS、TNF、烧伤血清和创伤血清对内皮细胞的作用有限,细胞凋亡率在 15% 以下。

二、Ars、LPS、TNF 及烧伤血清、创伤血清对内皮细胞 CD11b 表达的影响: Ars 使内皮细胞 ICAM-1 表达呈剂量依赖地降低 (与对照相比, P<0.01) ,且 160μM Ars 组与 40μM Ars 组相比,降低更为明显 (P<0.05) (图 2A)。除 10% 烧伤血清组外,其余各组 ICAM-1 的表达均有不同程度的下降 (与对照相比, P<0.05) (图 2B、图 2C)。

三、内皮细胞凋亡的 DNA 电泳观察: Ars 作用于内皮细胞后产生明显的 DNA ladder 改变,而对对照则没有小片段 DNA 产生 (照片 1)。

四、内皮细胞 bcl-2 的表达变化: 正常培养内皮细胞 bcl-2 蛋白主要位于胞浆中,免疫组化阳性反应较强 (照片 2A)。40μM Ars 作用 24h 后, bcl-2 阳性颗粒表达减少 (照片 2B) ,80μM Ars 作用后 bcl-2 阳性颗粒几乎检测不到 (照片 2C)。500ng/ml LPS、50ng/ml TNF 作用后 bcl-2 表达无明显减少 (照片 2D、2E)。30% 烧伤血清、创伤血清作用后内皮细胞形态及数量无明显变化,但 bcl-2 表达极弱 (照片 2F、2G)。

万方数据

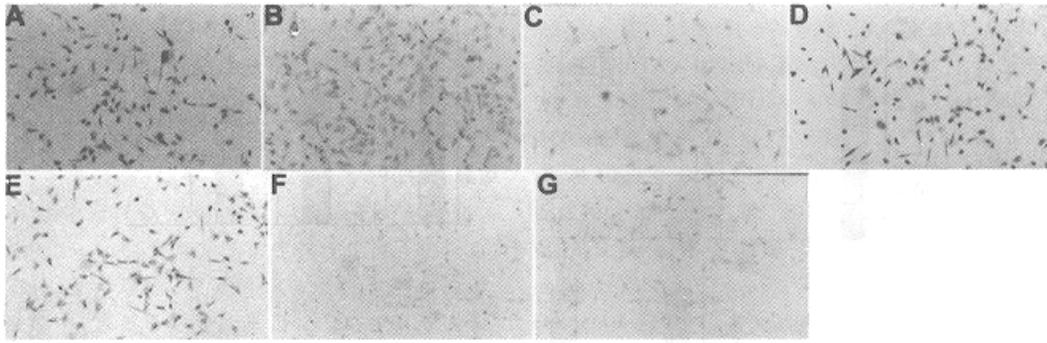


照片 1. 内皮细胞凋亡的电泳观察

Lane 1: marker Lane 2, 7: 对照
Lane 3, 4: 160μM Ars Lane 5: 80μM Ars
Lane 6: 40μM Ars

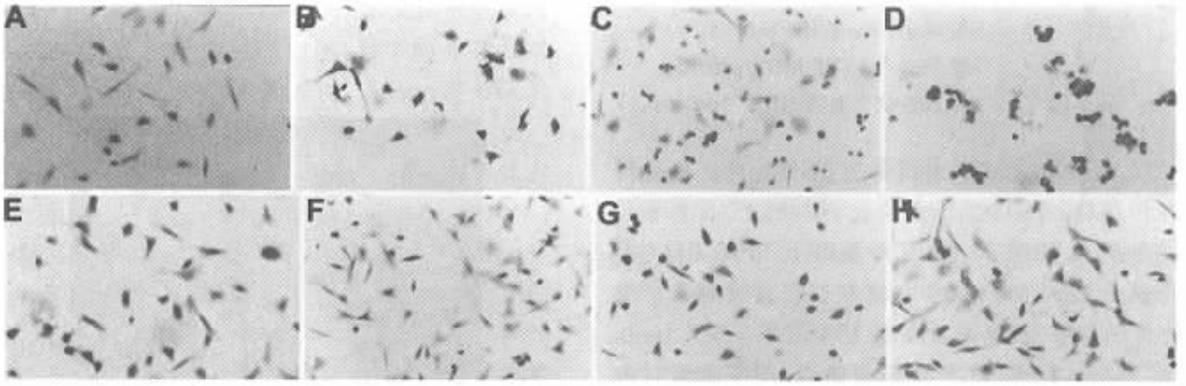
Ars 作用于内皮细胞后产生明显的 DNA ladder 改变,而对对照则没有小片段 DNA 产生

五、内皮细胞 p53 的表达变化: 正常培养内皮细胞 p53 较均匀地分布于细胞核中,表达量较低 (照片 3A)。40μM Ars 作用后阳性颗粒明显增多 (照片 3B) ,80μM Ars 作用后阳性颗粒主要集中在变圆的细胞中 (照片 3C) ,160μM Ars 作用后,视野中几乎所有细胞都变圆,且 p53 表达增强非常明显 (照片



照片 2. 内皮细胞 bcl-2 表达的变化(10×20倍)

A: 正常培养内皮细胞 bcl-2 蛋白主要位于胞浆中,免疫组化阳性反应较强。B: 40 μ M Arsenite 处理后, bcl-2 阳性颗粒表达减少。C: 80 μ M Arsenite 处理后 bcl-2 阳性颗粒几乎检测不到。D: 500ng/ml LPS 处理后 bcl-2 表达无明显减少。E: 50ng/ml TNF 处理后 bcl-2 表达无明显减少。F: 30% 烧伤血清处理后内皮细胞形态及数量无明显变化,但 bcl-2 表达极弱。G: 30% 创伤血清处理后内皮细胞形态及数量无明显变化,但 bcl-2 表达极弱。



照片 3. 内皮细胞 p53 表达的变化(10×40倍)

A: 正常培养内皮细胞 p53 较均匀地分布于细胞核中,表达量较低。B: 40 μ M Arsenite 处理后阳性颗粒明显增多。C: 80 μ M Arsenite 处理后阳性颗粒主要集中在变圆的细胞中。D: 160 μ M Arsenite 处理后,视野中几乎所有细胞都变圆,且 p53 表达增强非常明显。E: 500ng/ml LPS 处理后 p53 有不同程度增加,但细胞形态较正常。F: 50ng/ml TNF 处理后 p53 有不同程度增加,但细胞形态较正常。G: 30% 烧伤血清处理后 p53 有不同程度增加,但细胞形态较正常。H: 30% 创伤血清处理后 p53 有不同程度增加,但细胞形态较正常。

3D)。500ng/ml LPS、50ng/ml TNF、30% 烧伤血清、30% 创伤血清作用后 p53 有不同程度的增加,但细胞形态比较正常(照片 3E、3F、3G、3H)。

讨 论

Ars 诱导内皮细胞凋亡是文献中常见的在体外研究细胞凋亡的模型,效果明显而且稳定。用 7-AAD 染色在流式细胞仪上可区分正常细胞、凋亡细胞和坏死细胞,保证了凋亡细胞检测的准确性。由
万方数据

于采用悬浮式细胞培养,内皮细胞的贴壁增殖被大大抑制,因此可以探讨对一定数量的细胞而言各种因素对凋亡进程的影响。

研究发现,Arse 可以使内皮细胞发生剂量依赖的凋亡增加,最高可达 $51.1 \pm 10.05\%$,内皮细胞凋亡后产生明显的 DNA ladder 现象。而 500ng/ml 的 LPS 仅产生 $9.47 \pm 0.78\%$ 的内皮细胞凋亡,与对照相比虽有显著差异,但绝对值较低。TNF 在 50ng/ml 以下的浓度不能诱导内皮细胞凋亡,30% 烧伤血清及 10%、30% 创伤血清可以明显增加内皮细胞凋

亡。除 $160\mu\text{M}$ Ars 组外,在其它组中均未观察到细胞坏死。从上述结果可见,内皮细胞对 Ars 非常敏感,而 LPS、TNF 的作用较弱,烧伤血清和创伤血清对内皮细胞的作用在它们之间,细胞凋亡率在 10 ~ 15% 左右。上述结果来自体外实验,在体内环境中内皮细胞的凋亡变化是否如此,尚需进一步的实验证据。

ICAM-1 属于细胞粘附分子的免疫球蛋白超家庭成员,是一种细胞表面跨膜蛋白抗原,广泛分布于激活 T 细胞、内皮细胞、成纤维细胞和组织巨噬细胞上,外周血细胞表达很低。本实验发现,除 10% 烧伤血清外,所有处理因素都使内皮细胞 ICAM-1 表达降低。而表达 ICAM-1 是内皮细胞正常的功能之一。ICAM-1 表达降低反映了内皮细胞功能障碍,我们认为 LPS、TNF、烧伤血清、创伤血清不仅影响内皮细胞的凋亡,也抑制了内皮细胞的正常功能。

关于内皮细胞凋亡中基因及信号系统的参与目前了解较少。有人曾报道 TGF- β 可通过 bcl-2 的下调来诱导内皮细胞的凋亡^[7]。最新的研究表明,缺氧导致内皮细胞凋亡是通过 NF κ B 抑制 bcl-2 表达^[8]。本实验的细胞免疫组化结果显示,体外诱导内皮细胞凋亡与 bcl-2 表达降低、p53 表达增多有关,与文献报道的结果是一致的。

内皮细胞由于其分布的特殊性,在结构和功能上均很重要。了解内皮细胞凋亡的影响因素及其机制,旨在预防烧伤及创伤后并发症,如多器官功能不全综合征等。这对探讨创伤和创伤后并发症的发生机制、转归及指导临床治疗,避免和减轻创伤后并发症等方面可能具有重要意义。

参考文献

- [1] 刘韧,肖南,田昆仑,等. N-乙酰-L-半胱氨酸对亚砷酸钠诱导的内皮细胞凋亡的防治作用. 中华创伤杂志, 2000;16(5):302-304.
- [2] 肖南,刘韧,田昆仑,等. 还原型谷胱甘肽对亚砷酸钠诱

导的内皮细胞凋亡的保护作用. 细胞生物学杂志, 2000;22(4):209-212.

- [3] Schmid I, Uiffenbogart CH, Keld B, et al. A rapid method for measuring apoptosis and dual-color immunofluorescence by single laser flow cytometry. J Immunol Methods, 1994; 170: 145-157.
- [4] Wang JH, Redmond HP, Watson RWG, et al. The beneficial effect of taurine on the prevention of human endothelial cell death. Shock, 1996; 6(5): 331-338.
- [5] 王克万,杨志焕,王正国,等. 培养大鼠脑皮层神经元损伤后 c-fos 蛋白表达. 中华创伤杂志,1998;14:219-222
- [6] 舒斯云,鞠躬. 一种敏感的辣根过氧化物酶反应法:葡萄糖氧化酶-二氨基联苯胺-硫酸镍铵法. 解剖学报, 1989;20:400-404.
- [7] Tsukada, T, Eguchi K, Migita K, et al. Transforming growth factor β_1 induces apoptosis cell death in cultured human umbilical vein endothelial cells with down-regulated expression of bcl-2. Biochemi Biophys Res Commun, 1995; 210(3) 1076.
- [8] Matsushita H, Morishita R, Nata T, et al. Hypoxia-induced endothelial apoptosis through nuclear factor-kappaB (NF-kappaB)-mediated bcl-2 suppression: in vivo evidence of the importance of NFkappaB in endothelial cell regulation. Circ Res, 2000; 86(9): 984-981.

(收稿日期 2001-02-12)

【作者简介】

- 刘韧(1966-),女(汉族),河南固始人,四川大学毕业,助理研究员.
- 肖南(1963-),男(汉族),四川南充人,第三军医大学毕业,副研究员.
- 田昆仑(1964-),男(汉族),重庆忠县人,第三军医大学毕业,实验师.
- 刁有芳(1941-),女(汉族),重庆江津人,第三军医大学毕业,主管实验师.
- 陈惠孙(1930-),男(汉族),江苏吴县人,中国协和医科大学毕业,研究员.