

· 实验研究 ·

人脐静脉内皮细胞中还原型辅酶Ⅱ氧化酶对缺氧诱导因子-1 α 及内皮素-1表达的影响及其机制探讨

董兰, 陈克正, 何柳芳

(广州市儿童医院新生儿科, 广东 广州 510120)

[摘要] 目的 研究人脐静脉内皮细胞(HUVECs)中还原型辅酶Ⅱ(NADPH)氧化酶对缺氧诱导因子(HIF)-1 α 和内皮素(ET)-1表达的影响及其机制。方法 HUVECs培养液共25瓶,分为A(常氧)组、B(缺氧)组、C(NADPH氧化酶抑制剂夹竹桃麻素+常氧)组、D(可迅速降解HIF-1 α 的外源性H₂O₂+缺氧)组及E(H₂O₂+夹竹桃麻素+常氧)组,每组各5瓶。各组处理3h后收集培养上清液及提取细胞总蛋白,分别用Western Blot法和ELISA法检测细胞中HIF-1 α 蛋白水平和上清液中ET-1水平。结果 A组HIF-1 α 灰度扫描比值为 0.336 ± 0.012 , ET-1值为 5.87 ± 2.22 pg/mL,均呈低水平表达;B及C组HIF-1 α 灰度扫描比值分别为 0.773 ± 0.018 及 0.888 ± 0.022 , ET-1值分别为 95.38 ± 8.06 pg/mL及 33.67 ± 4.21 pg/mL,水平均显著高于A组(均 $P < 0.05$);D及E组HIF-1 α 灰度扫描分别为 0.330 ± 0.016 及 0.318 ± 0.034 ,比值呈低水平表达,但ET-1值分别为 108.43 ± 8.38 pg/mL及 109.66 ± 5.80 pg/mL,水平均显著高于A组(均 $P < 0.05$)。结论 缺氧或夹竹桃麻素可诱导HUVECs的HIF-1 α 和ET-1表达升高,H₂O₂可抑制HIF-1 α 表达,但仍使ET-1表达升高。其机制可能是作为氧感受器的NADPH氧化酶通过改变细胞内氧化还原状态而使HIF-1 α 表达发生变化,其下游基因ET-1表达除受HIF-1 α 调控外,还存在H₂O₂的调控机制。 [中国当代儿科杂志, 2006, 8(4): 323-326]

[关键词] 内皮细胞;缺氧诱导因子;内皮素;夹竹桃麻素;NADPH氧化酶;缺氧;H₂O₂

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2006)04-0323-04

Effect of NADPH oxidase on hypoxia-inducible factor-1 α and endothelin-1 expression in human umbilical endothelial cells and its possible mechanism

DONG Lan, CHEN Ke-Zheng, HE Liu-Fang. Department of Neonatology, Guangzhou Children's Hospital, Guangzhou 510120, China (Chen K-Z, Email: kezchen@163.com)

Abstract: Objective To study the effect of NADPH oxidase on hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and endothelin (ET)-1 expression in human umbilical endothelial cells (HUVECs) and its possible mechanism. **Methods** Twenty-five bottles of HUVECs culture fluid were randomly assigned into five groups: group A (normoxic control), group B (hypoxic), group C (NADPH oxidase inhibitor apocynin + normoxic), group D (H₂O₂ which can degrade HIF-1 α rapidly + hypoxic) and group E (H₂O₂ + apocynin + normoxic), with five bottles in each group. The culture supernates were collected and the total protein was extracted 3 hrs after treatment. Western Blot and ELISA were used to detect the HIF-1 α protein expression in HUVECs and the ET-1 level in the culture supernates respectively. **Results** There was a lower expression of HIF-1 α protein (0.336 ± 0.012) and lower ET-1 levels (5.87 ± 2.22 pg/mL) in group A. The HIF-1 α protein expression in groups B and C (0.773 ± 0.018 and 0.888 ± 0.022) and ET-1 levels (95.38 ± 8.06 and 33.67 ± 4.21 pg/mL) were noticeably higher than in group A ($P < 0.05$). The groups D and E had the HIF-1 α protein expression levels similar to group A, but the ET-1 levels in group D (108.43 ± 8.38 pg/mL) and group E (109.66 ± 5.80 pg/mL) were significantly higher than in group A ($P < 0.05$). **Conclusions** Hypoxia or apocynin can increase the HIF-1 α and ET-1 expression in HUVECs. H₂O₂ can inhibit the HIF-1 α expression but increase the ET-1 levels. It is speculated that NADPH oxidase as an oxygen sensor regulates the HIF-1 α expression by changing the intracellular redox reaction and that except HIF-1, H₂O₂ might contribute to ET-1 synthesis and release.

[Chin J Contemp Pediatr, 2006, 8(4): 323-326]

Key words: Endothelial cell; Hypoxia-inducible factor; Endothelin; Apocynin; NADPH oxidase; Hypoxia; H₂O₂

[收稿日期] 2006-01-27; [修回日期] 2006-05-08

[基金项目] 广州市计委重大科技攻关项目资助(编号:穗计科[1998]11号)

[作者简介] 董兰,女,硕士研究生,医师。主攻方向:新生儿专业。

[通讯作者] 陈克正,教授,广州市儿童医院新生儿科。邮编:510120。

动物实验证实,缺氧所致的新生儿肺出血,存在肺血管内皮细胞中缺氧诱导因子(HIF)-1 α 表达增加及其下游基因内皮素(ET)-1的大量分泌^[1,2]。推测此异常改变与血管内皮细胞中还原型辅酶Ⅱ(NADPH)氧化酶作为缺氧感受器,于缺氧时其活性受抑制、导致诱导生成的H₂O₂等信使分子减少,进而增加HIF-1 α 及ET-1的表达有关。为进一步明确对NADPH氧化酶上述作用的推断,以更深入了解新生儿肺出血的发病机制,本实验拟采用缺氧、能阻断NADPH氧化酶亚基聚合并抑制其活性的NADPH氧化酶抑制剂夹竹桃麻素^[3]及可迅速降解细胞中HIF-1的外源性H₂O₂^[4]等,分别或联合作用于经分离及培养的人脐静脉内皮细胞(HUVECs),探讨不同条件下NADPH氧化酶对内皮细胞HIF-1 α 及ET-1表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

人脐静脉内皮细胞(HUVEC),为原代培养;胎牛血清(购自Gibico公司);DMEM细胞培养基(购自Gibico公司);小鼠抗人HIF-1 α 单克隆抗体及兔抗人GAPDH多克隆抗体(购自SantaCruz公司);HRP标记的羊抗鼠二抗(购自中山公司);ECL Western blot检测试剂(购自CST公司);硝酸纤维素膜(购自Amersham公司)及ET-1 ELISA试剂盒(购自R&D公司)。

1.2 方法

1.2.1 原代人脐静脉内皮细胞(HUVECs)的分离及培养 用0.25%胰酶灌注消化胎儿脐静脉,收集消化的细胞悬液,用含20%胎牛血清的DMEM培养液调整细胞密度,按 $(1 \sim 1.5) \times 10^5/L$ 的密度接种于25 cm²的培养瓶中,在37℃、5% CO₂条件下培养。12 h后换液,此后每2~3 d更换1次培养液,待细胞生长融合率达90%时,用0.25%胰酶消化传代,第3代~第4代的细胞用于实验。

1.2.2 实验方法与分组 取25 mL细胞培养瓶25个,将第3代~第4代HUVECs以 1×10^6 细胞密度接种于培养瓶中,于5% CO₂、95%空气、37℃条件下培养(常氧培养),待细胞长至约80%融合生长时,将培养瓶平均分为5组,每组各5瓶:A组(常氧组)继续上述常氧培养;B组(缺氧组)以5% CO₂、95% N₂、5 L/min流量缺氧培养;C组(夹竹桃麻素+常氧组)加入100 μ M夹竹桃麻素后继续常氧培养;D组(H₂O₂+缺氧组)以外源H₂O₂(终浓度0.5

mM)处理15 min后缺氧培养;E组(H₂O₂+夹竹桃麻素+常氧组)以外源H₂O₂(终浓度0.5 mM)处理15 min后再加入100 μ M夹竹桃麻素,继续常氧培养。各组按照上述方法处理并培养3 h后,收集培养上清液,并提取细胞总蛋白,-70℃保存待用。

1.2.3 Western Blot法检测HIF-1 α 蛋白水平的表达 取50 μ g的细胞蛋白抽提液,进行8%的聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分离,并以半干电转移槽转移至硝酸纤维素膜上,在室温下用封闭缓冲液封闭3 h,再依次与小鼠抗人HIF-1 α 单抗(1:100)、GAPDH多抗(1:100)、HRP标记的山羊抗小鼠二抗(1:1 000)反应后,增强化学发光法显色,X线底片曝光显影。结果用图像处理仪进行灰度扫描分析,并以稳定表达的基因GAPDH为内参照。

1.2.4 ELISA法检测ET-1水平 取等体积细胞培养上清液样本和ET-1检测试剂加入酶标板孔中,共同孵育,加入ET-1偶联剂,TMBE溶液显色,酶标仪650 nm波长下读取数值,根据标准曲线计算出ET-1量。

1.2.5 统计学处理 采用SPSS 11.0软件包进行统计学处理。所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用两样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 Western Blot法检测HIF-1 α 蛋白表达

A组基本检测不到(电泳)或仅有少量(灰度扫描比值)HIF-1 α 蛋白表达;B及C组HIF-1 α 蛋白表达升高,显示缺氧和单用夹竹桃麻素均可诱导HUVECs的HIF-1 α 蛋白表达增加;而D及E组HIF-1 α 蛋白表达明显受抑制,说明外源性H₂O₂预处理后,可阻断缺氧或夹竹桃麻素诱导HIF-1 α 蛋白表达的作用(见图1、表1)。

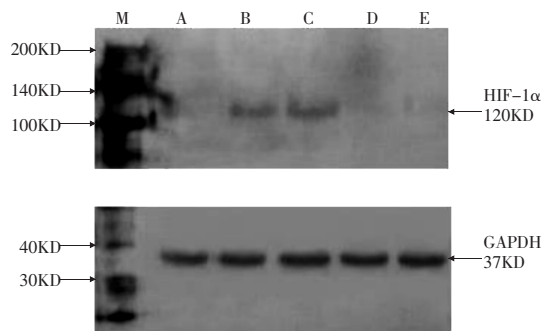


图1 Western Blot检测各组HUVECs HIF-1 α 蛋白表达 A:常氧对照组;B:缺氧组;C:夹竹桃麻素+常氧组;D:H₂O₂+缺氧组;E:H₂O₂+夹竹桃麻素+常氧组

表1 HUVECs HIF-1 α 蛋白表达的 Western Blot 灰度扫描结果

组别	培养瓶数	灰度扫描比值(HIF-1 α /GAPDH)
A组	5	0.336 $\pm$ 0.012
B组	5	0.773 $\pm$ 0.018 ^a
C组	5	0.888 $\pm$ 0.022 ^a
D组	5	0.330 $\pm$ 0.016 ^b
E组	5	0.318 $\pm$ 0.034 ^c

a 与 A 组比较, 均 $P < 0.05$; b 与 B 组比较, $P < 0.05$; c 与 C 组比较, $P < 0.05$

2.2 ELISA 法检测 ET-1 水平

A 组仅有低水平 ET-1 表达, 其余各组 ET-1 分泌均显著增加, 尤以 B、D、E 组为著。提示缺氧、夹竹桃麻素及 H_2O_2 均能不同程度地使 HUVECs 的 ET-1 分泌升高, 其中以 H_2O_2 的作用更明显(见表 2)。

表2 各组 HUVECs 培养上清液 ET-1 水平

组别	培养瓶数	ET(pg/mL)
A组	5	5.87 $\pm$ 2.22
B组	5	95.38 $\pm$ 8.06 ^a
C组	5	33.67 $\pm$ 4.21 ^{a,b}
D组	5	108.43 $\pm$ 8.38 ^{a,b}
E组	5	109.66 $\pm$ 5.80 ^{a,c}

a 与 A 组比较, 均 $P < 0.05$; b 与 B 组比较, 均 $P < 0.05$; c 与 C 组比较, $P < 0.05$

3 讨论

在开展低温缺氧后复温供氧的新生鼠肺出血发病机制研究中发现, 肺出血的主要病理生理改变为肺血管内皮细胞损伤和肺动脉高压^[5]。复温供氧后氧自由基(ROS)瀑布反应是导致肺血管内皮细胞损伤的直接原因^[6], 而肺血管内皮细胞中 ET-1 的异常分泌, 亦是导致 ROS 生成及肺动脉高压的主要原因^[7]。已知 HIF-1 α 是一种缺氧激活的转录因子, 是机体细胞适应低氧的主要中介物质, 在缺氧状态下可诱导其下游的各种缺氧反应基因进行转录调节, 促进后者的表达而产生一系列生理反应。目前对于细胞的低氧感受信号转导通路的学说主要有 4 种: ① 血红素直接感受低氧; ② 铁/硫簇(Fe/S-cluster)感受低氧; ③ 线粒体电子传递链复合物 IV(细胞色素 C 氧化酶 cytaa3); ④ NADPH 氧化酶产生低氧信号^[8]。NADPH 氧化酶产生的低氧信号通路尚不十分清楚, 推测在常氧下, NADPH 氧化酶感受 O_2 产生 O_2^- , 然后经 Fenton 反应形成 H_2O_2 、 OH^- 、

OH^- 等 ROS, 后者激活脯氨酸羟化酶, 使 HIF-1 α 脯氨酸残基羟化, 羟化后的 HIF-1 α 和 VHL 抑癌基因产物(pVHL)结合后成为泛素蛋白连接酶降解的靶目标, 最终导致 HIF-1 α 降解, 抑制 HIF-1 α 与 HIF-1 β 形成二聚体, 从而阻止 HIF-1 的激活, 抑制受其调控的缺氧反应基因的表达^[9]。缺氧时随着氧浓度降低, NADPH 氧化酶受抑制, O_2^- 产生减少, 继之 ROS 生成减少, 脯氨酸羟化酶活性受到抑制, pVHL 与 HIF-1 α 解离, 蛋白质的降解途径中断, 提高 HIF-1 α 的稳定性, HIF-1 α 大量积累, 并与 HIF-1 β 形成二聚体; 稳定的 HIF-1 入核、活化, 促使相关的缺氧反应基因转录和表达增强^[10]。本实验常氧下(A 组) HIF-1 α 蛋白表达阴性及缺氧下(B 组) HIF-1 α 蛋白活性升高, 支持了上述这一观点: 即 NADPH 氧化酶作为内皮细胞的氧感受器, 缺氧可抑制其活性而改变细胞内的氧化还原状态, 上调 HIF-1 α 表达。实验中单纯使用 NADPH 氧化酶特异性抑制剂夹竹桃麻素(C 组)后, NADPH 氧化酶抑制反应生成, 产生了类似缺氧使 HIF-1 α 表达上调(B 组)的效果, 即使其后细胞存在于常氧环境中, 常氧已不能对 HIF-1 α 蛋白表达产生抑制, 进一步提示 NADPH 氧化酶可能参与了 HIF-1 α 活化通路。若先以外源性 H_2O_2 刺激细胞, 由于 H_2O_2 可能对 NADPH 氧化酶激活作用较常氧更为强大, 能显著降解 HIF-1 α , 以致尽管其后给予缺氧(D 组)或应用夹竹桃麻素(E 组), 亦未能使 HIF-1 α 再活化, 导致两组 HIF-1 α 蛋白均无明显表达, 产生了类似常氧使 HIF-1 α 表达下调(A 组)的效果, 这亦与文献报道相符^[11]。说明 ROS 对 HIF-1 α 的抑制作用迅速而强大, 而缺氧与夹竹桃麻素对 HIF-1 α 的激活作用较弱及起效缓慢。

ET-1 基因是缺氧反应基因, 是 HIF-1 的靶基因之一, 已知 HIF-1 α 可通过调节 ET-1 而参与内皮细胞损伤及肺出血的形成^[1]。在生理状态下(A 组), 血管内皮细胞中 ET-1 的合成、释放量很低。在低氧的作用下(B 组), 因 NADPH 氧化酶受抑制而诱导产生并活化的 HIF-1 α , 可介导 ET-1 基因的转录调控, 使 ET-1 表达增多^[12]。夹竹桃麻素(C 组)通过抑制 NADPH 氧化酶, 同样起着类似缺氧诱导的作用, 这均与以往的研究结果相符^[11,13], 但 ET-1 水平的升高远不及 B 组显著, 可能与缺氧作用途径复杂而夹竹桃麻素对 NADPH 氧化酶的抑制作用单一有关, 因 ET-1 的表达与释放尚受许多因素的调节, 除缺氧外, 钙离子、各种细胞因子如 IL-1、TNF- α 等, 亦可促进 ET-1 的合成分泌^[12]; ET-1 尚能通过自分泌

作用调节自身的分泌活动^[14]。H₂O₂被认为是氧信号传递过程中重要的信使分子,Lopez等^[15]发现ROS可增加内皮素转化酶(ECE)的mRNA及蛋白表达,从而引起ET-1分泌增加,Cheng等^[16]则认为ROS可直接促进ET基因的mRNA表达,使ET合成释放增加。本实验用外源H₂O₂预处理后再缺氧(D组)或再用夹竹桃麻素干预(E组),HIF-1 α 蛋白表达均明显受抑制,但ET-1水平反而明显升高,出现两者表达分离现象,相信与H₂O₂的作用有关。H₂O₂可攻击生物膜中的不饱和脂肪酸,引发脂质过氧化,导致膜功能障碍和膜酶损伤,Na⁺/K⁺-ATP泵功能受损,促使细胞去极化,钙离子内流,促进细胞分泌释放ET-1增加;H₂O₂亦可激活核转录因子NF- κ B,诱导TNF α 、IL-1等细胞因子的表达,这些因子可能通过其他作用机制促进ET-1合成分泌^[17];此外,H₂O₂可激活ET-1基因启动子而促进ET-1合成,或通过增加ECE的表达而使ET-1释放增加^[18]。结果同样说明,H₂O₂对ET-1的激活作用比缺氧及夹竹桃麻素强大和直接。

通过本实验结果推测,缺氧后供高浓度氧新生鼠肺出血的发病机制,可能就是缺氧导致内皮细胞的氧感受器NADPH氧化酶受抑制,诱导HIF-1 α 大量积累,进而促使ET-1mRNA转录,ET-1合成和分泌显著增加,引起肺血管收缩而致肺动脉高浓度高压;供高浓度氧后尽管HIF-1 α 已受抑制,但氧自由基的大量生成一方面导致ET-1继续异常分泌,一方面攻击肺血管内皮细胞生物膜而导致肺血管损伤,最终引起肺出血。

[参 考 文 献]

- [1] 陶莉,陈克正. 低温缺氧/复温供氧新生鼠出血肺组织中缺氧诱导因子-1 α 蛋白的表达[J]. 广州医学院学报,2004,32(3): 26-28.
- [2] 陈克正,高晓燕. 内皮素致肺出血及降钙素基因相关肽拮抗内皮素的作用研究[J]. 中华儿科杂志,2004,42(6):446-449.
- [3] Hamilton CA, Brosnan MJ, Al-Benna S, Berg G, Dominiczak AF. NAD(P)H oxidase inhibition improves endothelial function in rat and human blood vessels[J]. Hypertension, 2002, 40(5): 755-762.
- [4] Kietzmann T, Fandrey J, Acker H. Oxygen radicals as messengers in oxygen-dependent gene expression[J]. News Physiol Sci, 2000, 15: 202-208.
- [5] 陈克正,陈光华. 肺组织中内皮素-1、降钙素基因相关肽的表达及其与新生儿弥漫性肺出血的关系[J]. 中华围产医学杂志, 2004,7(2):92-95.
- [6] 陈克正,王卫. 肺出血新生鼠肺组织病理与肺内氧自由基关系[J]. 小儿急救医学杂志,2002,9(4):207-209.
- [7] 陈克正,王卫. 新生鼠出血肺组织中内皮素、降钙素基因相关肽与氧自由基的关系[J]. 广东医学,2003,24(1):8-10.
- [8] Chang TC, Huang CJ, Tam K, Chen SF, Tan KT, Tsai MS, et al. Stabilization of hypoxia-inducible factor-1[α] by prostacyclin under prolonged hypoxia via reducing reactive oxygen species level in endothelial cells[J]. J Biol Chem, 2005, 280(44): 36567-36574.
- [9] Semenza GL. Perspectives on oxygen sensing[J]. Cell, 1999, 98(3): 281-284.
- [10] Ivan M, Kondo K, Yang HF, Kim W, Valiando J, Ohh M, et al. HIF-1 α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing[J]. Science, 2001, 292(5516): 464-468.
- [11] Yang ZZ, Zhang AY, Yi FX, Li PL, Zou AP. Redox regulation of HIF-1 α levels and HO-1 expression in renal medullary interstitial cells[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2003, 284(6): F1207-1215.
- [12] Jung F, Haendeler J, Hoffmann J, Reissner A, Dernbach E, Zeiher AM, et al. Hypoxic induction of the hypoxia-inducible factor is mediated via the adaptor protein Shc in endothelial cells[J]. Circ Res, 2002, 91(1): 38-45.
- [13] Le Brun G, Aubin P, Soliman H, Ropiquet F, Villette JM, Berthon P, et al. Upregulation of endothelin 1 and its precursor by IL-1 β , TNF- α and TGF- β in the PC3 human prostate cancer cell line[J]. Cytokine, 1999, 11(2): 157-62.
- [14] Hu J, Discher DJ, Bishopric NH, Webster KA. Hypoxia regulates expression of the endothelin-1 gene through a proximal hypoxia-inducible factor-1 binding site on the antisense strand[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 245(3): 894-899.
- [15] Lopez-Ongil S, Saura M, Zaragoza C, Gonzalez-Santiago L, Rodriguez-Puyol M, Lowenstein CJ, et al. Hydrogen peroxide regulation of bovine endothelin-converting enzyme-1[J]. Free Radic Biol Med, 2002, 32(5): 406-413.
- [16] Cheng TH, Shih NL, Chen SY, Loh SH, Cheng PY, Tsai CS, et al. Reactive oxygen species mediate cyclic strain-induced endothelin-1 gene expression via Ras/Raf/extracellular signal-regulated kinase pathway in endothelial cells[J]. J Mol Cell Cardiol, 2001, 33(10): 1805-1814.
- [17] Watanabe T, Koba S, Katagiri T, Pakala R, Benedict CR. Lyso-phosphatidylcholine potentiates the mitogenic effect of various vaso-active compounds on rabbit aortic smooth muscle cells[J]. Jpn Heart J, 2002, 43(4): 409-416.
- [18] Hua H, Munk S, Goldberg H, Fantus IG, Whiteside CI. High glucose-suppressed endothelin-1 Ca²⁺ signaling via NADPH oxidase and diacylglycerol-sensitive protein kinase C isozymes in mesangial cells[J]. J Biol Chem, 2003, 278(36): 33951-33962.

(本文编辑:吉耕中)