

肝细胞生长因子抗糖基化终产物诱导内皮细胞凋亡及分子机制

周一军¹, 王佳贺², 张锦¹

(1. 中国医科大学附属第一医院内分泌科, 辽宁 沈阳 110001; 2. 感染科)

[摘要] 目的: 探讨肝细胞生长因子抑制糖基化终产物诱导内皮细胞凋亡的作用及其相关分子机制。方法: 体外培养人脐静脉内皮细胞, 分为实验对照组、糖基化终产物及糖基化终产物 + 肝细胞生长因子组, 采用 MTT 法测定各组血管内皮细胞生长抑制率; 瑞氏-吉姆萨染色观察细胞形态学变化、流式细胞术测定细胞凋亡率; 蛋白免疫印迹法分析各组凋亡基因 Bax、Bcl-2 蛋白的表达及酶联反应法测定 caspase-3 活性。结果: 糖基化终产物诱导培养的内皮细胞出现明显的凋亡形态学改变, 内皮细胞凋亡率与糖基化终产物的浓度和作用时间呈依赖关系, 肝细胞生长因子干预后可显著降低不同时间的内皮细胞凋亡率; 肝细胞生长因子作用内皮细胞抗凋亡基因 Bcl-2 表达明显升高, 而促凋亡基因 Bax 表达无明显变化; caspase-3 活性显著降低。结论: 肝细胞生长因子抑制糖基化终产物诱导内皮细胞凋亡, 其作用机制可能是上调抗凋亡基因 Bcl-2 水平、抑制 caspase-3 的激活。

[关键词] 肝细胞生长因子; 细胞凋亡; 血管内皮细胞; 糖基化终产物; 动脉粥样硬化

[中图分类号] R587.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-4646(2006)04-0367-04

Effect of hepatocyte growth factor on vascular endothelial cell apoptosis induced by advanced glycosylation end products

ZHOU Yi-jun¹, WANG Jia-he², ZHANG Jin¹

(1. Department of Endocrinology and Metabolism, The First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China; 2. Department of Infectious Diseases)

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effect of hepatocyte growth factor (HGF) on vascular endothelial cell apoptosis induced by advanced glycosylation end products (AGEs) and the possible mechanism. **Methods:** Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were cultured in vitro and treated with different concentrations of AGEs and HGF. The growth inhibition rates of the cells in each group at different time points (12, 24, 48, and 72 hours after intervention) were determined by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. The cell apoptosis was detected by flow cytometry, and the cell morphology was observed by Wright's-Giemsa staining. The expressions of apoptosis-associated genes Bax and Bcl-2 were detected by Western blotting, and the activity of caspase-3 was measured by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results:** Morphological observation indicated that AGEs induced characteristic apoptotic changes in HUVECs in a dose- and time-dependent manner. HGF significantly inhibited the apoptosis of HUVECs induced by AGEs. HGF significantly increased the expression of Bcl-2 and decreased the activity of caspase-3, without affecting Bax expression. **Conclusion:** AGEs can induce the apoptosis of vascular endothelial cells in vitro. HGF effectively inhibits AGEs-induced apoptosis by upregulating the expression of Bcl-2 and inhibiting the activation of caspase-3.

[Key words] hepatocyte growth factor; apoptosis; advanced glycosylation end products; vascular endothelial cell; atherosclerosis

血管内皮细胞受损在动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)等心血管疾病过程中起着重要作用, 是 AS 的始动因素。因为覆盖在血管壁的凋亡细胞影响内皮依赖性舒张功能及内皮细胞再生, 内皮细胞

凋亡比死亡更易导致 AS 的形成。研究发现, 高糖环境下形成的糖基化终产物(advanced glycosylation end products, AGEs)可诱导内皮细胞凋亡^[1], AGEs 与糖尿病血管病变有密切的关系。肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)是最强的促血管内皮细胞生长因子, 其还能促进血管内皮细胞损伤的修复^[2]。本研究以 AGEs 诱导人脐静脉内皮细胞凋亡为模型, 探讨 HGF 干预后对内皮细胞凋亡的影响

[基金项目] 辽宁省教育厅高等学校科研基金资助项目(2004D159)

[作者简介] 周一军(1969-), 男, 博士。研究方向: 糖尿病大血管病变。

[通讯作者] 张锦, E-mail: zhangjin@163.com

及其相关机制。

1 材料与方法

1.1 材料

重组人 HGF(rhHGF)(美国 R & D 公司), 兔抗人 Bax、Bcl-2 单克隆抗体(Santa Cruz 公司); RP-MI-1640 细胞培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司); 人血清白蛋白(HSA)、D-葡萄糖、二甲基亚砜(DMSO)、四甲基偶氮唑蓝、碘化丙啶(PI)(美国 Sigma 公司); caspase-3 活性检测试剂盒(美国 BD 公司)。

1.2 糖基化终末产物的制备^[3]

0.5 g 人血清白蛋白(HSA), 3.0 g D-葡萄糖, 1 000 μg 青霉素, 500 μg 庆大霉素溶于 10 ml 0.5 mol/L PBS(pH7.4) 中, 0.22 μm 微孔膜过滤除菌, 恒温 37 ℃ 避光孵育 90 d。孵育结束以无菌的 pH 7.4 的 PBS 透析, 除去未结合的葡萄糖。以同样条件, 不含 D-葡萄糖的孵育液培养的 HSA 作为对照。制备的 AGEs 修饰的人血清白蛋白(AGE-HSA) 经荧光分光光度法鉴定, AGEs 含量为 78.2 kU/g, HSA 对照样本为 2.36 kU/g。

1.3 血管内皮细胞培养及分组

人脐静脉内皮细胞株(HUVECs) 购自上海中科院细胞研究所。生长于含 10% 灭活胎牛血清的 RP-MI-1640 培养基中, 置 37 ℃、5% CO₂ 饱和湿度孵箱内培养。2~3 d 换液 1 次, 细胞经传代, 待细胞生长至亚融合状态时, 改用无血清培养液孵育。实验处理分组: 实验对照组为培养液加入 200 mg/L HSA; AGEs 组: 分别在培养液中加入 AGE-HSA, 使培养液中 AGE-HSA 终浓度分别为 100 mg/L、200 mg/L、400 mg/L; 干预组: 400 mg/L AGE-HSA + 100 ng/ml rhHGF。每个实验重复 3 次。

1.4 四甲基偶氮唑蓝法测定细胞生长抑制率

取对数生长期细胞制成 3×10^5 /ml 的细胞悬液, 接种于 96 孔培养板内, 每孔 100 μl, 4h 细胞贴壁后, 按上述实验处理分组, 每组设 8 个复孔, 调零孔加 100 μl 培养液, 继续培养 12, 24, 48, 72 h, 结束前 4 h 每孔吸去上清液, 加 100 μl 浓度 0.5 mg/ml MTT 培养 4 h, 调零孔不加 MTT, 吸去全部上清液, 然后每孔加 200 μl DMSO, 震荡摇匀, 使结晶充分溶解, 酶联免疫检测仪测每孔吸光度(A)值(检测波长 570nm)。细胞抑制率 = $(1 - \text{实验组 A 值}/\text{对照 A 值}) \times 100\%$ 。

1.5 瑞氏-吉姆萨染色观察凋亡细胞

内皮细胞爬于盖玻片后, 经不同处理, 捞出盖玻片, PBS 洗 3 次, 甲醇固定, 瑞氏-吉姆萨室温染色 20

min, 室温晒干 24 h。用二甲苯浸泡 3 min, 使玻片透明, 反转放于洁净载玻片上, 用树脂封片。镜下观察, 摄片。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡

分别收集不同时间的各组细胞, PBS 洗细胞 2 次, 用预冷的 70% 乙醇固定, 4 ℃ 过夜, 离心并将细胞重悬于 1 ml PBS 调整细胞浓度为 5×10^6 /ml, 加 Rnase 及 PI, 避光 4 ℃ 染色 30 min。流式细胞仪检测凋亡细胞的百分比, 用 CELL Quest 软件对结果进行分析。

1.7 Western blotting 检测

经上述处理后于相应的时间收集细胞, 冷 PBS 洗 2 次, 加入预冷细胞裂解液裂解细胞, 超声破碎, 提取物冰上孵育 30 min, 12 000 r/min, 4 ℃ 离心 20 min, 上清液中的蛋白浓度经考马斯亮蓝法定量。每组取 20 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分离, 转移到硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶粉的 TBST 4 ℃ 封闭过夜, 加入一抗(兔抗人 Bax、bcl-2 单抗, 1:400) 室温振荡 3 h, TBST 洗膜 10 min \times 3 次, 辣根过氧化物酶标记的抗兔 IgG 室温孵育 1 h, 常规洗膜, 化学发光试剂显色。QWIN 图像分析系统蛋白条带扫描和灰度分析。

1.8 检测 caspase3 活性

分别收集各组细胞, 1 500 r/min, 离心 10 min, PBS(pH7.4) 洗 1 次, 3 000 r/min 离心 5 min, 弃上清。4 ℃ 50 μl 细胞裂解液重悬细胞, 冰浴 10 min, 4 ℃ 10 000 r/min, 离心 10 min, 保留上清。加 50 μl 2 \times Reaction Buffer/DTMmix 及 DEVD-fmk 1 ml, 冰浴 30 min, 加 5 μl 1 mmol/L DEVD-PNA, 37 ℃ 水浴 2 h, 加样至 96 孔培养板, 酶联免疫检测仪测 A 值, 检测波长为 405 nm。

1.9 统计学处理

采用 SPSS12.0 软件进行统计学分析。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析, SNK 检验两两比较。以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 细胞生长抑制率测定

不同浓度 AGE-HSA 作用不同时间对 HUVECs 的细胞生长抑制率(表 1)。AGE-HSA 对体外生长的 HUVECs 的生长抑制率随作用时间延长和浓度的升高而增加($P < 0.01$)。当 AGE-HAS 浓度为 400 mg/L 时, 加入 rhHGF 处理后, 与处理前相比, 不同时间的细胞生长抑制率显著降低($P < 0.05$), 见表 1。

2.2 细胞形态学结果

HUVECs 瑞氏-吉姆萨染色显微镜下观察:对照组正常细胞核染色均匀,颜色稍淡;AGE 组凋亡细胞,细胞质固缩,核致密浓染,核碎裂呈颗粒状;加入 rhHGF 干预后核浓染、固缩及核碎裂的细胞较 AGE 组明显减少。

2.3 流式细胞仪检测凋亡结果

AGE-HSA 作用后, HUVECs 凋亡率随 AGE-HSA 浓度增加而升高,随时间延长而增加,差异有显著意义 ($P < 0.01$),见表 2。加入 100 ng/ml rhHGF 处理后使 400 mg/L AGE-HSA 诱导的不同时间的 HUVECs 凋亡率明显降低 ($P < 0.05$),见表 2。

表 1 不同时间各组内皮细胞生长抑制率的比较 ($\bar{x} \pm s, \%, n = 8$)

Tab. 1 Comparison of growth inhibition rates of HUVECs at different time points among groups ($\bar{x} \pm s, \%, n = 8$)

分 组	12 h	24 h	48 h	72 h
AGEs 组 100 mg/L	3.1 ± 1.3	5.2 ± 1.6	13.4 ± 1.4	20.5 ± 1.5
200 mg/L	10.4 ± 1.6 ¹⁾	18.9 ± 1.8 ¹⁾	45.2 ± 1.3 ¹⁾	52.3 ± 1.4 ¹⁾
400 mg/L	19.1 ± 0.6	45.5 ± 6.0 ²⁾	68.6 ± 5.0 ²⁾	78.4 ± 6.1 ²⁾
AGEs + rhHGF 组	15.3 ± 0.4	31.7 ± 2.2 ³⁾	56.4 ± 4.4 ³⁾	68.1 ± 5.2 ³⁾

注:1)与 AGE 组 100 mg/L 比较 $P < 0.01$;2)与 AGE 组 200 mg/L 比较 $P < 0.01$;
3)与 AGE 组 400 mg/L 比较 $P < 0.05$

表 2 不同时间各组内皮细胞凋亡率的比较 ($\bar{x} \pm s, \%, n = 4$)

Tab. 2 Comparison of apoptotic rates of HUVECs at different time points among groups ($\bar{x} \pm s, \%, n = 4$)

分 组	12 h	24 h	48 h	72 h
对照组	1.09 ± 1.5	2.15 ± 1.4	4.36 ± 1.6	6.87 ± 1.5
AGEs 组 100 mg/L	3.48 ± 1.3	6.59 ± 1.6	10.87 ± 1.4	16.25 ± 1.6
200 mg/L	9.58 ± 1.6	14.56 ± 1.8	25.56 ± 1.3	32.58 ± 1.4
400 mg/L	20.75 ± 0.6	35.59 ± 2.0	45.38 ± 1.3	58.48 ± 2.1
AGEs + rhHGF 组	12.25 ± 0.4 ¹⁾	23.63 ± 2.2 ¹⁾	36.25 ± 1.4 ¹⁾	43.52 ± 2.4 ¹⁾

注:1)与 AGE 组 400 mg/L 比较 $P < 0.05$

2.4 Western blot 检测 Bax、Bcl-2

HUVECs 经 AGE-HSA (100、200、400 mg/L) 作用 48h,随着 AGE-HSA 浓度的增加, HUVECs 凋亡过程中 Bax 蛋白表达与对照组比较呈上调趋势 ($P < 0.01, n = 4$),而 Bcl-2 蛋白表达无显著性差异;加入 rhHGF 后上调 Bcl-2 蛋白表达 ($P < 0.01, n = 4$),Bax 蛋白表达降低,但无统计学意义。

2.5 caspase3 活性检测结果

400 mg/L AGE-HSA 作用 48 h, caspase-3 活性为 0.214 ± 0.034 ,对照组为 0.075 ± 0.026 , caspase-3 活性明显增高 ($P < 0.01$);随着时间的延长,活性增加;400 mg/L AGE-HSA 加入 rhHGF 干预 48 h, caspase3 为活性 0.116 ± 0.031 ,活性明显降低 ($P < 0.05$)。

3 讨论

血管内皮细胞的过度凋亡在 AS 形成过程中可能发挥触发、维持与加速作用。内皮细胞凋亡不但使血管内皮防止血脂沉积的屏障作用、局部抗凝和纤溶机制减弱,而且凋亡的内皮细胞具有致凝作用,这些因素造成血管壁局部血栓形成,加速 AS 发展。AGEs 是蛋白质的氨基组与糖的醛基组发生的非酶

性糖化、氧化反应的终末期产物。正常机体体内存在少量 AGE 修饰蛋白,可通过与单核/巨噬细胞等细胞表面的 RAGE 相互作用而被清除、降解。糖尿病、慢性肾衰竭患者体内 AGEs 水平明显高于正常人群,体内滞留的 AGEs 在糖尿病慢性并发症大血管病变、慢性肾衰竭血液透析的远期并发症如 AS 的发生、发展中具有重要作用^[4]。有研究表明^[2] AGEs 通过 AGEs 受体 (RAGE) 介导诱导血管内皮细胞的凋亡。内皮细胞受到 AGEs 刺激后,激活核转录因子 (NF- κ B),单核巨噬细胞分泌 TNF- α 增加,诱导内皮细胞凋亡;另外也可通过特异性核转录因子调节凋亡基因^[5]。

本研究以 AGE-HAS 作用于体外人脐静脉内皮细胞,结果发现 AGEs 对血管内皮细胞生长有明显的抑制作用,其抑制率具有明显,AGEs 浓度依赖性和作用时间依赖性。通过瑞氏-吉姆染色镜下观察到典型的凋亡细胞的形态特征。说明 AGEs 抑制人血管内皮细胞生长的作用主要通过诱导细胞凋亡实现的。应用 FCM 检测发现,AGEs 诱导血管内皮细胞的凋亡率随浓度升高和作用时间延长而升高,具有浓度与时间依赖性。本研究进一步显示 AGEs 能够引起内皮细胞活性明显降低并诱导内皮细胞凋

亡。因此,保护内皮细胞,防止 AGEs 诱导其过度凋亡具有积极的抗 AS 作用。

HGF 最初被认为是肝细胞中最强的促有丝分裂物质,促进肝细胞的增生。现在认为它也是特异性内皮生长因子之一。同 bFGF、VEGF、IL-1 和 IL-6 相比,HGF 是最强促内皮细胞刺激因子。此外,HGF 还能促进内皮细胞的运动和内皮细胞损伤的修复。在内皮细胞和血管平滑肌细胞中的局部 HGF 系统(HGF 和其受体 c-met)已在机体内外得到证实^[6,7]。MORISHITA R. 等研究发现 HGF 能够抑制高糖环境下内皮细胞的程序性死亡(凋亡),促进血管内皮细胞再修复,起到抗 AS 的作用^[3]。在实验中我们发现高浓度 AGEs 条件下,血管内皮细胞数目明显减少,加入重组 hHGF 后,AGEs 对内皮细胞凋亡作用明显减弱。目前尚不完全清楚 HGF 抑制内皮细胞凋亡、促进内皮细胞生长的机制,可能是通过激活 Bag-1、Bcl-xL、Bcl-2 来实现的^[8]。研究发现 Bag-1 基因与 HGF 受体 c-met 和抑制凋亡基因 Bcl-2 均有结合能力,当 Bag-1 和 Bcl-2 结合可促进 Bcl-2 的抑制细胞凋亡作用,并推测 HGF 的特异信号可通过 Bag-1 促进 Bcl-2 的抑制细胞凋亡功能^[9]。本研究结果显示:AGEs 不改变 Bcl-2 蛋白的表达但上调促凋亡基因 Bax 蛋白的表达,并增强 Caspase-3 的活性。Bax 高表达可通过线粒体通路从胞浆向线粒体转运,促进线粒体内膜跨膜电位下降,细胞凋亡启动因子细胞色素 c 从线粒体内释放,后者激活 caspase-9、增强 caspase-3 的水解活性,进而诱导内皮细胞凋亡^[10];而 rhHGF 可明显增强 Bcl-2 表达,抑制 caspase-3 的活性。HGF 可能通过 Bcl-2 表达增强阻抑 Bax 从胞浆向线粒体转运,抑制 caspase-3 的激活,从而抑制内皮细胞的凋亡^[11]。有关 HGF 抗凋亡的确切机制,有待于进一步研究证实。

参考文献:

- [1] 郑超,文格波,曹仁贤,等. 糖基化终末产物对人脐静脉内皮细胞凋亡及其受体表达的影响[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2003,19(2):115-118.
- [2] MORRISHI R, NAKAMURA S, HAYASHI S, et al. Contribution of a vascular modulator, hepatocyte growth factor (HGF), to the pathogenesis of cardiovascular disease[J]. *Atheroscler Thromb*, 1998, 4(3): 128-134.
- [3] GOPALKRISHNAPILLAI B, NADATHANGAM V, KARMAKAR N, et al. Evaluation of autofluorescent property of hemoglobin-advanced glycation end product as a long-term glycemic index of diabetes[J]. *Diabetes*, 2003,52(4):1041-1046.
- [4] MIYATA T, WADA Y, CAI Z, et al. Implication of an increased oxidative stress in the formation of advanced glycosylation end products in patients with end-stage renal failure[J]. *Kidney Int*, 1997,51(4): 1170-1181.
- [5] SCHMIDT AM, YAN SD, WAUTIER JL, et al. Activation of receptor for advanced glycosylation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 1999,84(5): 489-497.
- [6] NAKAMURA Y, MORISHITA R, Higaki J, et al. Hepatocyte growth factor (HGF) is a novel member of endothelium-specific growth factors: additive stimulatory effect of HGF with basic fibroblast growth factor, but not vascular endothelial growth factor[J]. *J Hypertens*, 1996,14(8): 1067-1072.
- [7] NAKAGAMI H, KANEDA Y, OGIHARA T, et al. Hepatocyte growth factor as potential cardiovascular therapy[J]. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2005, 8(3):513-519.
- [8] WANG X, ZHOU YS, KIM HP, et al. Hepatocyte growth factor protects against hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in endothelial cells[J]. *J Biol Chem*, 2004,279(7): 5237-5243.
- [9] ANTOKU K, MASER RS, SCULLY WJ JR, et al. Isolation of Bcl-2 binding proteins that exhibit homology with BAG-1 and suppressor of death domains protein[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 286(5): 1003-1010.
- [10] NAKAGAMI H, MORISHITA R, YAMAMOTO K, et al: Phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase downstream of bax-caspase-3 pathway leads to cell death induced by high D-glucose in human endothelial cells[J]. *Diabetes*, 2001, 50 (4): 1472-1481.
- [11] NAKAGAMI H, MORISHITA R, YAMAMOTO K, et al. Hepatocyte growth factor prevents endothelial cell death through inhibition of bax translocation from cytosol to mitochondrial membrane[J]. *Diabetes*, 2002,51(8): 2064-2611.

[收稿日期] 2005-10-08