

高静水压培养对内皮酯酶表达的影响*

许灿新¹⁾ 王 春¹⁾ 朱炳阳¹⁾ 高治平¹⁾ 罗迪贤¹⁾ 廖端芳^{1, 2)**}

(¹⁾ 南华大学生命科学研究中心药物药理研究所, 衡阳 421001; ²⁾ 湖南中医药大学中医分子诊断研究室, 长沙 410208)

摘要 探讨高静水压培养对内皮酯酶表达的影响及其机制。分大气压(0 mmHg)和高于 1 个标准大气压的递增压力(120、150、180 mmHg)培养人脐静脉内皮细胞, 用蛋白酶体抑制剂 MG132 进行干预。RT-PCR 检测内皮酯酶 mRNA 的表达, 间接免疫荧光技术和流式细胞术检测内皮酯酶蛋白的表达。结果显示, 高静水压培养明显促进内皮酯酶 mRNA 和蛋白质的表达, 180 mmHg 培养 24 h 内皮酯酶 mRNA 的表达较对照组上调 2.2 倍($P < 0.001$), 内皮酯酶蛋白表达较对照组上调 2.54 倍($P < 0.001$)。蛋白酶体抑制剂 MG132 干预明显抑制 180 mmHg 培养诱导的内皮酯酶 mRNA 的表达, MG132 干预组内皮酯酶 mRNA 表达约为 180 mmHg 培养组的 50% ($P < 0.05$)。结果说明, 高静水压上调内皮酯酶 mRNA 和蛋白质的表达, 其机制可能与核因子- κ B 活化有关。

关键词 高静水压, 内皮酯酶, 核因子- κ B, 内皮细胞

学科分类号 Q66

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00732

内皮酯酶(endothelial lipase, EL)是唯一由血管内皮细胞合成的甘油三酯脂酶基因家族新成员, 1999 年 Jaye 等和 Hirata 等两个小组分别独立克隆出了 EL 基因(endothelial lipase gene, LIPG)^[1-2]。EL 主要有磷脂酶 A1 的活性, 能够降低高密度脂蛋白胆固醇水平, 促进动脉粥样硬化(As)的形成和发展^[3-6], 并且也促进单核/巨噬细胞与血管内皮细胞黏附及动脉粥样硬化斑块面积进一步扩大^[7]。

细胞因子和物理因素调节 EL 的表达。细胞因子(IL-1 β 、TNF- α)、血管紧张素 II 和佛波酯均促进 EL 的表达, 核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 调控 EL 的表达^[8-9]。高血压时血管壁的剪切力(shear stress)、血管张力(cyclic stretch)和静水压力(hydrostatic stress)均明显升高。研究报道高血压大鼠模型中 EL 表达显著增加^[10]。剪切力(shear stress)明显增加内皮细胞 EL 表达, 血管张力亦使 EL mRNA 表达升高^[11]。静水压力垂直直接作用于血管壁内皮细胞, 但关于高血压时血管壁侧压即静水压对 EL 表达的影响尚未见报道。

本研究在体外模拟高静水压即高压培养血管内皮细胞, 观察高压对 EL mRNA 及蛋白质表达的影响, 并初步探讨压力诱导 EL 表达的分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人脐静脉内皮细胞株(HUVEC-12)由中南大学湘雅药学院提供, 源于美国典型培养物保藏中心(ATCC)。37℃、5% CO₂ 条件, HUVEC-12 细胞培养于含体积分数为 10%胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素的 DMEM 完全培养基中, 待生长融合后, 细胞用含 1%胎牛血清的 DMEM 洗 3 次, 并用 1%胎牛血清的 DMEM 静止培养 24 h, 然后高压处理细胞。

1.2 RT-PCR

细胞总 RNA 的提取按 Trizol 抽提试剂说明书进行。概言之, 每个 50 ml 培养瓶加 1 ml Trizol, 反复吹打后, 裂解 10 min, 将裂解液收集于 1.5 ml

* 国家自然科学基金资助项目(30770868, 30971170), 国家重点基础研究发展计划(973)子项目(2006CB503808), 湖南省教育厅科研基金资助项目(06C710)和湖南省卫生厅项目(B2006-094)。

** 通讯联系人。

Tel: 0734-8281308, E-mail: dfliao66@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-12-09, 接受日期: 2010-02-22

的 EP 管中, 加入 200 μl 氯仿, 振荡 15 s, 常温下放置 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 加入 500 μl 异丙醇, -20 $^{\circ}\text{C}$ 过夜. 次日, 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 75%乙醇清洗一次, 空气干燥 5 min, 用 30 μl DEPC 水溶解. 取 5 μl 稀释 200 倍测 A 值, 计算 RNA 含量; 另取 5 μl 做凝胶电泳. RT 反应体系组成: 25 mmol/L MgCl_2 4 μl , 10 $\times$ 缓冲液 2 μl , dNTP 2 μl , RNase 抑制剂 0.5 μl , ALV 逆转录酶 1 μl , Oligo dT 1 μl , 每 20 μl 体系中含 RNA 3 μg , 按以下条件进行反应: 65 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 42 $^{\circ}\text{C}$ 90 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 制备的 cDNA -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存. PCR 反应体系组成: 双蒸水 10 μl , 2 $\times$ PCR 反应液 8 μl , cDNA 1 μl , 引物 1 μl (1 $\mu\text{mol/L}$). 混匀后, 按以下条件进行反应: 变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 退火 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 进行 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min. 结束后, 各取产物 5 μl , 混合 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 (50 V, 60 min), 用全自动凝胶分析系统灰度扫描分析, 结果用 3 个样本的平均相对单位 EL/GAPDH 表示. EL 引物: 正向引物, 5' CCA GGA GAA CAT CTG TGC CAA CG 3', 反向引物, 5' AGG CTC GGG TCC TAT TCC CAA AA 3' (387 bp); GAPDH 引物: 正向引物, 5' TCA CCA TCT TCC CAG GCG CGA G 3', 反向引物, 5' TGT CGC TGT TGA AGT CAG AG 3' (696 bp).

1.3 间接免疫荧光技术

取对数生长期细胞, 以 4×10^4 /孔的密度接种于 24 孔培养板, 不同因素处理后, 各组细胞用预冷的 PBS 洗涤 3 次, 每孔加固定液 (甲醇: 冰乙酸 3: 1) 200 μl , 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 15 min, 用预冷的 PBS 洗涤 3 次, 加入一抗 (1: 200) 200 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 预冷的 PBS 洗涤 3 次, 加入罗丹明标记的二抗 (1: 50) 50 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 荧光倒置显微镜下观察并照像.

1.4 流式细胞术

不同因素处理后, 用质量浓度为 0.25% 胰蛋白酶消化贴壁的 HUVEC-12 细胞, 1 000 r/min 离心 10 min, 去上清, PBS 洗涤 2 次, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{L}$, 加入一抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 45 min 后, 再加入 FITC 标记的二抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 45 min 后, PBS 重悬细胞, 离心去上清, 1 ml 0.5% 多聚甲醛固定, 上流式细胞仪检测平均荧光强度. 测定数据按流式细胞仪所配置的软件进行数据处理.

1.5 统计学分析

数据均用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示. 用 SPSS11.0 进行统计处理, 组间比较用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 检验, 后用最小有意义差异 t 检验 (least significant different, LSD- t) 进行均数间的多重比较, 以 $P < 0.05$ 判定差异有无统计学意义.

2 结 果

2.1 压力对 EL mRNA 表达的影响

HUVEC-12 细胞 180 mmHg 培养 3、6 和 12 h 组, EL mRNA 表达较对照组上调约 1.8 倍 ($P < 0.01$), 但无时间依赖性; 180 mmHg 培养 24 h 组 EL mRNA 表达最高, 较对照组升高约 2.4 倍 ($P < 0.001$) (图 1).

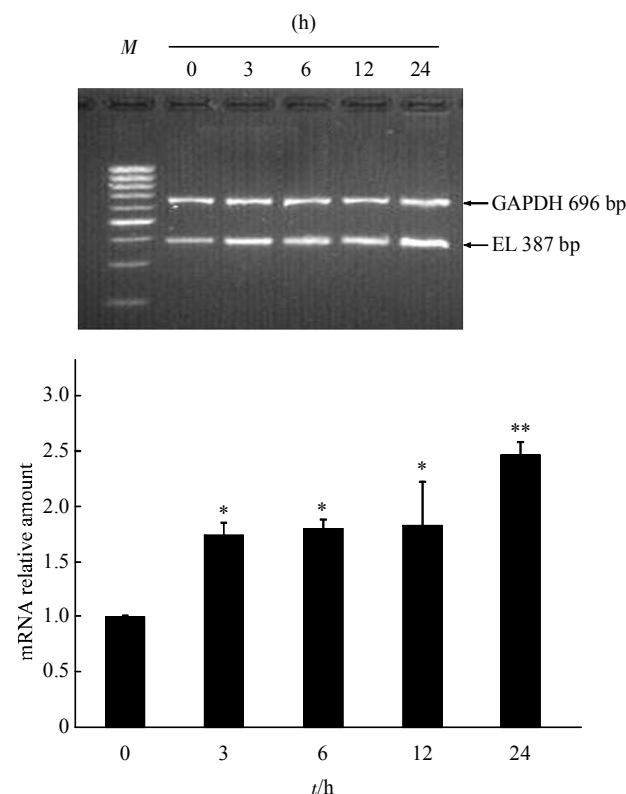


Fig. 1 Effect of 180 mmHg treatment for different time on EL mRNA expression

$n=3$, * $P < 0.01$ vs 0 h group; ** $P < 0.001$ vs 0 h group.

HUVEC-12 细胞大气压和 120 mmHg 培养 24 h 组 EL mRNA 表达都较低, 150 mmHg 和 180 mmHg 培养 24 h 组 EL mRNA 表达较大气压组分别增加 2.2 和 2.4 倍 ($P < 0.001$) (图 2).

2.2 压力对 EL 蛋白表达的影响

免疫荧光结果显示: 正常细胞荧光较弱, EL 蛋白表达很低; 高压培养组细胞荧光增强, EL 蛋

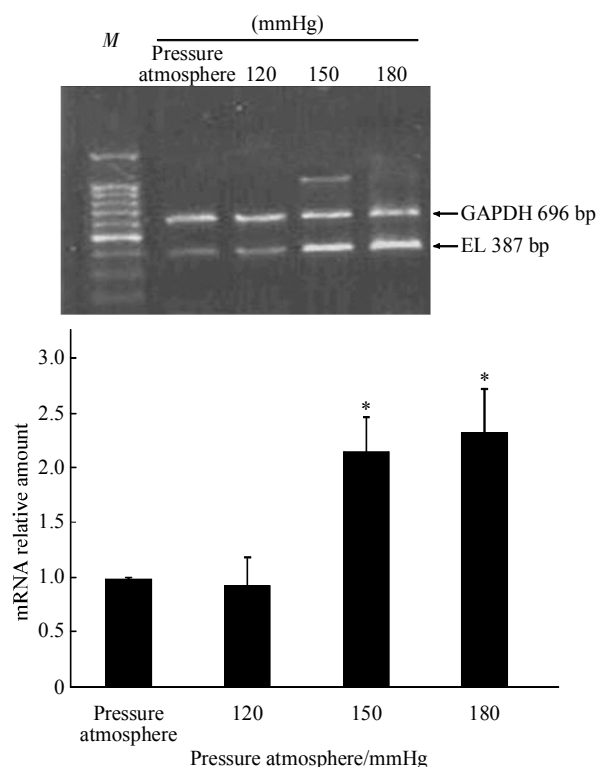


Fig. 2 Effect of different pressure treatment for 24 h on EL mRNA expression

$n=3$, * $P < 0.001$ vs pressure atmosphere group.

白表达增加, 120 mmHg 组 EL 细胞荧光轻微增强, 150 和 180 mmHg 组细胞荧光明显增强, EL 蛋白表达明显增加(图 3)。

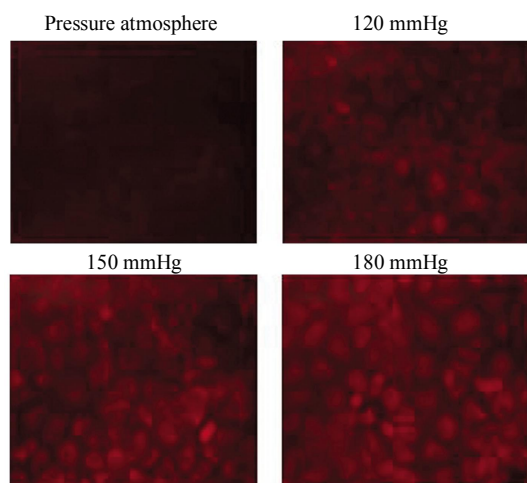


Fig. 3 Effect of different pressure treatment for 24 h on EL protein expression (10×20)

流式细胞术结果显示: 高压促进 EL 蛋白表达, 120 mmHg 培养 24 h 组 EL 蛋白表达仅增加 1.19 倍, 150 和 180 mmHg 培养 24 h 组 EL 蛋白表达较大气压组分别增加 1.97 倍和 2.28 倍(图 4, $P < 0.001$)。

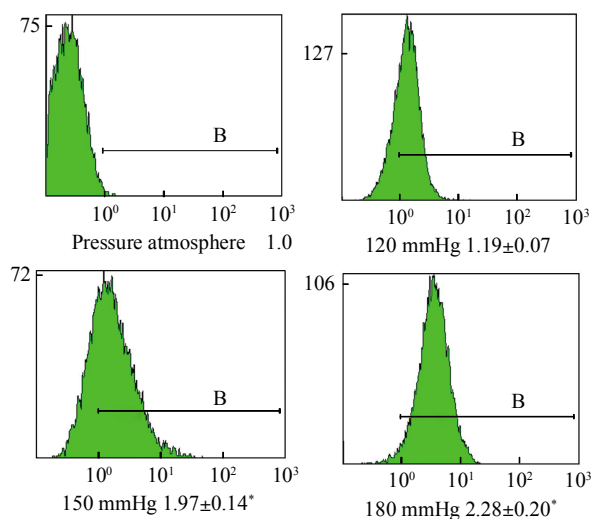


Fig. 4 Effect of different pressure treatment for 24 h on EL protein expression

$n=3$, $\bar{x} \pm s$, * $P < 0.001$ vs pressure atmosphere group.

2.3 MG132 干预对高压诱导 EL mRNA 表达的影响

HUVEC-12 细胞 180 mmHg 培养 24 h 组 EL mRNA 较大气压组升高约 2.5 倍 ($P < 0.001$), MG132 干预显著抑制压力诱导的 EL mRNA 表达, MG132 处理的 180 mmHg 培养 24 h 组 EL mRNA 表达约为 180 mmHg 培养组的 50% ($P < 0.05$). MG132 组与大气压组 EL mRNA 的表达基本无差别(图 5)。

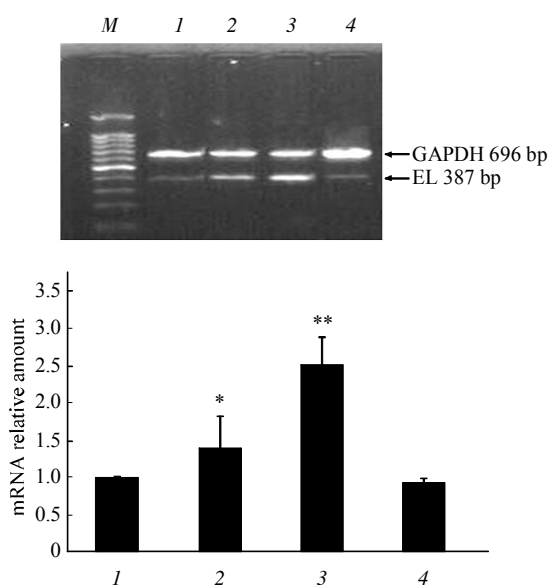


Fig. 5 MG132 attenuated the induction of EL mRNA expression by 180 mmHg

1: Pressure atmosphere; 2: MG132 + 180 mmHg; 3: 180 mmHg; 4: MG132. $n=3$, * $P < 0.05$ vs group 3, ** $P < 0.001$ vs group 1, 4.

3 讨 论

近年来,对于动脉粥样硬化和高血压的研究已逐渐偏重于血管内皮细胞^[12],在探讨有关血管内皮细胞功能紊乱与动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发病关系的研究中,国内外许多学者均采用人脐静脉内皮细胞作为研究对象来间接反映血管内皮细胞病理的变化^[13].血管内皮细胞始终受到血管中流动血液的流体力学作用,已知高血压致使血流冲击血管内膜,导致管壁增生、增厚,管腔狭窄.管壁内膜受损后易致胆固醇、脂质等沉积,加重了动脉粥样斑块形成.血管内皮不仅是存在于血液与血管平滑肌之间的屏障结构,而且还是一个重要的内分泌器官.高血压时,血管壁侧压即静水压可调节内皮细胞合成和分泌内皮素-1、前列环素、纤维蛋白溶解酶原激活物抑制因子-1.本实验研究发现,短时的高压刺激3~24 h明显上调 EL mRNA 和蛋白质表达,150 和 180 mmHg EL mRNA 和蛋白质表达显著增加,临床上诊断为轻度和中度高血压时收缩压的水平为 150 和 180 mmHg,这可能是高血压病人 EL 表达水平为什么明显高于正常人群的部分原因.EL 在 As 的形成过程起了很重要的作用,该研究表明,血液的流动所产生的机械应力除了剪切力和血管张力对心血管疾病产生很大的影响,高血压时静水压力同样也对心血管疾病的发生发展有着重要的意义,进一步扩展了血流动力学对心血管疾病所引起的病理生理学机制.

血液动力学作为外部信息,如何影响血管的生理功能以及相关疾病的发生和发展,也就是说,血液动力学信息如何传入细胞,进而引发血管重构等病理生理改变,已成为近年来国内外研究的热点问题.有研究表明,血液流动作用于相应的血管内皮细胞,调控由 G 蛋白和核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B) 介导的信号转导通路,从而调节内皮细胞多种基因表达,导致血管的结构和功能改变^[14].在血管重构早期,血液流动作用于血管,可诱导单核细胞与血管内皮细胞黏附、迁移以及加快血小板聚集,这些作用与细胞内 NF- κ B 有关.大量研究表明^[15],NF- κ B 是免疫、炎症和应激反应的主要调控因子,故 NF- κ B 的激活可能是血管重构的始动机制.静息状态下,NF- κ B 与其抑制亚单位(inhibitor of nuclear factor κ b, I κ B) 结合,以无活性的形式存在于细胞浆中,NF- κ B 的激活主要是通过降解 I κ B 来实现的.我们先前的实验^[16]发现,高压培养细

胞 3~24 h I κ B α 蛋白明显降解,其表达显著降低,细胞 NF- κ B 明显活化转位.本实验研究发现蛋白酶抑制剂 MG132(通常作为 NF- κ B 的阻断剂)干预可以抑制压力诱导的 EL mRNA 的表达.这些结果表明压力诱导 EL 的表达与激活 I κ B α /IKK 信号通路,促进 NF- κ B 活化有关.

根据上述实验结果我们推测:静水压力可能促进血管内皮细胞分泌细胞因子(IL-1 β , TNF- α)和血管活性物质(血管紧张素 II),继而这些因子通过相关受体作用血管内皮细胞激活 NF- κ B,静水压力也可能直接作用相关受体,如剪切力受体整合素,激活 NF- κ B.由于 EL 表达不完全受 NF- κ B 调控,静水压力还可能通过 G 蛋白等其他信号通路激活其他转录因子,具体机制有待进一步研究.

参 考 文 献

- [1] Jaye M, Lynch K J, Krawiec J, *et al.* A novel endothelial-derived lipase that modulates HDL metabolism. *Nat Genet*, 1999, **21** (4): 424-428
- [2] Hirata K, Dichek H L, Cioffi J A, *et al.* Cloning of a unique lipase from endothelial cells extends the lipase gene family. *J Biol Chem*, 1999, **274**(20): 14170-14175
- [3] Mank-Seymour A R, Durham K L, Thompson J F, *et al.* Association between single-nucleotide polymorphisms in the endothelial lipase (LIPG) gene and high-density lipoprotein cholesterol levels. *Biochim Biophys Acta*, 2004, **1636**(1): 40-46
- [4] Cilingiroglu M, Ballantyne C. Endothelial lipase and cholesterol metabolism. *Curr Atheroscler Rep*, 2004, **6**(2): 126-130
- [5] Jaye M, Krawiec J. Endothelial lipase and HDL metabolism. *Curr Opin Lipidol*, 2004, **15**(2): 183-189
- [6] Badellino K O, Rader D J. The role of endothelial lipase in high-density lipoprotein metabolism. *Curr Opin Cardiol*, 2004, **19** (4): 392-395
- [7] Fuki I V, Blanchard N, Jin W J, *et al.* Endogenously produced endothelial lipase enhances binding and cellular processing of plasma lipoproteins *via* heparan sulfate proteoglycan-mediated pathway. *J Biol Chem*, 2003, **278**(36): 34331-34338
- [8] Jin W J, Sun G S, Marchadier D, *et al.* Endothelial cells secrete triglyceride lipase and phospholipase activities in response to cytokines as a result of endothelial lipase. *Circ Res*, 2003, **92** (4): 644-650
- [9] Kempe S, Kestler H, Lasar A, *et al.* NF- κ B controls the global pro-inflammatory response in endothelial cells: evidence for the regulation of a pro-atherogenic program. *Nucleic Acids Res*, 2005, **33**(16): 5308-5319
- [10] Shimokawa Y, Hirata K, Ishida T, *et al.* Increased expression of endothelial lipase in rat models of hypertension. *Cardiovasc Res*, 2005, **66**(3): 594-600
- [11] Choi S Y, Hirata K, Ishida T, *et al.* Endothelial lipase: a new lipase on the block. *J Lipid Res*, 2002, **43**(11): 1763-1769

- [12] Flavahan N A, Vanhoutte P M. Endothelial cell signaling and endothelial dysfunction. *Am J Hypertens*, 1995, **8**(5 Pt 2): 28S-41S
- [13] Zeiher A M, Fisslthaler B, Schray-Utz B, *et al*. Nitric oxide modulate the expression of monocyte chemoattractant protein-1 in cultured human endothelial cells. *Circ Res*, 1995, **76**(6): 980-986
- [14] Shyy J Y, Chien S. Role of integrins in endothelial mechanosensing of shear stress. *Circ Res*, 2002, **91**(9): 769-775
- [15] Mohan S, Hamuro M, Koyoma K, *et al*. High glucose induced NF-kappaB DNA binding activity in HAEC is maintained under low shear stress but inhibited under high shear stress: role of nitric oxide. *Atherosclerosis*, 2003, **171**(2): 225-234
- [16] 许灿新, 王 春, 朱炳阳, 等. 高压培养调节 E 选择素表达及核因子 κ B 信号通路. *中国动脉硬化杂志*, 2008, **16**(3): 6-9
- Xu C X, Wang C, Zhu B Y, *et al*. *Chin J Arterioscl*, 2008, **16**(3): 6-9

Effect of High Hydrostatic Pressure on Endothelial Lipase Expression*

XU Can-Xin¹⁾, WANG Chun¹⁾, ZHU Bing-Yang¹⁾, GAO Zhi-Ping¹⁾, LUO Di-Xian¹⁾, LIAO Duan-Fang^{1,2)**}

¹⁾ *Institute of Pharmacy and Pharmacology, Life Science Research Center, University of South China, Hengyang 421001, China;*

²⁾ *Department of Traditional Chinese Diagnostics, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)*

Abstract Hydrostatic pressure has direct effect on vascular endothelium. Endothelial lipase (EL) is a newly identified member, only secreted by endothelial cells, of the triglycerides lipase family. EL may be one important determinants of HDL-metabolism and inflammation acting at the vessel wall. However, little is known about regulation of EL at the vessel wall. The effect of hydrostatic pressure on EL and its possible mechanism were investigated. In human umbilical vein endothelial cells, increasing pressures (120, 150 and 180 mmHg) treatment in a custom-made pressure incubator increased the mRNA and protein expression level of EL without obvious cells apoptosis. 180 mmHg treatment up-regulated EL mRNA and protein about 2.2, 2.54 fold relative to pressure atmosphere, respectively. Inhibitor of nuclear factor- κ B MG132 attenuated the high pressure induction of EL expression level, which is half of EL expression in 180 mmHg treatment group. These findings provide new insights into the effect of hydrostatic pressure on EL expression through nuclear factor- κ B signal pathways.

Key words hydrostatic pressure, endothelial lipase, nuclear factor- κ B, endothelial cells

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00732

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30770868, 30971170), National Basic Research Program of China (2006CB503808), Scientific Research Fund of Hunan Provincial Education Department (06C710) and The Department of Health of Hunan Province (B2006-094).

**Corresponding author.

Tel: 86-734-8281308, E-mail: dfliao66@yahoo.com.cn

Received: December 9, 2009 Accepted: February 22, 2010