

## 促红细胞生成素预防内皮细胞凋亡时对天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3 亚家族的影响

王志禄 熊建文 杨小芳 李伊 许哲通 崔丽君 王锋 谈丽丽 张丽

**【摘要】** 目的 探讨重组人促红细胞生成素(rhEPO)在预防氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导人脐静脉内皮细胞(HUVECs)凋亡过程中对天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3(caspases-3)亚家族的影响。方法 体外培养 HUVECs, 将细胞随机分组, 分别加入 caspase-3 抑制剂 DEVD-CHO、caspase-8 抑制剂 z-IETD-fmk、caspase-9 抑制剂 z-LEHD-fmk 各 25 μmol/L 预孵育 24 h 后, 再加入 100 mg/L ox-LDL 处理 48 h。平行实验中, 加入 6.25、25.00、100.00 kU/L 的 rhEPO 预处理 HUVECs 24 h, 再加入 100 mg/L ox-LDL 处理 48 h。用比色法检测 caspase-3、caspase-8、caspase-9 活性; 用四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法检测 HUVECs 活性; 用流式细胞术检测 caspase-3 阳性表达率和 HUVECs 凋亡率。结果 caspase-3 抑制剂、caspase-8 抑制剂分别降低各自对应的 caspase 活性, caspase-9 抑制剂可同时降低 caspase-3、caspase-9 活性( $P$  均 $<0.05$ )。加入 rhEPO 预处理后, ox-LDL 诱导内皮细胞 caspase-3、caspase-9 活性及 caspase-3 阳性表达率降低, 且呈剂量依赖性( $P$  均 $<0.05$ ), 而 caspase-8 活性无明显变化, HUVECs 的细胞凋亡率也呈剂量依赖性降低( $P$  均 $<0.05$ )。结论 rhEPO 可呈剂量依赖性抑制 ox-LDL 诱导 HUVECs 凋亡时 caspase-3、caspase-9 活性, 提示 ox-LDL 诱导 HUVECs 凋亡信号通路涉及 caspase-3、caspase-9, 而与 caspase-8 无关。

**【关键词】** 促红细胞生成素; 人脐静脉; 内皮细胞; 信号通路; 氧化低密度脂蛋白

**Effect of erythropoietin on the caspase-3 subfamily in preventing apoptosis of endothelial cell** WANG Zhi-lu, XIONG Jian-wen, YANG Xiao-fang, LI Yan, XU Zhe-tong, CUI Li-jun, WANG Feng, TAN Li-li, ZHANG Li. Department of Cardiology, First Hospital of Lanzhou University, Key Lab of Preclinical Study for New Drugs of Gansu Province, Lanzhou 730000, Gansu, China

**【Abstract】** Objective To explore effect of erythropoietin on the caspase-3 subfamily in preventing apoptosis of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) induced by oxidized-low density lipoprotein (ox-LDL). Methods Third - sixth passages of HUVECs were used. Two experiments were conducted. In the first experiment, there was a blank control group, ox-LDL control group (100 mg/L, incubated for 48 hours), and low, medium, and high recombinant human erythropoietin (rhEPO) groups (6.25, 25.00, 100.00 kU/L rhEPO incubated for 24 hours + 100 mg/L ox-LDL incubated for 48 hours). Another experimental protocol consisted of groups of the cells pretreated with either caspase-3 inhibitor DEVD-CHO, or caspase-8 inhibitor z-IETD-fmk, or caspase-9 inhibitor z-LEHD-fmk of 25 μmol/L for 24 hours, then HUVECs were exposed ox-LDL (100 mg/L) incubated for 48 hours. The activity of caspase-3, caspase-8, or caspase 9 was determined by caspase colorimetric assay. The cell survival rate was assessed with methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method. The positive expression rate of caspase-3 and apoptotic rate were measured by flow cytometer. Results The activity of caspase-3 was significantly decreased and cell survival rate was increased in the caspase-3 inhibitor group (both  $P < 0.05$ ). The activity of caspase-8 was decreased in the caspase-8 inhibitor group ( $P < 0.05$ ), but the cell survival rate was not significantly different from that of ox-LDL group ( $P > 0.05$ ). The activity of caspase-3 or caspase-9 was lower and cell survival rate was higher in the caspase-9 inhibitor group than that of ox-LDL group (all  $P < 0.05$ ). The pretreatment with rhEPO led to decreased activity of caspase-3, caspase-9, positive expression rate of caspase-3 and apoptotic rate in a dose-dependent manner compared with ox-LDL group (all  $P < 0.05$ ), but the activity of caspase-8 showed no significant difference from rhEPO pretreatment groups (all  $P > 0.05$ ). Conclusion These results demonstrate that rhEPO can significantly inhibit the activity of caspase-3 or caspase-9 in endothelial cell apoptosis in a dose-dependent manner. Activation of caspase-3 or caspase-9 is involved in ox-LDL-induced HUVECs apoptotic signaling pathway, but caspase-8 is not involved.

**【Key words】** Erythropoietin; Human umbilical vein; Endothelial cell; Signaling pathway; Oxidized-low density lipoprotein

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2009.12.004

基金项目: 甘肃省新药临床前研究重点实验室开放基金项目(GSKFKT-0707); 兰州大学医学科研项目(820726)

作者单位: 730000 甘肃, 兰州大学第一医院心内科, 甘肃省新药临床前研究重点实验室

Email: wangzhilu@medmail.com.cn

促红细胞生成素(EPO)是红系细胞增殖、分化及凋亡的关键调节因子,能促进红系细胞的增殖、分化,并减少凋亡。近年来有关 EPO 对造血系统以外的细胞保护作用研究较多,已发现其对缺血/再灌注损伤时的心肌细胞和神经元均有保护作用<sup>[1-2]</sup>。因此,研究 EPO 对血管内皮细胞凋亡的调控具有重要意义。一般认为细胞凋亡过程中天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(caspases)发挥关键性的作用,控制着细胞凋亡的启动与进展,而细胞凋亡为caspases 家族活化并水解底物的结果。但是,caspases 转导信号的活化并非都是导致细胞凋亡。有研究发现,心肌细胞内细胞色素 C 释放和 caspase-3 激活时细胞核并未受到影响,而保持相对完整,这种现象被称为“凋亡中断”<sup>[3]</sup>。EPO 是否对 caspases 信号转导产生影响,是否能通过影响这条通路进一步干预内皮细胞的凋亡,其机制目前尚不清楚。因此,本实验中通过建立内皮细胞凋亡实验模型<sup>[3]</sup>,测定 EPO 干预下 caspase-3、caspase-8、caspase-9 活性和细胞凋亡率,探讨 EPO 能否通过影响 caspase-3 信号通路而干预内皮细胞的凋亡过程。

### 1 材料与方 法

1.1 主要实验试剂:原代人脐静脉内皮细胞(HUVECs)购自上海澳赛尔生物技术有限公司,氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)购自上海浙沛生物科技有限公司,重组人促红细胞生成素(rhEPO)购自以色列 ProSpec-Tany TechnoGene Ltd 公司。caspase-3、caspase-8、caspase-9 活性比色法测定试剂盒均购自美国 BioVision 公司,十二烷基硫酸钠(SDS)购自美国 Sigma 公司。

1.2 HUVECs 的培养及鉴定:取原代 HUVECs,接种并调整细胞密度至 $2 \times 10^5$ /ml,CO<sub>2</sub> 培养箱内培养至约 80%融合时传代。传代培养至 3~6 代、处于对数生长期的细胞用于实验。根据形态学、Ⅶ因子染色和乙酰化低密度脂蛋白(LDL)鉴定内皮细胞。

1.3 实验分组:将内皮细胞随机分组处理,正常对照组(细胞悬液),ox-LDL 对照组(细胞悬液+终浓度 100 mg/L ox-LDL 处理 48 h),低、中、高浓度 rhEPO 处理组(细胞悬液+终浓度 6.25、25.00、100.00 kU/L rhEPO 孵育 24 h+终浓度 100 mg/L ox-LDL 处理 48 h),caspase 抑制剂预处理组(细胞悬液+caspase-3 抑制剂 DEVD-CHO、caspase-8 抑制剂 z-IETD-fmk 或 caspase-9 抑制剂 z-LEHD-fmk 25 μmol/L 预孵育 24 h 后,再以终浓度 100 mg/L ox-LDL 诱导凋亡 48 h)。

### 1.4 检测指标及方法

1.4.1 caspases 抑制剂和 rhEPO 对 ox-LDL 诱导 caspases 活性的影响:用比色法检测,按试剂盒说明书步骤收集细胞、处理检测样品,在酶标仪激发波长 405 nm 处测定吸光度(A)值,同时按公式计算被标本的活性增值(背景为不加生色底物的反应体系),以此来评估 caspase-3、caspase-8、caspase-9 的活性。样品的活性增值=(实验组 A 值-背景 A 值)/(正常对照组 A 值-背景 A 值)。

1.4.2 caspases 抑制剂和 rhEPO 对 ox-LDL 诱导 HUVECs 活性的影响:用四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法检测,取培养好的 HUVECs,调整细胞密度至 $6 \times 10^4$ /ml,在 96 孔培养板中以每孔 90 μl 加入细胞悬液,每组设 5 个复孔。于实验终止前 4 h 每孔加入 MTT 10 μl,实验终止时每孔加入 SDS 100 μl,放置 12 h 后振荡 10 min,于波长 570 nm 处测定 A 值。根据公式计算细胞存活率。细胞存活率(%)=(处理组 A 值-空白对照组 A 值)/(ox-LDL 对照组 A 值-空白对照组 A 值)×100%。

1.4.3 caspase-3 阳性表达率:用流式细胞术检测,将培养细胞经胰蛋白酶消化、离心、磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤后,加入缓冲液和 poly-caspase 抑制剂 z-VAD-fmk,CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 30 min,离心弃上清液,用洗涤缓冲液两次重悬细胞沉淀,用流式细胞仪检测 caspase-3 阳性表达。

1.4.4 内皮细胞凋亡率:用流式细胞术膜联蛋白/碘化丙啶(Annexin V /PI)双染法检测,收集细胞按操作规程处理,用流式细胞术检测分析。

1.5 统计学分析:采用 SPSS 10.0 软件,数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用单因素方差分析、q 检验、秩和检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 2 结 果

2.1 caspases 抑制剂对 ox-LDL 诱导 caspases 活性的影响(表 1):ox-LDL 能诱导 caspase-3 和 caspase-9 活性( $P$  均 $< 0.05$ ),但不影响 caspase-8 活性产生影响( $P > 0.05$ );caspase-3 抑制剂能抑制 ox-LDL 诱导的 caspase-3 活性;caspase-8 抑制剂能抑制 caspase-8 活性;caspase-9 抑制剂可同时抑制 caspase-3 和 caspase-9 活性( $P$  均 $< 0.05$ )。

2.2 caspases 抑制剂对 ox-LDL 诱导 HUVECs 活性的影响(表 1):MTT 比色法检测显示,ox-LDL 诱导后细胞存活率显著降低,而 caspase-3、caspase-9 抑制剂可提高细胞存活率( $P$  均 $< 0.05$ ),caspase-8 抑制剂对细胞存活率无明显影响( $P > 0.05$ )。

表 1 caspases 抑制剂对 ox-LDL 诱导 caspases 活性及 HUVECs 活性作用的比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数	caspases 活性(倍增值)			HUVECs	
		caspase-3	caspase-8	caspase-9	细胞活性(A 值)	细胞存活率(%)
正常对照组	5	1	1	1	0.64±0.05	100.00±2.03
ox-LDL 组	5	3.12±1.03 <sup>a</sup>	1.03±0.36	3.07±0.29 <sup>a</sup>	0.40±0.02 <sup>a</sup>	58.03±3.21 <sup>a</sup>
caspase-3 抑制剂组	5	0.80±0.17 <sup>b</sup>	1.01±0.27	3.05±0.31	0.50±0.01 <sup>b</sup>	74.21±1.68 <sup>b</sup>
caspase-8 抑制剂组	5	3.09±0.89	0.60±0.16 <sup>b</sup>	3.01±0.73	0.40±0.01	57.24±4.45
caspase-9 抑制剂组	5	1.02±0.21 <sup>b</sup>	1.03±0.17	1.30±0.42 <sup>b</sup>	0.50±0.01 <sup>b</sup>	74.08±3.64 <sup>b</sup>

注:与正常对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 ox-LDL 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

表 2 不同浓度 rhEPO 对 ox-LDL 诱导 caspases 活性、HUVECs 活性、caspase-3 阳性表达率及细胞凋亡率的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数	caspases 活性(倍增值)			HUVECs		caspase-3 阳性表达率(%)	HUVECs 凋亡率(%)
		caspase-3	caspase-8	caspase-9	细胞活性(A 值)	细胞存活率(%)		
正常对照组	5	1	1	1	0.65±0.06	100.00±2.31	1.09±0.74	0.63±0.14
ox-LDL 组	5	12.74±1.34 <sup>a</sup>	1.06±0.23	5.01±0.36 <sup>a</sup>	0.40±0.03 <sup>a</sup>	57.24±1.32 <sup>a</sup>	48.93±3.11 <sup>a</sup>	35.42±1.32 <sup>a</sup>
低 rhEPO 组	5	10.81±0.67 <sup>b</sup>	1.08±0.18	3.64±0.21 <sup>b</sup>	0.42±0.01 <sup>b</sup>	61.23±3.04 <sup>b</sup>	45.67±6.65 <sup>b</sup>	22.13±2.16 <sup>b</sup>
中 rhEPO 组	5	6.43±1.06 <sup>bc</sup>	0.96±0.36	2.03±0.37 <sup>bc</sup>	0.43±0.02 <sup>bc</sup>	63.09±2.67 <sup>bc</sup>	13.65±4.46 <sup>bc</sup>	13.38±2.35 <sup>bc</sup>
高 rhEPO 组	5	3.65±0.78 <sup>bcd</sup>	1.01±0.41	1.67±0.13 <sup>bcd</sup>	0.49±0.01 <sup>bcd</sup>	74.08±3.84 <sup>bcd</sup>	3.36±0.42 <sup>bcd</sup>	5.77±1.13 <sup>bcd</sup>

注:与正常对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 ox-LDL 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与低 rhEPO 组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ ;与中 rhEPO 组比较,<sup>d</sup> $P < 0.05$

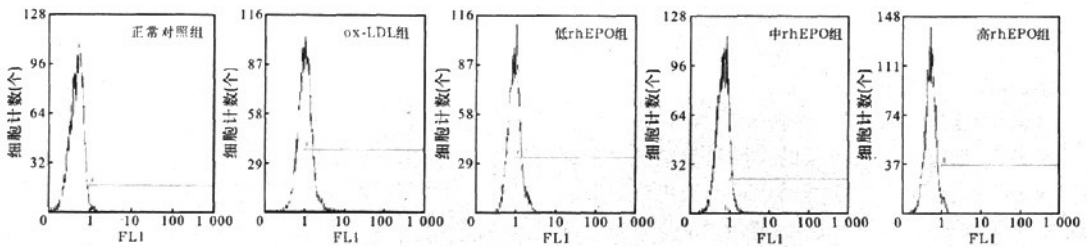


图 1 不同浓度 rhEPO 预处理对 HUVECs caspase-3 阳性表达率的影响

2.3 rhEPO 对 ox-LDL 诱导 HUVECs 凋亡时 caspases 活性的影响(表 2):用比色法检测显示, rhEPO 预处理后 ox-LDL 诱导的细胞内 caspase-3、caspase-9 活性降低,呈剂量依赖性( $P$  均  $< 0.05$ ),但对 caspase-8 活性无影响( $P$  均  $> 0.05$ )。

2.4 rhEPO 对 ox-LDL 诱导 HUVECs 活性的影响(表 2):随 rhEPO 浓度增加, HUVECs 存活率显著升高,且呈剂量依赖性( $P$  均  $< 0.05$ )。

2.5 流式细胞术检测 caspase-3 阳性表达率(表 2; 图 1):ox-LDL 组 caspase-3 阳性表达率显著高于正常对照组( $P < 0.05$ )。低、中、高浓度 rhEPO 预处理组 caspase-3 阳性表达率均显著低于 ox-LDL 组,且呈剂量依赖性( $P$  均  $< 0.05$ )。

2.6 流式细胞术检测 rhEPO 对 HUVECs 凋亡率的影响(表 2):ox-LDL 组细胞凋亡率显著高于正常对照组( $P < 0.05$ )。不同浓度 rhEPO 预处理组随浓度升高,细胞凋亡率均显著降低,呈剂量依赖性( $P$  均  $< 0.05$ )。

### 3 讨论

凋亡信号转导是一个由 caspases 家族成员介导的蛋白酶级联反应过程,不同的启动性 caspases 介导不同的凋亡信号。效应性 caspases 激活后主要从以下几方面导致细胞凋亡:①激活凋亡特异性核酸酶,水解 DNA 导致细胞凋亡的发生;②降解细胞骨架蛋白;③裂解 DNA 修复的关键酶多聚 ADP 核糖多聚酶等。普遍认为 caspase-3 是细胞凋亡蛋白酶级联反应的必经之路,但除了经典的 caspases 依赖性途径外,还存在 caspases 非依赖性凋亡途径。

本实验结果显示, ox-LDL 可上调 caspase-3、caspase-9 活性,但对 caspase-8 无影响。如果加入 caspases 抑制剂则可抑制相应的 caspases 活性,且 caspase-9 抑制剂还可同时抑制 caspase-3 活性。在多条凋亡信号通路中, caspase-8 是 caspase-3、caspase-9 的上游分子,可通过一系列级联反应激活 caspase-3、caspase-9, caspase-9 又是 caspase-3 的上游分子。本实验中尽管抑制了 caspase-8 的活性,但

是 caspase-3、caspase-9 的活性并未受到影响,证明 ox-LDL 诱导 HUVECs 凋亡的信号通路是一条不涉及 caspase-8 的通路,同时 ox-LDL 对 caspase-8 活性无影响也能证明这一点。rhEPO 预处理可抑制 ox-LDL 诱导 caspase-3、caspase-9 活性,降低细胞 caspase-3 的阳性表达率。

rhEPO 可以抑制 ox-LDL 诱导的 caspase-3、caspase-9 活化,未必一定会抑制凋亡。Narula 等<sup>[3]</sup>认为,心力衰竭过程存在一个有趣的现象,被称为“凋亡中断”。目前一些初步研究表明,细胞内存在一套精细的调控机制,一旦凋亡程序启动,负调控因子表达将发生改变,细胞保护性因子表达增多,DNA 分裂因子显著下调;同时,凋亡是一个耗能的过程,如果细胞内能量不足则不能完成凋亡或转为坏死。本实验结果显示 rhEPO 抑制内皮细胞 caspase-3、caspase-9 活化的程度和改善细胞凋亡率的程度相关,即 rhEPO 浓度越高,caspases-3、caspase-9 活性就越低,同时细胞凋亡率也越低。据此可以推断,rhEPO 通过抑制 caspase-3、caspase-9 信号通路来减轻 ox-LDL 诱导的内皮细胞凋亡。

研究发现急性低氧能够刺激肝、肾组织内 EPO 基因表达;而间断低氧习服的大鼠耐低氧能力明显增强,肝、肾组织内 EPO 基因表达水平可恢复到常氧对照组水平<sup>[4]</sup>。在神经系统,有研究表明低氧可促进 EPO 在海马 CA1 和 CA3 区的表达<sup>[5]</sup>。在 EPO 对视网膜神经节细胞、神经元、心肌细胞保护机制研究中发现,Akt、Erk 磷酸化介导 EPO 对细胞生存信号通路的促进在 EPO 的保护机制中发挥关键作用<sup>[6-8]</sup>。这种 EPO 发挥保护细胞作用的机制不同于本实验。EPO 的细胞保护作用还与维持线粒体跨膜电位有关<sup>[9]</sup>,如果检测线粒体跨膜电位将有助于了解 EPO 在本实验中对线粒体稳定的影响。Chong 等<sup>[10]</sup>研究发现,EPO 对暴露于高糖中的血管内皮细胞也有显著的保护作用。EPO 对细胞的保护作用不全是有益的,对乳腺癌体内外研究发现,EPO 可激活乳腺癌细胞 Akt、Erk 磷酸化,降低肿瘤细胞的凋亡

率<sup>[8]</sup>。这些实验使用了不同的细胞及诱导剂,与本实验结果基本相同,表明 EPO 具有抗炎、抗过氧化、抗凋亡、促血管生成作用,从而发挥细胞保护作用。

综上所述,本研究表明,rhEPO 通过提高 ox-LDL 诱导的 HUVECs 活性来抑制 HUVECs 凋亡;这一作用与细胞中的 caspase-3、caspase-9 活性上调有关,但对 caspase-8 活性无影响,提示 ox-LDL 诱导 HUVECs 凋亡的信号通路不涉及 caspase-8。

参考文献

- [1] Yu YP, XU QQ, Zhang Q, et al. Intranasal recombinant human erythropoietin protects rats against focal cerebral ischemia. *Neurosci Lett*, 2005, 387(1): 5-10.
- [2] Shan X, Xu X, Cao B, et al. Transcription factor GATA-4 is involved in erythropoietin-induced cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury. *Int J Cardiol*, 2009, 134(3): 384-392.
- [3] Narula J, Haider N, Arbustini E, et al. Mechanisms of disease; apoptosis in heart failure—seeing hope in death. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2006, 3(12): 681-688.
- [4] 王震虹,王祥瑞.低氧预处理诱导促红细胞生成素对脑缺血后损伤及认知功能的保护作用. *中国中西医结合急救杂志*, 2008, 15(6): 365-369.
- [5] 陈伟,陈家佩,葛世丽,等.低氧对大鼠肝肾组织内红细胞生成素和低氧诱导因子-1 $\alpha$  基因表达的影响. *中国危重病急救医学*, 2004, 16(1): 9-12.
- [6] Kilic U, Kilic E, Soliz J, et al. Erythropoietin protects from axotomy-induced degeneration of retinal ganglion cells by activating ERK-1/-2. *FASEB J*, 2005, 19(2): 249-251.
- [7] Kilic E, Kilic U, Soliz J, et al. Brain-derived erythropoietin protects from focal cerebral ischemia by dual activation of ERK-1/-2 and Akt pathways. *FASEB J*, 2005, 19(14): 2026-2028.
- [8] Hanlon PR, Fu P, Wright GL, et al. Mechanisms of erythropoietin mediated cardioprotection during ischemia-reperfusion injury; role of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *FASEB J*, 2005, 19(10): 1323-1325.
- [9] Leuner K, Hauptmann S, Abdel-Kader R, et al. Mitochondrial dysfunction; the first domino in brain aging and Alzheimer's diseases? *Antioxid Redox Signal*, 2007, 9(10): 1659-1675.
- [10] Chong ZZ, Shang YC, Maiese K. Vascular injury during elevated glucose can be mitigated by erythropoietin and Wnt signaling. *Curr Neurovasc Res*, 2007, 4(3): 194-204.

(收稿日期:2009-03-23 修回日期:2009-08-17)

(本文编辑:李银平)

欢迎订阅 2010 年《中国危重病急救医学》杂志

中文核心期刊 中国科技论文统计源期刊

中华医学会主办,全国各地邮局订阅,邮发代号:6-58

定价:每期 14 元,全年 168 元 2010 年以前的刊物可在本刊社邮购部购买

刊社地址:天津市和平区睦南道 122 号 邮编:300050 电话:022-23042150