

[文章编号] 1000-4718(2007)01-0063-04

血流剪切应力对内皮细胞表达人类凋亡蛋白抑制剂的作 用

臧彬¹, 舒强², 金鑫³

(中国医科大学¹第二附属医院急诊科,²第一附属医院外科局解教研室, 辽宁 沈阳 110004;

³厦门大学医学院药理学系, 福建 厦门 361105)

[摘要] 目的: 本研究目的是阐明血流剪切应力抑制血管内皮细胞凋亡的分子机制。方法: 人脐静脉内皮细胞(HUVECs)培养于DMEM, 当细胞融合时, 转染 Smac 基因, 将细胞暴露于 20 dyne/cm²的剪切应力, 分别测定人类凋亡蛋白抑制剂(human inhibitor of apoptosis protein-2, HIAP-2)蛋白表达及细胞凋亡蛋白酶(caspase-3)活性。结果: 20 dyne/cm²的剪切应力抑制 caspase-3 活性的增加, 此作用与剪切应力能够明显诱导内皮细胞产生 HIAP-2 蛋白表达明显增加有关。结论: 证实生理水平剪切应力能够明显诱导内皮细胞产生 HIAP-2 蛋白的表达, 这可能是剪切应力抑制内皮细胞凋亡发挥抗动脉粥样硬化作用的机制之一。

[关键词] 内皮细胞; 剪切应力; 细胞凋亡

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

Effect of shear stress on inhibitor of apoptosis protein - 2 expression in human umbilical vein endothelial cells

ZANG Bin¹, SHU Qiang², JIN Xin³

(¹Department of Emergency of The Second Affiliated Hospital, ²Department of Regional Anatomy of Surgery, The First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China; ³Department of Pharmacy, School of Medicine, Xiamen University, Xiamen 361105, China. E-mail: Zangbin60@sohu.com)

[ABSTRACT] AIM: Laminar shear stress at physiological level inhibits apoptosis of endothelial cells (ECs) and exerts a potent antiatherosclerotic effect. The aim of this study is to investigate the molecular mechanisms, that regulate shear stress-mediated inhibition of apoptosis. METHODS: Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were cultured and passaged in DMEM. When the cells became confluent, they were transfected with Smac, then exposed to laminar shear stress at 20 dyne/cm². The expression of the human inhibitor of apoptosis protein-2 (HIAP-2) protein and caspase-3 activity were checked. RESULTS: Caspase-3 activity was decreased by laminar shear stress of 20 dyne/cm², and this effect was partly related to the HIAP-2 protein expression induced by shear stress. CONCLUSION: The present study provides evidence that laminar shear stress at physiological level induces significantly expression of HIAP-2 mRNA and protein. Up-regulation of HIAP-2 may contribute to the potent antiatherosclerotic effect of shear stress by preventing ECs from apoptosis.

[KEY WORDS] Endothelial cells; Shear stress; Apoptosis

血流动力学因素,特别是剪切应力在动脉硬化的发生中起着重要作用^[1,2]。剪切应力通过刺激血管内皮产生 NO/NO 合成酶、转化生长因子-β(TGF-β)、组织纤溶酶原激活因子(tissue plasminogen activator, tPA)、锰过氧化物歧化酶(Mn-SOD)等血管活性物质调节内皮细胞及平滑肌细胞的功能及生长^[3]。近年来的研究表明剪切应力还影响血管内皮细胞的凋亡。体外实验表明 15 及 30 dyn/cm² 的剪

切应力能够抑制内皮细胞的凋亡^[4],但其作用的分子机制至今尚未完全阐明。人类凋亡蛋白抑制剂(inhibitors of apoptosis protein, IAP)是一个能够抑制细胞凋亡的重要家族。在人体发现有 6 种 IAP,它们分别是 HIAP-1、HIAP-2、XIAP-1、survivin、NAIP-1 及 BRUCE^[5],已有报道 HIAP-1 在内皮细胞中有表达^[6]。我们发现剪切应力可诱导血管内皮细胞表达 HIAP-2 mRNA 及蛋白,本研究将进一步验证内

[收稿日期] 2005-04-08

[修回日期] 2005-07-26

E-mail: Zangbin60@sohu.com

皮细胞表达 HIAP - 2 所发挥的抑制细胞凋亡作用。

材 料 和 方 法

1 细胞培养

通过将 0.05% 胰蛋白酶及 0.02% EDTA 注入人脐带静脉, 37 °C 细胞培养箱中孵育 5 min 后, 将洗出液冲出并收集于 10 cm 培养皿中, 并置于细胞培养箱中, 培养液中含有 20% 胎牛血清, 100 1 mg/L 碱性纤维细胞生长因子。细胞融合后进行传代培养, 分离后的 HUVECS 要用免疫组化方法鉴定, CD34 抗体阳性后再进行实验。本实验使用 4 - 8 代细胞。

2 剪切应力实验

首先将细胞转移到聚酯平板上培养, 细胞融合后, 将此平板置于图 1 装置中, 利用流动速度控制装

置调节产生所需剪切应力, 利用驱动泵来维持培养液循环流动, 当培养液流过细胞表面时产生剪切应力。该剪切力刺激装置配有流量计, 经计算后得到流量与剪切力大小的对应关系, 以后每次实验时直接通过调整流量大小得到所需的剪切力。此装置可控制温度及 pH 值。对照组细胞放入 CO₂ 培养箱, 培养条件与实验组相同。

3 Caspase - 3 活性测定

采用试剂盒 (Pharmingen 公司) 测定人脐带静脉内皮细胞 caspase - 3 活性。在我们先前的研究中发现剪切应力诱导 HIAP - 2 的表达, HIAP - 2 的作用是通过抑制 caspase - 3 活性抑制凋亡。caspase - 3 是凋亡关键蛋白酶, 所以 caspase - 3 活性可以反映细胞的生存状态。

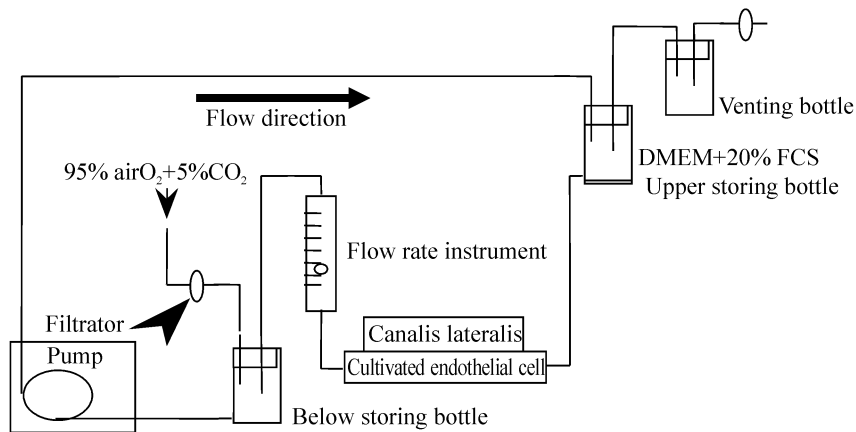


Fig 1 Shear stress experimental installation diagram.

图 1 剪切应力实验装置图

4 内皮细胞的 Smac 基因转染

Smac 是在细胞凋亡时线粒体内释放的 IAPs 的抑制剂, 促进凋亡发生。Smac 基因被装在质粒载体 pcDNA 3.1 (-) 上, 由美国 Howard Hu8ghes Medical Institute, University of Texas 王晓东博士提供。使用 FuGENE 6 基因转染试剂 (Roche 公司)。7 μg DNA 用 352 μL FuGENE 6 试剂稀释, 加入到内皮细胞进行孵育 20 h, 然后, 被转染的细胞可进行试验或测定。免疫组织化学染色显示, 在转染 48 h 后, Smac 阳性内皮细胞达到 64%, 具有较高的转染效率。

5 免疫沉降与 Western blotting 法

收集细胞, 按常规提取蛋白质样品。用 Lorry 法定量, 取 360 μg 蛋白进行免疫沉降。沉降方法用试剂盒 IMMUNOCatature (CytoSignal) 示范方法进行, 最后样品溶解于 40 μL 加样缓冲液中。制备 7.5% SDS - PAGE 胶, 取 5 μL 加样, 电泳后, 按常规方法转移到硝酸纤维素膜上。用小鼠抗人 HIAP - 2 单克隆抗体 (B75 - 1, Pharmingen) 1:200 稀释液孵育 1 h

(室温) 后, 用 TBS 液 5 min × 4 清洗后, 用过氧化物酶标记的第 II 抗体 1:3 000 稀释液孵育 1 h (室温), 清洗后, 用 ECL 试剂在 X 光底片上显像。用密度扫描仪测定条带的面积和灰度。

6 血管内皮细胞凋亡过程中 DNA 的变化测定

收集实验组和对照组的血管内皮细胞, 按 Miao 等^[5]方法提取其 DNA, 并用 2% 琼脂糖凝胶电泳观察 DNA 的变化。

7 统计学处理

实验数据以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两样本均数比较用 *t* 检验。多组资料统计处理, 应用方差分析。

结 果

1 血管内皮细胞凋亡过程中 DNA 的变化测定

伴随着血管内皮细胞凋亡过程的形态学变化, 细胞 DNA 发生了细胞凋亡所特有的片段化, 可见典型的 DNA 条带 (DNA ladder), 3 为施加剪切力

20 dyne/cm², 18 h 的结果, 见图 2。

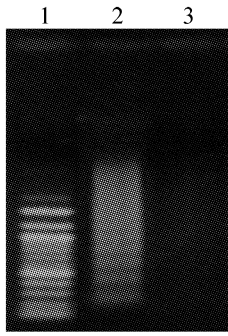


Fig 2 DNA change in the process of apoptosis. 1: DNA marker; 2: control group; 3: shear stress group.

图 2 HUVECs 凋亡过程中 DNA 的变化

2 剪切应力对内皮细胞凋亡的抑制

采用在培养液中去掉血清或 bFGF 方法诱导 HUVECs 凋亡。结果显示(图 3), 去掉血清或 bFGF 后, 未施加剪切应力(static)的 HUVECs 出现了明显的 caspase - 3 活性增加, 分别为 382.5 ± 45.1 和 348.5 ± 69.7 , 剪切应力(shear)组分别为 78.8 ± 44.6 和 77.6 ± 65.3 。Static 组与 shear 组比较, caspase - 3 活性均有显著差异 ($P < 0.01$), 说明 20 dyne/cm² 剪切应力能完全抑制 caspase - 3 活性增加。

3 剪切应力诱导的 HIAP - 2 对 HUVECs 凋亡的抑制

图 4A 显示 HUVECs 转染 Smac 基因后, 用 Western blotting 法测定 Smac 蛋白表达, 结果证实 Smac 成功转染。图 4B 显示, 转染 Smac 基因后, 先用抗 Smac 抗体进行免疫沉降, 然后用 Western blot-

ting 法测定 HIAP - 2 蛋白表达, 结果施加剪切应力的细胞表达了较多的 HIAP - 2 蛋白, 并且与 Smac 结合, 抑制 caspase - 3 的活性, 进而抑制凋亡。那么, 我们需要了解剪切应力诱导的 HIAP - 2 发挥多大程度的抑制 caspase - 3 的活性作用。图 4C 显示在用转染质粒载体 pcDNA 3.1 (-) 的对照组中, 剪切应力抑制了 caspase - 3 活性增加, 其中 static 组为 229.3 ± 10.2 , shear 组为 61.4 ± 9.7 , 有显著差异 ($P < 0.01$), 抑制率为 75%。而在转染含有 Smac 质粒 pcDNA 3.1 (-) 的实验组中, 剪切应力也抑制了 caspase - 3 活性增加, 其中 static 组为 266.5 ± 9.9 , shear 组为 138.0 ± 13.4 , 差异显著 ($P < 0.01$), 抑制率为 51%。

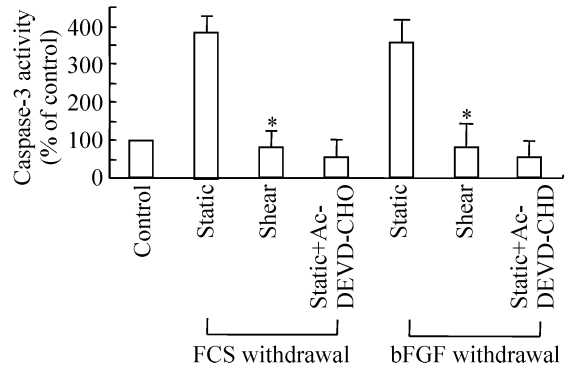


Fig 3 Caspase - 3 activity determination ($n = 5$). Control group stands for that culture fluid containing 20% FCS and 5 μ g/L bFGF HUVECs is regarded as standard contrast. Ac - DEVD - CHO is a caspase - 3 inhibitor regarded as positive control.

图 3 人脐带静脉内皮细胞 caspase - 3 活性

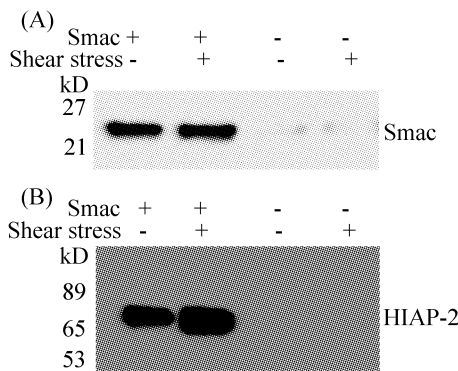


Fig 4 HIAP - 2 induced by shear stress inhibits apoptosis. A: Smac successful transfection is confirmed by Western blotting methods; B: HIAP - 2 is determined; C: caspase - 3 activity determination ($n = 5$).

图 4 剪切应力诱导的 HIAP - 2 对 HUVECs 凋亡的抑制

讨 论

IAP 家族最早在 baculoviruses 中被发现^[7]。其

功能是在病毒复制时保持宿主细胞的成活。随后 IAP 又在人体细胞中被发现, 其功能是能够抑制由各种刺激如抗 Fas 抗体^[9]、TNF - α ^[10]、病毒感染、化疗

药物、紫外线照射^[11]等所引起的细胞凋亡。迄今为止, 研究表明 IAP 抑制凋亡的机制是抑制 caspase 3, 7 和 9。Caspase 家族是细胞凋亡中心的调节物质。初始的 caspase(包括 caspase 8, 9, 10 及 12) 与凋亡信号相偶联, 一旦被激活, 这些 caspases 将进一步激活下游的效应 caspase(包括 caspase 3, 6 和 7 等), 破坏细胞骨架及核蛋白, 从而引起凋亡^[12, 13]。Smac 因子是王晓东等发现的线粒体产生的凋亡调节因子, 它的作用是在受到凋亡的刺激时有线粒体释放到胞浆, 与 IAPs 结合, 抑制 IAPs 的作用, 升高 caspase 活性, 促进凋亡的发生^[14]。

尽管血流剪切应力已经被证实能够抑制血管内皮细胞凋亡, 但其作用机制并未完全阐明。有文献报道剪切应力能够增加抗凋亡因子 Bcl - XL 的表达^[8], Akt 激酶活性增加等^[15]。本研究结果则提供了另一个解释, 即 HIAP - 2 表达增加, 是剪切应力抑制内皮细胞凋亡的机制之一。本研究结果显示剪切应力明显抑制由去除培养液中血清或 bFGF 诱导的 caspase - 3 活性增加, 而这种抑制作用部分受到 Smac 的拮抗, 表明剪切应力诱导内皮细胞产生的 HIAP - 2 发挥了重要的抑制凋亡作用。由于内皮细胞死亡可引起血栓形成及内皮通透性增加, 甚至导致动脉硬化斑块破裂。因此, 血流剪切应力刺激内皮细胞所产生的 HIAP - 2 在抑制动脉硬化的形成及发展中起着重要作用。

[参 考 文 献]

- [1] Ku DN, Giddens DP, Zarins CK, et al. Pulsatile flow and atherosclerosis in the human carotid bifurcation: positive correlation between plaque location and low oscillating shear stress[J]. *Arteriosclerosis*, 1985, 5(3): 293 - 302.
- [2] 向青, 董晞, 徐梅, 等. 剪切应力和 TNF- α 调节人血管内皮细胞质膜微束蛋白的表达[J]. *中国病理生理杂志*, 2005, 21(5): 833 - 857.
- [3] Nerem RM, Harrison DG, Taylor WR, et al. Hemodynamics and vascular endothelial biology[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1993, 21(Suppl): S6 - S10.
- [4] Dimmeler S, Haendeler J, Rippman V, et al. Shear stress inhibits apoptosis of human endothelial cells[J]. *FEBS Lett*, 1996, 399(12): 71 - 74.
- [5] Miao JY, Araki S, Kaji K, et al. Inhibitors of phospholipase promote apoptosis of human endothelial cells[J]. *J Biochem*, 1997, 121(3): 612 - 618.
- [6] Duckett CS, Nava VE, Gedrich RW, et al. A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitor[J]. *EMBO J*, 1996, 15(1): 2685 - 2694.
- [7] Horrevoets AJ, Fontijn RD, Van Zonneveld AJ, et al. Vascular endothelial genes that are responsive to tumor necrosis factor - alpha *in vitro* are expressed in atherosclerotic lesions, including inhibitor of apoptosis protein - 1, stannin, and two novel genes[J]. *Blood*, 2001, 93(5): 3418 - 3431.
- [8] 金鑫, 舒强, 凌光烈. 血流剪切应力诱导人脐带内皮细胞 HIAP - 2 的表达[J]. *中国现代医学杂志*, 2004, 14(8): 11 - 14.
- [9] Bartling B, Tostlebe H, Darmer D, et al. Shear stress - dependent expression of apoptosis - regulating genes in endothelial cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 278(11): 740 - 746.
- [10] Chu ZL, McKinsey TA, Liu L, et al. Suppression of tumor necrosis factor - induced cell death by inhibitor of apoptosis c - IAP2 is under NF - κ B control[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(9): 10057 - 10062.
- [11] Verhagen AM, Silke J, Ekert PG, et al. HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(1): 445 - 454.
- [12] Salvesen G, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis[J]. *Cell*, 1997, 272(11): 443 - 446.
- [13] Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis[J]. *Science*, 1998, 281(8): 131309 - 131312.
- [14] Du C, Fang M, Li Y, et al. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome C - dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition[J]. *Cell*, 2000, 102(7): 33 - 42.
- [15] Dimmeler S, Assmus B, Hermann C, et al. Fluid shear stress stimulates phosphorylation of Akt in human endothelial cells[J]. *Circ Res*, 1998, 83(8): 334 - 341.