

bcl-2 在同型半胱氨酸致血管内皮细胞凋亡中的作用*

李录¹ 贾绍斌² 陈大鹏² 孙娜¹ 张华¹ 严宁¹ 赵小瑞¹

[摘要] 目的:研究 bcl-2 在同型半胱氨酸致人脐静脉内皮细胞凋亡过程中的作用。方法:以人脐静脉内皮细胞株为实验对象,用含有不同浓度同型半胱氨酸的 RPMI 1640 培养液对其作用 48 h,MTT 法测定细胞增殖生长能力;流式细胞术测定细胞凋亡水平;荧光定量 PCR 测定 bcl-2 基因的 mRNA 表达;Western blotting 测定 bcl-2 蛋白表达量。结果:同型半胱氨酸对人脐静脉内皮细胞的增殖能力有明显的抑制作用,OD 值从(0.99±0.05) 渐下降至(0.28±0.03)($P<0.01$),且呈明显的剂量效应关系;细胞凋亡率由(2.05±0.26)% 渐增至(30.86±1.94)%($P<0.01$);与对照组相比,实验组 bcl-2 mRNA 及蛋白表达明显下降($P<0.01$)。结论:同型半胱氨酸可通过下调 bcl-2 的 mRNA 及蛋白质表达,促进人脐静脉内皮细胞的凋亡。

[关键词] 同型半胱氨酸;bcl-2;人脐静脉内皮细胞;细胞凋亡

doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2014.01.023

[中图分类号] R541.4 [文献标志码] A

Role of bcl-2 in human umbilical vein endothelial cell apoptosis Induced by homocysteine

LI Lu¹ JIA Shaobin² CHEN Da peng² SUN Na¹
ZHANG Hua¹ YAN Ning¹ ZHAO Xiaorui¹

(¹Ningxia Medical University, Yingchuan, 750004, China; ²Center of Cardiology, General Hospital, Ningxia Medical College)

Corresponding author: JIA Shaobin, E-mail: jsbxn@163.com

Abstract Objective: To study the role of bcl-2 in human umbilical endothelial cell apoptosis induced by homocysteine. **Method:** After human umbilical endothelial cells (HUVEC) were treated with different concentrations of homocysteine (Hcy) for 48 h, and MTT was used to measure the proliferation of HUVEC. The flow cytometry assay was used to detect the level of cell apoptosis. The expressions of Bcl-2 mRNA and Bcl-2 protein were correspondingly analyzed by fluorescence quantitative PCR and Western blotting. **Result:** The proliferation of HUVEC was obviously inhibited by homocysteine, the OD value decreased from (0.99±0.05) to (0.28±0.03) ($P<0.01$) and there was a significant dose-effect relationship. The rate of apoptosis in HUVEC cells increased from (2.05±0.26)% to (30.86±1.94)% ($P<0.01$). Compared to the control group, the expression of bcl-2 mRNA and protein were significantly depressed ($P<0.01$). **Conclusion:** Hcy could induce apoptosis of HUVEC through down-regulating the bcl-2 mRNA and protein expression.

Key words homocysteine; Bcl-2; human umbilical endothelial cell; cell apoptosis

临床荟萃研究显示,血浆同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)水平每升高 5 $\mu\text{mol/L}$,冠心病事件的发生率上升 20%,且独立于冠状动脉粥样硬化的其他危险因素^[1-2],其促动脉粥样硬化的详细机制未知。Banfi 等^[3]发现,血管内皮细胞的凋亡可引起血管调节功能的异常,促进平滑肌细胞的增殖,由此认为血管内皮细胞凋亡是动脉粥样硬化的一个始动因素。有研究认为,Hcy 致冠状动脉粥样硬化作用与其促内皮祖细胞凋亡及 Caspase 3 活化有关^[4]。作为调节细胞凋亡的关键基因 bcl-2 在其中起到怎样的作用,目前尚鲜见报道,值得进一步的研究。因此,本实验通过含有不同浓度 Hcy 的细胞

培养液对 HUVEC 细胞进行干预后,从细胞增殖抑制、细胞凋亡、bcl-2 的 mRNA 及蛋白表达诸方面进行研究,从而为 Hcy 致冠状动脉粥样硬化发病机制提供新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人脐静脉内皮细胞(Human umbilical endothelial cell, HUVEC)株(ATCC 美国);同型半胱氨酸(homocystein, Hcy)试剂(sigma 美国);RPMI 1640 培养液(Hyclone 美国),胎牛血清(全氏金),MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(凯基生物),细胞凋亡检测试剂盒(贝博生物);Trizol (invitrogen, 美国);兔源多克隆抗 bcl-2 抗体(三鹰生物);SYBR Green qPCR supermix(promega 美国);bcl-2 引物由上海生工合成。

* 基金项目:宁夏自然科学基金(No: NZ11266)

¹ 宁夏医科大学(银川,750004)

² 宁夏医科大学总医院心脏中心

通信作者:贾绍斌, E-mail: jsbxn@163.com

1.2 人脐静脉内皮细胞培养及实验分组

MTT 细胞增殖实验及细胞凋亡实验分为 6 组:①对照组;②2 mmol/L Hcy 组;③4 mmol/L Hcy 组;④8 mmol/L Hcy 组;⑤16 mmol/L Hcy 组;⑥32 mmol/L Hcy 组。作用时间为 48 h。根据 MTT 实验结果,以改良寇氏公式计算半数增殖抑制率(IC₅₀),以 IC₅₀ 时 Hcy 浓度组作为后续实验组。作用时间仍为 48 h。

1.3 MTT 法测定细胞增殖生长能力

收集对数期生长细胞,调整细胞悬液浓度为 ($10^4 \sim 10^5$)/ml,按每孔 100 μ l,均匀铺于 96 孔板,以含上述不同浓度的 Hcy 培养液干预细胞。每组设 6 个复孔。48 h 后每孔加入 50 μ l 1 \times MTT, 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h。吸取上清后每孔加入 150 μ l 二甲基亚砷(DMSO),摇床平摇 10 min。于酶标仪 490 nm 波长处检测每孔吸光度。计算各组细胞增殖抑制率后,求半数抑制率(IC₅₀)时 Hcy 浓度,公式如下:抑制率(%)=(对照组 OD 值-实验组 OD 值)/对照组 OD 值 \times 100%;Lg IC₅₀=X_k-d/2 \sum (P_i+P_{i+1})X_k;Lg 最大剂量;d:最大及相邻两组剂量对数之差;P_i,P_{i+1}:第 i 组及 i+1 组抑制率^[5]。

1.4 流式细胞术测定细胞凋亡率

用 0.25%胰酶消化细胞,并以 2 000 \times g 离心 5 min 后,弃培养液。用冷 PBS 洗涤细胞 3 次,400 μ l 1 \times Annexin V 结合液悬浮细胞,使其浓度约为 1 \times 10⁶/ml。加入 5 μ l Annexin V-FITC 染色液,4 $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min。加入 10 μ l PI 染色液后混匀于 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 5 min。以流式细胞仪进行分析,激发波长为 488 nm。

1.5 荧光定量 PCR 测定 bcl-2 基因 mRNA 表达

采用 Trizol 法提取细胞总 RNA。每组取 1 mg 总 RNA,采用 invitrogen 公司 M-MLV 第一链合成系统试剂盒将其反转录为 cDNA。按下列条件配制 PCR 反应体系:Nuclease-Free Water 5.2 μ l、上游引物(10 μ m)0.4 μ l、下游引物(10 μ m)0.4 μ l、GoTaq[®] qPCR Master Mix, 2 \times 10 μ l、模版 cDNA 4 μ l,总体积 20 μ l。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性,2 min,1 个循环;95 $^{\circ}$ C 变性,15 sec;60 $^{\circ}$ C 退火,1 min。变性及退火共进行 40 个循环,采用 Roche Lighter Cyler 荧光定量 PCR 仪进行 PCR 反应。引物序列如表 1。

表 1 引物名称及序列

Table 1 The name and sequence of primers

引物名称	引物序列 5'-3'
Bcl-2 F	atg tgt gtg gag agc gtc aa
Bcl-2 R	acc tac cca gcc tcc gtt at
β -actin F	tga cgt gga cat ccg caa ag
β -actin R	ctg gaa ggt gga cag cga gg

1.6 Western blotting 法测定 bcl-2 蛋白表达

采用凯基生物公司全蛋白提取试剂盒,进行细胞全蛋白的提取。BCA 法测定蛋白含量。将蛋白样本加入等体积的 2 \times 上样缓冲液,煮沸变性。每孔加入 20 μ l 样品置于电泳槽中行 SDS-PAGE 电泳转膜。丽春红染膜后,用 TBST 洗去丽春红。5%脱脂奶粉(TBST 稀释)封闭,室温摇床 1 h。加入一抗(用 5% BSA+TBS 稀释),置于 4 $^{\circ}$ C 过夜。加入二抗(用 5%脱脂奶粉+TBS 稀释),常温摇床 1 h。将发光液 A、B 等容积混匀后滴到膜上约 1 min,暗室曝光 5 min,洗胶片。Image J 图象分析系统测定吸光度值。

1.7 统计学处理

SPSS19.0 软件进行统计处理,各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。经正态性检验及方差齐性检验后,多组间均数的比较采用单因素方差分析;两组间均数的比较采用 *t* 检验;*P*<0.05 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HUVEC 细胞增殖能力测定结果

由 2 表可见,随 Hcy 浓度的增加,各组检测到的 OD 值渐由 (0.99 \pm 0.05) 降低至 (0.28 \pm 0.03) (*P*<0.01),且呈明显剂量效应关系。利用抑制率计算公式及改良寇氏公式算得 IC₅₀ 时 HCY 浓度为 9.28 mmol/L,取其近似值 9.00 mmol/L 作为后续实验药物干预浓度。

2.2 流式细胞学检查细胞凋亡结果

如图 1 所示,第 1 象限为晚期凋亡细胞,第 4 象限为早期凋亡细胞,我们将第 1 及第 4 象限之和作为统计指标。结果如表 2 所示,各组细胞凋亡率位于 (2.05~30.86)% 之间,且呈明显的剂量效应关系,差异有统计学意义(*P*<0.01)。

2.3 bcl-2 mRNA 的表达

采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法对数据进行整理分析。与对照组相比,实验组 bcl-2 mRNA 表达水平明显降低 (*P*<0.01)。如图 2 所示。

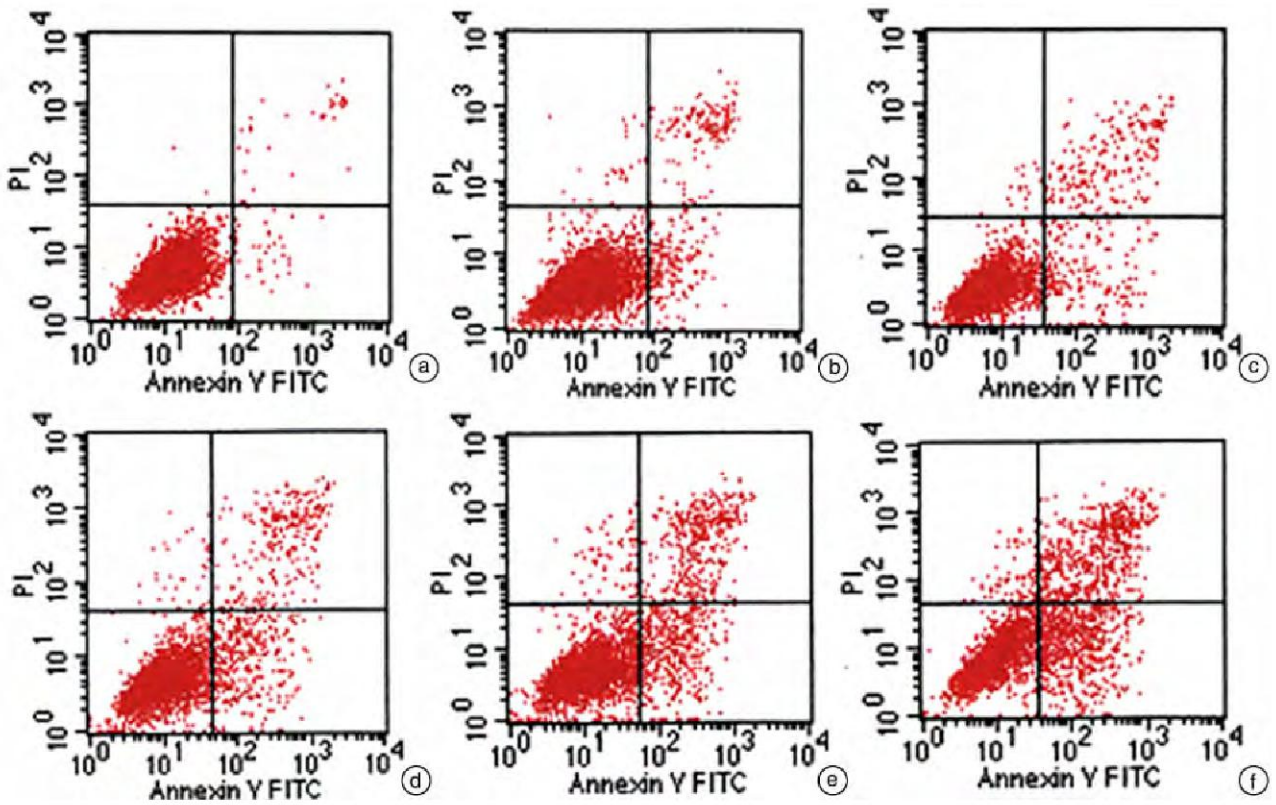
2.4 bcl-2 蛋白的表达

如图 3 及图 4 所示,实验组 bcl-2 蛋白相对表达含量由对照组(bcl-2/ β -actin)的 (0.89 \pm 0.04) 下降到 (0.56 \pm 0.05) (*P*<0.01)。

3 讨论

Hcy 是甲硫氨酸代谢过程中的重要中间产物。甲硫氨酸在腺苷转移酸的作用下形成 S-腺苷甲硫氨酸,并最终在甲基转移酶的作用下形成 S-腺苷同型半胱氨酸,继而形成 Hcy。既往发现 Hcy 可引起血管内皮细胞凋亡^[6],但 Hcy 是如何导致内皮细胞凋亡的,其机制并不完全清楚。

细胞凋亡是由基因调控的细胞的自发性、程序性的死亡,由 Kerr 于 1972 年提出。人体内细胞凋亡的失衡与多种疾病的发生、发展密切相关。有研究表明以冠心病为代表的动脉粥样硬化的发生与



a:对照组;b:2 mmol/L组;c:4 mmol/L组;d:8 mmol/L组;e:16 mmol/L组;f:32 mmol/L组。

图1 各组细胞凋亡分析

Figure 1 Apoptosis analysis of HUVEC in each group

表2 各组 HUVEC 细胞增殖能力及细胞凋亡率

Table 2 Reproductive activity and apoptosis rate of HUVEC

组别	OD 值	细胞凋亡率/%
对照组	0.99 ± 0.05	2.05 ± 0.26
2 mmol/L 组	0.82 ± 0.07 ¹⁾	4.76 ± 0.16 ¹⁾
4 mmol/L 组	0.74 ± 0.05 ¹⁾	8.55 ± 0.63 ¹⁾
8 mmol/L 组	0.56 ± 0.05 ¹⁾	15.63 ± 0.49 ¹⁾
16 mmol/L 组	0.42 ± 0.05 ¹⁾	20.16 ± 0.85 ¹⁾
32 mmol/L 组	0.28 ± 0.03 ¹⁾	30.86 ± 1.94 ¹⁾

与对照组比较,¹⁾ $P < 0.01$ 。

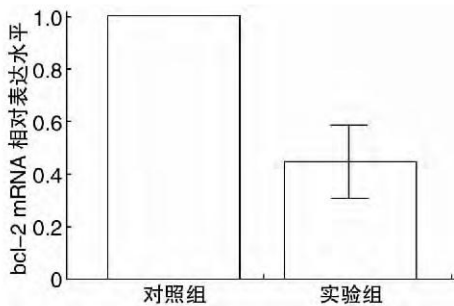
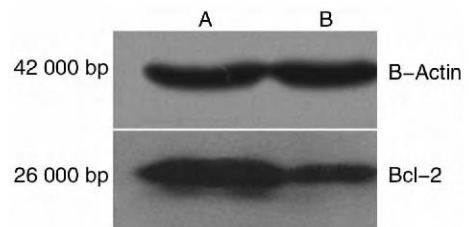


图2 bcl-2 mRNA 表达水平

Figure 2 The expression of bcl-2 mRNA level in each group



a:对照组;b:实验组。

Figure 3 Western blotting 检测各组 HUVEC bcl-2 蛋白表达
 Figure 3 Western blotting analysis of bcl-2 protein expressions of HUVEC

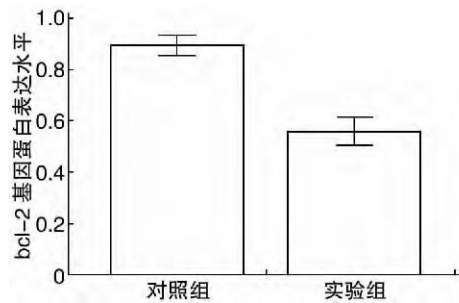


图4 HUVEC 细胞 bcl-2 蛋白表达水平 (bcl-2/β-actin)

Figure 4 bcl-2 protein expression level of HUVEC (bcl-2/β-actin)

包括内皮细胞在内的多种细胞的凋亡有关^[7]。Hcy 是公认的动脉粥样硬化的独立危险因素。既往的资料显示, Hcy 的致细胞凋亡作用, 可能是其促动脉粥样硬化作用的重要机制之一^[8]。

bcl-2 基因是一种原癌基因, 编码产生一个 26 KD 的膜整合蛋白, 主要存在于核膜、线粒体及内质网膜, 是细胞凋亡的关键调节基因^[9], 可通过抑制细胞色素 C 从线粒体透过线粒体膜向胞质的释放, 阻止 caspase9 前体的活化, 从而最终阻止 caspase3 的活化, 防止凋亡的发生。即往对于 bcl-2 基因的研究更多的是集中于肿瘤方面, 但 Hcy 是否是通过调节 bcl-2 基因的表达, 从而影响血管内皮细胞的凋亡, 值得深入研究。

本实验选用 HUVEC 细胞为实验对象, 观察 Hcy 对 HUVEC 细胞的凋亡程度的影响, 及在此过程中 bcl-2 基因表达水平的改变。通过实验我们发现, Hcy 不仅对 HUVEC 细胞的增殖有明显的抑制作用, 而且对 HUVEC 细胞有显著的促凋亡作用, 并呈明显的剂量效应关系 ($P < 0.01$)。在此过程中实验组 bcl-2 的 mRNA 及蛋白表达水平较对照组明显下降 ($P < 0.01$)。这提示 Hcy 的促 HUVEC 细胞凋亡作用可能是通过下调 bcl-2 基因的 mRNA 和蛋白表达这一途径得以实现。我们在前期的研究中也发现, Hcy 可引 Wistar 大鼠主动脉内皮细胞凋亡增加, 并发生脱乱及排列紊乱。可能正是得益于内皮细胞的凋亡与脱落, 泡沫细胞才得以在内膜下浸润、沉积, 进而形成动脉粥样硬化的早期病理改变。但既往也有研究得出了相反的结论, Chiang 等^[10] 发现 Hcy 可抑制细胞凋亡, 诱导细胞增殖, 不同之处在于, Chiang 是在以平滑肌细胞为研究对象时, 得出上述结论。这说明 Hcy 对细胞凋亡的调节是一个复杂、双向的过程, 有一定的组织特异性, 但无论是内皮细胞发生凋亡, 还是平滑肌细胞的增殖, 均有利于动脉粥样硬化的发生。另外本实验并没有明确 Hcy 是如何实现对 bcl-2 基因调控的。有资料表明, Hcy 可引起 bcl-2 启动子区甲基化水平改变。有趣的是甲硫氨酸生成 Hcy 过程中产生的 S-腺苷甲硫氨酸被称为活性甲基, 是 DNA 发生甲基化的甲基供体。但 bcl-2 启动子区甲基化水平改变, 在 Hcy 致 HUVEC 凋亡的过程中, 是否对 bcl-2 基因的表达起到调节作用, 需要进一步的实验研究证实。

综上所述, 我们有理由认为, Hcy 是通过对 bcl-2 基因 mRNA 和蛋白的表达水平的下调, 从而引起内皮细胞的凋亡, 并且可能是其进一步引起动脉粥样硬化的机制之一。但 Hcy 的致动脉粥样硬化作用, 可能还与其促进炎性递质的释放、激活内皮细胞凝血活性、上调 CD40/CD40L 表达等因素有关^[11-14]。但诸因素之间是否存在协同作用, 以及 Hcy 是如何实现的对 HUVEC 细胞 bcl-2 基因表

达的调控, 这些都需要进一步的研究和探索。

参考文献

- [1] HUMPHREY L L, FU R, ROGERS K, et al. Homocysteine level and coronary heart disease incidence: a systematic review and meta-analysis[J]. *Mayo Clin Proc*, 2008, 83: 1203-1212.
- [2] CHRISTEN W G, AJANI U A, GLYNN R J, et al. Blood levels of homocysteine and increased risks of cardiovascular disease: causal or casual? [J]. *Arch Intern Med*, 2000, 160: 422-434.
- [3] BANFI C, BRIOSCHI M, WAIT R, et al. Proteome of endothelial cell-derived procoagulant microparticles [J]. *Proteomics*, 2005, 5: 4443-4455.
- [4] LI L, HU B C, GONG S J, et al. Homocysteine-induced caspase-3 activation by endoplasmic reticulum stress in endothelial progenitor cells from patients with coronary heart disease and healthy donors [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2011, 75: 1300-1305.
- [5] 蒋知俭. 医学统计概论、方法及应用 [M]. 黑龙江: 黑龙江科学技术出版社, 1987: 154-158.
- [6] TYAGI N, OVECHKIN A V, LOMINADZE D, et al. Mitochondrial mechanism of microvascular endothelial cells apoptosis in hyperhomocysteinemia [J]. *J Cell Biochem*, 2006, 98: 1150-1162.
- [7] KAVURMA M M, BHINDI R, LOWE H C, et al. Vessel wall apoptosis and atherosclerotic plaque instability [J]. *Thromb Haemost*, 2005, 3: 465-472.
- [8] LI L, HU B C, GONG S J, et al. Homocysteine-induced caspase-3 activation by endoplasmic reticulum stress in endothelial progenitor cells from patients with coronary heart disease and healthy donors [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2011, 75: 1300-1305.
- [9] VELA L, GONZALO O, NAVAL J, et al. Direct interaction of Bax and Bak with Bcl-2 Homology domain-3 (BH3)-only proteins in living cells revealed by fluorescence complementation [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288: 4935-4946.
- [10] CHIANG J K, SUNG M L, YU H R, et al. Homocysteine induces smooth muscle cell proliferation through differential regulation of cyclins A and D1 expression [J]. *J Cell Physiol*, 2011, 226: 1017-1026.
- [11] ZHANG D, JIANG X, FANG P, et al. Hyperhomocysteinemia promotes inflammatory monocyte generation and accelerates atherosclerosis in transgenic cystathionine beta-synthase-deficient mice [J]. *Circulation*, 2009, 120: 1893-1902.
- [12] MENG S, CIMENT S, JAN M, et al. Homocysteine induces inflammatory transcriptional signaling in monocytes [J]. *Front Biosci*, 2013, 18: 685-695.
- [13] ZHU J, XIE R, PIAO X, et al. Homocysteine enhances clot-promoting activity of endothelial cells via phosphatidylserine externalization and microparticles formation [J]. *Amino Acids*, 2012, 43: 1243-1250.
- [14] PRONTERA C, MARTELLI N, EVANGELISTA V, et al. Homocysteine modulates the CD40/CD40L system [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2007, 49: 2182-2190.

(收稿日期: 2013-06-22)