



## C-反应蛋白抑制缺氧状态下人脐静脉内皮细胞表达低氧诱导因子-1 $\alpha$

C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)是炎症反应非特异性标志物,近年人们发现血中CRP浓度增高不利于冠心病的预后,因此建议将CRP作为冠心病的独立危险因素的一项检测指标[1][2]。CRP不仅是炎症反应非特异性标志物,本身亦具有病理作用,可激活补体清除坏死与凋亡心肌[3]以及抑制血管新生[4]。

低氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF)是促血管新生关键物质,它由HIF-1 $\alpha$ 和HIF-1 $\beta$ 两个亚基构成,其中HIF-1 $\alpha$ 对HIF活性起主要调节作用[5]。CRP是否对它的表达产生影响至今未见有关报道,而目前国内仅有关于CRP对冠心病预后影响的观察[6],尚未见到CRP对冠心病病理作用的研究。本实验利用CoCl<sub>2</sub>模拟缺氧,研究CPR对缺氧状态下人脐静脉内皮细胞(HUVECs) HIF-1 $\alpha$ 表达的影响,以探讨CRP抑制血管新生的机制。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

人重组CRP(德国Merck公司); CoCl<sub>2</sub>[1](Sigma); 鼠抗人HIF-1 $\alpha$ 抗体、兔抗鼠HRP抗体(美国Santa Cruz公司); Western blotting检测试剂盒(美国Cell Signaling Technology公司); 胎牛血清(杭州四季青公司产品); RPMI 1640、0.05%胰蛋白酶(Gibco); HUVECs(广州维尔曼公司)。

#### 1.2 细胞培养

HUVECs生长于含10%胎牛血清RPMI1640。待细胞长至50%~60%融合时,换无血清RPMI 1640培养。静止24 h后添加刺激物,刺激24 h后提取蛋白。

#### 1.3 实验分组

将HUVECs分为5组,每组4瓶细胞,均用100  $\mu$ mol/L CoCl<sub>2</sub>模拟缺氧环境,其中4个试验组分别添加5、10、50、100  $\mu$ g/ml的人重组CRP,1个试验组不添加人重组CRP作为对照。另设一个正常空白对照,即不添加CoCl<sub>2</sub>和CRP。

#### 1.4 Western blotting

用Bradford法测定HUVECs提取物中蛋白质浓度,按30  $\mu$ g/孔的加样量计算出应加细胞提取物的体积。样品蛋白在7%分离胶上电泳,而后转移到氟化聚偏二乙烯膜上。用封闭液(5%脱脂奶、10 mmol/L Tris、100 mmol/L氯化钠、0.1% Tween20, pH7.5)室温封闭1 h后再与1:500小鼠抗人HIF-1 $\alpha$ 单克隆抗体,4  $^{\circ}$ C孵育过夜。充分洗涤后与二抗1:2 000 HRP兔抗鼠抗体室温结合1 h。化学发光法显色,X光片记录影像,再用凝胶图像分析系统分析。蛋白含量以面积 $\times$ 密度表示,以对照组测得值为100计算相对光密度值。

#### 1.5 统计分析

用SPSS 11.0 进行数据录入和统计分析。用单因素方差分析比较处理组间HIF-1 $\alpha$ 表达量的差异,多重比较采用LSD方法。并用线性趋势检验分析剂量-反应关系。

空白对照组未检测到HIF-1 $\alpha$ 的表达。5个试验组HIF-1 $\alpha$ 的经Western blotting检测发现,在相对分子质量约120 000处可见一组条带,对照组最为明显,随着CRP浓度增高,条带逐渐变淡(图1)。

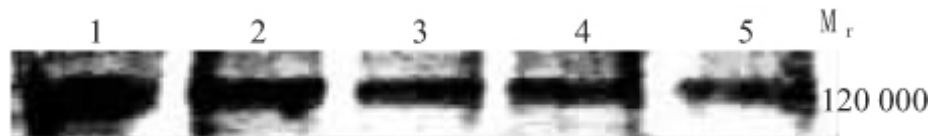


图1 5个实验组HIF-1 $\alpha$ 的Western Blotting 检测结果

Fig.1 Western blot analysis of HIF-1 $\alpha$  in the 5 experimental groups

CRP: C-reactive, ; Lanes 1-5: 100  $\mu$ mol/L CoCl<sub>2</sub>+CRP (0, 5, 10, 50, 100  $\mu$ mol/L) respectively

所有试验组的相对光密度值方差齐( $P=0.08$ ),单因素方差分析发现,5个试验组之间的相对光密度值存在统计学差异( $F=18.20$ ,  $P<0.05$ )。用LSD多重比较方法进一步分析具体每两个试验组之间的差异,添加CRP的4个试验组其HIF-1 $\alpha$ 的相对光密度值均显著低于实验对照组( $P<0.001$ ),4个不同浓度的CRP组除了10和50  $\mu$ g/ml CRP组之间无显著差异( $P=0.642$ )外,其它各组之间均存在显著性的差异( $P<0.05$ ),以5  $\mu$ g/ml CRP组最高,100  $\mu$ g/ml CRP组最低(表1)。线性趋势检验结果显示相对光密度值随CRP浓度的增大而降低( $F=70.29$ ,  $P<0.001$ )。

表1 5个试验组平均相对光密度值的比较 ( $n=4$ ,  $\bar{x}\pm s$ )

Tab. 1 Measurements of the relative optical density in the 5 experimental groups ( $n=4$ ,  $Mean\pm SD$ )

Group	D( $\lambda$ )
1 (100 $\mu$ mol/L CoCl <sub>2</sub> )	100 $\pm$ 0
2 (100 $\mu$ mol/L CoCl <sub>2</sub> +5 $\mu$ g/ml CRP)	84.24 $\pm$ 6.81*
3 (100 $\mu$ mol/L CoCl <sub>2</sub> +10 $\mu$ g/ml CRP)	70.38 $\pm$ 13.01*
4 (100 $\mu$ mol/L CoCl <sub>2</sub> +50 $\mu$ g/ml CRP)	67.51 $\pm$ 11.30** <sup>§</sup>
5 (100 $\mu$ mol/L CoCl <sub>2</sub> +100 $\mu$ g/ml CRP)	51.85 $\pm$ 4.51*** <sup>§</sup>

CRP: C-reactive protein; \* $P<0.05$  vs group 1; \*\* $P<0.05$  vs group 2; <sup>§</sup> $P<0.05$  vs group 3; \*\*\* $P<0.05$  vs group 4

### 3 讨论

大量流行病学调查研究显示升高的CRP和心血管疾病之间有很强的相关性[8]。已有研究发现CRP有诱导内皮细胞表达粘附分子、促进巨噬细胞摄取低密度脂蛋白、致动脉粥样硬化等作用[9]。最近Verma报道CRP可以抑制血管新生[4],后者对缺血缺氧区域心肌细胞血液供应起重要作用,因此探讨CRP抑制血管新生机制,为改善心血管疾病预后提供线索具有重要意义。

在血管新生过程中, HIF起关键作用。它通过在转录水平调节血管内皮生长因子(VEGF)等下游基因表

达，长出成熟的血管。HIF是由两个亚基构成的异二聚体，有氧条件下，HIF-1 $\alpha$  564位和402位脯氨酸被羟化，再与von Hippel-Lindau (VHL) 结合后由蛋白水解酶降解，所以检测不出。缺氧条件下，此过程受抑制，导致 HIF-1 $\alpha$ 堆积[10]，诱发血管新生。目前虽然报道有很多因素对HIF-1 $\alpha$ 表达产生影响，尚未见CRP与之关系的报道。鉴于此点，我们做了CRP对HIF-1 $\alpha$ 表达影响的研究。

国外有人利用CoCl<sub>2</sub>来模拟细胞缺氧环境进行HIF-1 $\alpha$ 表达的研究[11]，在50~200  $\mu$ mol/L浓度范围内，刺激HUVECs表达HIF-1 $\alpha$ 呈剂量反应关系，再增高CoCl<sub>2</sub>浓度并不增加其表达[12]。本实验亦采取这个方法刺激细胞表达HIF-1 $\alpha$ 。考虑到CoCl<sub>2</sub>和CRP均有细胞损害作用，本实验采用适当剂量(100  $\mu$ mol/L)CoCl<sub>2</sub>刺激，结果使得细胞损害较小，得以完成实验。

本实验结果显示CRP在5  $\mu$ g/ml水平即减少HIF-1 $\alpha$ 表达，且呈剂量反应关系。该作用主要通过其在转录水平抑制内皮细胞合成一氧化氮(NO) [4]。许多学者证明NO促进内皮细胞HIF-1 $\alpha$ 表达并探讨了其机理，包括NO使VHL的E3连接酶亚硝基化失去蛋白水解酶活性、影响p53与HIF-1 $\alpha$ 相互作用(p53促进HIF降解)、NO直接作用于铁调节蛋白减少细胞内铁储藏等[13]。尚不确定CRP是否对HIF-1 $\alpha$ 合成产生影响，可通过测定HIF-1 $\alpha$  mRNA表达量来进一步研究其机理。

最新一项针对美国3万名妇女进行长达8年的随访研究表明CRP水平的高低是预测心血管疾病发生的一个非常敏感的指标，指出有望通过测量CRP的水平来筛选心血管疾病的高危人群[14]。而本研究从分子水平初步探讨了CRP对心血管系统的影响。发现在低氧状态下CRP即使轻微升高的(5  $\mu$ g/ml)亦能降低HIF-1 $\alpha$ 的表达，从而抑制血管新生。本实验室结果进一步证实CRP是心血管疾病的一个危险因素。同时本实验最高CRP浓度组(100  $\mu$ g/ml)，相当于急性管脉综合症时尤其是急性心肌梗塞时的CRP水平。心肌梗死时病变部位心肌处于严重的缺血缺氧状态，此时的血管新生尤为重要。本实验发现CRP浓度越高，减少HIF-1 $\alpha$ 越明显，反映升高的CRP将严重影响心肌梗死发生后的血管新生，对心梗的预后极不利。本研究与已往有关动物试验的结果一致，有人在冠脉结扎大鼠身上注入人的CRP，结果发现梗死灶比对照组扩大40%[15]。

上述论述表明CRP在心血管疾病发生发展中的重要作用，说明降低CRP水平的重要性，尤其对于为数众多的只有CRP增高而低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL) 正常的人群。临床上，已有研究证实他汀类药物降低CRP的水平，即使LDL在正常范围内使用该类药可以进一步减少冠心病发病率以及改善预后[8]，提示降低CRP可能是预防和治疗心血管疾病的一个方向。现在已经比较清楚CRP结构、功能使开发出能有效降低CRP的药物成为可能。同时减轻体重、少量饮酒、锻炼等良好生活习惯也能减少CRP[16]。

本实验成功利用CoCl<sub>2</sub>模拟细胞缺氧环境，发现CRP抑制缺氧状态下人脐静脉内皮细胞表达低氧诱导因子，探讨了CRP抑制血管新生的机理，进一步证明CRP导致心血管疾病的病理作用，提示降低CRP的水平可能是治疗心血管疾病的一个方向。

#### 参考文献：

[1] Aronow WS. C-reactive protein: Should it be considered a coronary risk factor[J]? *Geriatrics*, 2003, 58(5):19-25.

[2] 迟东升, 靳风霞, 杨曙光, 等. 高脂血症患者C-反应蛋白含量的变化及氟伐他汀对它的影响[J]. *第一军医大学学报*, 2002, 23(12): 1109-11.

Chi DS, Jin FX, Yang SG, et al. Effects of fluvastatin on the levels of C-reactive protein and lipids in patients with hyperlipidemia[J]. *J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2002, 23(12): 1109-11.

[3] Lagrand WK, Niessen HW, Wolbink GJ, et al. C-reactive protein colocalizes with complement in human hearts during acute myocardial infarction[J]. *Circulation*, 1997, 95(1): 97-103.

[4] Verma S, Wang CH, Li SH, et al. A self-fulfilling prophecy-C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis[J]. *Circulation*, 2002, 106(8): 913-9.

[5] Pugh CW, Ratcliffe RJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system[J]. *Nat Med*, 2003, 9(6): 677-84.

[6] 徐 耕, 金国栋, 傅国胜, 等. 冠心病患者C反应蛋白水平及其1059G/C基因多态性的研究[J]. 中华心血管病杂志, 2003, 31(4): 274-7.

Xu G, Jin GD, Fu GS, et al. Plasma C reactive protein level and the 1059G/C polymorphism of CRP in patients with coronary artery disease[J]. Chin J Cardiol, 2003, 31(4): 274-7.

[7] Shrive AK, Cheetham GMT, Holden D, et al. Three-dimensional structure of human C-reactive protein[J]. Nat Struct Biol, 1996, 3(4): 346-54.

[8] Danesh J, Muir J, Wong YK, et al. Risk factors for coronary heart disease and acute-phase proteins. A population-based study[J]. Eur Heart J, 1999, 20(13): 954-9.

[9] Zhang YX, Cliff WJ, Schoefl GI, et al. Coronary C-reactive protein distribution: its relation to development of atherosclerosis[J]. Atherosclerosis, 1999, 145(2): 375-9.

[10] 付锐斌, 吴平生, 戴铁英, 等. pcDNA3.1+-HIF-1 $\alpha$ 载体的构建和初步表达鉴定[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(11): 1134-6.

Fu RB, Wu PS, Dai TY, et al. Construction and expression analysis of recombinant vector pcDNA3.1+-HIF-1 $\alpha$ [J]. J First Mil Med Univ/ Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(11): 1134-6.

[11] Yong-gun Yoo, Seung Hyun Oh, Eun Soo Park, et al. Hepatitis B virus X protein enhances transcriptional activity of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  through activation of mitogen-activated protein kinase pathway[J]. J Biol Chem, 2003, 278(40): 39076-84.

[12] Yanaya K, Tsai AL, Kamitani T. Cobalt-and nickel-binding property of cullin-2[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 290(1): 294-299.

[13] Dulk J, Alica J. Regulation of endothelial growth factor synthesis by nitric oxide: Facts and controversies[J]. Antioxidants and redox signaling, 2003, 5(1): 123-32.

[14] Ridker PM. High-sensitivity C-reactive protein and cardiovascular risk: rationale for screening and primary prevention[J]. Am J Cardiol, 2003, 92(suppl): 17k-22k.

[15] Griselli M, Herbert J, Hutchinson WL, et al. C-reactive protein and complement are important mediators of tissue damage in acute myocardial infarction[J]. J Exp Med, 1999, 190:1733-9.

[16] Pepys MB, Hirschfield MG. C-reactive protein: a critical update[J]. J Clin Invest, 2003, 111(12): 1805-12.

#### 参考文献:

[1] Aronow WS. C-reactive protein: Should it be considered a coronary risk factor[J]? Geriatrics, 2003, 58(5):19-25.

[2] 迟东升, 靳风霞, 杨曙光, 等. 高脂血症患者C-反应蛋白含量的变化及氟伐他汀对它的影响[J]. 第一军医大学学报, 2002, 23(12): 1109-11.

Chi DS, Jin FX, Yang SG, et al. Effects of fluvastatin on the levels of C-reactive protein and lipids in patients with hyperlipidemia[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 23(12): 1109-11.

[3] Lagrand WK, Niessen HW, Wolbink GJ, et al. C-reactive protein colocalizes with complement in human hearts during acute myocardial infarction[J]. Circulation, 1997, 95(1): 97-103.

[4] Verma S, Wang CH, Li SH, et al. A self-fulfilling prophecy-C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis[J]. Circulation, 2002, 106

(8): 913-9.

[5] Pugh CW, Ratcliffe RJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system[J]. Nat Med, 2003, 9(6): 677-84.

[6] 徐 耕, 金国栋, 傅国胜, 等. 冠心病患者C反应蛋白水平及其1059G/C基因多态性的研究[J]. 中华心血管病杂志, 2003, 31(4): 274-7.

Xu G, Jin GD, Fu GS, et al. Plasma C reactive protein level and the 1059G/C polymorphism of CRP in patients with coronary artery disease[J]. Chin J Cardiol, 2003, 31(4): 274-7.

[7] Shrive AK, Cheetham GMT, Holden D, et al. Three-dimensional structure of human C-reactive protein[J]. Nat Struct Biol, 1996, 3(4): 346-54.

[8] Danesh J, Muir J, Wong YK, et al. Risk factors for coronary heart disease and acute-phase proteins. A population-based study[J]. Eur Heart J, 1999, 20(13): 954-9.

[9] Zhang YX, Cliff WJ, Schoebl GI, et al. Coronary C-reactive protein distribution: its relation to development of atherosclerosis[J]. Atherosclerosis, 1999, 145(2): 375-9.

[10] 付锐斌, 吴平生, 戴铁英, 等. pcDNA3.1+-HIF-1 $\alpha$ 载体的构建和初步表达鉴定[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(11): 1134-6.

Fu RB, Wu PS, Dai TY, et al. Construction and expression analysis of recombinant vector pcDNA3.1+-HIF-1 $\alpha$ [J]. J First Mil Med Univ/ Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(11): 1134-6.

[11] Yong-gun Yoo, Seung Hyun Oh, Eun Soo Park, et al. Hepatitis B virus X protein enhances transcriptional activity of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  through activation of mitogen-activated protein kinase pathway[J]. J Biol Chem, 2003, 278(40): 39076-84.

[12] Yanaya K, Tsai AL, Kamitani T. Cobalt-and nickel-binding property of cullin-2[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 290(1): 294-299.

[13] Dulk J, Alica J. Regulation of endothelial growth factor synthesis by nitric oxide: Facts and controversies[J]. Antioxidants and redox signaling, 2003, 5(1): 123-32.

[14] Ridker PM. High-sensitivity C-reactive protein and cardiovascular risk: rationale for screening and primary prevention[J]. Am J Cardiol, 2003, 92(suppl): 17k-22k.

[15] Griselli M, Herbert J, Hutchinson WL, et al. C-reactive protein and complement are important mediators of tissue damage in acute myocardial infarction[J]. J Exp Med, 1999, 190:1733-9.

[16] Pepys MB, Hirschfield MG. C-reactive protein: a critical update[J]. J Clin Invest, 2003, 111(12): 1805-12.