

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 α

宋云峰, 吴平生, 赖文岩 (第一军医大学南方医院心内科, 广东 广州 510515)

摘要:目的 研究 C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)对低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)表达的影响。方法 利用 CoCl₂ (浓度为 100 μ mol/L)模拟缺氧环境,使其分别与 4 个试验组的 CRP (浓度分别为 5, 10, 50, 100 μ g/ml)同时作用于脐静脉内皮细胞,以仅加 CoCl₂ (100 μ mol/L)组为对照;同时设空白对照组。刺激 24 h 后提取蛋白。用 Western-blotting 半定量检测 HIF-1 α 的蛋白表达量,数据用 SPSS11.0 软件进行统计分析。结果 CRP 在 5 μ g/ml 水平即减少 HIF-1 α 表达 ($P<0.001$),在 100 μ g/ml 水平达到最大作用,其作用效果呈剂量反应关系 ($P<0.001$)。结论 CRP 抑制缺氧状态下人脐静脉内皮细胞表达 HIF-1 α 。此结果证实 CRP 直接作用于血管,抑制缺氧组织血管新生。

关键词: C-反应蛋白;低氧诱导因子-1 α ;CoCl₂

中图分类号:R54;R-33 文献标识码:A 文章编号:1000-2588(2004)07-0746-03

C-reactive protein inhibits the expression of hypoxia-inducible factor-1 α in human umbilical vein endothelial cells in hypoxic condition

SONG Yun-feng, WU Ping-sheng, LAI Wen-yan

Department of Cardiology, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To investigate the effect of C-reactive protein (CRP) on expression of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α). **Methods** Using CoCl₂ (100 μ mol/L) to simulate hypoxic condition for culturing human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), we examined the effects of CRP on expression of HIF-1 α . The proteins were extracted from the cells after a 24-hour exposure of the cells to CRP of varied concentrations in the presence of CoCl₂, and Western blotting was performed for quantification of HIF-1 α expression, the results were analyzed statistically with SPSS software. **Results** CRP at the concentration of 5 μ g/ml decreased the expression of HIF-1 α ($P<0.001$), producing the maximum inhibitory effect at the concentration of 100 μ g/ml, an effect exhibiting dose-dependence. **Conclusion** CRP inhibits the expression of HIF-1 α in HUVECs subjected to hypoxic condition, which serves as an important evidence for the inhibitory effect of CRP on angiogenesis in hypoxic condition.

Key words: C-reactive protein; hypoxia inducible factor-1 α ; CoCl₂

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 α 和 HIF-1 β 两个亚基构成,其中 HIF-1 α 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 CoCl₂ 模拟缺氧,研究 CRP 对缺氧状态下人脐静脉内皮细胞(HUVECs) HIF-1 α 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);CoCl₂ (Sigma);鼠抗人 HIF-1 α 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 μ mol/L CoCl₂ 模拟缺氧环境,其中 4 个试验组分别添加 5、10、50、100 μ 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 CoCl₂ 和 CRP。

1.4 Western blotting

用 Bradford 法测定 HUVECs 提取物中蛋白质浓

收稿日期:2004-02-11

基金项目:国家自然科学基金项目 (30370587)

Supported by National Natural Science Foundation of China (30370587)

作者简介:宋云峰(1977-),男,第一军医大学在读硕士研究生,电话:

020-61641504, E-mail: yfsong789@yahoo.com.cn

度,按 30 μg /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 α 单克隆抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 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 α 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。

2 结果

空白对照组未检测到 HIF-1 α 的表达。5 个试验组 HIF-1 α 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)。

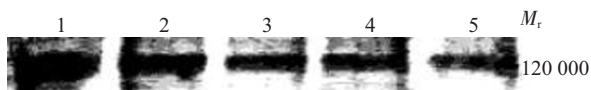


图 1 5 个实验组 HIF-1 α 的 Western Blotting 检测结果

Fig.1 Western blot analysis of HIF-1 α in the 5 experimental groups

CRP: C-reactive.; Lanes 1-5: 100 $\mu\text{mol/L}$ CoCl₂+CRP (0,5,10,50,100 $\mu\text{mol/L}$) 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 α 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 $\mu\text{g/ml}$ 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 $\mu\text{g/ml}$ CRP 组最高,100 $\mu\text{g/ml}$ 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 ($F=70.29, P<0.001$)。

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

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 ($n=4, \text{Mean}\pm\text{SD}$)

Group	D(λ)
1 (100 $\mu\text{mol/L}$ CoCl ₂)	100 \pm 0
2 (100 $\mu\text{mol/L}$ CoCl ₂ +5 $\mu\text{g/ml}$ CRP)	84.24 \pm 6.81*
3 (100 $\mu\text{mol/L}$ CoCl ₂ +10 $\mu\text{g/ml}$ CRP)	70.38 \pm 13.01*
4 (100 $\mu\text{mol/L}$ CoCl ₂ +50 $\mu\text{g/ml}$ CRP)	67.51 \pm 11.30* ^{ns}
5 (100 $\mu\text{mol/L}$ CoCl ₂ +100 $\mu\text{g/ml}$ CRP)	51.85 \pm 4.51* ^{ns&}

CRP: C-reactive protein; * $P<0.05$ vs group 1; ^{ns} $P<0.05$ vs group 2; ^{ns&} $P<0.05$ vs group 3; [&] $P<0.05$ vs group 4

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^[1],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 α 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 α 堆积^[10],诱发血管新生。目前虽然报道有很多因素对 HIF-1 α 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 α 表达影响的研究。

国外有人利用 CoCl₂ 来模拟细胞缺氧环境进行 HIF-1 α 表达的研究^[11],在 50~200 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内,刺激 HUVECs 表达 HIF-1 α 呈剂量反应关系,再增高 CoCl₂ 浓度并不增加其表达^[12]。本实验亦采取这个方法来刺激细胞表达 HIF-1 α 。考虑到 CoCl₂ 和 CRP 均有细胞损害作用,本实验采用适当剂量(100 $\mu\text{mol/L}$)CoCl₂ 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 $\mu\text{g/ml}$ 水平即减少 HIF-1 α 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)^[1]。许多学者证明 NO 促进内皮细胞 HIF-1 α 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 α 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 α 合成产生影响,可通过测定 HIF-1 α 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^[4]。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 (6 $\mu\text{g/ml}$) 亦能降低 HIF-1 α 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 $\mu\text{g/ml}$), 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 α 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%^[5]。

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^[6]。

本实验成功利用 CoCl_2 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.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] Pugh CW, Ratcliffe RJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system [J]. Nat Med, 2003, 9(6): 677-84.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] Zhang YX, Cliff WJ, Schoeffl GI, *et al.* Coronary C-reactive protein distribution: its relation to development of atherosclerosis [J]. Atherosclerosis, 1999, 145(2): 375-9.
- [12] 付锐斌, 吴平生, 戴铁英, 等. pcDNA3.1⁺-HIF-1 α 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.
- [13] Fu RB, Wu PS, Dai TY, *et al.* Construction and expression analysis of recombinant vector pcDNA3.1⁺-HIF-1 α [J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(11): 1134-6.
- [14] Yong-gun Yoo, Seung Hyun Oh, Eun Soo Park, *et al.* Hepatitis B virus X protein enhances transcriptional activity of hypoxia-inducible factor-1 α through activation of mitogen-activated protein kinase pathway [J]. J Biol Chem, 2003, 278(40): 39076-84.
- [15] Yanaya K, Tsai AL, Kamitani T. Cobalt-and nickel-binding property of cullin-2 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 290(1): 294-299.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] Pepys MB, Hirschfield MG. C-reactive protein: a critical update [J]. J Clin Invest, 2003, 111(12): 1805-12.