

缬沙坦对人冠脉内皮细胞氧化应激过程中 gp91^{Phox} 的影响

王成^{1,2} 韩卫星¹ 吴继军¹ 刘超³ 刘晓颖⁴

摘要 目的 研究缬沙坦对人冠脉内皮细胞(HCAEC)氧化应激过程中 gp91^{Phox} 的影响。方法 对照组:体外贴壁培养 HCAEC,不进行其他干预;实验组:相同培养条件下加入缬沙坦(10 μmol/L)培养 24 h。应用 Western blot 法和细胞免疫荧光法测定两组细胞中 gp91^{Phox} 的水平,对两组结果进行统计分析并比较。结果 实验组 HCAEC 中 gp91^{Phox} 的水平明显低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 缬沙坦可以显著减少 HCAEC 中尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶亚基 gp91^{Phox} 的表达,从而降低氧化应激水平。

关键词 缬沙坦;人冠脉内皮细胞;氧化应激;gp91^{Phox}

中图分类号 R 541.4; R 972+.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)06-0739-04

氧化应激是指机体内产生活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)系统的氧化作用水平与具有阻止其效应、修复其损害的抗氧化系统的抗氧化作用水平失衡。体内的 ROS 产生过多或机体的抗氧化能力减低,致使 ROS 清除不完全,而在机体内聚积,产生氧化性损伤^[1-2]。尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶是体内产生 ROS 的重要酶之一,是由细胞膜亚基 gp91^{Phox}、p22^{Phox},细胞浆亚基 p40^{Phox}、p47^{Phox}、p67^{Phox} 以及小分子的 GTP 酶结合蛋白 Rac 组成的复合物^[3]。血管紧张素 II 受体拮抗剂(angiotensin receptor blocker, ARB)成为目前临床治疗心血管系统疾病的常用药,可干扰 NADPH 氧化酶以降低氧化应激水平。针对 NADPH 氧化酶所采用的抗氧化治疗可能成为今后预防和与治疗与氧化应激有关疾病的作用靶点^[4],从而也为心血管疾病的临床抗氧化治疗提供一个新途径。然而 ARB 类药物如何通过 NADPH 氧化酶来降低氧化应激水

平的具体途径和机制尚不明确。该研究旨在探讨 ARB 类药物缬沙坦对人冠脉内皮细胞(human coronary artery endothelial cell, HCAEC)氧化应激过程中 NADPH 氧化酶亚基 gp91^{Phox} 的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 HCAEC 购自上海拜力生物科技有限公司。

1.1.2 主要试剂 DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司;胎牛血清购自杭州四季青公司;缬沙坦购自美国 Sigma 公司;小鼠抗人多克隆抗体 gp91^{Phox} 购自美国 Santa Cruz 公司;小鼠抗人单克隆抗体 β-actin、TRITC 标记山羊抗小鼠 IgG 和辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG 均购自北京中杉金桥生物技术有限公司;BCA 试剂盒和 ECL 发光试剂盒均购自美国 Pierce 公司;蛋白 Marker 购自北京全式金公司;DAPI 购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞复苏、培养和传代 细胞复苏、培养和传代按常规方法操作。细胞以 10⁵ 密度传代,传代细胞随机分两组:一组作为对照组,对照组细胞常规培养,不做任何处理;另一组作为实验组,实验组在细胞传代 2 h 后,细胞基本贴壁时,加入缬沙坦(10 μmol/L)并记时,待处理 24 h 后,取出两组培养的细胞备用。

1.2.2 蛋白样品的提取 分别取出上述两组细胞置于冰上,吸出培养液,用预冷的 PBS 液洗 3 次,再加 1 ml 预冷 PBS 吹打贴壁细胞,收集实验组和对照组的细胞于 EP 管中,4 ℃ 离心 2 min(4 000 r/min),分别加入预冷细胞裂解液,在冰水中超声裂解细胞 15 s,4 ℃ 离心 10 min(4 000 r/min),分别收集上清液于新 EP 管中,4 ℃ 离心 20 min(14 000 r/min),此时上清液即为细胞质蛋白成分,沉淀部分用分析液溶解即为细胞膜蛋白成分。提取的细胞质和细胞膜蛋白,并用 BCA 试剂盒进行定量,加入上样缓冲液,放入煮沸的水浴锅内加热 5 min, -20 ℃ 保存备用。

2014-02-17 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81070210)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院心血管内科,合肥 230022

安徽医科大学²第一临床学院诊断学教研室、³基础医学院组织与胚胎学教研室、⁴生命科学院细胞生物学教研室,合肥 230022

作者简介:王成,男,硕士研究生;

韩卫星,女,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: ayhwx57@163.com

1.2.3 Western blot 法测定细胞中 gp91^{Phox} 的水平

取出上述的蛋白样品,行 SDS-PAGE 电泳分离蛋白质,5% 浓缩胶以 80 V 电压电泳约 30 min,12% 分离胶以 100 V 电压电泳约 120 min。完成后取出凝胶,以 80 V 电压转膜约 60 min,将蛋白转到 PVDF 膜上。取出 PVDF 膜,以 5% 脱脂奶溶液封闭 2 h,再加小鼠抗人 gp91^{Phox} IgG (1 : 500) 于 4 °C 孵育过夜。以 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,洗涤后加辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG (1 : 5 000),室温孵育 2 h,同时以 β-actin (1 : 1 000) 作为内参,最后用 ECL 发光试剂盒检测,压片曝光显影。

1.2.4 细胞免疫荧光法测定细胞中 gp91^{Phox} 的水平

细胞免疫荧光片的制作,常规传代培养细胞,放入用多聚赖氨酸预处理的盖玻片,2 h 后待细胞基本贴壁时,实验组加入缬沙坦 (10 μmol/L),对照组不做任何处理,待 24 h 后取出盖玻片,用 PBS 溶液洗 3 次,每次 5 min,-20 °C 预冷的甲醛固定 2 min,弃甲醛,70% 乙醇室温固定 5 min,弃乙醇,PBS 溶液洗 3 次,每次 5 min。1% 脱脂奶溶液封闭 30 min,再加小鼠抗人 gp91^{Phox} IgG (1 : 100) 室温孵育 2 h。以封闭液洗 3 次,每次 5 min,再以 TRITC 标记山羊抗小鼠 IgG (1 : 200) 作为二抗,室温孵育 1 h,PBS 溶液洗 3 次,每次 5 min,以 0.5 μg/ml DAPI 溶液 100 μl 覆盖盖玻片,室温 3 min,PBS 溶液洗 3 次,每次 5 min,用荧光封片胶封片,4 °C 避光储存,隔夜后于荧光显微镜下拍照。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 Western blot 法检测缬沙坦对 HCAEC 中 gp91^{Phox} 表达水平的影响 与对照组比较,实验组在 HCAEC 中 gp91^{Phox} 表达水平明显降低,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),见图 1。

2.2 细胞免疫荧光法观察缬沙坦对 HCAEC 中 gp91^{Phox} 表达水平的影响 采用细胞免疫荧光方法观察结果如下:与对照组比较,实验组在 HCAEC 中 gp91^{Phox} 表达水平显著降低,见图 2。

3 讨论

冠心病已成为目前心血管疾病中导致猝死的主要原因之一,其发病原因已经不能完全用那些传统危险因素加以解释,如吸烟、糖尿病、高血压和高血

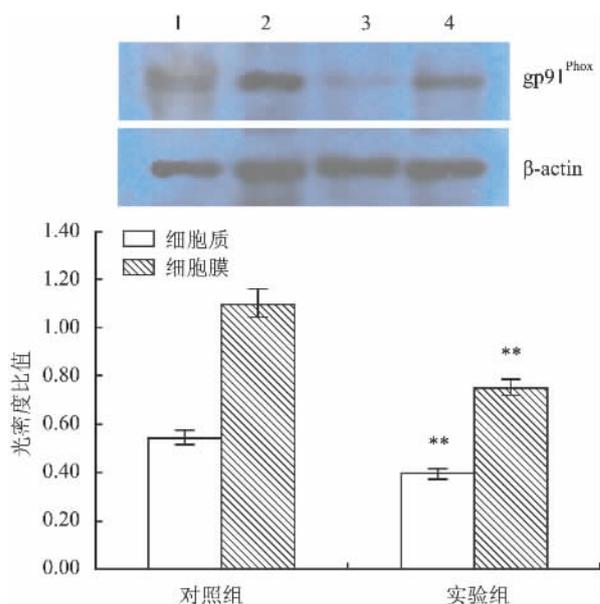


图1 Western blot 法检测缬沙坦对 HCAEC 中 gp91^{Phox} 蛋白表达的影响

1: 对照组细胞质; 2: 对照组细胞膜; 3: 实验组细胞质; 4: 实验组细胞膜; 与对照组比较: ** $P < 0.01$

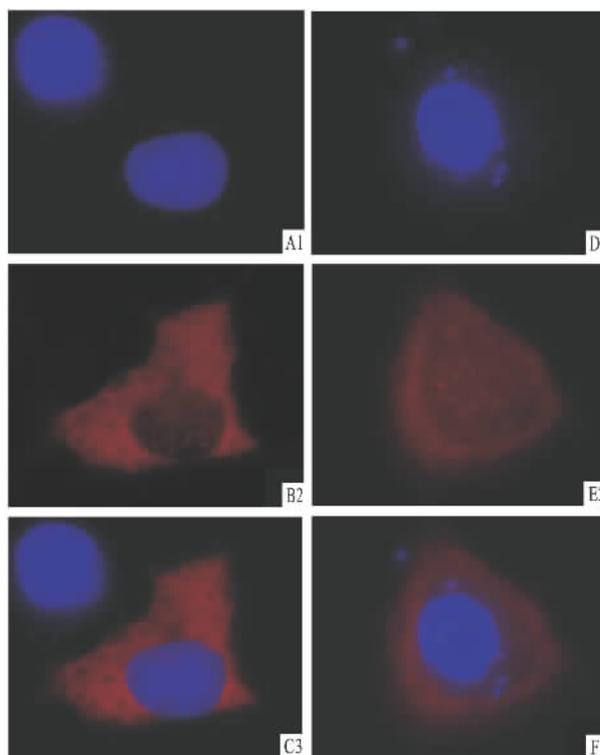


图2 荧光显微镜观察缬沙坦对 HCAEC 中 gp91^{Phox} 蛋白表达的影响 ×1 000

A、B、C: 对照组; D、E、F: 实验组; 1: DAPI 染色示细胞核; 2: TRITC 标记 gp91^{Phox} 蛋白; 3: MERGE 为相应组 1 和 2 两个图像的叠加

脂等。氧化应激作为一个新的角色,在冠心病的发

生发展过程中起了重要的作用。氧化应激时机体内各种有害刺激导致 ROS 的产生,而抗氧化防御与其严重失衡,致使 ROS 积蓄,从而引起细胞毒性反应和组织损伤^[5]。当 ROS 生成过多而抗氧化酶活性不足时,就会引起蛋白质、脂质以及核酸等的氧化性损伤,造成细胞生物学功能发生障碍,从而引起相关疾病发生、发展^[6]。

氧化应激在动脉粥样硬化发生、发展的众多危险因素以及分子水平损伤机制里都有其参与^[7]。研究^[8]表明 ROS 不仅存在于动脉粥样硬化的发病机制,而且病程进展中也一直有 ROS 的存在。冠状动脉斑块的形成以及破裂与 ROS 的氧化性损伤作用有关,其可以作用于血管内皮细胞和血管平滑肌细胞,从而引起多种细胞因子产生及活化,导致内皮细胞发生凋亡以及血管平滑肌细胞产生迁移,最终引起冠状动脉内斑块的形成以及破裂。Honjo et al^[9]研究发现,在冠状动脉粥样硬化患者的冠脉中 NADPH 氧化酶的表达显著增强,并且脉管中被氧化的低密度脂蛋白的分布也与 NADPH 氧化酶以及 ROS 有着密切的联系,氧化型低密度脂蛋白是导致内皮细胞损伤以及诱导内皮细胞内促炎症因子表达的重要原因,脉管中的 NADPH 氧化酶、ROS 以及低密度脂蛋白形成了一个恶性循环。

动脉粥样硬化是冠心病发病的基础,而动脉粥样硬化是一种由于氧化应激引起和放大的血管壁的炎症反应,而 ARB 类药物可以降低氧化应激水平^[10]。内皮功能障碍是动脉粥样硬化发生的第一步,肾素-血管紧张素系统在发展内皮功能障碍和动脉粥样硬化中扮演重要的角色,许多临床试验^[11]显示 ARB 类药物能减少心血管疾病的发生,表明 ARB 类药物能预防和延迟动脉粥样硬化。临床中运用 ARB 类与他汀类药物联合用药治疗心血管系统疾病,可以更好的降低组织的氧化应激水平,比两者单独使用更加有效^[12]。氧化应激在众多的心血管疾病尤其是在冠心病的发生发展中有着重要的作用,传统治疗方法疗效始终有限,而介入支架治疗创伤性较大且治标不治本,容易二次堵塞,因此在传统治疗方法上联合抗氧化治疗已成为一种趋势,而 ARB 类药物也成为目前临床首选的抗氧化治疗药物之一。虽然目前临床抗氧化治疗冠心病尚未取得预期的疗效,但随着对氧化应激研究的不断深入,新型抗氧化剂的发现,冠心病的治疗定会取得满意疗效。

鉴于 ARB 类药物对 NADPH 氧化酶的影响,本实验研究了 ARB 类药物对 NADPH 氧化酶亚基 gp91^{Phox} 的影响,并表明缬沙坦可以抑制 HCAEC 的 NADPH 氧化酶亚基 gp91^{Phox} 的表达,缬沙坦可以抑制血管的氧化应激反应,提示可能是 ARB 类药物能够降低氧化应激水平的机制之一;同时,也说明缬沙坦对冠状动脉氧化应激状态有抑制作用,应该对冠心病的防治有益。但 ARB 类药物对 NADPH 氧化酶的其他亚基影响及作用机制,将是本实验室接下来需要研究的。

参考文献

- [1] Ansley D M, Wang B. Oxidative stress and myocardial injury in the diabetic heart [J]. *J Pathol*, 2013, 229(2): 232-41.
- [2] Raedschelders K, Ansley D M, Chen D D. The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion [J]. *Pharmacol Ther*, 2012, 133(2): 230-55.
- [3] Gardiner G J, Deffit S N, McLetchie S, et al. A Role for NADPH Oxidase in Antigen Presentation [J]. *Front Immunol*, 2013, 4: 295.
- [4] Drummond G R, Selemidis S, Griendling K K, et al. Combating oxidative stress in vascular disease NADPH oxidases as therapeutic targets [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2011, 10(6): 453-71.
- [5] 鹿敏, 刘晓颖, 韩卫星. 多巴胺受体和脂筏对高血压患者细胞 NADPH 氧化酶的作用 [J]. *安徽医科大学学报*, 2013, 48(3): 211-5.
- [6] Gamkrelidze M, Mamamtavrishvili N, Bejitashevili N, et al. Role of oxidative stress in pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Georgian Med News*, 2008 (163): 54-7.
- [7] Aristidis S, Nikolaidis M G, Kyparos A, et al. Effects of xanthine oxidase inhibition on oxidative stress and swimming performance in rats [J]. *Appl Physiol Nutr Metab*, 2008, 33(6): 1140-54.
- [8] Pastori D, Carnevale R, Pignatelli P. Is there a clinical role for oxidative stress biomarkers in atherosclerotic diseases? [J]. *Intern Emerg Med*, 2014, 9(2): 123-31.
- [9] Honjo T, Yamaoka-Tojo M, Inoue N. Pleiotropic effects of ARB in vascular metabolism-focusing on atherosclerosis-based cardiovascular disease [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2011, 9(2): 145-52.
- [10] Aoyama T, Minatoguchi S. The effect of ARB on prevention of atherosclerosis [J]. *Nihon Rinsho*, 2011, 69(1): 92-9.
- [11] Patarroyo Aponte M M, Francis G S. Effect of Angiotensin-converting enzyme inhibitors and Angiotensin receptor antagonists in atherosclerosis prevention [J]. *Curr Cardiol Rep*, 2012, 14(4): 433-42.
- [12] Kim-Mitsuyama S. Pharmacological characteristics of ARB and potential strategy to develop novel ARB [J]. *Nihon Rinsho*, 2009, 67(4): 812-8.

不同浓度的胎牛血清对骨髓间充质干细胞纯度及周期的影响

陈小丹, 何家才

摘要 目的 比较含有体积分数为 0.10、0.15、0.20 的胎牛血清(FBS)的完全培养基对体外培养的大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)纯度及细胞周期的影响,寻求适宜干细胞培养的 FBS 浓度。方法 用颈椎脱臼法处死 SD 大鼠,采用全骨髓贴壁法分离培养大鼠 BMSCs。实验分为 A、B、C 3 组,分别为 FBS 体积分数是 0.10、0.15、0.20 的完全培养基培养的 BMSCs,比较各组细胞在第 2、3、4、5 代(P₂, P₃, P₄, P₅)的 CD45、CD29、CD90、CD44 的表达情况;消化 A 组 P₃ 细胞,用 3 种不同浓度的完全培养基连续培养 4 d,用流式细胞仪测其在培养后的 24、48、72、96 h 的细胞周期;收集 P₃ BMSCs 制备细胞悬液接种到 6 块 96 孔板,每块板接种的 BMSCs 分别用 FBS 体积分数是 0.10、0.15、0.20 的完全培养基进行培

养,每天取 1 块培养板用 CCK-8 检测其吸光度值(OD)。结果 CD45 阴性表达,CD29、CD90、CD44 阳性表达,3 种完全培养基培养的 BMSCs 的表面标志物在前 2 代时差别较大,但在 P₃、P₄ 时差别已较少,P₄ 时均可以获得较纯的 BMSCs;细胞周期结果显示,在同一时间点,G₀/G₁ 期:A、B、C 3 组随着 FBS 浓度的增加,G₀/G₁ 期降低且差异无统计学意义;G₂/M 期:在培养后的 24 h,A、B、C 3 组差异有统计学意义($P < 0.05$, $F = 12.412$),但随着时间的延长,差异消失;S 期 3 组均无差别;S + G₂/M 期随 FBS 浓度的增加而增高。细胞活力结果显示,在 24 h 时 A、B、C 3 组的 OD 值依次增大,差异有统计学意义($P < 0.05$, $F = 5.002$),随时间的延长 3 组之间无明显差异。结论 这 3 种培养基在 P₄ 能获得较纯的 BMSCs;细胞周期及活力结果显示,3 种完全培养基均能促进 BMSCs 的增长,3 组之间不存在差异。体积分数为 0.10 的 FBS 已满足 BMSCs 的分离和扩增,要想在短期内获得较纯的 BMSCs,原代培养使用体积分数为 0.15,传代用 0.10 FBS 的完全培养基。

关键词 骨髓间充质干细胞;胎牛血清;细胞周期;表面标志物
中图分类号 R-33

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)06-0742-06

2013-12-20 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81371114);安徽省自然科学基金(编号:11040606M173);安徽医科大学博士科研资助基金(编号:XJ201034);安徽高校省级自然科学研究重点项目(编号:KJ2013A154)

作者单位:安徽医科大学口腔医学院,安徽医科大学附属口腔医院,安徽省口腔疾病研究中心实验室,合肥 230032

作者简介:陈小丹,女,硕士研究生;

何家才,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:hejiacai@163.com

骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem

Effect on gp91^{Phox} human coronary artery endothelial cells in the process of oxidative stress by valsartan

Wang Cheng^{1,2}, Han Weixing¹, Wu Jijun¹, et al

(¹Dept of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of Diagnostics, The First Clinical College of Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract **Objective** To study the effect on human coronary artery endothelial cells (HCAEC) gp91^{Phox} in the process of oxidative stress by valsartan. **Methods** The control group: adherent culture HCAEC *in vitro*, no other intervention; the experimental group: under the same conditions with valsartan (10 μmol/L) train for 24 hours. Using Western blot and cell immunofluorescence measure gp91^{Phox} levels in two groups of cells. The results were statistically analyzed and compared in both groups. **Results** The experimental group gp91^{Phox} level significantly lower than the control group in HCAEC ($P < 0.01$), the difference was statistically significant. **Conclusion** Valsartan can significantly decrease the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase subunit gp91^{Phox} expression in HCAEC, thus reduce oxidative stress level.

Key words valsartan; HCAEC; oxidative stress; gp91^{Phox}