

G1 对 EA.hy926 内皮细胞内质网应激的抑制作用

夏东晖¹, 曹幸毅², 王静宇³, 袁明³, 吴士文²

(1. 新乡医学院, 新乡市 453003; 2. 中国人民武装警察部队总医院, 北京市 100039;
3. 中国航天员科研训练中心, 航天医学基础与应用国家重点实验室, 北京市 100094)

【摘要】 目的 观察 GPR30 受体激动剂 G1 对高糖诱导的 EA.hy926 内皮细胞内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS) 的影响。方法 选用 EA.hy926 内皮细胞为研究对象, 分为 3 组: 正常对照组 (Con, 17.51 mmol/L 葡萄糖)、高糖组 (HG, 33.3 mmol/L 葡萄糖)、高糖 + G1 组 (HG + G1, HG + 1 μmol/L G1), 利用流式细胞术检测 3 组细胞凋亡率, Western blot 法检测 ERS 相关分子 Bip、IRE1、PERK 及凋亡分子 Bax、Bcl-2 的表达变化, RT-PCR 法检测 Bip 和 CHOP 的 mRNA 表达变化。结果 HG 组与 Con 组比较, 细胞凋亡率明显升高 ($P < 0.01$), Bip、IRE1、PERK 及凋亡分子 Bax 表达上调 ($P < 0.01$, $P < 0.05$ 或 $P < 0.001$), Bcl-2 的表达下调 ($P < 0.01$), Bip mRNA、CHOP mRNA 表达上调 ($P < 0.001$ 及 $P < 0.01$); HG + G1 组与 HG 组比较, 细胞凋亡率明显降低 ($P < 0.05$), Bip、IRE1、PERK 及凋亡分子 Bax 表达下调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), Bcl-2 的表达上调 ($P < 0.05$), Bip mRNA、CHOP mRNA 表达下调 ($P < 0.001$ 及 $P < 0.01$)。结论 GPR30 受体激动剂 G1 可抑制 EA.hy926 内皮细胞内质网应激。

【关键词】 G1; 内质网应激; 动脉粥样硬化; EA.hy926 内皮细胞

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 02-0026-06

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2014.02.006

Inhibitory effect of G1 on the endoplasmic reticulum stress in EA.hy926 endothelial cells

XIA Dong-hui¹, CAO Xing-yi², WANG Jing-yu³, YUAN Ming³, WU Shi-wen²

(1. Xinxiang Medical College, Xinxiang 453003, China; 2. Armed Police General Hospital, Beijing, 100039;
3. China Astronaut Research and Training Center, Beijing 100094)

【Abstract】 Objective To observe the effect of GPR30 agonist G1 on high glucose-induced endoplasmic reticulum stress (ERS) in endothelial EA.hy926 cells. **Methods** EA.hy926 endothelial cells were divided into three groups: normal control group (Con, 17.51 mmol/L glucose), high glucose (HG, 33.3 mmol/L), high glucose + G1 group (HG + G1, HG + 1 μmol/L G1). The apoptosis rate of endothelial cells was measured by flow cytometry, the protein expression changes of ERS related molecules Bip, IRE1, PERK and apoptotic molecules Bax, Bcl-2 were measured by Western blot, the mRNA expressions of Bip and CHOP were measured by RT-PCR assay. **Results** Compared with Con group, the apoptosis in HG group was significantly increased ($P < 0.01$), Bip, IRE1, PERK and apoptotic molecule Bax were upregulated ($P < 0.05$, $P < 0.01$ or $P < 0.001$), Bcl-2 downregulated ($P < 0.01$) and Bip mRNA, CHOP mRNA expression were upregulated ($P < 0.001$ and $P < 0.01$). Compared with the HG group, apoptosis rate in HG + G1 group was significantly lower ($P < 0.05$), BIP, IRE1, PERK and apoptotic molecules Bax downregulated ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), Bcl-2 expressions was increased ($P < 0.05$), Bip mRNA and CHOP mRNA expression were decreased ($P < 0.001$ or $P < 0.01$). **Conclusion** GPR30 agonist G-1 inhibits EA.hy926 ERS in endothelial cells.

【Key words】 G1; Endoplasmic reticulum stress; Atherosclerosis; EA.hy926 endothelial cells

[基金项目] 航天医学基础与应用国家重点实验室资助课题 (No. SMFA11A01)

[作者简介] 夏东晖 (1987 -), 男, 研究方向: 脑血管病。E-mail: 574808385@qq.com

[通讯作者] 吴士文, 硕士生导师。E-mail: neurowu@gmail.com; 袁明, E-mail: smfa@gmail.com

内皮细胞损伤是动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)发生的始动因素之一,持续的高血糖可诱导血管内皮细胞损伤甚至凋亡^[1]。内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)是细胞应对有害刺激时的一种保护性调节机制,但持续或程度较强的 ERS 可引起血管内皮细胞损伤及功能障碍,从而促进动脉粥样硬化的发生^[2-3]。先前的研究表明,雌激素可通过对抗高糖诱导的 ERS 调节内皮细胞功能^[4]。GPR30 作为新近发现的雌激素受体,激动 GPR30 可抵抗高糖导致的内皮细胞凋亡^[5],但这种保护作用是否通过抑制 ERS 相关通路尚未阐明。本实验应用高浓度葡萄糖干预 EA. hy926 内皮细胞,观察 ERS 与高糖诱导内皮细胞凋亡的关系,研究 GPR30 的特异性受体激动剂 G1 对高糖诱导内皮细胞 ERS 及凋亡的影响,探讨其保护效应。

1 材料与方 法

1.1 试剂与仪器

主要试剂:GPR30 受体激动剂 G1 (Sigma 公司,美国),Annex V 细胞凋亡检测试剂盒(BD Pharmingen 公司,美国),抗 Bip、IRE1、PERK、Bax、Bcl-2 抗体(Cell Signaling Technology 公司,美国),Trizol(Invitrogen 公司,美国)、PCR 引物(北京奥科生物技术有限公司,中国),反转录及实时定量 PCR 试剂盒(TaKaRa 公司,日本)。主要仪器:二氧化碳细胞培养箱(NUAIRE 公司,美国),倒置显微镜(Nikon TS100,日本),实时定量 PCR 仪(Eppendorf 公司,美国),电泳系统(Bio-rad,美国),流式细胞仪(BD FACS Aria II,美国)。

1.2 方法

表 1 PCR 引物序列

Tab.1 The primer sequences and PCR conditions

基因名称 Name of genes	引物序列 Sequence of primer	退火温度/℃ Annealing temperature	产物长度/bp Product length
Bip	5' AAACCGCTGAGGCTTATTGG 3' 3' CCAGCAATAGTCCAGCGGTCT 5'	58	345
CHOP	5' GACCTGCAAGAGGTCCTGTCTT 3' 3' AGCAGGGTCAAGAGTGGTGAA 5'	60	275
GAPDH	5' AACGTGCAAGAGGTCCTGTCTT3' 3' TTCAGGGTCAAGGTAATGA5'	58	307

1.2.4 蛋白印迹法^[6]检测 ERS 相关分子蛋白表达

根据实验分组处理 EA. hy926 内皮细胞,24 h 后收集细胞(1 × 10⁶ 细胞/组),使用蛋白裂解液及超声法提取细胞总蛋白,BCA 法测蛋白浓度,取 30 μg 蛋白加入样品缓冲液,100℃ 水煮沸 5 min。配制

1.2.1 细胞分组及处理方法

EA. hy926 内皮细胞培养于含 10% 胎牛血清、100U/mL 青霉素、100U/mL 链霉素的 DMEM/F-12 培养液中,在 5% CO₂、37℃ 细胞培养箱中培养。细胞达 80% 融合状态时,将细胞分为 3 组:正常对照组(Con,17.51 mmol/L 葡萄糖)、高糖组(HG,33.3 mmol/L)、高糖 + G1 组(HG + G1, HG + 1 μmol/L G1),3 组细胞同时处理 24 h。

1.2.2 流式细胞术检测细胞凋亡^[6]

根据实验分组处理后,使用 0.25% 胰酶消化 EA. hy926 内皮细胞,PBS 清洗 1 次,1500 g 离心 5 min,弃上清,收集细胞(1 × 10⁶ 细胞/组)。PBS 洗 3 次,以结合缓冲液重悬细胞沉淀,使细胞浓度为 1 × 10⁶/mL,100 μL 细胞悬液,加入 annexinV-PE 及 7-AAD 各 5 μL,室温避光 15 min,加入 400 μL 结合缓冲液,进行流式细胞术定量检测。以不加 annexinV-PE 及 7-AAD 的一管作为阴性对照。凋亡及死亡的细胞膜磷脂酰丝氨酸外翻以致 annexin V 染色阳性;而活细胞 annexin V 染色阴性;死亡细胞则为 7-AAD 染色阳性。即第一象限 7-AAD +/annexin V + 为死亡细胞,第二象限 7-AAD +/annexin V-为机械损伤的细胞,第三象限 7-AAD-/annexin V-为活细胞,第四象限 7-AAD -/annexin V + 为凋亡细胞。

1.2.3 RNA 提取与实时定量 PCR

按实验分组处理 EA. hy926 内皮细胞并用 Trizol 法提取各组总 RNA,取 RNA 产物 2 μg 反转录合成 cDNA。PCR 反应条件:95℃ 预变性 30 s,95℃ 变性 5 s,60℃ 退火 30 s,循环 40 次。使用 Eppendorff mastercycle 荧光定量 PCR 仪进行扩增及定量分析(表 1)。

SDS-PAGE 凝胶后加入样品后进行电泳,电泳结束后通过半干电转仪将样品转移到 PVDF 膜上,室温下摇床用含 5% 脱脂奶粉的 TBS-T 封闭 1 h,以 Bip、IRE1、PERK、Bax、Bcl-2、与抗体稀释液(1:1000)分别 4℃ 孵育过夜。TBS-T 清洗 PVDF 膜 3 次,每次

10 min, 然后与 HRP 抗兔抗体(1:1000)室温孵育 1 h 后, TBS-T 清洗 PVDF 膜 3 次, 每次 10 min, ECL 显色系统 X 线感光显影。用扫描仪对图片进行扫描, 以 GAPDH 蛋白作为内参照, 进行半定量分析。

1.2.5 统计分析

采用 Graphpad Prism5.0 分析软件对实验数据进行统计分析, 数据结果以 $\bar{x} \pm \text{SEM}$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 Newman-Keuls 检验, $P < 0.05$ 为差别有统计学意义。

2 结果

2.1 高糖对 EA. hy926 内皮细胞凋亡的影响及 G1 的作用

HG 组与 Con 组比较, 细胞凋亡率明显升高 [$(11.2 \pm 0.2)\%$ vs $(5.4 \pm 0.18)\%$, $P < 0.01$], 差异有显著性; HG + G1 组与 HG 组比较, 细胞凋亡率明显降低 [$(7.8 \pm 0.15)\%$ vs $(11.2 \pm 0.2)\%$, $P < 0.05$], 差异有显著性。见图 1。

2.2 高糖对 EA. hy926 细胞凋亡相关分子和 ERS 相关蛋白表达的影响及 G1 的作用

HG 组与 Con 组比较, Bip、IRE1、PERK 及凋亡

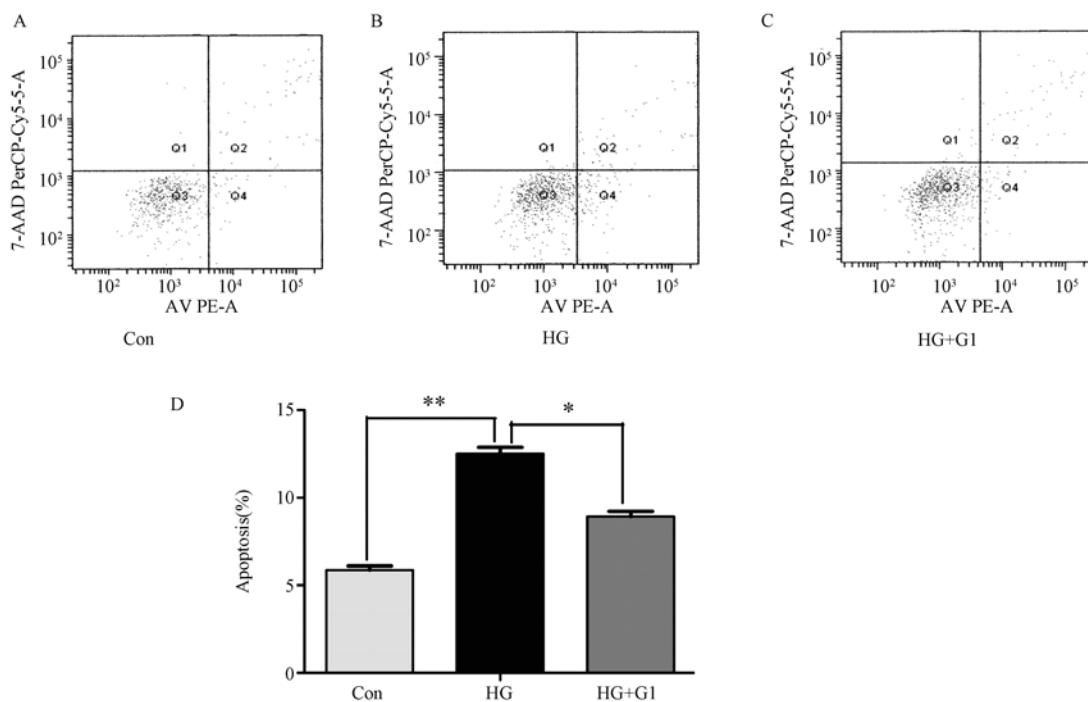
分子 Bax 表达上调 ($P < 0.05$, $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$), Bcl-2 的表达下调 ($P < 0.01$), 差异有显著性; HG + G1 组与 HG 组比较, Bip、IRE1、PERK 及凋亡分子 Bax 表达下调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), Bcl-2 的表达上调 ($P < 0.05$) 差异均有显著性。见图 2。

2.3 高糖对内皮细胞 Bip mRNA 和 CHOP mRNA 表达的影响及 G1 的作用

HG 组较 Con 组, Bip mRNA、CHOP mRNA 表达上调 ($P < 0.001$ 及 $P < 0.01$), 差异有显著性; HG + G1 组与 HG 组比较, Bip mRNA、CHOP mRNA 表达下调 ($P < 0.001$ 及 $P < 0.01$), 差异有显著性。见图 3。

3 讨论

血管内皮细胞损伤是动脉粥样硬化发生的早期事件, 致动脉粥样硬化的危险因素均可导致血管内皮细胞损伤甚至细胞凋亡^[7]。已有研究报道, 高糖作为动脉粥样硬化的危险因素, 可通过诱导内皮细胞损伤促进动脉粥样硬化的发生发展^[8], 本研究通过流式细胞术证实持续的高糖可诱导 EA. hy926 内皮细胞凋亡。

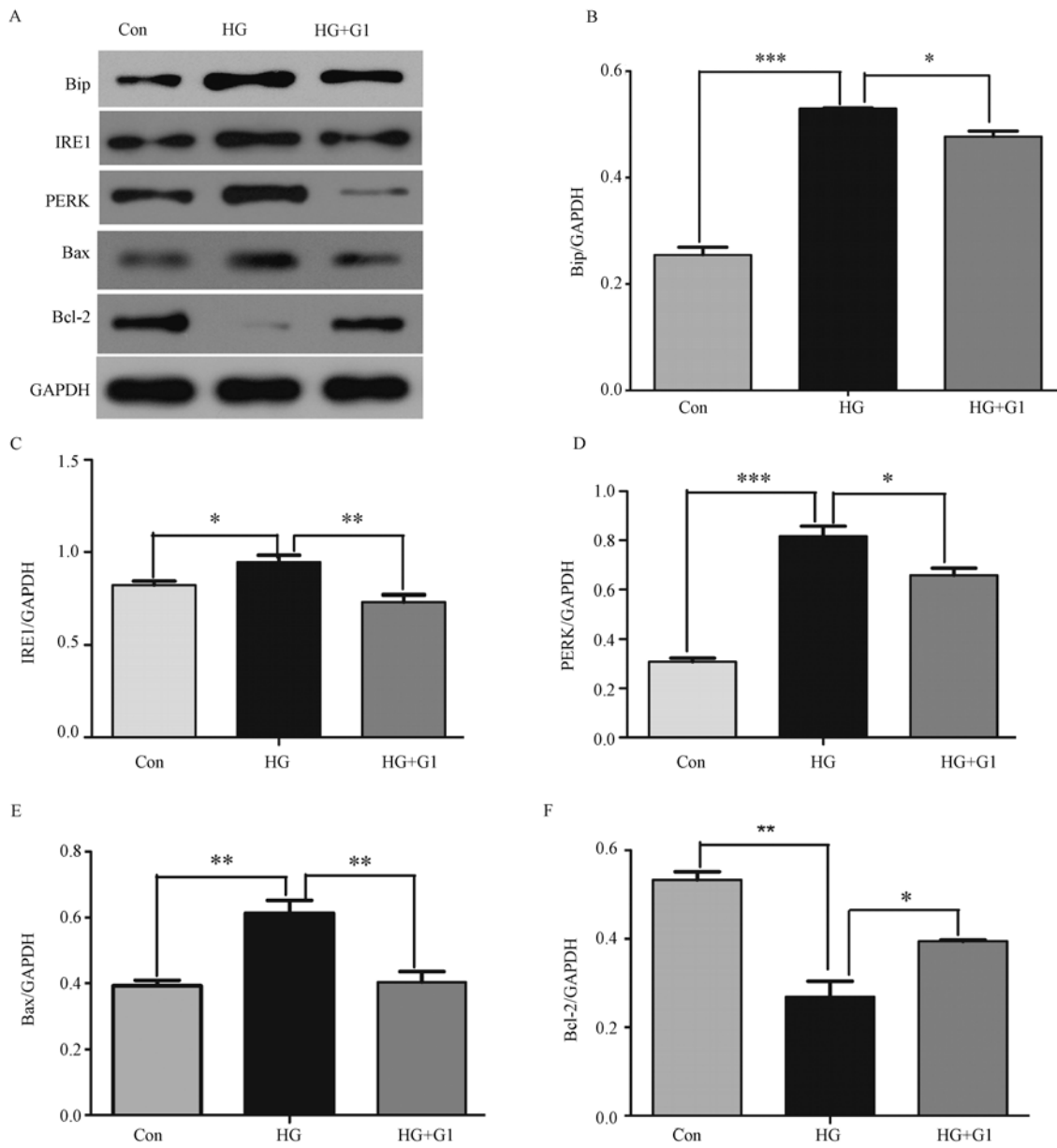


注: **为 HG 组与 Con 组相比差异有显著性, $P < 0.01$; * 为 HG + G1 组与 HG 组相比差异有显著性, $P < 0.05$ 。

图 1 流式细胞仪检测各组细胞凋亡水平

Note: **The difference between HG group and Con group is significant, $P < 0.01$; * The difference between HG group and HG + G1 group is significant, $P < 0.05$.

Fig. 1 The apoptosis rate of endothelial cells in each group measured by Flow cytometry

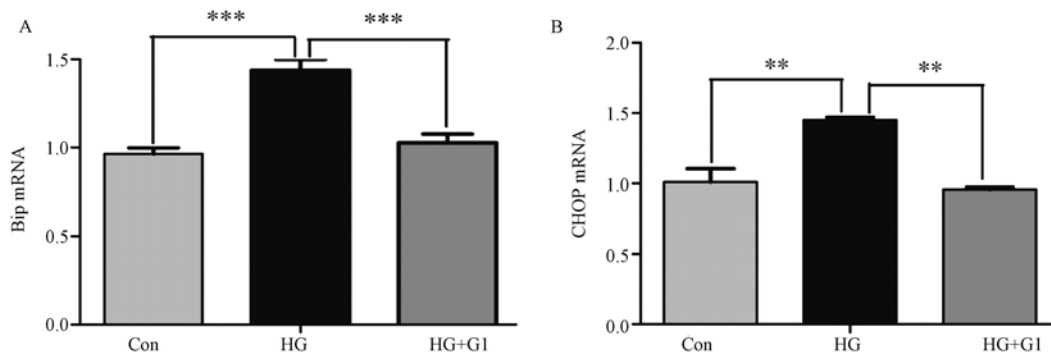


注:HG 组与 Con 组相比,Bip 表达上调($P < 0.001$);IRE1 表达上调($P < 0.05$);PERK 表达上调($P < 0.001$);Bax 表达上调($P < 0.01$);Bcl-2 表达下调($P < 0.01$)。结果差异均有显著性。HG + G1 组与 HG 组相比,Bip 表达下调($P < 0.05$);IRE1 表达下调差异有显著性($P < 0.01$);PERK 表达下调($P < 0.05$);Bax 表达下调($P < 0.01$);Bcl-2 表达上调($P < 0.05$)结果差异均有显著性。

图 2 各组内皮细胞 Bip、IRE1、PERK、Bax、Bcl-2 蛋白的表达

Note: HG group compared with the Con group, Bip expression increased ($P < 0.001$); IRE1 expression increased ($P < 0.05$); PERK expression increased ($P < 0.001$); Bax expression increased ($P < 0.01$); Bcl-2 expression lower ($P < 0.01$). The results showed significant differences. HG + G1 group compared with the HG group, Bip downregulated ($P < 0.05$); IRE1 downregulated There was significant difference ($P < 0.01$); PERK downregulated ($P < 0.05$); Bax downregulated ($P < 0.01$); Bcl-2 expression increased ($P < 0.05$) results have significant differences.

Fig. 2 The protein expression of Bip, IRE1, PERK, Bax, Bcl-2 in endothelial cells for each group



注: ***为 HG 组与 Con 组相比, HG + G1 组与 HG 组相比, Bip mRNA 表达变化差异有显著性, $P < 0.001$; **为 HG 组与 Con 组相比, HG + G1 组与 HG 组相比, CHOP mRNA 表达变化差异有显著性, $P < 0.01$ 。

图 3 各组内皮细胞 Bip mRNA、CHOP 的 mRNA 的表达

Note: *** For the HG group compared with the Con group, HG + G1 group compared with the HG group, Bip mRNA there is a significant difference, $P < 0.001$; ** for the HG group compared with the Con group, HG + G1 group compared with the HG group, CHOP mRNA expressions have significant difference, $P < 0.01$.

Fig. 3 Bip mRNA, CHOP mRNA expression of endothelial cells in each group

细胞凋亡主要有三条通路:死亡受体活化通路、线粒体损伤通路和内质网应激启动的凋亡通路,前两者是经典凋亡通路,而内质网应激通路是近年来才发现的一种新的凋亡途径^[9]。内质网是真核细胞中蛋白质折叠加工的主要场所。由于各种原因引起的内质网中出现错误折叠与未折叠蛋白在腔内聚集以及 Ca^{2+} 平衡紊乱的状态称为内质网应激。Bruno 等^[10]的研究表明,持续的高血糖可上调内质网应激相关蛋白 Bip、PERK、IRE1, Bip 是内质网中一种特征性的伴侣蛋白,其诱导表达对内质网应激起着关键作用,被认为是内质网应激信号系统上游的开关分子,是内质网应激的一种标志蛋白^[11]。PERK、IRE1 在正常情况下都以无活性的状态与分子伴侣 Bip 结合,内质网应激时未折叠蛋白的聚集使 Bip 与这两种蛋白分离^[12],本实验结果表明,持续的高糖可上调 EA. hy926 内皮细胞 ERS 的标志蛋白 Bip,上游的感受器蛋白 PERK、IRE1。PERK、IRE1 都能诱导转录因子 CHOP 的表达,在生理状况下,CHOP 的表达量很少,主要存在于细胞质中,而当细胞发生内质网应激时,CHOP 的含量大量增加并聚集在细胞核内^[13]。本实验结果表明, HG 组较 Con 组, ERS 特异的转录因子 CHOP mRNA 表达增加,具有显著差异,过量表达的 CHOP 通过激活 GADD34、ERO1 和死亡受体 DR5 等凋亡反应蛋白促进细胞凋亡,也能调节其他基因的转录,比如 Bcl-2 家族蛋白, Bcl-2 家族在细胞凋亡领域中倍受关注,细胞对凋亡刺激的敏感性很大程度上取决于

Bcl-2 家族促凋亡与抗凋亡蛋白的平衡。CHOP 与 cAMP 反应元件结合蛋白 (CREP) 形成二聚体能抑制 Bcl-2 蛋白的表达,进而促进线粒体对促凋亡因素的敏感性^[14]。本实验 HG 组与 Con 组比较,凋亡蛋白 Bax 表达增加,抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达降低。正常血管内皮细胞中 Bax 蛋白表达较低,当细胞受到损伤后 Bax 蛋白表达增加, Bcl-2 蛋白表达降低,对细胞凋亡的发生和调节发挥重要作用^[15],因此,持续的高糖可促进 EA. hy926 内皮细胞凋亡,从而促进动脉粥样硬化的发生。

雌激素是类固醇激素家族中重要的激素,参与调节许多生理与病理效应,具有重要的心血管保护作用,主要表现在保护内皮、抑制血管平滑肌细胞增殖迁移、减少动脉粥样硬化斑块形成和促进斑块消退等方面^[16]。Haas 等^[4]的研究证实,雌激素可通过对抗高糖诱导的 ERS 调节内皮细胞功能, GPR30 作为新近发现的雌激素受体, Li 等^[5]的研究表明,激动 GPR30 可抵抗高糖导致的内皮细胞凋亡,但此作用是否通过 ERS 相关通路尚未见报道。本实验以高糖诱导 EA. hy926 内皮细胞 ERS 为模型,证实了 GPR30 特异性受体激动剂 G1 可下调高糖诱导的 ERS 相关蛋白 Bip、PERK、IRE1 以及凋亡分子 Bax, CHOP mRNA,也可上调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达。因此, GPR30 特异性受体激动剂 G1 能对抗高糖诱导的 ERS 及细胞凋亡,从而拮抗动脉粥样硬化的发生。

综上所述,持续高糖诱导的内皮细胞凋亡作用,

部分是因为激活了 ERS 相关凋亡信号通路, GPR30 特异性受体激动剂 G1 可抑制 EA. hy926 内皮细胞内质网应激从而发挥抗凋亡作用。

参 考 文 献

- [1] Su Y, Mao N, Li M et al. Sarpogrelate inhibits the expression of ICAM-1 and monocyte-endothelial adhesion induced by high glucose in human endothelial cells[J]. Mol Cell Biochem, 2013, 373(1) :195 - 199.
- [2] Sanson M, Auge N, Vindis C, et al. Oxidized low-density lipoproteins trigger endoplasmic reticulum stress in vascular cells: prevention by oxygen-regulated protein 150 expression[J]. Circ Res, 2009, 104(3) :328 - 336.
- [3] Kawanami D, Matoba K, Okada R, et al. Fasudil inhibits ER stress-induced VCAM-1 expression by modulating unfolded protein response in endothelial cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 435(2) :171 - 175.
- [4] Haas MJ, Raheja P, Jaimungal S. Estrogen-dependent inhibition of dextrose-induced endoplasmic reticulum stress and superoxide generation in endothelial cells[J]. Free Radic Biol Med. 2012, 52(11) :2161 - 2167.
- [5] Li ZL, Liu JC, Liu SB, et al. Improvement of vascular function by acute and chronic treatment with the GPR30 agonist G-1 in experimental diabetes mellitus [J]. Plos One, 2012, 7(6) : e38787.
- [6] 贾方,孙建辉,吴春芳,等. 阿托伐他汀对同型半胱氨酸诱导内皮细胞内质网应激的抑制作用[J]. 江苏大学学报(医学版)2012, 22(6) :483 - 490.
- [7] Gimbrone MA Jr, Garcia-Cardena G. Vascular endothelium, hemodynamics, and the pathobiology of atherosclerosis [J]. Cardiovasc Pathol. 2013, 22(1) :9 - 15.
- [8] Schisano B, Harte AL, Lois K, et al. GLP-1 analogue, Liraglutide protects human umbilical vein endothelial cells against high glucose induced endoplasmic reticulum stress[J]. Regul Pept, 2012, 174(3) :46 - 52.
- [9] Verfaillie T, Garg AD, Agostinis P et al. Targeting ER stress induced apoptosis and inflammation in cancer [J]. Cancer Lett. 2013, 332(2) :249 - 264.
- [10] SU Y C, WU J L, HONG J R. Beta nodavirus up-regulates chaperone GRP78 via ER stress; role of GRP78 in viral replication and host mitochondria-mediated cell death [J]. Apoptosis, 2011, 16(3) :272 - 287.
- [11] Sasaki S, Samejima S, Uruga T, et al. Synthetic studies of the spirocyclic cyclohexene part of versipelostatatin, a novel GRP78/Bip molecular chaperone down regulator[J]. Antibiot (Tokyo). 2013, 66(3) :147 - 154.
- [12] Huber AL, Lebeau J, Guillaumot P, et al. p58(IPK)-mediated attenuation of the proapoptotic PERK-CHOP pathway allows malignant progression upon low glucose[J]. Mol Cell. 2013, 49(6) :1049 - 1059.
- [13] Wu XD, Zhang ZY, Sun S, et al. Hypoxic preconditioning protects microvascular endothelial cells against hypoxia/reoxygenation injury by attenuating endoplasmic reticulum stress [J]. Apoptosis, 2013, 18(1) :85 - 98.
- [14] Dalton LE, Clarke HJ, Knight J, et al. The endoplasmic reticulum stress marker CHOP predicts survival in malignant mesothelioma [J]. Br J Cancer, 2013, 108(6) :1340 - 1347.
- [15] 王彪, 庄福连, 张鹏飞, 等. 细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 在血管瘤和血管畸形中的表达 [J]. 中华整形外科杂志 2003, 19(5) :347 - 349.
- [16] Munir JA, Wu H, Bauer K, et al. The perimenopausal atherosclerosis transition: relationships between calcified and noncalcified coronary, aortic, and carotid atherosclerosis and risk factors and hormone levels [J]. Menopause. 2012, 19(1) :10 - 15.

[收稿日期] 2013-11-03