

胞浆型磷脂酶 A₂ 介导弱氧化修饰低密度脂蛋白诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡*

王 韻^{1,2)} 周 新¹⁾** 汪炳华²⁾ 陈丽达²⁾ 张 冀²⁾ 曹金秀²⁾

(¹⁾ 武汉大学中南医院基因诊断中心, 武汉 430071; ²⁾ 武汉大学医学院生物化学与分子生物学系, 武汉 430071)

摘要 探讨弱氧化修饰低密度脂蛋白 (MM-LDL) 能否诱导人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 凋亡以及胞浆型磷脂酶 A₂ (cPLA₂) 在此过程中的作用. MTT 法测定细胞存活率; 相差显微镜、荧光显微镜和流式细胞仪检测细胞凋亡; ³H-花生四烯酸 (³H-AA) 预标法测定 PLA₂ 活性; 蛋白质印迹检测 cPLA₂ 磷酸化; 激光共聚焦显微镜检测单个细胞内钙离子浓度的变化. 结果表明, MM-LDL (100 ~ 300 mg/L) 作用后的 HUVECs 呈现凋亡典型的形态特征, 凋亡率随 MM-LDL 浓度的增加而上升. MM-LDL 能引起胞内钙离子浓度增加, cPLA₂ 的活化及磷酸化. 15 μmol/L AACOCF₃ 和 5 mmol/L EGTA 在抑制 cPLA₂ 活性的同时, 部分抑制 MM-LDL 诱导的 HUVECs 凋亡. 加入外源性 AA (50 μmol/L) 能逆转 AACOCF₃ 引起的凋亡抑制. 结果提示, cPLA₂ 参与了 MM-LDL 诱导 HUVECs 凋亡的信号传递.

关键词 弱氧化修饰低密度脂蛋白, 细胞凋亡, 胞浆型磷脂酶 A₂, 钙, 花生四烯酸, 内皮细胞

学科分类号 Q255, Q257

血管内皮细胞凋亡是动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 发病机制中的关键事件^[1]. 大量证据表明, 氧化修饰低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 与血管壁细胞凋亡有关^[2]. 鉴于细胞凋亡现象开始于早期 AS 斑块, Napoli 等^[3]推测早期 AS 损伤处发生凋亡的细胞主要不是暴露于重度氧化修饰低密度脂蛋白 (extensively modified oxidized LDL, ox-LDL), 而是弱氧化修饰低密度脂蛋白 (minimally modified oxidized LDL, MM-LDL), 后者含有相对较低的脂质过氧化产物并被证实广泛存在于早期 AS 斑块中^[4]. 胞浆型磷脂酶 A₂ (cytosolic phospholipase A₂, cPLA₂) 与体内花生四烯酸 (arachidonic acid, AA) 的产生有关, 参与了多种细胞的凋亡过程^[5]. 本实验旨在观察 MM-LDL 能否诱导人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 凋亡, 并探讨 cPLA₂ 在此过程中的信号转导作用.

1 材料和方法

1.1 材料

胎牛血清 (FBS) 及 DMEM 培养基购自 Gibco-BRL 公司; 噻唑蓝 (MTT)、p-BPB、花生四烯酸 (AA) 与碘化丙锭 (PI) 均购自 Sigma 公司; AACOCF₃ 与 EGTA 购自 Calbiochem 公司; Hoechst 33258 与 Fluo-3/AM 购自 Molecular Probes 公司; 兔抗人 cPLA₂ 多克隆抗体 (N-216, sc-438) 及辣根

过氧化物酶标记的抗兔 IgG 购自 Santa Cruz 公司; [5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15-³H] -AA 和 ECL 免疫印迹检测试剂盒购自 Amersham 公司; 其余试剂均为国产分析纯.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 人脐静脉内皮细胞的培养参考文献 [6] 的方法. 细胞接种于含 20% FBS、100 U/ml 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 DMEM 培养基中培养. Ⅷ因子相关抗原免疫组化呈阳性鉴定为内皮细胞. 所有实验均采用培养 3 天后呈汇聚生长的第 2 ~ 3 代细胞.

1.2.2 天然-LDL 与 MM-LDL 的制备: 天然 LDL (native LDL, n-LDL) 和 MM-LDL 均参考文献 [4] 的方法制备. 将制备好的 n-LDL 置于含 9 μmol/L FeSO₄ 的磷酸盐缓冲液中, 4℃ 透析 72 h. 然后用不含 FeSO₄ 的磷酸盐缓冲液于 4℃ 继续透析 24 h, 并过滤除菌. 通过测定硫代巴比妥酸反应物值和 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 LDL 的氧化修饰程度. MM-LDL 中 MDA 含量为 (4.2 ± 0.4) μmol/g, 琼脂糖凝胶电泳相对迁移率为 n-LDL 的 1.1 ~ 1.2 倍. n-LDL 和 MM-LDL 均保存于 4℃, 两周内使用.

* 湖北省自然科学基金资助项目 (2003ABA188).

** 通讯联系人.

Tel: 027-87331907, Fax: 027-87307966

E-mail: wangyunyun@sina.com.cn

收稿日期: 2003-09-28, 接受日期: 2003-10-31

1.2.3 MTT 分析: 采用 MTT 法^[7]检测细胞存活率. 细胞存活率按公式计算: 细胞存活率 = 处理组 A_{570} /对照组 $A_{570} \times 100\%$

1.2.4 细胞凋亡的检测: 相差显微镜观察 HUVECs 的形态学变化. 细胞经 DNA 特异性荧光染料 Hoechst33258 染色后在荧光显微镜下观察细胞核形态改变^[8]. 细胞样本经 PI 常规染色后用流式细胞仪检测细胞凋亡率. 简言之, 5×10^5 个细胞经 70% 乙醇于 4℃ 固定过夜. 离心收集细胞后, 加入 RNA 酶 (100 mg/L) 于 37℃ 孵育 30 min, 接着加入 PI (50 mg/L) 于 4℃ 避光染色 30 min 后用于流式细胞仪 (美国 BD 公司, FACS420) 分析. 每个细胞样本检测 10 000 个细胞.

1.2.5 PLA₂ 活性测定: 参照文献 [9] 方法, 通过测定 ³H-AA 预标细胞的 AA 释放率反映 PLA₂ 活性. 细胞以 2×10^5 /孔接种于 6 孔板, 加入 ³H-AA 共同孵育 18 h, 加处理因素前用 PBS 轻轻地漂洗两次. 换无血清 DMEM 培养基或含 5 mmol/L EGTA、20 μmol/L p-BPB 或 15 μmol/L AACOCF₃ 的无血清 DMEM 与细胞预孵育 1 h 后, 再加入 n-LDL 或不同浓度 MM-LDL. 作用 0.5 h、1 h、2 h、和 4 h 后分别收集培养上清液, 5 000 g 离心 2 min. 用液闪计数器 (Beckman 公司, LS1801) 测定上清中的放射活性. 结果以实验组与对照组上清液中游离 ³H-AA 的放射活性比值表示.

1.2.6 激光共聚焦显微镜检测单个细胞内游离钙离子浓度: 参照文献 [10] 并稍作改动. 细胞在含 5 μmol/L fluo-3/AM, 1% 牛血清白蛋白的 Hanks 液中 37℃ 避光染色 1 h. 用不含荧光染料的 Hanks 液洗 3 次, 除去胞外多余的染料. 在 20× 或 63× 物镜下观察细胞内钙离子的荧光图像. 以间隔 5 s 的速度扫描并绘制荧光强度-时间扫描曲线.

1.2.7 免疫印迹检测 cPLA₂ 磷酸化: 经 MM-LDL 处理后的 HUVECs (5×10^6), 加入 100 μl 细胞裂解液 (50 mmol/L Hepes, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 10% 甘油, 1% Triton X-100, 100 μmol/L 钒酸钠, 10 mmol/L 焦磷酸钠, 100 mmol/L 氟化钠, 10 mg/L 亮氨酸, 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟). 冰上裂解 30 min, 15 000 g 离心 20 min. 用 Bradford 法测定上清液中的蛋白质含量. 每孔上样量为 50 μg 蛋白质, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳并转印到聚偏二氟乙烯膜上. 5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后, 加入含有 cPLA₂ 多克隆抗体 (1:2 000 稀释) 和 5% 脱脂奶粉的 TTBS 缓冲液 (20 mmol/L Tris,

pH 7.6, 137 mmol/L NaCl, 0.05% Tween-100) 4℃ 孵育过夜, 再与辣根过氧化物酶标记的抗兔 IgG (1:2 000 稀释) 室温孵育 30 min, 然后用 ECL 试剂进行免疫检测^[11].

1.3 统计学分析

每个实验至少重复 3 次, 每次实验至少有 3 个重复值. 数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示. 统计学分析采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 判定差异有统计学意义.

2 结 果

2.1 MM-LDL 诱导 HUVECs 凋亡

由图 1 可见, 100 ~ 300 mg/L MM-LDL 与 HUVECs 分别作用 12 h, 24 h 和 48 h 后, 能以浓度和时间依赖性的方式降低 HUVECs 存活率. 300 mg/L MM-LDL 作用 48 h 时抑制作用最强 (59.3%). 相反, 300 mg/L n-LDL 对细胞存活率无明显影响. 相差显微镜观察显示, 正常 HUVECs 呈现铺路石样形态; 300 mg/L MM-LDL 处理 48 h 后, 大量 HUVECs 的体积明显缩小、变圆 (图 2a 和图 2b). 细胞经 DNA 染料 Hoechst33258 染色后于荧光显微镜下观察细胞核形态变化. 正常细胞的核较大, 染色质均匀分布于整个核; MM-LDL 处理后的细胞呈现核皱缩、核碎裂和染色质凝聚等特征 (图 2c 和图 2d). DNA 组分分析显示亚 G1 峰, 凋亡率较正常组显著增加, 并呈现浓度依赖性 (表 1). 上述典型特征表明 MM-LDL 可诱导 HUVECs 凋亡.

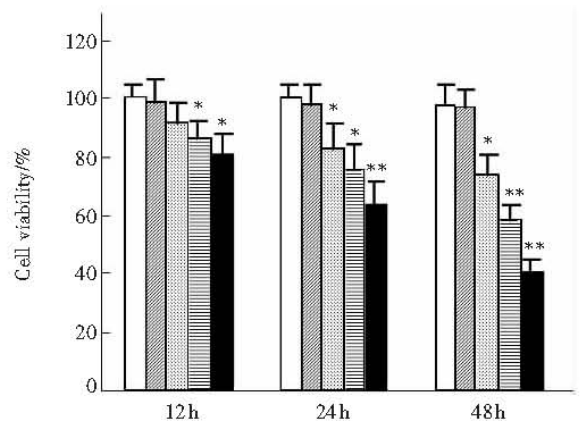


Fig.1 Effects of MM-LDL on the viability of HUVECs HUVECs were treated with n-LDL or various concentration of MM-LDL for indicated times. Cell viability was measured by MTT assay. Each value is the ($\bar{x} \pm s$) of four determinations. □: control; ▨: 300 mg/L n-LDL; ▤: 100 mg/L MM-LDL; ▩: 200 mg/L MM-LDL; ■: 300 mg/L MM-LDL. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus the control group.

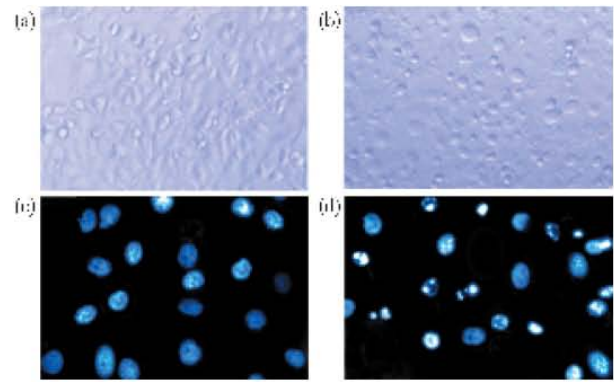


Fig. 2 MM-LDL induced apoptotic morphological changes in HUVECs

Typical morphological changes were observed in HUVECs by phase-contrast microscopy ($\times 200$) and fluorescence microscopy ($\times 400$) after stained with Hoechst33258. Untreated HUVECs presented a cobblestone-like morphology (a) and the nuclei appeared normal (c). In contrast, numerous cells underwent a reduction in size and became round in shape following 48 h exposure to 300 mg/L MM-LDL (b). Nuclei in cells were severely shrunken, fragmented and compacted with condensed chromatin (d).

Table 1 Induction of apoptosis in HUVECs by MM-LDL

Groups	Apoptotic ratio/%
Control	2.9 $\pm$ 0.3
300 mg/L n-LDL	3.1 $\pm$ 0.4
100 mg/L MM-LDL	7.2 $\pm$ 1.6 ¹⁾
200 mg/L MM-LDL	20.7 $\pm$ 3.1 ²⁾
300 mg/L MM-LDL	42.3 $\pm$ 4.6 ²⁾
5 mmol/L EGTA + 300 mg/L MM-LDL	24.6 $\pm$ 3.7 ^{1,3)}
15 μ mol/L AACOCF ₃ + 300 mg/L MM-LDL	28.1 $\pm$ 3.3 ^{2,3)}
15 μ mol/L AACOCF ₃ + 300 mg/L MM-LDL + 50 μ mol/L AA	40.8 $\pm$ 4.1 ²⁾

The apoptotic ratios were measured by FCM. Each value is the ($\bar{x} \pm s$) of three determinations ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ versus the control group; ³⁾ $P < 0.05$ versus 300 mg/L MM-LDL treated-group.

2.2 MM-LDL 诱导 AA 的释放和 cPLA₂ 的活化

表 2 和图 3a 表明, MM-LDL 能浓度和时间依赖性地刺激³H-AA 释放, 即引起 PLA₂ 的活化. 在有 EGTA (5 mmol/L) 存在时, AA 释放减少了 24.3%, 提示 MM-LDL 引起 PLA₂ 的活化是钙离子依赖性的. 有两种截然不同的钙离子依赖性 PLA₂ 参与使 AA 从细胞膜上释放的反应^[5]: 分泌型 PLA₂ (secretory PLA₂, sPLA₂) 和 cPLA₂. 预先加入 sPLA₂ 特异性抑制剂 *p*-BPB (20 μ mol/L), AA 释放并未减少. 相反, 15 μ mol/L AACOCF₃ (此浓度仅能抑制 cPLA₂ 而不抑制钙离子非依赖性的

PLA₂^[12]) 使 AA 释放减少了 35%. 基于上述结果, MM-LDL 可能激活了 cPLA₂ 而非 sPLA₂.

Table 2 Stimulation ³H-AA release by MM-LDL in HUVECs

Groups	³ H-AA release (% over control)
300 mg/L n-LDL	103.5 $\pm$ 5.6
100 mg/L MM-LDL	135.6 $\pm$ 8.4 ¹⁾
200 mg/L MM-LDL	171.8 $\pm$ 10.4 ¹⁾
300 mg/L MM-LDL	221.1 $\pm$ 15.8 ²⁾
5 mmol/L EGTA + 300 mg/L MM-LDL	167.4 $\pm$ 7.6 ^{2,3)}
20 μ mol/L <i>p</i> -BPB + 300 mg/L MM-LDL	204.2 $\pm$ 14.2 ²⁾
15 μ mol/L AACOCF ₃ + 300 mg/L MM-LDL	143.8 $\pm$ 8.7 ^{1,3)}

³H-AA release was measured after 2 h of treatment of prelabeled HUVECs with various reagents as described in Materials and methods. Each value is the ($\bar{x} \pm s$) of three determinations. ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ versus the control group; ³⁾ $P < 0.05$ versus 300 mg/L MM-LDL-treated group.

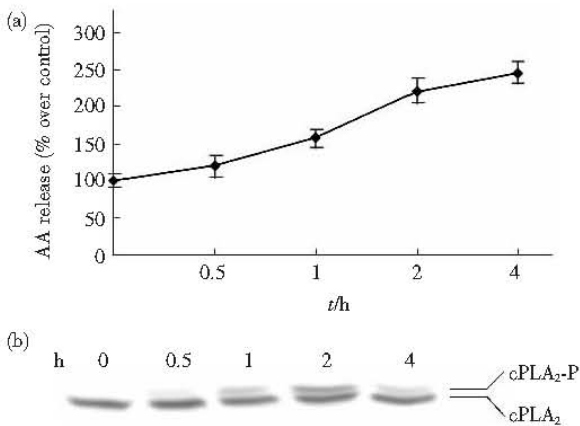


Fig. 3 The time course of MM-LDL-induced AA release and cPLA₂ phosphorylation

(a) ³H-AA prelabeled cells were exposed to 300 mg/L MM-LDL for the indicated time points. AA release was determined as described in Materials and methods and expressed as fold of increase compared with the control. (b) Phosphorylation of cPLA₂ was evaluated by Western blot of cell lysates of HUVECs treated with 300 mg/L MM-LDL for 0.5, 1, 2, and 4 h, respectively. Samples (50 μ g protein per lane) were subjected to immunoblotting with antibodies against cPLA₂, recognizing both phosphorylated and nonphosphorylated cPLA₂.

2.3 MM-LDL 引起钙离子内流

在大多数已研究的细胞中, 细胞内钙离子浓度的增加能激活 cPLA₂^[13, 14]. 为此, 我们检测 MM-LDL 对胞内钙离子浓度的影响. 图 4a 示单个

HUVEC 内钙离子的荧光图像, 可见胞内荧光强度分布不均匀, 胞质区荧光强度较低而中央核周区荧光强度较高. 加入 MM-LDL (100 mg/L) 后, 胞内荧光强度迅速增加, 约在 55 s 时达到峰值, 随后逐渐下降至基线水平 (图 4b 左图). 为了确定增加的钙离子是来源于胞内钙库的释放还是胞外钙的内流, 检测了在胞外钙离子螯合剂 EGTA 存在时, MM-LDL 对胞内钙离子浓度的影响. 以 EGTA (5 mmol/L) 与 HUVECs 预孵育, 能降低静息水平的钙离子浓度并显著抑制 MM-LDL 引起的钙离子浓度的升高 (35.5%) (图 4b 右图), 提示有钙内流参与. 鉴于 EGTA 未能完全抑制胞内钙离子的增加, 我们认为细胞内钙库的释放可能也参与了 MM-LDL 引起的钙应答.

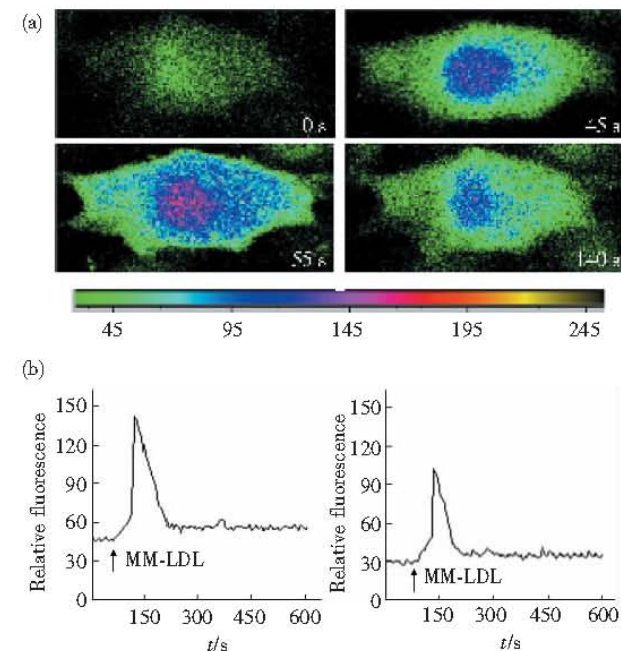


Fig. 4 Elevation of $[Ca^{2+}]_i$ in HUVEC by MM-LDL

Changes of $[Ca^{2+}]_i$ in single cell were monitored by LSCM. (a) An image of the same cell is shown at indicated time points after stimulation with 100 mg/L MM-LDL. (b) Effect of MM-LDL in the absence (left) or presence (right) of 5 mmol/L EGTA on intracellular $[Ca^{2+}]_i$.

Arrows indicate the time point of addition of MM-LDL.

2.4 MM-LDL 诱导 cPLA₂ 磷酸化

很多研究表明, cPLA₂ 第 505 位丝氨酸的磷酸化是其活化过程中的一部分^[13, 15]. 本实验探讨了 cPLA₂ 的活化是否伴随其磷酸化. 如图 3b 所示, 未处理的 HUVECs 中的 cPLA₂ 主要为迁移较快的非磷酸化形式. 细胞经 300 mg/L MM-LDL 作用后,

磷酸化 cPLA₂ 的比例增加. MM-LDL 作用 0.5 h 后即可检测到, 2 h 时达最多, 4 h 时已下降, 但仍高于对照组. 而且, cPLA₂ 磷酸化时相与其活化时相一致, 提示 cPLA₂ 的磷酸化参与了 MM-LDL 诱导的 cPLA₂ 活化过程.

2.5 抑制 cPLA₂ 活性降低 MM-LDL 致凋亡作用

直接抑制 cPLA₂ 活性或通过遏制胞内钙离子增加间接抑制 cPLA₂ 活性, 以观察 cPLA₂ 活化与 MM-LDL 诱导 HUVECs 凋亡间的关系. 细胞先与 15 μ mol/L AACOCF₃ 或 5 mmol/L EGTA 预孵育 1 h, 再加入 300 mg/L MM-LDL 以诱导 HUVECs 凋亡. 结果表明, AACOCF₃ 和 EGTA 能使细胞凋亡率分别下降 33.6% 和 41.8%. 若同时加入外源性的 AA 能逆转 AACOCF₃ 对凋亡的抑制 (表 1).

3 讨 论

大量研究证实, 氧化修饰 LDL 对血管内皮细胞的毒性作用在动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 的起始阶段中具有重要的作用^[1, 2]. 氧化修饰 LDL 的细胞毒作用部分归因于它的致细胞凋亡效应^[2]. 体外研究表明, 氧化修饰 LDL 致细胞凋亡机制与 Fas 受体和配体, caspase-3 的活化, Bcl-2, STAT 和 NF- κ B 等信号分子的调节有关^[2]. 然而, 氧化修饰 LDL 致凋亡的信号通路与 AS 病变演化间的关联仍不清楚, 因为以往多数实验采用的都是重度氧化修饰的 ox-LDL, 一般认为它并不存在于早期 AS 斑块中^[3]. 与重度修饰的 ox-LDL 相反, MM-LDL 作为 AS 早期危险因子, 与 AS 起始阶段动脉壁中发生修饰的 LDL 具有很多相似的特征^[4]. 因此, 我们选择 MM-LDL 作为研究的对象.

本实验首次发现 MM-LDL (100 ~ 300 mg/L) 能诱导 HUVECs 凋亡. 细胞经 MM-LDL 处理后, 引起胞内钙离子增加, cPLA₂ 被活化及磷酸化. 抑制钙内流及 cPLA₂ 的活性, 对 MM-LDL 的致凋亡效应具有一定的保护作用. 加入外源性 AA 能逆转 AACOCF₃ 引起的凋亡率下降. 上述结果提示, 钙、cPLA₂ 及其产物 AA 参与了 MM-LDL 诱导 HUVECs 凋亡的信号转导途径.

PLA₂ 是一类能水解磷脂 sn-2 位酯键释放出游离的脂肪酸和溶血磷脂的酯酶超家族^[5], 分为三大类, 包括分泌型、胞浆型和钙离子非依赖型^[5]. 越来越多的研究证实 PLA₂ 具有介导细胞凋亡的作用, 发挥作用的 PLA₂ 的类型取决于细胞的种类和作用因素^[5]. 在这些亚型中, cPLA₂ 对 sn-2 位为

AA 的磷脂具有优先选择性^[5, 13], 并被证实在 25-羟胆固醇诱导的巨噬细胞和成纤维细胞凋亡中发挥关键作用^[11]. 本实验也提示, cPLA₂ 的活化参与了 MM-LDL 引起的 AA 释放和 HUVECs 凋亡.

我们进一步研究了 MM-LDL 激活 cPLA₂ 的机制. 众所周知, 细胞内钙离子浓度的升高与 cPLA₂ 的活化有关. 钙离子能结合至 cPLA₂ 的 C2 结构域, 继而促进 cPLA₂ 从胞浆快速转位至核被膜和内质网膜而活化^[13, 14]. MM-LDL 部分通过促进胞外钙内流引起 HUVEC 内钙离子浓度快速增加. 用 EGTA 螯合胞外钙离子, 在减少胞内钙增加的同时也抑制了 AA 的释放, 表明钙离子参与了 MM-LDL 引起的 cPLA₂ 的活化. 与 AACOCF₃ 相比, EGTA 对 AA 释放的抑制作用较小而对 HUVECs 凋亡的抑制作用较强, 提示钙离子作为一种关键的上游信号分子, 除了活化 cPLA₂ 外, 还可能启动其他与 MM-LDL 诱导的凋亡相关的信号转导途径. 研究表明, 胞内钙离子增加可引起核酸内切酶的活化、线粒体膜的去极化以及活性氧的形成从而启动细胞凋亡^[16]. cPLA₂ 活化的另一机制是通过 PKC 或 p42/44 MAPK 途径使其第 505 位的丝氨酸残基发生磷酸化^[13, 15]. 蛋白质印迹结果表明, MM-LDL 确实能引起 cPLA₂ 磷酸化. MM-LDL 作用 0.5 h 后, 随着磷酸化的 cPLA₂ 比例逐渐增加, ³H-AA 释放也加快, 4 h 时磷酸化的 cPLA₂ 比例已下降, ³H-AA 释放也相应减慢. 尽管磷酸化本身不足以激活 cPLA₂, 但对 cPLA₂ 的活化具有促进作用^[13]. 至于 cPLA₂ 通过哪条途径被磷酸化还不清楚, 尚在研究中.

激活 cPLA₂ 进而引起酶促的 AA 释放, 后者能通过环氧化酶、脂氧化酶和细胞色素 P450 代谢生成各种类花生烷样化合物^[17]. 在多种细胞中, AA 和它的各种生物活性代谢物能通过氧化应激来发挥细胞毒作用^[18, 19]. 我们的研究也提示, 由 cPLA₂ 活化产生的 AA 可能是 MM-LDL 诱导 HUVECs 凋亡过程中的一种重要信号分子. AA 是否通过氧化生成其他代谢产物来发挥其致凋亡效应, 还有待进一步研究.

总之, 本研究表明 MM-LDL 在体外能诱导 HUVECs 凋亡. 胞内钙离子增加所激活的 cPLA₂ 在此过程中发挥重要作用, AA 可能是该途径中的一种重要的脂质信号分子. 同时也提示, cPLA₂ 特异性抑制剂的使用可能为防治 AS 提供一条有益的途径.

参 考 文 献

- Choy J C, Granville D J, Hunt D W, *et al.* Endothelial cell apoptosis: biochemical characteristics and potential implications for atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol*, 2001, **33** (9): 1673 ~ 1690
- Salvayre R, Auge N, Benoist H, *et al.* Oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, 2002, **1585** (2 ~ 3): 213 ~ 221
- Napoli C, Quehenberger O, de Nigris F, *et al.* Mildly oxidized low density lipoprotein activates multiple apoptotic signaling pathways in human coronary cells. *FASEB J*, 2000, **14** (13): 1996 ~ 2007
- Liao F, Berliner J A, Mehrabian M, *et al.* MM-LDL is biologically active *in vivo* in mice. *J Clin Invest*, 1991, **87** (6): 2253 ~ 2257
- Taketo M M, Sonoshita M. Phospholipase A₂ and apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, 2002, **1585** (2 ~ 3): 72 ~ 76
- Jaffe E A, Nachman R L, Becher C G, *et al.* Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. *J Clin Invest*, 1973, **52** (11): 2745 ~ 2756
- Liu S Y, Feng Y J. Sulindac derivative-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cell line ECV304. *Chin Med J*, 2002, **115** (7): 1074 ~ 1077
- 王 颀, 汪炳华, 代赵明, 等. 高浓度花生四烯酸诱导小鼠成纤维细胞 L929 凋亡的研究. *中国病理生理杂志*, 2003, **19** (6): 825 ~ 828
Wang Y, Wang B H, Dai Z M, *et al.* Chinese Journal of Pathophysiology, 2003, **19** (6): 825 ~ 828
- Skin K J, Chung C H, Wang Y A, *et al.* Phospholipase A₂-mediated Ca²⁺ influx by 2, 2', 4, 6-tetrachlorobiphenyl in PC12 cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2002, **178** (1): 37 ~ 43
- Han W J, Zhang S Z, Han D Y, *et al.* Cholinergic agonists increase intracellular calcium concentration in guinea pig vestibular hair cells. *Chin Med J*, 2001, **114** (7): 714 ~ 717
- Panini S R, Yang L, Rusinol A E, *et al.* Arachidonate metabolism and the signaling pathway of induction of apoptosis by oxidized LDL/oxysterol. *J Lipid Res*, 2001, **42** (10): 1678 ~ 1686
- Yasuda Y, Yoshinaga N, Murayama T, *et al.* Inhibition of hydrogen peroxide-induced apoptosis but not arachidonic acid release in GH3 cell by EGF. *Brain Res*, 1999, **850** (1 ~ 2): 197 ~ 206
- Leslie C C. Properties and regulation of cytosolic phospholipase A₂. *J Biol Chem*, 1997, **272** (27): 16709 ~ 16712
- Glover S, de Carvalho M S, Bayburt T, *et al.* Translocation of the 85-kDa phospholipase A₂ from cytosol to the nuclear envelope in rat basophilic leukemia cells stimulated with calcium ionophore or IgE/antigen. *J Biol Chem*, 1995, **270** (25): 15359 ~ 15367
- Wheeler-Jones C, Abu-Ghazaleh R, Cospedal R, *et al.* Vascular endothelial growth factor stimulates prostacyclin production and activation of cytosolic phospholipase A₂ in endothelial cells via p42/p44 mitogen-activated protein kinase. *FEBS Lett*, 1997, **420** (1): 28 ~ 32
- McConkey D J, Orrenius S. The role of calcium in the regulation of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, **239** (2): 357 ~ 366
- Pompeia C, Freitas J J, Kim J S, *et al.* Arachidonic acid cytotoxicity in leukocytes: implications of oxidative stress and eicosanoid synthesis. *Biol Cell*, 2002, **94** (4 ~ 5): 251 ~ 265
- 王 颀, 汪炳华, 陈丽达, 等. 花生四烯酸诱导人脐静脉内皮细胞氧化损伤和凋亡. *基础医学与临床*, 2004, **24** (1): 61 ~ 65
Wang Y, Wang B H, Chen L D, *et al.* Basic Med Sci Clin, 2004, **24** (1): 61 ~ 65
- Wolf L A, Laster S M. Characterization of arachidonic acid-induced apoptosis. *Cell Biochem Biophys*, 1999, **30** (3): 353 ~ 368

Cytosolic Phospholipase A₂ Mediates MM-LDL-induced Apoptosis in Human Umbilical Vein Endothelial Cells*

WANG Yun^{1, 2)}, ZHOU Xin¹⁾ **, WANG Bing-Hua²⁾, CHEN Li-Da²⁾, ZHANG Ji²⁾, CAO Jin-Xiu²⁾

(¹⁾ *Gene Diagnosis Center of Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, China;*

²⁾ *Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medicine, Wuhan University, Wuhan 430071, China)*

Abstract In order to investigate if minimally modified low-density lipoprotein (MM-LDL) could induce apoptosis in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and the potential role of cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂) in this process. Cell viability was determined by MTT assay, cell apoptosis was assessed by phase-contrast microscopy, fluorescence microscopy and flow cytometry (FCM), PLA₂ activity was determined by measuring the release of ³H-arachidonic acid (³H-AA) from prelabeled cells, phosphorylation of cPLA₂ was analyzed using Western blot, changes of [Ca²⁺]_i in single cell were monitored by laser scanning confocal microscope (LSCM). The results showed that MM-LDL (100 ~ 300 mg/L) induced decrease in cell viability in a dose- and time-dependent manner. After 48 h exposure to 300 mg/L MM-LDL, apoptosis with cell shrinkage, chromatin condensation and nuclear fragmentation were observed. FCM assay showed that the apoptotic ratio rose with an increase in concentration of MM-LDL. MM-LDL caused a rapid elevation of [Ca²⁺]_i in HUVECs partly through calcium influx. Incubation with MM-LDL induced calcium-dependent cPLA₂ activation companied with its phosphorylation. Inhibition of cPLA₂ activity with 5 mmol/L EGTA or 15 μmol/L AACOCF₃ reduced MM-LDL-induced apoptosis by 41.8% and 33.6%, respectively. Addition of exogenous AA (50 μmol/L) reversed AACOCF₃-induced reduction of apoptosis. It was demonstrated that MM-LDL induced apoptosis in HUVECs. cPLA₂ activated by increase in intracellular Ca²⁺ was involved in the signal pathway.

Key words minimally modified low-density lipoprotein, apoptosis, cytosolic phospholipase A₂, calcium, arachidonic acid, endothelial cell

* This work was supported by a grant from The Natural Sciences Foundation of Hubei Province (2003ABA188).

** Corresponding author. Tel: 86-27-87331907, E-mail: wangyunyun@sina.com.cn

Received: September 28, 2003 Accepted: October 31, 2003